

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA
TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

ANTAGONISMO DE *Trichoderma asperellum* Y *T. harzianum* Y SU INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS IN VITRO SOBRE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp. Y *Penicillium* spp.

Autor: Bach. Elder Antonio Quispe Aguilar

Asesores:

Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova

Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

M. Sc. Aline Camila Caetano

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023



ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Quispe Aguilar, Elder Antonio
DNI N°: 73583790
Correo electrónico: 7358379071@untrm.edu.pe
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agrónoma

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Antagonismo de Trichoderma asperellum y T. harzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp, Aspergillus spp. y Penicillium spp

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Mansilla Cordova, Pedro Javier
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41956401
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): https://orcid.org/0000-0002-9560-7678

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Oliva Cruz, Segundo Manuel
DNI, Pasaporte, C.E N°: 05374749
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): https://orcid.org/0000-0002-9670-0970

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html

1.06.05 - Micología

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 04 / mayo / 2023

Firma del autor 1

Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

Todo este esfuerzo está dedicado a mis padres y toda mi familia, por ser las personas que contribuyeron de diversas formas en mi formación profesional.

A Dios, a mis amigos y cada una de las personas que formaron parte de mi desarrollo personal y profesional.

Elder Antonio Quispe Aguilar

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mi hija y esposa, a mis queridos padres y toda mi familia por ser quienes me motivaron y apoyaron en lograr mis objetivos profesionales.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A), a la Facultad de Ingeniería y Ciencia Agrarias, a la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma y a todos los docentes por compartir sus conocimientos durante mi formación académica y profesional.

A mis asesores, el Dr. Pedro Mansilla, el Dr. Segundo Oliva y la M. Sc. Aline Caetano, por dedicar su tiempo y voluntad en la realización de mi trabajo de investigación además por el conocimiento compartido, enseñanza y la disciplina transmitida la cual hizo posible el desarrollo de este trabajo.

A Jhon Dávila, la Ing. Lucy Alvarado, la Ing. Ruddy Vilcarrromero y el Dr. Segundo Oliva por proveer los aislados utilizados en la presente investigación y, en especial, a la Ing. Fiorela Gaslac, asistente de investigación de la Clínica Fitopatológica, quien colaboró en la ejecución del trabajo y la implementación de la técnica fotográfica.

A la M. Sc. Aline Caetano quien hizo posible los análisis estadísticos y el análisis del TLC. En este sentido, se hace extensivo el agradecimiento a la Dra. Natalie Verónica Rondinel Mendoza, de la UNSAAC, por el asesoramiento en el abordaje estadístico, a la Dra. María Antonia Calori-Domingues, de la ESALQ-USP y a la M. Sc. Ligia Manoel Martins, del ITAL y UNICAMP, quienes orientaron en el análisis del TLC ejecutado por la M. Sc. Aline Caetano, así como al Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana, de la UNTRM-A, por apoyar en la adquisición de algunos reactivos para el TLC.

Al Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [contrato N° 031-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV], con el cual se ejecutó el subproyecto "Implementación de técnicas de diagnóstico de enfermedades en Pitahaya (*Hylocereus* spp.), Tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze) y Azucena (*Lilium* spp.) como parte de la creación de la Clínica Fitopatológica en la región Amazonas”. Este proyecto finalizado permitió la existencia de la actual Clínica Fitopatológica del Laboratorio de Fitopatología y Entomología, perteneciente al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva

(INDES-CES) de la UNTRM-A, donde se encuentra la infraestructura y materiales que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación. En la Clínica Fitopatológica no solo ejecuté la mayor parte de mi investigación, si no que se convirtió en mi segunda casa, donde conocí a personas maravillosas de las que aprendí y sigo aprendiendo, y con los que compartí momentos gratos que guardaré siempre en mi corazón.

Al proyecto de investigación “Perfil de Compuestos Orgánicos Volátiles del Grano Verde y de la Bebida de Café determinado por GS-MS” – VOCCOFFEE, ganador del concurso de proyecto de investigación, innovación y desarrollo tecnológico - PROINTEC 2021 organizado por la Universidad Nacional de Jaén (Resolución N° 364-2021-CO-UNJ y Acuerdo Ejecución N° 01-2022-UNJ/PCO), que indirectamente favoreció a la presente investigación al poner a disposición equipos adquiridos como agitador, microscopio y cabina UV, que junto con la infraestructura y materiales del área de Cromatografía del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del INDES-CES complementaron e hicieron posible la ejecución de mi trabajo de investigación.

Elder Antonio Quispe Aguilar

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph. D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

RECTOR

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

Dr. ERICK ALDO AUQUÍÑIVIN SILVA

DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Antagonismo de Trichoderma asperellum y T. harzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp, Aspergillus spp y Penicillium spp. del egresado Elder Antonio Quispe Aguilar de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 03 de abril de 2023



Mansilla

Firma y nombre completo del Asesor

Pedro Javier Mansilla Córdova
DNI 41956401



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Antagonismo de Trichoderma asperellum y T. harzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp., Aspergillus spp. y Penicillium spp. del egresado Elder Antonio Quispe Aguilar de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 03 de abril de 2023

Firma y nombre completo del Asesor

Segundo Manuel Oliva Cruz
DNI: 03374749



ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Antagonismo de Trichoderma asperellum y T.narzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp, Aspergillus spp. y Penicillium spp. ; del egresado Elder Antonio Quispe Aguilar de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 03 de abril de 2023



Aline Camila Caetano

Firma y nombre completo del Asesor

Aline Camila Caetano

CE: 001630382

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dra. LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

PRESIDENTE



Dr. JORGE ALBERTO CONDORI APFATA

SECRETARIO



M.Cs. CESAR GUEVARA HOYOS

VOCAL



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Antagonismo de Trichoderma asperellum y T. harzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp, Aspergillus spp y Penicillium spp, presentada por el estudiante ()/egresado (x) Elder Antonio Quispe Aguilar de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma con correo electrónico institucional 7358379071@untrm.edu.pe después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 11 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (✓) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 04 de mayo del 2023

Signature of Secretary and label SECRETARIO

Signature of President and label PRESIDENTE

Signature of Member and label VOCAL

OBSERVACIONES:

Two dotted lines for observations



ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 10 de Mayo del año 2023 siendo las 16 horas, el aspirante: Elder Antonio Quispe Aguilar, asesorado por Pedro Mansilla, Segundo Oliva y Aline Coetana defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Antagonismo de Trichoderma asperellum y To horzianum y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de Colletotrichum spp., Aspergillus spp. y Penicillium spp., para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ph. D. Ligia Nagali García Rosero

Secretario: Dr. Jorge Alberto Condori Apfata.

Vocal: M. Cs. Cesar Buevara Hoyos

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:08 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

Catrina A.

SECRETARIO

Ligia

PRESIDENTE

Cesar

VOCAL

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

RESUMEN	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
I. INTRODUCCIÓN	25
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
2.1. Lugar de estudio.....	28
2.2. Obtención del material biológico.....	28
2.3. Caracterización del material biológico	29
2.4. Enfrentamiento biológico entre <i>Trichoderma</i> y los agentes patógenos.....	30
2.5. Evaluación de la interacción	31
2.5.1. <i>Interacción física</i>	31
2.5.2. <i>Inhibición del crecimiento</i>	31
2.5.3. <i>Inhibición de la esporulación</i>	32
2.5.4. <i>Inhibición de la germinación de las esporas</i>	33
2.6. Determinación de la capacidad de producción de micotoxinas.....	33
2.7. Análisis de datos	34
III. RESULTADOS	35
3.1. Caracterización del material biológico	35
3.1.1. <i>Trichoderma</i>	35
3.1.2. <i>Colletotrichum</i>	37
3.2. Interacción entre <i>Penicillium</i> y <i>Trichoderma</i>	40
3.2.1. <i>Interacción física</i>	40
3.2.2. <i>Inhibición del crecimiento micelial</i>	42
3.2.3. <i>Inhibición de la producción de esporas</i>	48
3.2.4. <i>Inhibición de la germinación de esporas</i>	53
3.3. Interacción entre <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i>	56
3.3.1. <i>Interacción física</i>	56
3.3.2. <i>Inhibición de crecimiento micelial</i>	58
3.3.3. <i>Inhibición de la producción de esporas</i>	66
3.3.4. <i>Inhibición de la germinación de esporas</i>	69
3.4. Interacción entre <i>Colletotrichum</i> y <i>Trichoderma</i>	72
3.4.1. <i>Interacción física</i>	72

3.4.2.	<i>Inhibición de crecimiento micelial</i>	75
3.4.3.	<i>Inhibición de la producción de esporas</i>	80
3.4.4.	<i>Inhibición de la germinación de esporas</i>	81
3.5.	Efecto de la interacción en la producción de micotoxinas.....	82
IV.	DISCUSIÓN	84
V.	CONCLUSIONES	89
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Interacción física de Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT), en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y T. asperellum (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore y Dickinson (1976)...</i>	42
Tabla 2. <i>Interacción física de Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y T. asperellum (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore & Dickinson (1976).</i>	58
Tabla 3. <i>Interacción física de Colletotrichum sp. (CR) y C. asianum (CM) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y T. asperellum (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore y Dickinson (1976).....</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la forma de siembra para enfrentamiento biológico, donde los círculos representan la placa de Petri de 90 mm y, los puntos, los lugares de siembra de (A) <i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> o <i>Colletotrichum spp.</i> y (B) <i>Trichoderma spp.</i>	30
Figura 2. <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) en medio PDA, a los 3.25 dds, y en medio CYA, MEA y G25N, a los 7 dds, mostrando el lado anverso (a) y reverso (r), a 25°C.....	35
Figura 3. Micrografías de (a) conidióforo, (b) clamidosporas e hifas, (c) conidios de <i>Trichoderma asperellum</i> , (d) conidios y conidióforo, (e) hifas y (c) conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> , a los 4 dds en medio PDA, barra = 150 μ m	37
Figura 4. <i>Colletotrichum sp.</i> (CR) y <i>C. asianum</i> (CM), en medio PDA, a los 12 dds, y en CYA, MEA y G25N, a los 7 dds, mostrando el lado anverso (a) y reverso (r), a 25 °C.	38
Figura 5. Micrografías (a) hifas y (b) conidios de <i>Colletotrichum sp.</i> , (c) hifas teñidas con azul de lactofenol y (d) conidios de <i>Colletotrichum asianum</i> , a los 7 dds en medio PDA, barra =150 μ m.....	39
Figura 6. <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) a los 3.25 dds a 25 °C	40
Figura 7. Borde de las colonias de <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio	41
Figura 8. <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> a los 3.25 dds a 25 °C	43
Figura 9. <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> a los 3.25 dds.....	44
Figura 10. Inhibición de crecimiento micelial de (A) <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y (B) <i>viceversa</i> , en medio PDA a 25 °C.....	45
Figura 11. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), <i>toxigénico 2</i> (PT2) y <i>no toxigénico</i> (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) <i>viceversa</i> , a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos	46

Figura 12. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación.....	47
Figura 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial entre (A) <i>Penicillium</i> spp. (PT1, PT2 Y PNT) vs. <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y (B) viceversa.....	48
Figura 14. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos	49
Figura 15. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación.....	50
Figura 16. Inhibición de esporulación de <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	51
Figura 17. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C	51
Figura 18. Inhibición de esporulación de <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	52
Figura 19. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C.....	52
Figura 20. Inhibición de la germinación de esporas de <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	53
Figura 21. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de (A) <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C	54

Figura 22. Inhibición de la germinación de esporas de <i>Penicillium toxigénico 1 (PT1)</i> , <i>toxigénico 2 (PT2)</i> y <i>no toxigénico (PNT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum (TA)</i> y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	54
Figura 23. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) <i>Penicillium spp. (PT1, PT2 y PNT)</i> en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> y (B) viceversa.	55
Figura 24. <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum (TH)</i> a los 3.25 dds a 25 °C	56
Figura 25. Borde de las colonias de <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum (TH)</i> a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio.....	57
Figura 26. <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum (TA)</i> a los 3.25 dds a 25 °C	59
Figura 27. Borde de las colonias de <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum (TA)</i> a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio.....	60
Figura 28. Inhibición de crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum (TH)</i> y (B) viceversa, en medio PDA a 25 ° C	60
Figura 29. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos	61
Figura 30. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación.....	62
Figura 31. Inhibición de crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum (TA)</i> y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	63
Figura 32. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus toxigénico 1 (AT1)</i> , <i>toxigénico 2 (AT2)</i> y <i>no toxigénico (ANT)</i> en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos	64

Figura 33. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación.....	65
Figura 34. Inhibición de esporulación de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	66
Figura 35. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C	67
Figura 36. Inhibición de esporulación de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	67
Figura 37. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y (B) viceversa, a 25 °C.....	68
Figura 38. Inhibición de germinación de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	69
Figura 39. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) <i>Aspergillus</i> spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con <i>T. harzianum</i> y (B) viceversa..	70
Figura 40. Inhibición de germinación de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	70
Figura 41. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) <i>Aspergillus</i> spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> y (B) viceversa.	71
Figura 42. <i>Colletotrichum asianum</i> aislado de mango (CM), en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y a los 12.25 dds a 25 °C	72
Figura 43. Borde de las colonias de <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM), en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) a los 12.25 dds a 25 °C y aumento de 10X	73
Figura 44. <i>Colletotrichum</i> sp. aislado de rocoto (CR), en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) y a los 5.25 dds a 25 °C	74

Figura 45. Borde de las colonias de <i>Colletotrichum</i> sp. aislado de rocoto (CR), en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) 5.25 dds a 25 °C y aumento de 10X.....	74
Figura 46. Inhibición de crecimiento micelial de (A) <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	75
Figura 47. Inhibición de crecimiento micelial de (A) <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	76
Figura 48. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) y (B) <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR), ambos en cultivo dual con <i>T. harzianum</i> (TH), a 25 °C.....	76
Figura 49. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR) y <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) y en cultivo dual con <i>T. harzianum</i> y (B) viceversa, a 25 °C.....	77
Figura 50. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> en cultivo dual con (A) <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) y (B) <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR), en medio PDA a 25 °C.....	78
Figura 51. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) <i>Colletotrichum</i> de mango (CM) en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> (TA) y (B) <i>Colletotrichum</i> de rocoto en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> (TA), a 25 °C.....	78
Figura 52. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR) y <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) y en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> (TA), a 25 °C.....	79
Figura 53. Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) en cultivo dual con (A) <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM) y (B) <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR), en medio PDA a 25 °C.....	79
Figura 54. Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Trichoderma asperellum</i> frente a dos aislados de <i>Colletotrichum</i> teniendo en cuenta el factor día.....	80
Figura 55. Inhibición de esporulación de <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C.....	80

Figura 56. Inhibición de esporulación de <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) en cultivo dual con <i>Colletotrichum asianum</i> de mango (CM), en medio PDA a 25 °C.....	81
Figura 57. Inhibición de germinación de <i>Colletotrichum</i> sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH), en medio PDA a 25°C..	82
Figura 58. Inhibición de la germinación de <i>Trichoderma asperellum</i> (TA) y <i>T. harzianum</i> (TH) en cultivo dual con <i>Colletotrichum asianum</i> (CM) en medio PDA a 25 °C.....	82
Figura 59. Perfil de metabolitos en placas de Cromatografía de Capa Delgada (TLC), de <i>Penicillium</i> toxigénico 1 (PT1), <i>Penicillium</i> toxigénico 2 (PT2), <i>Penicillium</i> no toxigénico (PNT) con y sin exposición a <i>Trichoderma harzianum</i> y a <i>T. asperellum</i> usando el estándar de OTA en diferentes concentraciones para comparación	83
Figura 60. Perfil de metabolitos en placas de Cromatografía de Capa Delgada (TLC), de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (AT1), <i>Aspergillus</i> toxigénico 2 (AT2), <i>Aspergillus</i> no toxigénico (ANT) con y sin exposición a <i>Trichoderma harzianum</i> y a <i>T. asperellum</i> usando el estándar de OTA en diferentes concentraciones para comparación	83
Figura 61 Procedimiento para la preparación de suspensión de esporas. a) materiales, b) filtrado de zumo de naranja, c) obtención de disco de 5 mm conteniendo esporas, d) preparación de suspensión en solución de Tween 20 al 0.05% con el zumo, e) montaje en cámara de Neubauer y f) estimación del número de esporas bajo el microscopio a 400X	96
Figura 62 Representaciones de las estructuras microscópicas de <i>T. harzianum</i> , a) conidióforo, b) hifas septadas, c) conidios	96
Figura 63. Procedimiento para la estimación del número de esporas germinadas a) Preparación de solución de azul de toluidina y transferencia placas de Petri con solución de esporas y previamente esparcidas en la superficie e incubadas, b) distribución del colorante mediante movimientos circulares, c) Reposo, d) obtención de porción de medio de cultivo con dimensiones ligeramente menores a la lámina portaobjeto, e) montaje del medio de cultivo conteniendo las esporas, f) visualización sin uso de lámina cubreobjeto, g) campo visual mostrando esporas y sus tubos germinativos.....	97
Figura 64. Representaciones de las estructuras microscopicas de <i>T. asperellum</i> a) conióforo b) clamidosporas y c) conidios.....	97
Figura 65 Estructuras de reproducción de <i>Aspergillus</i> toxigénico 1 (a, b), <i>Aspergillus</i> toxigénico 2 (c, d), <i>Aspergillus</i> no toxigénico (e, f), siendo las imágenes de los conidióforos (a, c, e) y de las esporas (b, d, f), barra = 150 μm.....	98

Figura 66. Estructuras de reproducción de <i>Penicillium toxigénico 1</i> (a, b), <i>Penicillium toxigénico 2</i> (c, d), <i>Penicillium no toxigénico</i> (e, f), siendo las imágenes de los conidióforos (a, c, e) y de las esporas (b, d, f), barra = 150 μm	98
Figura 67. <i>Penicillium toxigénico 1</i> (PT1), en cultivo dual con <i>T. harzianum</i> en medio YESA a los 40 dds	99
Figura 68. <i>Aspergillus no toxigénico</i> (ANT), en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> en medio YESA a los 6 dds (A) y <i>Colletotrichum de rocoto</i> , en cultivo dual con <i>T. asperellum</i> en medio PDA a los 5 dds a 25 °C (B)	99
Figura 69. Interacción de <i>Penicillium spp.</i> (PT1, PT2 y PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH).....	100
Figura 70. Interacción de <i>Penicillium spp.</i> (PT1, PT2 y PNT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA)	101
Figura 71. Seguimiento de crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma harzianum</i> (TH).....	102
Figura 72. Seguimiento de crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> (TA).....	103
Figura 73. Seguimiento de crecimiento de <i>Colletotrichum asianum</i> (CM) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>T. harzianum</i>	104
Figura 74. Seguimiento de crecimiento de <i>Colletotrichum sp</i> (CR) en cultivo dual con <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>T. harzianum</i>	105

RESUMEN

El control biológico a través del uso de microorganismos con potencial antagonico es de interés general, teniendo cierta inclinación por el género *Trichoderma*, el cual ha demostrado tener capacidad para el control de muchos patógenos. Sin embargo, el género comprende a especies que están muy estrechamente relacionadas unas de otras, lo que motivó a realizar esta investigación para evaluar el antagonismo de *Trichoderma asperellum* y *T. harzianum* y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de *Colletotrichum*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Los microorganismos fueron sembrados en cultivo dual en medio PDA e incubados a 25 °C. La evaluación de la interacción fue empleando una escala de Skidmore y Dickinson. Para la caracterización biológica se empleó el método de siembra de Pitt y Hocking, y, finalmente, la detección de la capacidad toxigénica se usó la técnica de cromatografía en capa fina. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey. Los resultados mostraron a *T. harzianum* como uno de los aislados con la mayor capacidad de colonización y la influencia en la producción de micotoxinas dependió de la especie de *Trichoderma* y la cepa toxigénica.

Palabras claves: Antagonismo; Antibiosis, Cultivo dual; Fitopatógeno; Micotoxina; TLC.

ABSTRACT

Biological control using microorganisms with antagonistic potential is of general interest, having a certain inclination for the genus *Trichoderma*, which has shown its ability to control many pathogens. However, the genus includes species that are very closely related to each other, which motivated us to carry out this research to evaluate the antagonism of *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum* and its influence on the production of mycotoxins in vitro on *Colletotrichum* isolates, *Aspergillus* and *Penicillium*. The microorganisms were sown in dual culture in PDA medium and incubated at 25 °C. The evaluation of the interaction was using a Skidmore and Dickinson scale. For the biological characterization the Pitt and Hocking sowing method was used, and, finally, the detection of the toxigenic capacity was used the thin layer chromatography technique. The data were subjected to an analysis of variance and a comparison of means by Tukey's test. The results showed *T. harzianum* as one of the isolates with the highest colonization capacity and the influence on mycotoxin production depended on the *Trichoderma* species and the toxigenic strain.

Keywords: Antagonism; Antibiosis, Dual culture; Phytopathogen; Mycotoxin; TLC.

I. INTRODUCCIÓN

La calidad y el rendimiento de muchos cultivos en cosecha y postcosecha se ven influenciada por diversos factores entre los cuales destacan las enfermedades. Los métodos de control a emplear varían de acuerdo con la naturaleza de los patosistemas y puede ser cultural, químico, físico entre otros, siendo el químico el más utilizado por su eficiencia (Nazarov et al., 2020). Sin embargo, este tipo de control presenta problemas como la resistencia de los patógenos y alteración de los ecosistemas. El control biológico es una estrategia de control menos impactante y es amigable con el medio ambiente. Dentro de este tipo de control se destaca el uso de hongos del género *Trichoderma*, conocido desde antes de 1920 por su capacidad como controlador biológico sobre diversos patógenos (Harman, 2006). Este género también es utilizado en control de plagas, promoción del crecimiento de plantas y biorremediación. Los mecanismos por los que actúa son la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia, entre otros (Harman et al., 2012; Verma et al., 2007).

La capacidad antagonica puede variar de acuerdo con el tipo de patógeno y la especie de *Trichoderma*. Por ejemplo, el porcentaje de inhibición de síntomas en el caso de *Trichoderma asperellum* frente al causante la pudrición del tallo del maíz, *Fusarium* sp. es de 71%, dependiendo del aislado de *Trichoderma* (Li et al., 2016). Celis-Perera et al. (2021) encontraron 100% de inhibición in vitro del crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y de 100% de inhibición de esporulación y germinación de conidios de *Colletotrichum cassiicola*, *Alternaria alternata* y *F. equiseti* cuando expuestos a *Trichoderma asperellum*.

La eficiencia y tipo de patógenos más susceptibles a la inhibición depende de la especie del agente de control biológico Legesse y Alemu. (2021) estudiaron el nivel in vitro de inhibición micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre *Fusarium xylarioides* patógeno causante del marchitamiento en el café. *T. viride* fue el más eficiente con 63.6% de inhibición. Amin et al. (2010) también encontró que *T. viride* fue el más eficiente en el control in vitro de *F. xylarioides*, con inhibición micelial de 41.88%, además de 30.58% de inhibición micelial y 65.65% en producción de esclerocios para *Rhizoctonia solani*. Los metabolitos de *T. viride* redujeron también de forma considerable la producción de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. El máximo porcentaje de inhibición del crecimiento vegetativo de *Colletotrichum capsici* y

Alternaria brassicicola se registró con *T. viride*, mientras que *T. harzianum* presentó el máximo inhibición de 37.16% del crecimiento de micelio de *Helminthosporium oryzae*.

Trichoderma harzianum y *Trichoderma asperellum* han demostrado acción sobre *Colletotrichum truncatum*, un patógeno que causa antracnosis en *Capsicum annum*, llevando a la reducción de las lesiones. Además, se ha encontrado que inducen resistencia sistemática en la planta, la producción de enzimas de defensa y de compuestos como los fenoles (Yadav et al., 2021). *T. harzianum* también tiene efecto antagonista in vitro sobre *Fusarium oxysporum*, *F. ipomoeae*, *F. solani*, *Penicillium citrinum*, *P. rotoruae*, *Aspergillus goingii*, *Mucor variicolumellatus* y *F. oxysporum*, causantes de enfermedades en postcosecha a nivel de raíz en camote (Paul et al., 2021). Algunas cepas de *T. harzianum* presentan inhibición de hasta 80% de la podredumbre de los cítricos ocasionada por *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Ferreira et al., 2020).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, o sea, que no son esenciales para la sobrevivencia de los hongos toxigénicos. Los géneros de hongos filamentosos que pueden producir micotoxinas de importancia o preocupación en la agricultura son, principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* (Cheung et al., 2004). La investigación cuyo objetivo fue desarrollar un ensayo de PCR multiplex para encontrar y cuantificar diversidad de especies de hongos productores de toxinas. La evaluación in silico determinó amplificación en más de 40 especies de *Aspergillus*, 23 especies de *Fusarium* y 32 especies de *Penicillium*, así como otras 64 géneros de hongos (Suanthie et al., 2009). *Trichoderma* además presenta antagonismo sobre *Aspergillus flavus* y se han encontrado aislados de *Trichoderma* que reducen de forma significativa la producción de aflatoxinas B₁ (Ren et al., 2022).

En el país, no siempre es posible conseguir las cepas de las instituciones gubernamentales encargadas por la investigación y comercialización de estos. Además, a pesar de haber avances en el conocimiento y uso de controladores biológicos, todavía falta mucho por hacer. Recientemente, como parte de investigaciones de tesis patrocinadas por proyectos de investigación, se ha conseguido una colección de aislados de *Aspergillus* y *Penicillium* de frutos y granos de café de Jaén y Rodríguez de Mendoza y se ha detectado la capacidad de algunos de ellos para producir toxinas (Davila-Garcia, 2023; Gaslac-Culqui, 2022), una característica que se suma a la variabilidad característica de los aislados y que pone

en evidencia un tema poco estudiado en la mayoría de los países de Sudamérica. También se han conseguido aislados de *Colletotrichum* de frutos de rocoto y mango. En este último caso, se encontró que la especie es *C. asianum* y corresponde al primer reporte de confirmación de la presencia de esta especie en el país (Vilcarronero-Ramos et al., 2022). El estudio de estos aislados de manera general y la búsqueda de formas de control, en vista de su naturaleza patogénica, se reviste de importancia. Teniendo en cuenta todo esto, se buscó evaluar el anatagonismo de *Trichoderma asperellum* y *T. harzianum* y su influencia en la producción de micotoxinas in vitro sobre aislados de *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Con la determinación del porcentaje de la inhibición del crecimiento, esporulación y germinación de los patógenos por *T. asperellum* y *T. harzianum* y viceversa, y el efecto de *T. asperellum* y *T. harzianum* en la producción de toxinas por cepas toxigénicas de *Aspergillus* y *Penicillium*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio

El lugar de realización de la investigación fue esencialmente en el área de diagnóstico de enfermedades de plantas, más conocido como Clínica Fitopatológica, ubicado en el Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV) o de Entomología y Fitopatología. El análisis de la detección e identificación de las toxinas fue realizado en el área de cromatografía del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG). Ambos hacen parte del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A).

2.2. Obtención del material biológico

Las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* fueron obtenidas del INDES-CES. Estas fueron mantenidas a una temperatura de aproximadamente 5 °C en forma de propágulos adheridos a papel filtro dentro de frascos de vidrio que contenían sílica gel. Para la reactivación se sembraron los fragmentos de papel de filtro en medio papa dextrosa agar (PDA) con antibióticos. Las placas de Petri fueron puestas a incubar a 25 °C en oscuridad y posteriormente los hongos fueron repicados a otras placas de Petri y mantenidas a lo largo del experimento.

Los hongos patógenos fueron obtenidos de la colección de aislados de la Clínica Fitopatológica. Estos se describen a continuación con sus respectivos acrónimos, escogidos arbitrariamente para facilitar su identificación: *Colletotrichum* sp. recolectado en Molinopampa-Amazonas a partir de frutos de rocoto (CR), *C. asianum* aislado en Balsas a partir de frutos de mango (CM), *Aspergillus* sp. sección *Nigri* toxigénico de Lonya Grande (AT1), *Aspergillus* sp. sección *Circumdati* toxigénico de Rodríguez de Mendoza (AT2), *Aspergillus* sp. no toxigénico de Rodríguez de Mendoza (ANT), *Penicillium* sp. toxigénico (PT1), *Penicillium* sp. toxigénico (PT2), *Penicillium* sp. no toxigénico de Rodríguez de Mendoza (PNT). Todos los aislados de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron obtenidos a partir de granos de café (*Coffea arabica*) almacenados de la variedad Catimor. La identificación y caracterización biológica de todos ellos fue realizada en anteriores investigaciones y su identificación molecular está en proceso,

como parte de investigaciones independientes, con excepción de *C. asianum* que ya fue reportado (Vilcarrero-Ramos et al., 2022). Todos estos aislados fueron conservados a 5 °C en sílica gel (SiO₂) contenida en tubos o en agar semilíquido cuya preparación se indica a continuación.

2.3. Caracterización del material biológico

Se utilizó el procedimiento y claves dicotómicas de Pitt y Hocking (2009) como se describe a continuación. Con una aguja de inoculación previamente flameada y en condiciones asépticas se extrajo una pequeña porción de micelio del borde de las colonias y se la depositó en un microtubo de centrifuga de polipropileno de 1.5 ml conteniendo agar semilíquido (0.2%) y Tween® 20 (polisorbato 20 o monolaurato de polioxietilensorbitano). Los tubos se agitaron vigorosamente por aproximadamente 12 s y luego se hizo un microspin por 3 s, tiempo suficiente para recuperar el contenido en el fondo del tubo. Con un asa bacteriológica se sembró ese inóculo en placas de Petri conteniendo medio Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar 25% Glicerol Nitrato (G25N). La siembra se realizó por triplicado en cada placa de Petri que fue de 90 mm × 15 mm en todos los casos. Estas fueron puestas a incubar a 25 °C. Una placa con medio CYA fue utilizada para sembrar hasta dos microorganismos en dos localizaciones cada uno e incubada a 37 °C. Finalmente, en una placa con medio CYA se realizó el mismo procedimiento anterior, con la diferencia que se utilizó la misma aguja de inoculación contaminada con el hongo al inicio, y la placa fue incubada a 5 °C. Las placas se rotularon y sellaron con cinta de policloruro de vinilo (PVC) flexible y fueron incubadas en oscuridad. Los cultivos fueron observados diariamente y medidos desde el tercer al séptimo día o hasta que las colonias presentaron contacto entre sus bordes. En ese momento, se registraron imágenes de las colonias con un Smartphone a resolución de 48 mp.

La identificación por las claves dicotómicas de Pitt y Hocking (2009) sirvió más que todo para caracterizar los aislados y generar informaciones que complementen posteriores abordajes de identificación, debido a la complejidad taxonómica de todos los géneros de hongos empleados. En ese sentido, se aprovechó el procedimiento para registrar imágenes y realizar observaciones microscópicas. Para este último caso, los aislados producidos en medio PDA fueron utilizados para preparar montajes microscópicos y observar las estructuras periódicamente. También fueron realizados montajes microscópicos

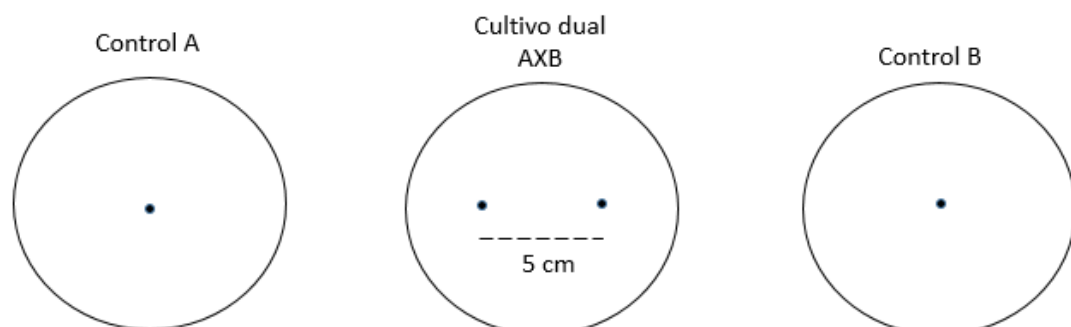
partiendo de la técnica del microcultivo, que consistió en sembrar el microorganismo en un cubo de agar de aproximadamente 0.25 cm³ situado entre una lámina portaobjeto y una lámina cubreobjeto dentro de una cámara húmeda durante más de 3 días hasta ser posible visualizar las estructuras de reproducción directamente en el vidrio de las láminas. Se registraron las imágenes con uso de líquido de montaje transparente (alcohol 70% y ácido láctico) y también realizando montajes con colorantes como fucsina ácida y azul de metileno o azul de algodón. Las estructuras de reproducción, esporas e hifas fueron medidas con un micrómetro y haciendo uso del programa Fiji (Schindelin et al., 2012). Todo esto se realizó para generar mayores informaciones y explicaciones sobre el comportamiento de los materiales biológicos estudiados.

2.4. Enfrentamiento biológico entre *Trichoderma* y los agentes patógenos

Los ensayos de evaluación de la actividad antagónica se realizaron con la técnica del cultivo dual. Para ello, se empleó una metodología similar a la siembra para la caracterización. Con un asa bacteriológica se sembró una de las especies de *Trichoderma* y uno de los patógenos con 5 cm de distanciamiento entre ellos y 2 cm de separación de cada colonia con relación al borde de la placa de Petri conteniendo PDA. Paralelamente, cada uno de los microorganismos se sembró en placas de Petri de forma independiente conteniendo el mismo medio. Estos últimos cultivos sirvieron como referencia (control) para determinar el porcentaje de inhibición (Figura 1). Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 5 días o hasta que se obtuvieron los datos necesarios (Rondoy & Severino, 2019).

Figura 1

Representación de la forma de siembra para enfrentamiento biológico, donde los círculos representan la placa de Petri de 90 mm y, los puntos, los lugares de siembra de (A) *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* o *Colletotrichum spp.* y (B) *Trichoderma spp.*



Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 5 días o hasta que se obtuvieron los datos necesarios (Rondoy & Severino, 2019).

Contando con 8 cepas de patógenos y 2 cepas de controladores biológicos, se realizaron 16 cultivos duales más 10 cultivos individuales. Todas las siembras se realizaron por triplicado, es decir, cada una de las 26 placas contó con 3 repeticiones, de forma que se trabajó con un total de 78 placas de Petri (De la Cruz-Quiroz et al., 2018). Sin embargo, debido a la complejidad de los procedimientos y para evitar contaminaciones cruzadas, se realizaron los experimentos con cada uno de los géneros de patógenos en tiempos distintos. En caso necesario, cuando los resultados no estaban completos, el experimento fue rehecho.

2.5. Evaluación de la interacción

2.5.1. Interacción física

La interacción de las colonias en cultivo dual se determinó empleando la escala planteada por Skidmore y Dickinson (1976), donde: (A) Crecimiento de ambos microorganismos entremezclados donde los dos crecen uno dentro de otro sin ningún tipo de interacción macroscópica; (Bi) Crecimiento entrecruzado donde el hongo en observación crece ya sea por debajo o sobre la colonia del otro o ambos casos; (Bii) Crecimiento entremezclado donde el hongo en observación ha dejado de crecer y está siendo colonizado o cubierto por el otro; (C) Crecimiento mutuo de los hongos hasta un punto donde presentan ligera inhibición de 1 a 2 mm aproximadamente entre ambas colonias; (D) Halo de inhibición entre colonias mayores a 2 mm. Esto se realizó después de la última medición de crecimiento de los microorganismos aproximadamente a los 3.25 días después de la siembra (dds). En el caso de *Colletotrichum* obtenido de rocoto y mango fue realizado a los 5 y 12 dds, respectivamente. Se realizaron observaciones microscópicas y se registraron imágenes de la interacción.

2.5.2. Inhibición del crecimiento

El crecimiento de las colonias fue medido con un paquímetro desde el primer día después de la siembra, hasta el contacto entre colonias. Se registró el diámetro en dos posiciones perpendiculares. Los datos que se emplearon para medir y evaluar el proceso de inhibición micelial han sido extraídos de la siguiente manera para el patógeno se tomó el

diámetro en dirección al patógeno dividido entre dos y para el biocontrolador se utilizó el radio en dirección al patógeno. Para el caso de los microorganismos en control se tomó en cuenta los diámetros en forma de cruz dividido entre 4. Sin embargo, en el caso de los cultivos duales, se consideró el radio y el diámetro en dirección al microorganismo opositor, en el caso del antagonista y el patógeno, respectivamente debido a que conforme pasaron los días, microorganismos como el *Trichoderma* habían alcanzado el límite de la placa en las otras direcciones, y porque el foco principal fue determinar la posible inhibición en la interacción. La inhibición del crecimiento (IC) se determinó en porcentaje diariamente hasta los 3 dds mediante la ecuación i (Rodríguez & Flores, 2018).

$$IC = \frac{\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del testigo}} \times 100 \quad (i)$$

2.5.3. Inhibición de la esporulación

El procedimiento se llevó a cabo luego de haber finalizado las pruebas de enfrentamiento. En el caso de los ensayos con los aislados de *Colletotrichum* CR y CM enfrentado con las cepas de *Trichoderma*, estas evaluaciones se realizaron a los 5 días y 12 días, respectivamente. Para ello, se agregó 10 ml de agua destilada (esterilizada) conteniendo Tween® 20 al 0.05% y zumo de naranja al 1% en un tubo de ensayo para incentivar a la germinación (Pelser & Eckert, 1977). Con un sacabocado se obtuvieron discos de agar de 5 mm de diámetro del centro de la colonia en el caso de las cepas de *Penicillium* (PT1, PT2 y PNT), *Aspergillus* (AT1), y 1 disco de *Trichoderma asperellum*, 2 discos en el caso de las cepas de *Aspergillus* (AT2 y ANT) y 3 de *Colletotrichum* (CR), en estos dos últimos casos los discos fueron retirados alrededor del punto de siembra, 10 discos en el caso de *Trichoderma harzianum*, siendo 9 discos a una distancia intermedia entre el centro y el borde de la colonia específicamente sobre la formación del primer anillo concéntrico y 1 del punto central de siembra. En el caso de los enfrentamientos con las cepas de *Colletotrichum* (CM) el método fue distinto. Veinte mililitros de la solución de Tween® 20 fue vertida sobre las colonias producidas en las placas de Petri, se realizó un raspado con una espátula de Drigalsky metálica previamente flameada y todo el líquido recuperado fue filtrado pasándolo a través de 4 pliegues de gaza y recuperado en un vaso de precipitado. La solución se diluyó 10 veces debido a la alta concentración de esporas de *Trichoderma* y los tubos fueron agitados a 2500 rpm/30 s. En todos los casos, una

alícuota de aproximadamente 20 µl de la suspensión de esporas se utilizó para estimar la concentración mediante una cámara de Neubauer (French & Hebert, 1980). La lectura fue realizada con 2 repeticiones, es decir, en los dos campos visuales, aprovechando el tamaño de las esporas el conteo se hizo empleando la totalidad de cada recuadro mayor utilizando un contador de células mecánico de 9 dígitos. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación ii:

$$IE = \frac{[(\text{número de esporas del testigo} - \text{número de esporas del tratamiento})]}{\text{número de esporas del testigo}} \times 100 \quad (\text{ii})$$

2.5.4. Inhibición de la germinación de las esporas

Para evaluar la inhibición de la germinación de esporas se usaron los mismos tubos conteniendo esporas en suspensión (ver subtítulo 2.5.3.). Se agitaron a 2500 rpm/20 s empleando el vórtex. Se dispuso de placas Petri con medio agar agua donde se añadió 100 µl de la solución con las esporas, se esparció empleando un asa de Drigalsky previamente esterilizada y se sellaron las placas con cinta de PVC. Las placas se incubaron a 25 °C entre 18 y 24 horas, dependiendo del hongo (Kuzmanovska et al., 2018). Transcurrido el tiempo de incubación, una alícuota de 400 µl de colorante azul de toluidina (1%) : ácido bórico (1%) (1:1, v/v) (Plascencia-Jatomea et al., 2003), filtrado con filtro de jeringa de 0.22 µm de nylon y 25 mm de diámetro, fue adicionado a la placa de Petri con la finalidad de detener la germinación y diferenciar con mayor facilidad los conidios y los tubos germinativos. El conteo se hizo empleando un contador de células mecánico Laboratory/ Counter. La inhibición de la germinación se calculó en porcentaje mediante la ecuación iii:

$$IG = \frac{[(\text{germinación del testigo} - \text{germinación del tratamiento})]}{\text{germinación del testigo}} \times 100 \quad (\text{iii})$$

2.6. Determinación de la capacidad de producción de micotoxinas

Los hongos reconocidos como toxigénicos en anteriores trabajos fueron inoculados en medio de cultivo Agar Extracto de Levadura y Sacarosa (YESA) e incubados durante 7 días a 25 °C. Transcurrido este tiempo de incubación, tres discos de agar (disco de medio

nutritivo de 5 mm con inóculo) del centro de la colonia de las placas enfrentadas y sin enfrentar fueron removidos y transferidos a un vial. Dos mililitros de una solución de metanol:cloroformo (1:1, v/v) fue adicionado al vial para la extracción de los metabolitos. El vial fue agitado en un agitador (TX4/Velp científica) por 30 segundos a 2500 rpm. En seguida, el extracto fue filtrado utilizando un filtro de jeringa de 0.22 μm de nylon y 25 mm de diámetro. Los extractos filtrados de *Aspergillus* (6 μl) y de *Penicillium* (0.5 μl) fueron aplicados a una cromatohoja para su separación y comparación con un estándar de ocratoxina A (Filtenborg et al., 1983; Samson et al., 2019) obtenido de la empresa Merck.

2.7. Análisis de datos

Los porcentajes de inhibición fueron sometidos a un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey. En el caso del porcentaje de inhibición de esporulación de los aislados de *Penicillium* confrontados con *Trichoderma harzianum* y del porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *T. harzianum* confrontado con aislados de *Penicillium*, los datos fueron transformados utilizando el logaritmo y el arcoseno, respectivamente, para cumplir los requisitos de normalidad del ANOVA. Para los resultados de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los aislados de *Aspergillus* confrontados con *T. harzianum* los datos fueron transformados con el arcoseno para cumplir con los supuestos del ANOVA, mientras que para los aislados de *Penicillium* confrontados con *T. asperellum* y viceversa, que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad del ANOVA, se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman, considerando dos factores, los tratamientos y los días. Los resultados de caracterización e interacción fueron presentados de forma descriptiva.

III. RESULTADOS

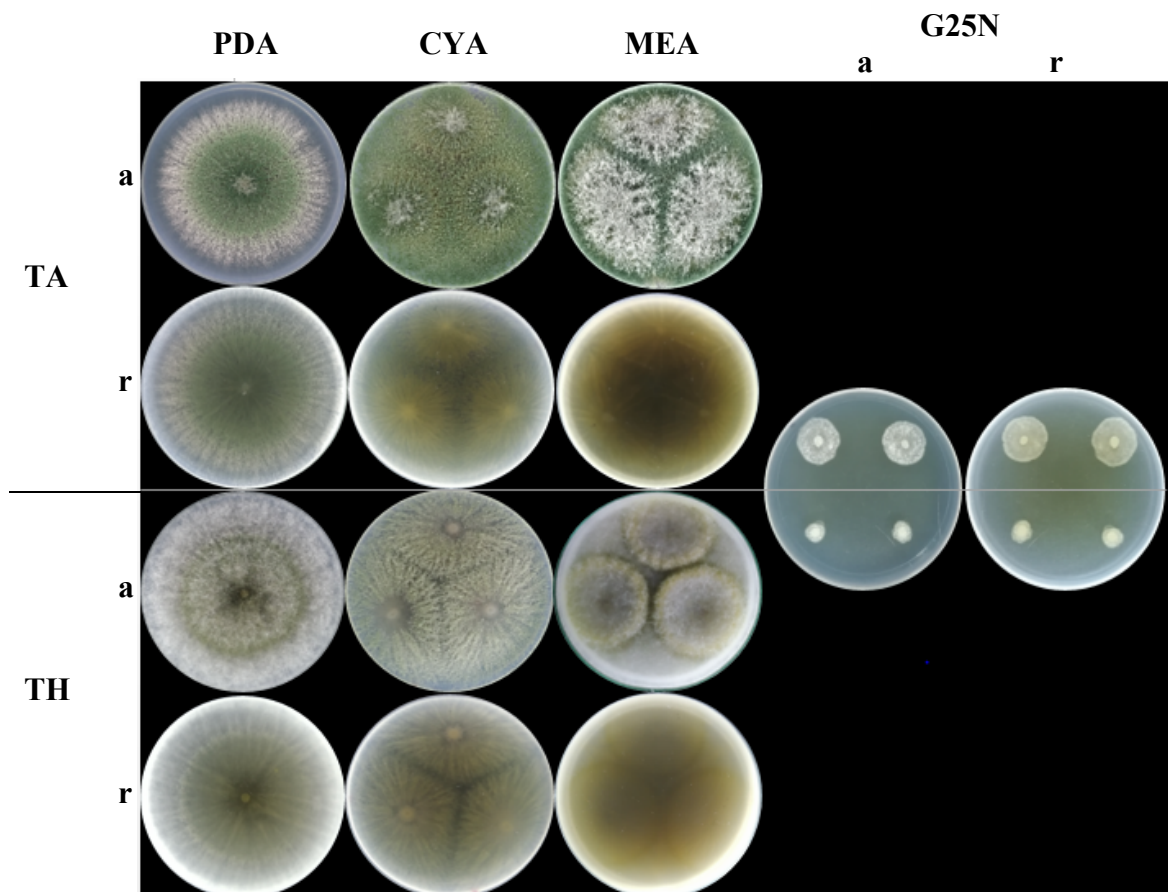
3.1. Caracterización del material biológico

3.1.1. *Trichoderma*

En la Figura 2 se aprecia la apariencia de las colonias de los dos aislados de *Trichoderma asperellum* y *T. harzianum* en los diferentes medios recomendados en la siembra en método Pitt. Las imágenes en el medio PDA fueron obtenidas antes porque se aprovechó una de las colonias control de los experimentos de interacción.

Figura 2

Trichoderma asperellum (TA) y *T. harzianum* (TH) en medio PDA, a los 3.25 dds, y en medio CYA, MEA y G25N, a los 7 dds, mostrando el lado anverso (a) y reverso (r), a 25°C



La apariencia de ambos aislados varió dependiendo del medio de cultivo. En el caso de *T. asperellum* en el medio PDA, se observó presencia de micelio con zonas diferenciadas o anillos concéntricos.

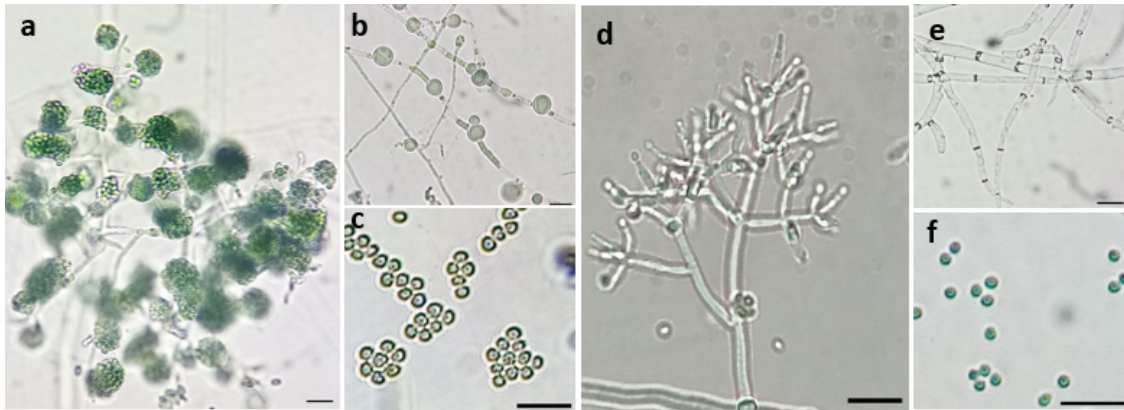
El centro de la colonia presentó color verde esmeralda y blanquecino en el borde, pudiendo ser observado esto en el envés también. En el medio CYA el micelio fue verdoso en los bordes y blanquecino en el centro y cubrió la superficie de la placa. En el medio MEA el micelio fue de aspecto algodonoso, blanquecino y de color verde esmeralda en los bordes. En el medio G25N el crecimiento fue más lento, alcanzando 18.46 mm y el micelio presentó color blanquecino. En el caso de *T. harzianum* en el medio PDA, el micelio presentó apariencia algodonosa de coloración blanquecina y gris con la formación de un anillo concéntrico. En el medio CYA, el micelio fue blanquecino filamentosos. En el medio MEA, el micelio fue blanquecino y amarillo verdoso en los bordes, con formación de circunferencias en cada colonia; en el medio G25N el crecimiento radial fue lento, alcanzando un promedio de 7.37 mm. En el medio CYA a 37°C los aislados no presentaron crecimiento, mientras que a 5°C sólo *T. harzianum* presentó un crecimiento de 4 mm (fotografías no presentadas).

Con respecto a las características microscópicas *T. asperellum* presentó hifas delgadas y ralas, conidióforos con abundantes ramificaciones que le dan una forma piramidal. Las clamidosporas se presentaron en forma escalonada en las hifas, estas últimas muestran variaciones en tamaños con un diámetro promedio de 124 µm y conidios ovoides de 42 µm de diámetro agrupados en racimos pequeños, con forma esférica sobre las fiálides. *T. harzianum* presentó hifas gruesas, septadas e incoloras de 54 µm de diámetro, fiálides ampuliformes las cuales van creciendo de forma irregular dando forma piramidal al conidióforo, además de conidios circulares, ovoides, de coloración verde esmeralda, de 31 µm de diámetro (Figura 3).

Para una mejor observación y mayor entendimiento de las estructuras microscópicas de los aislados de *Trichoderma* se realizaron diseños de estas estructuras (Figura 64 y 66 en ANEXOS).

Figura 3

Micrografías de (a) conidióforo, (b) clamidosporas e hifas, (c) conidios de *Trichoderma asperellum*, (d) conidios y conidióforo, (e) hifas y (f) conidios de *Trichoderma harzianum*, a los 4 dds en medio PDA, barra = 150 μm



3.1.2. *Colletotrichum*

En la Figura 4 se presentan las imágenes de las colonias de *Colletotrichum* sp. y *Colletotrichum asianum* aislados de plantas de rocoto y mango, respectivamente, en los diferentes medios recomendados por Pitt & Hocking (2009) a 25 °C. Las imágenes en el medio PDA fueron obtenidas posteriormente, a los 12 dds, porque se aprovechó una de las colonias control de los experimentos de interacción.

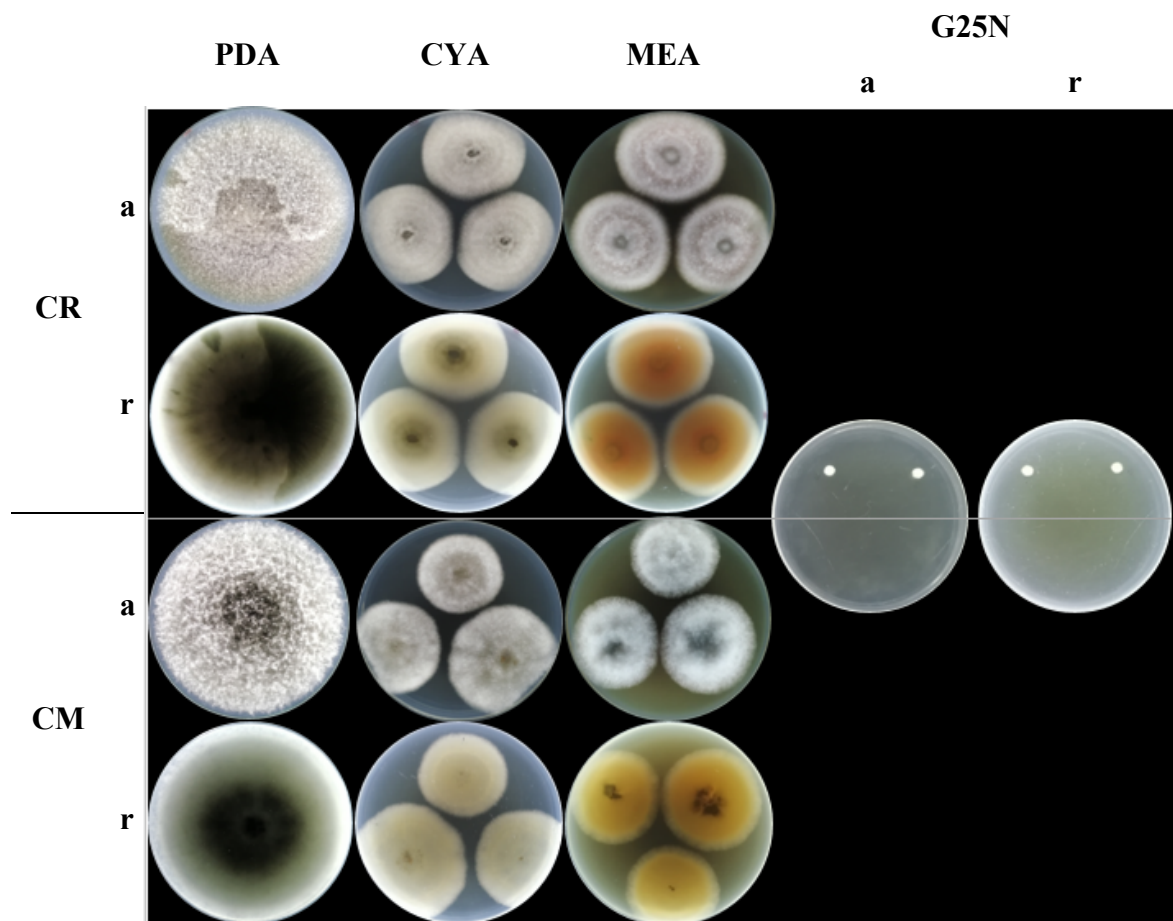
La apariencia de ambos aislados varió dependiendo del medio de cultivo. En el caso de *Colletotrichum* sp. en medio PDA, el micelio presentó apariencia algodonosa y densa, de coloración blanquecina y con manchas grises a los 12 días de incubación a 25 °C (Figura 4 - a de CR), el reverso de la colonia presentó un color de gris a negro (Figura 4 - r de CR). En el medio CYA, el micelio tuvo mayor densidad y presentó un color blanquecino con el centro gris y formación de anillos concéntricos, con crecimiento radial de 19.82 × 20.15 mm a los 6 días. En el medio MEA, el micelio también fue denso, de coloración rosa pálido y bordes blanquecinos, tono gris en el centro y formación de anillos concéntricos a los 7 días de incubación a 25 °C, con un promedio de crecimiento de 19 mm a los 6 dds.

En el medio G25N, el diámetro de la colonia fue de 4 mm a los 7 dds. En el caso de *Colletotrichum asianum* en el medio PDA el micelio tuvo una apariencia algodonosa y

densa, de coloración blanquecina y formación de puntos negros de color gris oscuro en el centro a los 12 dds. En CYA, el micelio de color blanquecino, con el centro gris y formación de anillos concéntricos, presentó un crecimiento denso, con un crecimiento radial promedio de 20 mm a los 6 dds. En MEA, presentó micelio denso, de coloración grisácea con bordes blanquecinos y tono gris en el centro a los 7 dds, con un promedio de crecimiento radial de 19 mm a los 6 dds. No presentó crecimiento en el medio G25N. Ninguno de los aislados creció a 37 °C y a 5 °C sólo el *Colletotrichum* sp. presentó 3 mm de crecimiento radial.

Figura 4

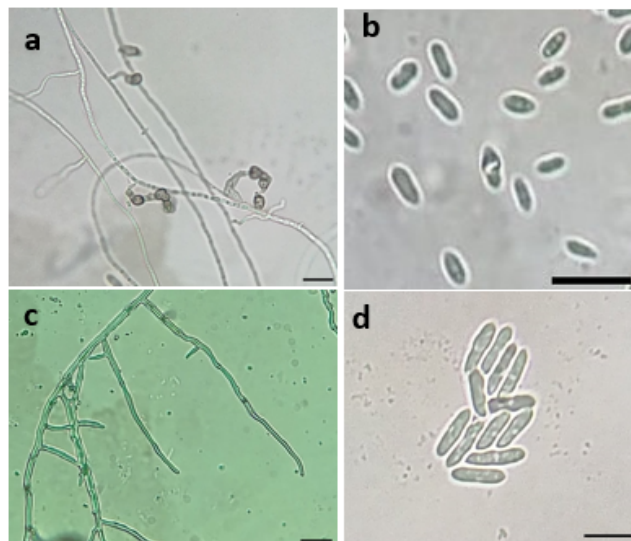
Colletotrichum sp. (CR) y *C. asianum* (CM), en medio PDA, a los 12 dds, y en CYA, MEA y G25N, a los 7 dds, mostrando el lado anverso (a) y reverso (r), a 25 °C



Las características microscópicas pueden ser observadas en la Figura 5. *Colletotrichum* sp. presentó hifas delgadas incoloras, conidios brillantes de forma cilíndrica, semi-alargados y redondeados en los extremos midiendo $109.7 \times 43.4 \mu\text{m}$ cuando fue cultivado en medio PDA. *Colletotrichum asianum* presentó hifas gruesas incoloras y conidios alargados cilíndricos con los extremos redondeados con forma semejante a un grano de arroz, con dimensiones de $167.6 \times 44 \mu\text{m}$ (Figura 5d).

Figura 5

Micrografías (a) hifas y (b) conidios de *Colletotrichum* sp., (c) hifas teñidas con azul de lactofenol y (d) conidios de *Colletotrichum asianum*, a los 7 dds en medio PDA, barra = $150 \mu\text{m}$



La caracterización de los aislados de *Aspergillus* y *Penicillium* fue realizada en investigaciones anteriores (Davila-Garcia, 2023; Gaslac-Culqui, 2022).

3.2. Interacción entre *Penicillium* y *Trichoderma*

3.2.1. Interacción física

La interacción física entre los aislados de *Penicillium* obtenidos de granos de café, y *Trichoderma harzianum* fue registrada fotográficamente de forma macroscópica (Figura 6) y microscópica (Figura 7) posterior a los 3 dds debido a que en ese momento se detuvo el registro del crecimiento porque las colonias de *T. harzianum* habían recubierto la superficie del medio de cultivo en las placas control.

Figura 6

Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) a los 3.25 dds a 25 °C

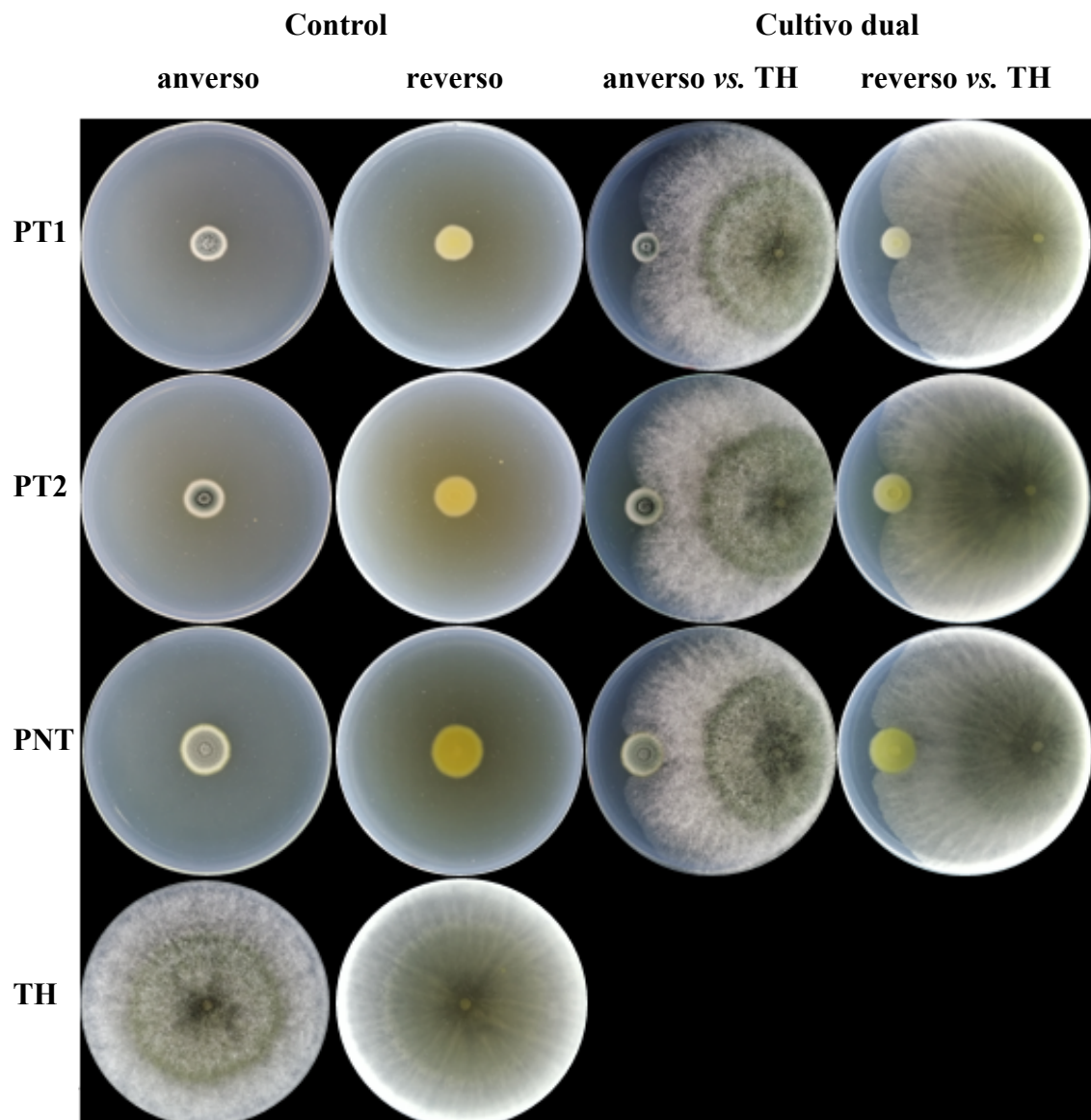
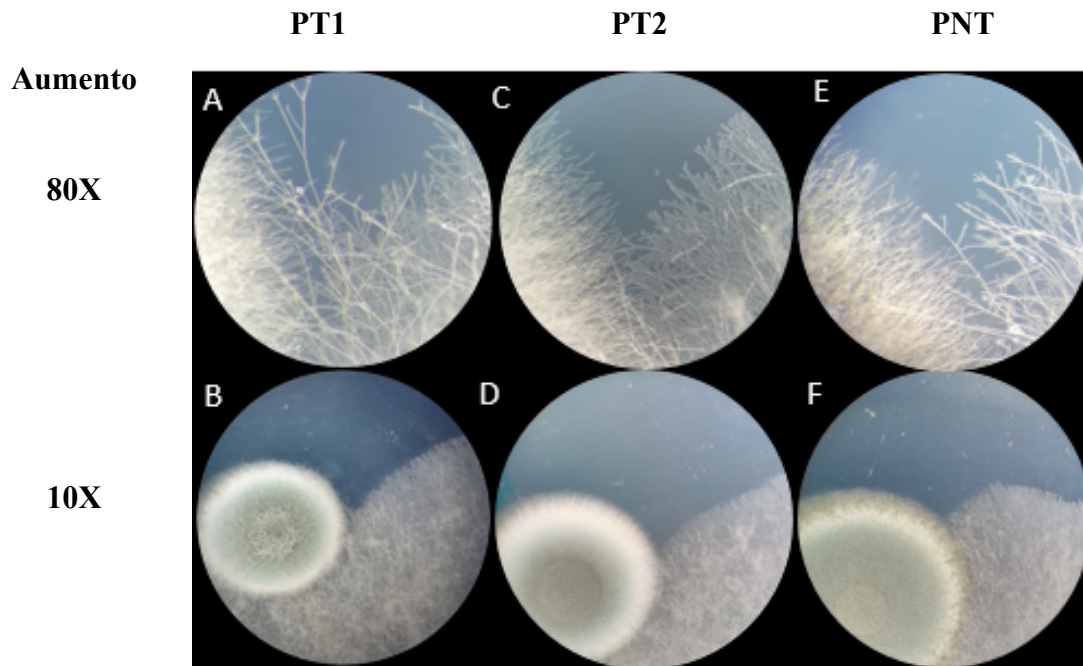


Figura 7

Borde de las colonias de *Penicillium* toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (TH) a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio



Aparentemente, el *Penicillium* no toxigénico crece más que el *Penicillium* toxigénico 2 y, este a su vez, más que el *Penicillium* toxigénico 1. El *Penicillium* toxigénico 2 presentó una apariencia más distinta que el *Penicillium* toxigénico 1 y el *Penicillium* no toxigénico. En el cultivo dual, todos los aislados parecen haber sufrido una reducción de su crecimiento, en comparación con las colonias no sometidas al enfrentamiento con hongos distintos. Esto es más evidente entre el aislado *Penicillium* toxigénico 1 en presencia de *T. harzianum*. En las imágenes de la Figura 6 es posible verificar la inexistencia de halos de inhibición entre los aislados de *Penicillium* y *T. harzianum*. Observando más de cerca, con ayuda de un estereoscopio (Figura 7), fue posible verificar que las hifas de las cepas de *Penicillium* y *T. harzianum* se entrecruzaban.

La respuesta de los aislados de *Penicillium* fueron del tipo Bii, mientras que la respuesta de *T. harzianum* fue del tipo Bi (Tabla 1).

Tabla 1

Interacción física de Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT), en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y T. asperellum (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore y Dickinson (1976)

Cultivo dual	Escala	Descripción de la respuesta del primer aislado	Escala	Descripción de la respuesta del segundo aislado
PT1 × TH	A	Entremezclados	A	Entremezclados
PT2 × TH	Bii	Entremezclados (siendo cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
PNT × TH	Bii	Entremezclados (siendo cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
PT1 × TA	C	Halo de inhibición de 1.12 mm - Antagonista	C	Halo de inhibición de 1.12 mm - Antagonizado
PT2 × TA	C	Halo de inhibición de 0.56 mm - Antagonista	C	Halo de inhibición de 0.56 mm - Antagonizado
PNT × TA	Bii	Entremezclados (siendo cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)

Con respecto a la interacción de las cepas de *Penicillium* con *T. asperellum* fue posible observar halos de inhibición, que demuestran que *T. asperellum* fue afectado por parte de los aislados *Penicillium* toxigénico 1 y *Penicillium* toxigénico 2. Esta fue la única interacción del tipo C, es decir, con halos de inhibición menores a 2 mm (Tabla 1).

En el caso del *Penicillium* no toxigénico hubo entrecruzamiento de hifas (respuesta tipo Bii) con *T. asperellum* (respuesta tipo Bi), a diferencia de los aislados toxigénicos (Figura 8 y 9).

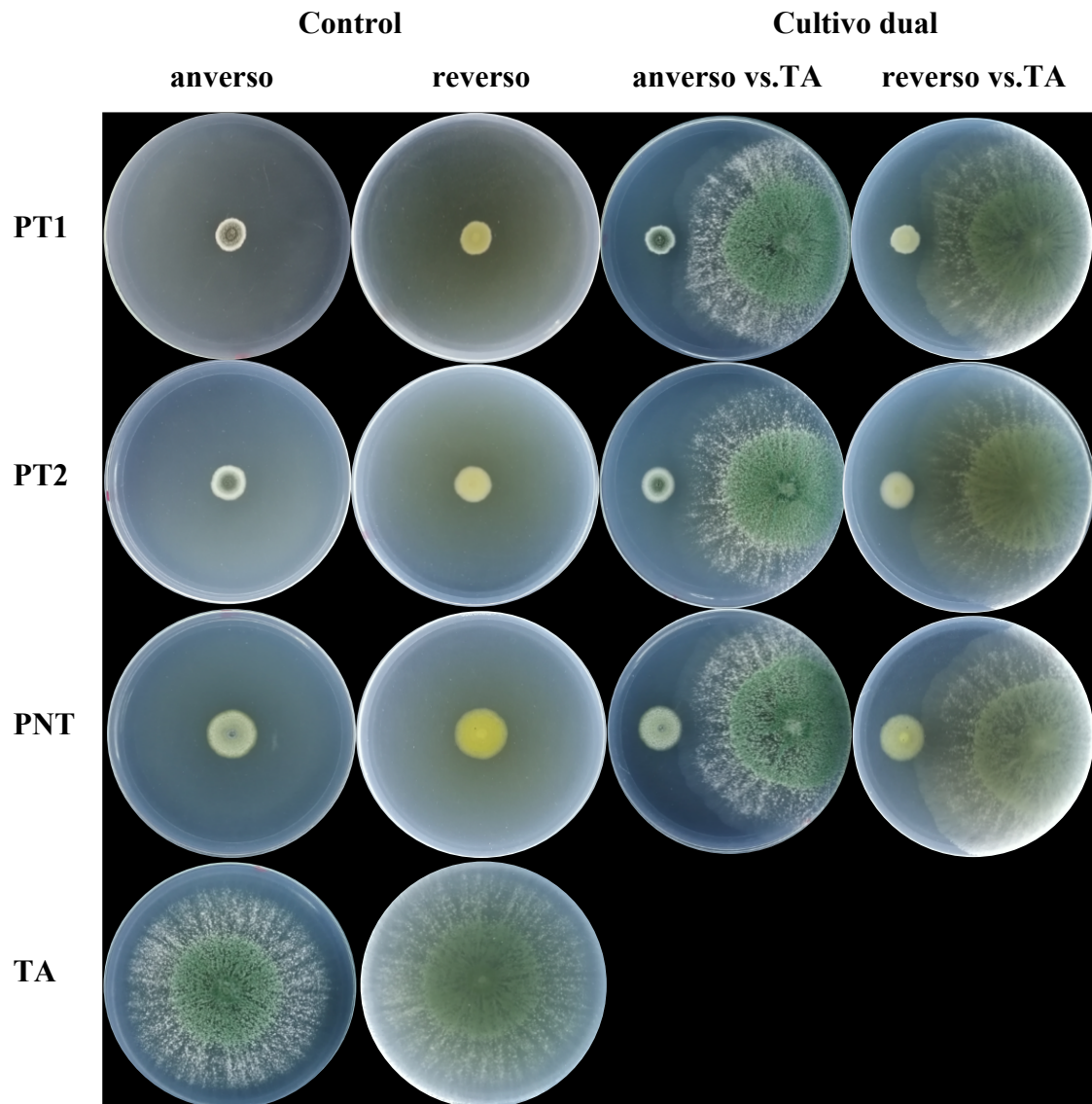
3.2.2. Inhibición del crecimiento micelial

La inhibición del crecimiento de los aislados de *Penicillium* por parte de *T. harzianum* fue entre 9% y 12% (Figura 10-A), sin diferencias notables entre ellos, pero con una tendencia a aumentar con el tiempo. Con respecto a la inhibición de *T. harzianum* por parte de los aislados de *Penicillium*, esta fue más notable con el aislado PT2 en el primer día, con cerca del 10%. En el segundo día, el porcentaje de inhibición del crecimiento varió entre 1% y 6% dependiendo del aislado de *Penicillium* (Figura 10-B). No fue posible continuar con las estimaciones después del segundo día debido a que el aislado de *T. harzianum* llenó completamente la placa de Petri utilizada como control 3 dds. De

cualquier forma, la tendencia del porcentaje de inhibición de *T. harzianum* parece ser mantenerse baja.

Figura 8

Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* a los 3.25 dds a 25 °C



Cuando los aislados de *Penicillium* fueron enfrentados a *T. asperellum*, el porcentaje de inhibición varió de 9 a 13%, no habiendo diferencias notables entre ellos hasta los 3 dds (Figura 13-A). *T. asperellum* presentó un ligero incentivo en su crecimiento 1 dds cuando fue cultivado en presencia de los aislados toxigénico 1 y no toxigénico de *Penicillium*. Hasta 3 dds los porcentajes de inhibición fueron bastante bajos (Figura 13-B).

Figura 9

Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum a los 3.25 dds

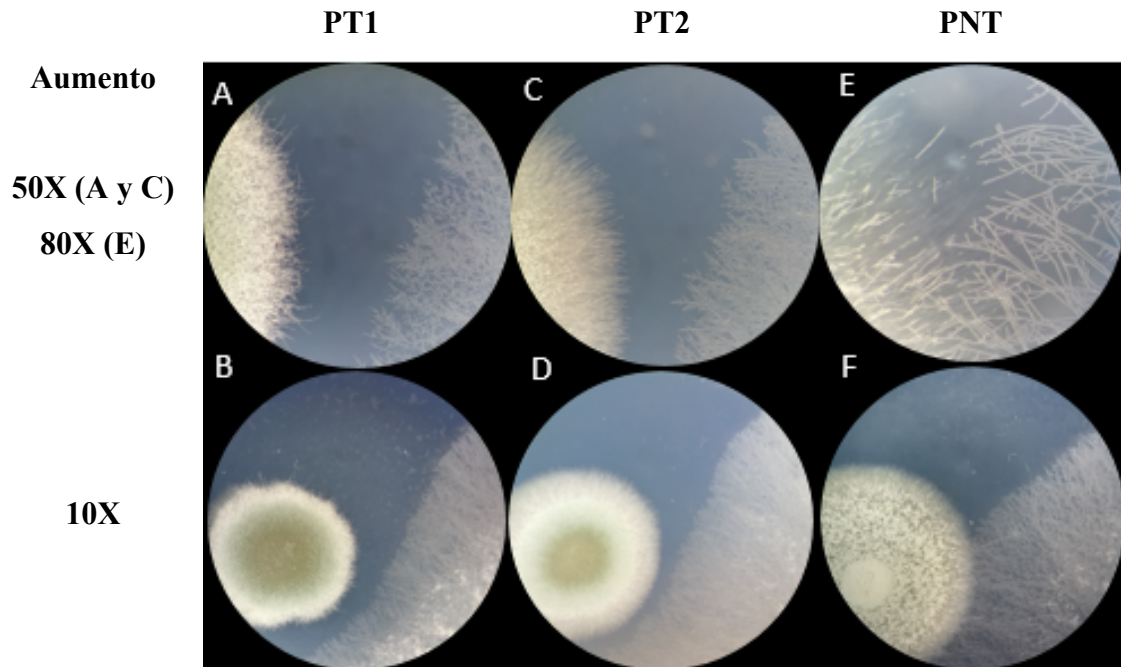
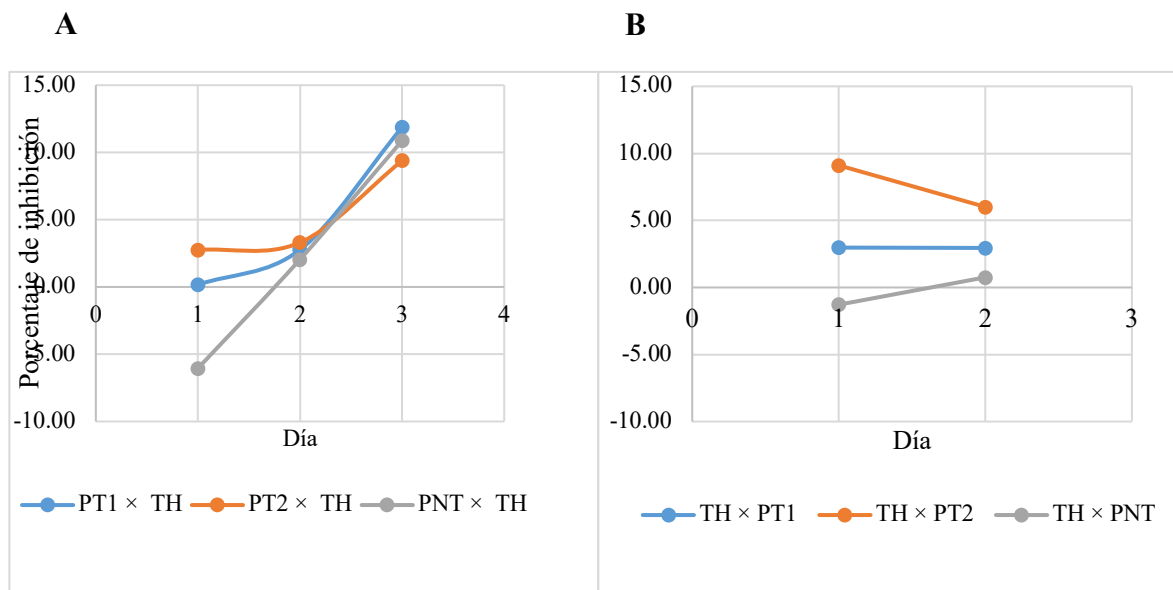


Figura 10

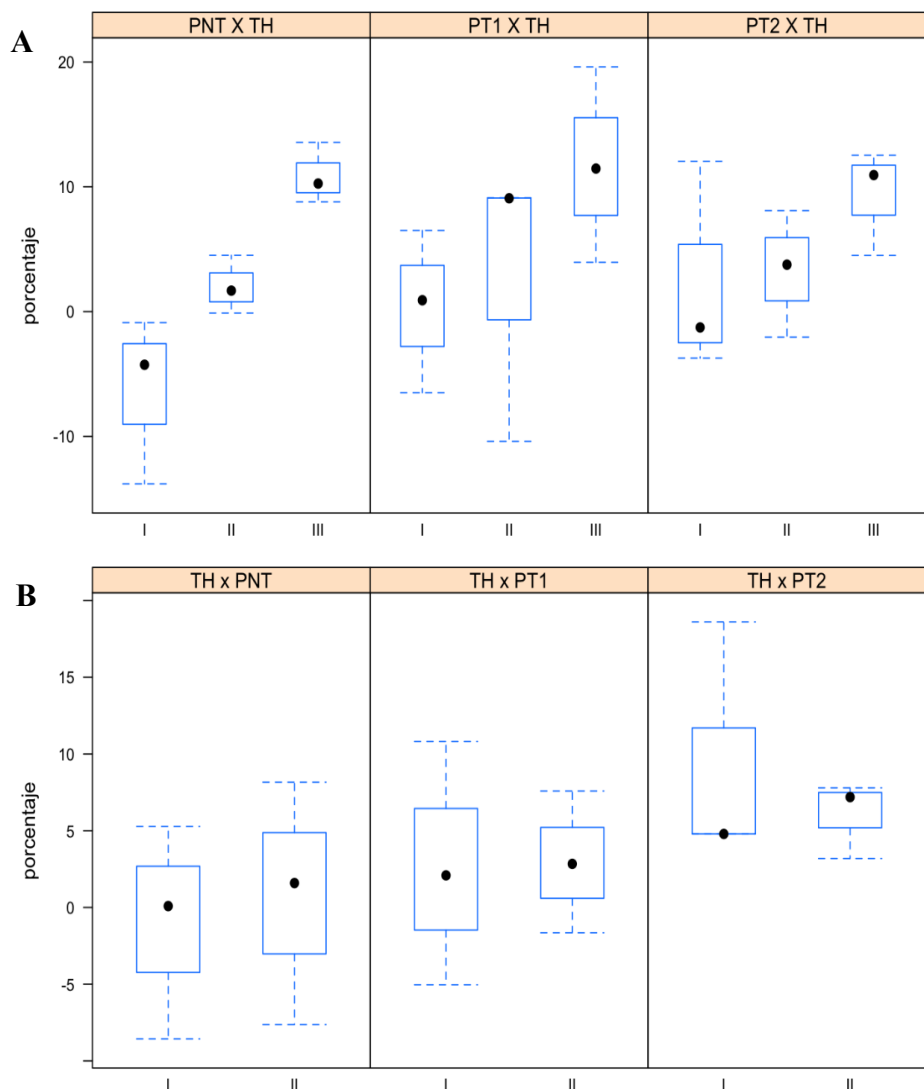
Inhibición de crecimiento micelial de (A) Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C



En el análisis exploratorio de los porcentajes de inhibición del crecimiento, con los diagramas de cajas y guiándose de las medianas que son los puntos negros, fue posible notar que esta inhibición aumentó conforme pasó el tiempo en todos los aislados de *Penicillium* (Figura 11A), mientras que la respuesta de *Trichoderma harzianum* ante la exposición a *Penicillium* spp. fue semejante, pero con porcentajes de inhibición mucho más bajos (Figura 11B).

Figura 11

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Penicillium* toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos



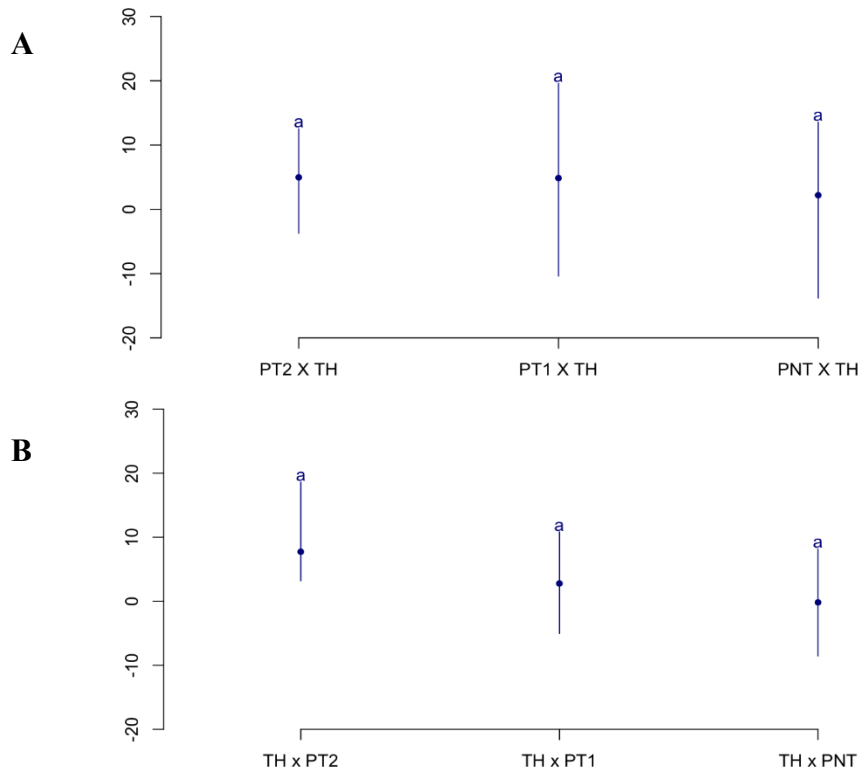
En los diagramas de cajas ya es posible percibir que podría no haber diferencias estadísticas en la respuesta de las diferentes cepas de *Penicillium* ante *Trichoderma harzianum* y viceversa. En la Figura 11 también es posible observar que hubo una variación considerable de los datos. Esta variación no esperada, considerando que los experimentos fueron realizados en laboratorio y no se tiene registro de fallas en las siembras, contaminación cruzada, sellado irregular de las placas o distribución irregular de la temperatura dentro de la incubadora, sólo puede explicarse por influencia del error experimental, específicamente a pequeñas variaciones en los procedimientos, propios de una primera experiencia en investigación, pero que no implicaron tendenciosidad. Los resultados muestran la ausencia de valores atípicos. Es importante mencionar que algunos aislados como el *Penicillium* toxigénico 1 y 2 fueron obtenidos por un procedimiento de punta de hifa. Esto significa que no se espera que la variación sea debido a una heterogeneidad en el material biológico (Davila-Garcia, 2023). En el caso de la respuesta de las cepas de *Trichoderma*, se intentó garantizar la uniformidad del inóculo con la obtención de cultivos monospóricos, mediante la técnica de aislamiento de esporas utilizando agujas preparadas con pipetas de Pasteur, debido al tamaño bastante pequeño de las esporas. Sin embargo, debido a la dificultad inherente a la técnica, que requiere práctica y, por lo tanto, un tiempo de entrenamiento, se obvió este paso para no comprometer los objetivos principales de la investigación y los plazos. Aún así, los resultados de las colonias puras de *Penicillium* demuestran que otros son los factores causantes de variabilidad.

En la Figura 12 se resume la respuesta de los aislados de *Penicillium* frente a *T. harzianum* y viceversa, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre cepas.

La respuesta de crecimiento micelial de los aislados de *Penicillium* frente a *T. asperellum* fue semejante a la encontrada frente a *T. harzianum* (Figura 13). Así mismo, en el diagrama de cajas (Figura 14) se observa de manera general, una tendencia a aumentar el porcentaje de inhibición del crecimiento, con variación mayor en la primera evaluación, probablemente debido a la sensibilidad de las evaluaciones con el vernier, que depende también de una buena observación por parte del evaluador. Se presentó una amplia variación en el *T. asperellum* expuesto al *Penicillium* no toxigénico y en el *Penicillium* toxigénico 1 expuesto al *T. asperellum* en el día 1 en comparación a los otros dos tratamientos.

Figura 12

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Penicillium toxigénico 1* (PT1), *toxigénico 2* (PT2) y *no toxigénico* (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) *viceversa*, a 25 °C e independiente del día de evaluación



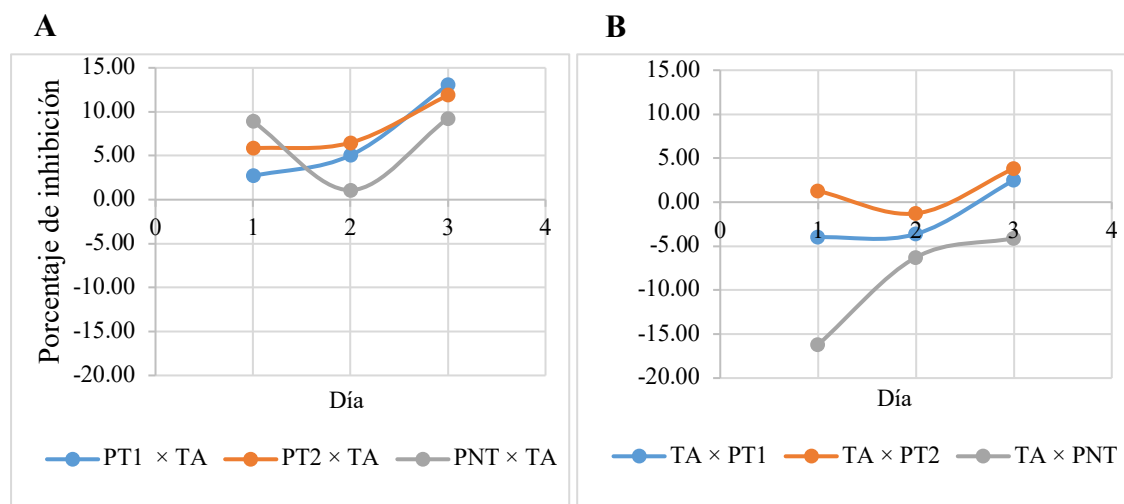
Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

No se aprecian valores atípicos y no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los 3 días (Figura 14).

El análisis de variancia mostró diferencias en el caso de la respuesta de *T. asperellum*. Cuando fue expuesto al *Penicillium* toxigénico 2, *T. asperellum* prácticamente no fue afectado en su crecimiento, pero fue significativamente diferente la respuesta ante cada aislado de *Penicillium* y, cuando fue confrontado al *Penicillium* no toxigénico la respuesta fue de incentivo del crecimiento (Figura 15).

Figura 13

Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial entre (A) *Penicillium* spp. (PT1, PT2 Y PNT) vs. *Trichoderma asperellum* (TA) y (B) viceversa



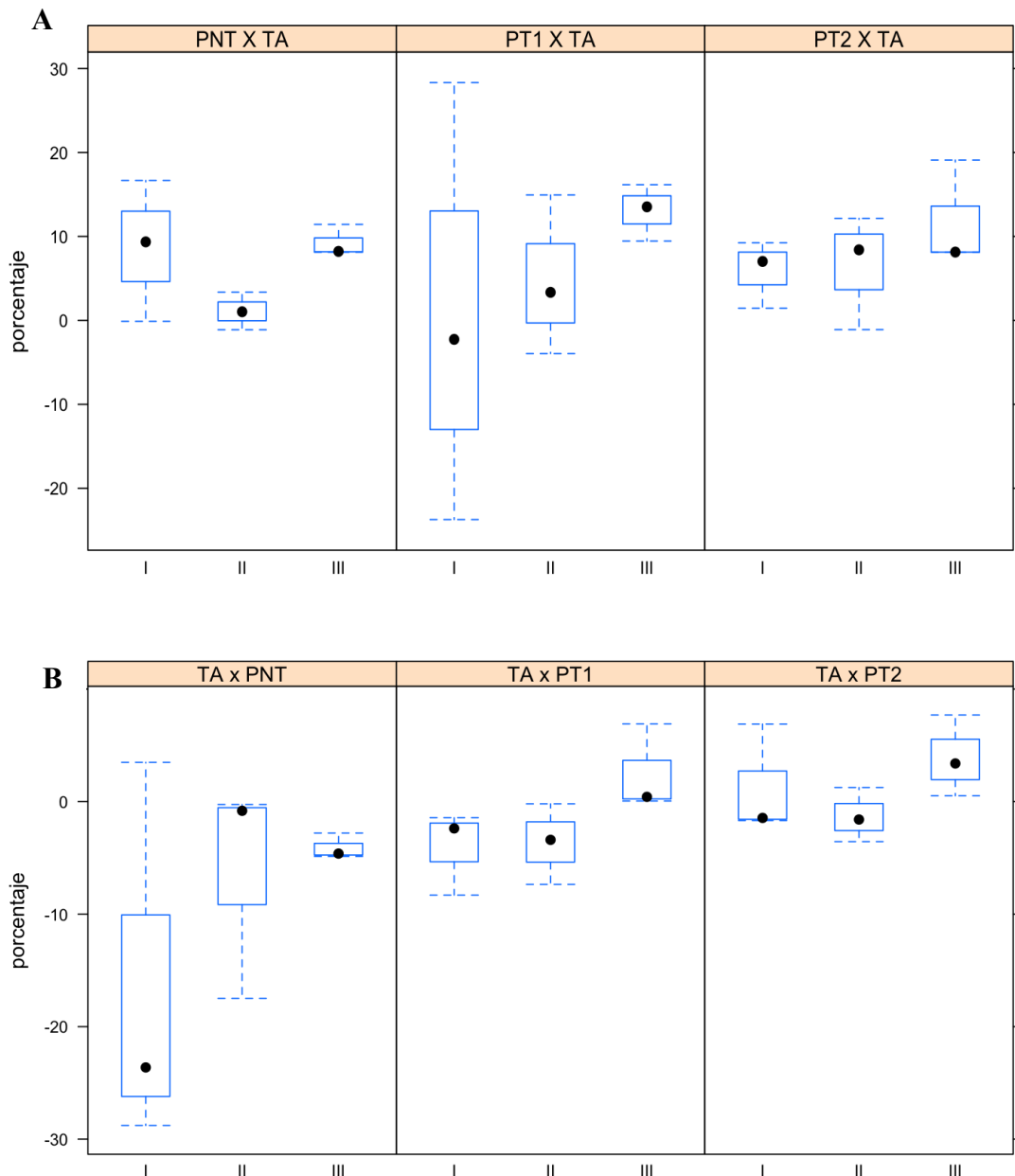
3.2.3. Inhibición de la producción de esporas

La inhibición de la producción de las esporas de las cepas de *Penicillium* por *T. harzianum* fue notable, destacándose el *Penicillium* toxigénico 1 con 70% de inhibición. En contraposición, la reacción de *T. harzianum* fue de un incentivo en el porcentaje de esporulación, de más de 40% cuando fue cultivado con *Penicillium* toxigénico 1. En cambio, cuando fue expuesto al *Penicillium* toxigénico 2 y el no toxigénico, *T. harzianum* presentó entre 30 y 48% de inhibición de la producción de esporas (Figura 16).

La agrupación de los datos y medianas en la Figura 17 lleva a pensar en posibles diferencias estadísticas en el porcentaje de inhibición de la esporulación. Sin embargo, el análisis exploratorio con el diagrama de cajas muestra bastante variación en los resultados y el análisis de variancia indicó ausencia de diferencias significativas cuando *Penicillium* spp. está confrontado a *T. harzianum* y viceversa. Existió mayor variación cuando *T. harzianum* estuvo confrontado con *Penicillium* toxigénico 1 en comparación a los otros 2 tratamientos (Figuras 16 y 17). Con respecto a la interacción entre *Penicillium* spp. con *T. asperellum*, el *Penicillium* no toxigénico fue el más afectado, con cerca de 70% de inhibición de la esporulación. En cambio, el *Penicillium* toxigénico 2 presentó un aumento en la producción de esporas, de más de 50%. Con respecto a *T. asperellum*, presentó un incentivo de 20% a 60% en la producción de esporas (Figura 18).

Figura 14

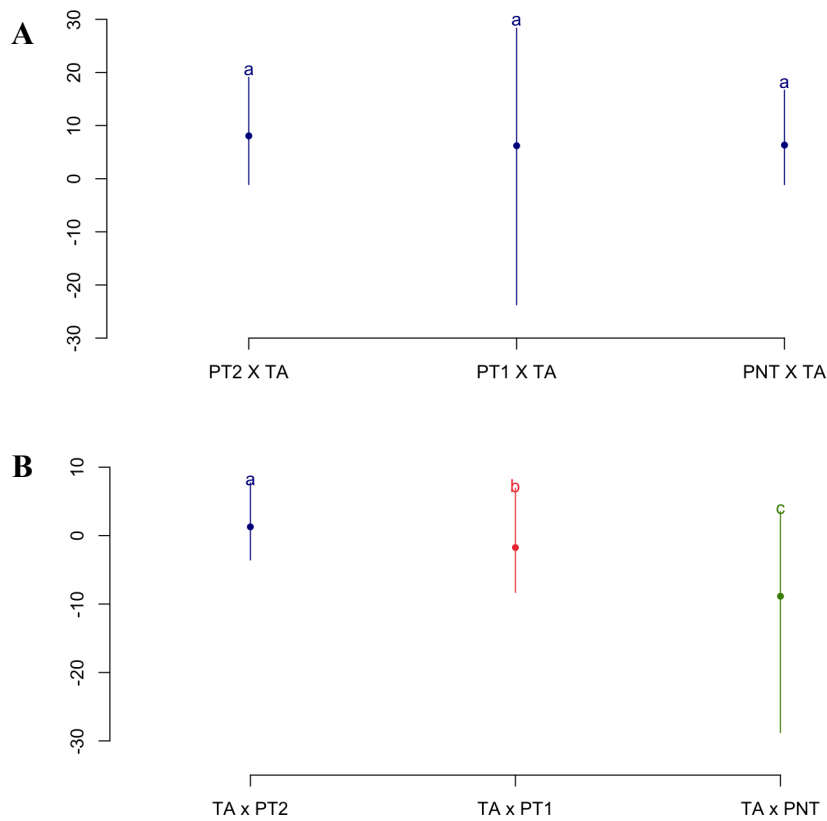
Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Penicillium toxigénico 1* (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos



Los diagramas de cajas no mostraron la presencia de valores atípicos y hubo aparentes diferencias en el porcentaje de inhibición de esporulación entre las cepas de *Penicillium* ante la presencia de *T. asperellum*.

Figura 15

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Penicillium toxigénico 1* (PT1), *toxigénico 2* (PT2) y *no toxigénico* (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* y (B) *viceversa*, a 25 °C e independiente del día de evaluación



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Sin embargo, el análisis estadístico indicó diferencias significativas solamente entre el *Penicillium toxigénico 2* con respecto a las demás cepas de *Penicillium* y la respuesta fue de incentivo en la producción de esporas de aproximadamente 50%. En la respuesta de *T. asperellum* se encontró amplia variación en los datos, esencialmente de incentivo, más que de inhibición de la esporulación. El análisis estadístico mostró ausencia de diferencias significativas en su respuesta frente las cepas de *Penicillium* (Figura 19).

Figura 16

Inhibición de esporulación de Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C

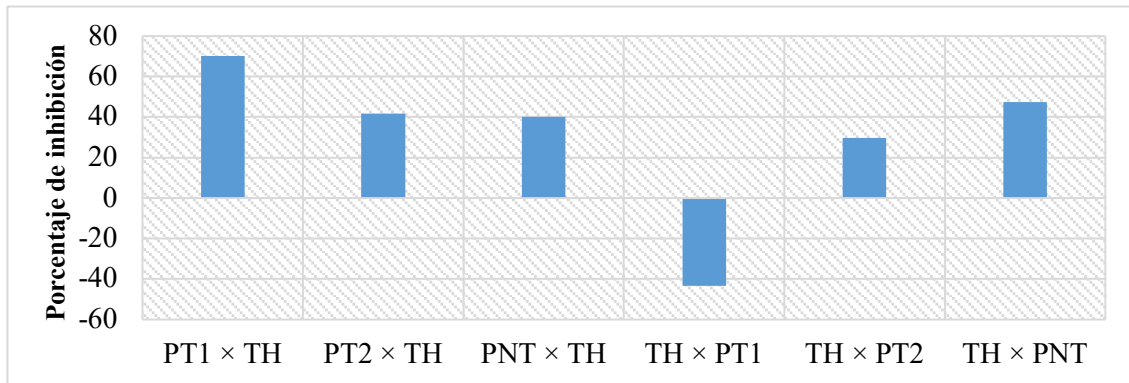
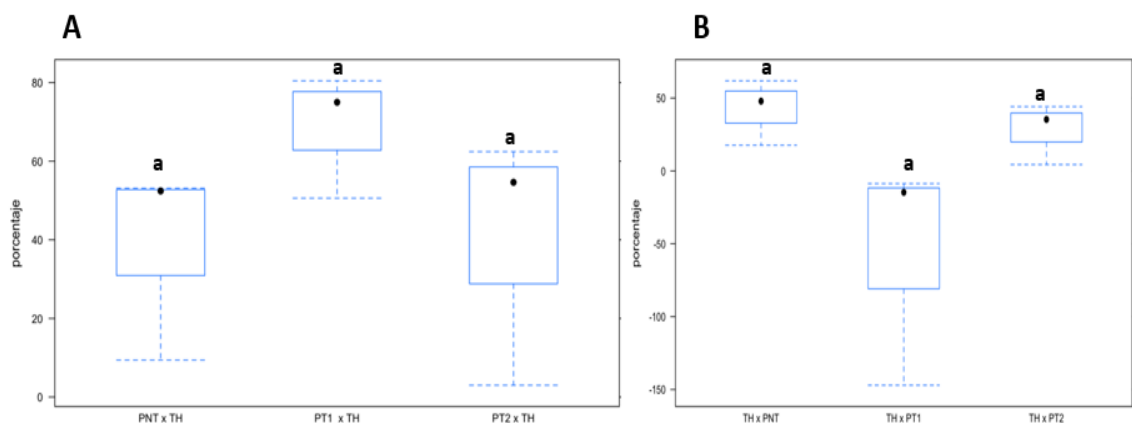


Figura 17

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum y (B) viceversa, a 25 °C



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Figura 18

Inhibición de esporulación de Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C

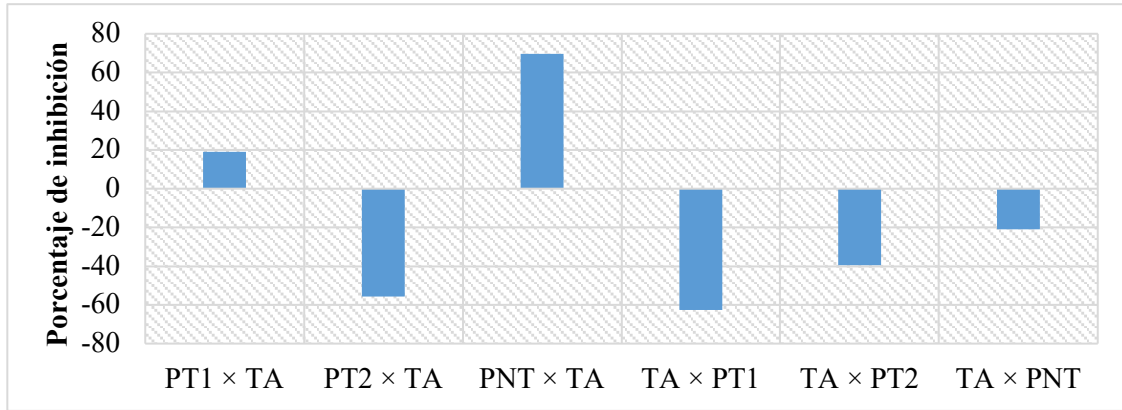
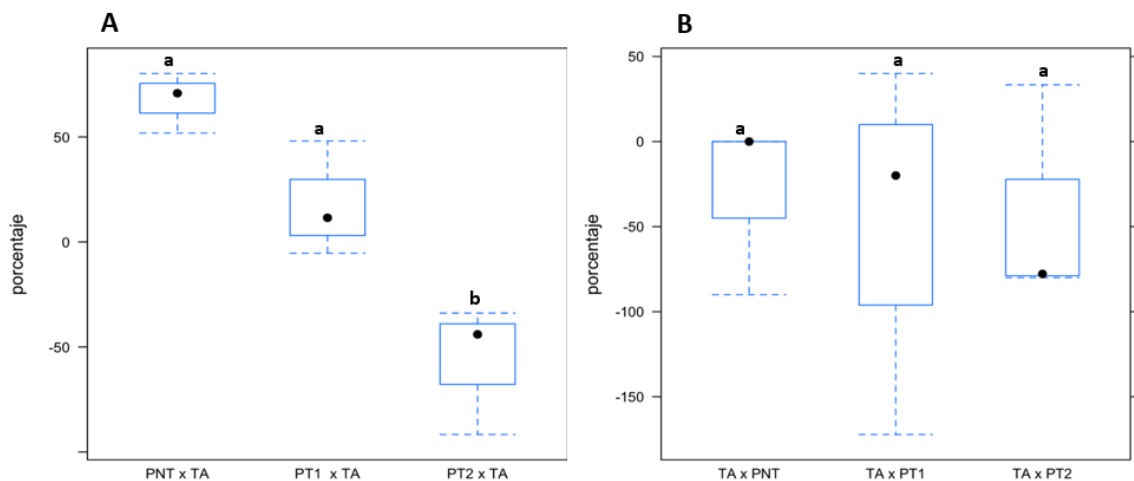


Figura 19

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum y (B) viceversa, a 25 °C



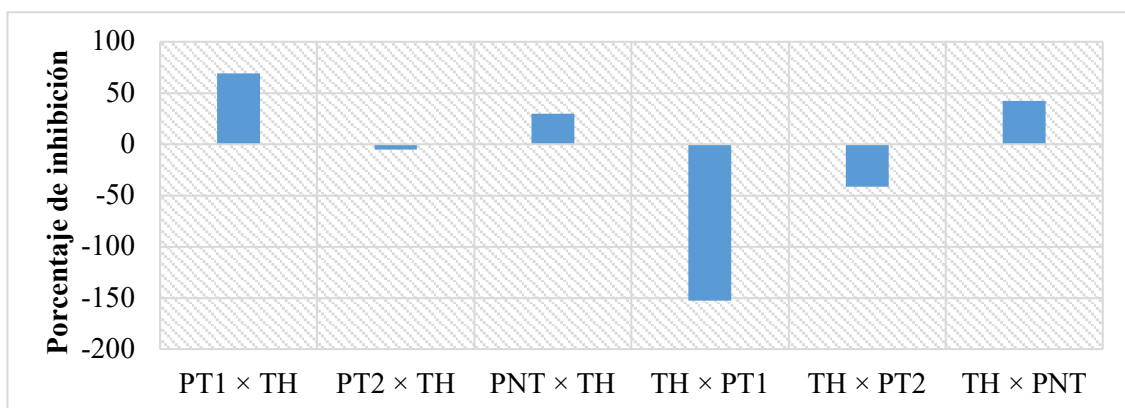
Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

3.2.4. Inhibición de la germinación de esporas

Trichoderma harzianum inhibió la germinación de esporas de *Penicillium* toxigénico 1 en 70% y en menor porcentaje del *Penicillium* no toxigénico, pero aparentemente no tuvo ningún efecto frente a *Penicillium* toxigénico 2. Con respecto a la respuesta de *T. harzianum*, su germinación de esporas fue incentivada en más del 150% cuando estuvo en presencia de la cepa *Penicillium* toxigénico 1. Ante la presencia del *Penicillium* toxigénico 2 fue incentivada su germinación con un promedio de 40%. Sin embargo, cuando estuvo en presencia de PNT, fue inhibida en cerca del 40% su germinación (Figura 20).

Figura 20

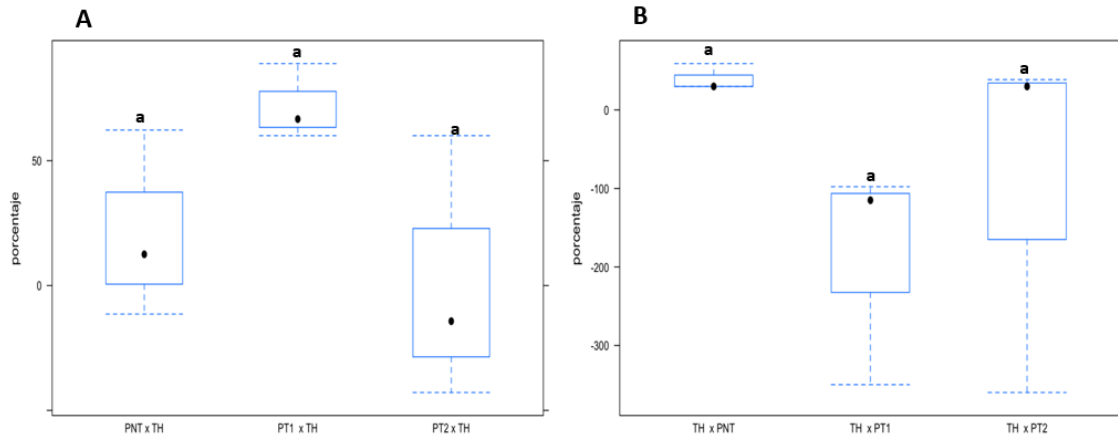
Inhibición de la germinación de esporas de Penicillium toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C



El análisis exploratorio de datos permitió verificar inhibición de la germinación de esporas sólo en el caso del *Penicillium* toxigénico 1 y del *Penicillium* no toxigénico y la respuesta de *T. harzianum* fue esencialmente de incentivo de la germinación con excepción a cuando estuvo ante la presencia del *Penicillium* no toxigénico. Las respuestas contrastantes podrían llevar a creer que estas son significativas. Sin embargo, el análisis de variancia mostró ausencia de diferencias estadísticas y esto podría deberse en parte a la alta variabilidad en los datos encontrados (Figura 21).

Figura 21

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de (A) *Penicillium toxigénico 1* (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C

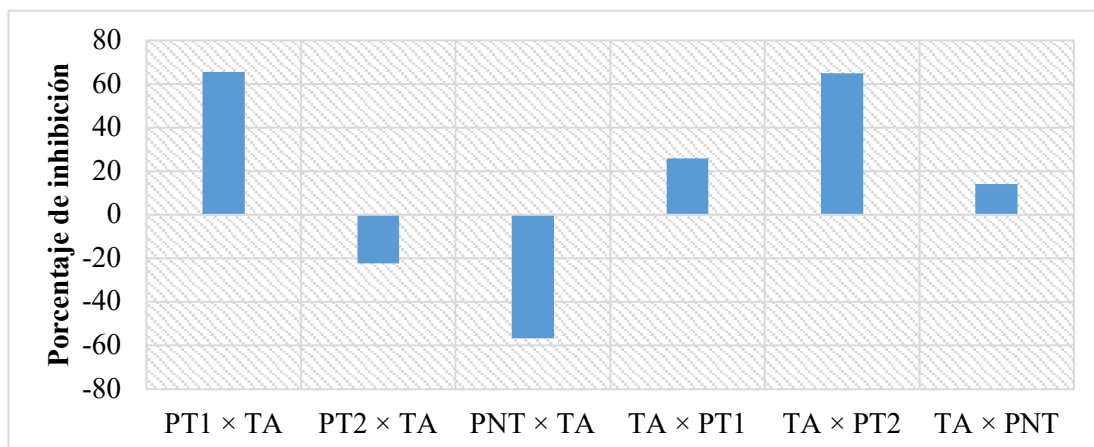


Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

La Figura 22 muestra que, en presencia de *T. asperellum*, se encontró coincidencia en la respuesta de inhibición de la germinación de esporas del *Penicillium* toxigénico 1 con un porcentaje semejante al encontrado cuando fue confrontado al *T. harzianum*.

Figura 22

Inhibición de la germinación de esporas de *Penicillium* toxigénico 1 (PT1), toxigénico 2 (PT2) y no toxigénico (PNT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y viceversa, en medio PDA a 25 °C

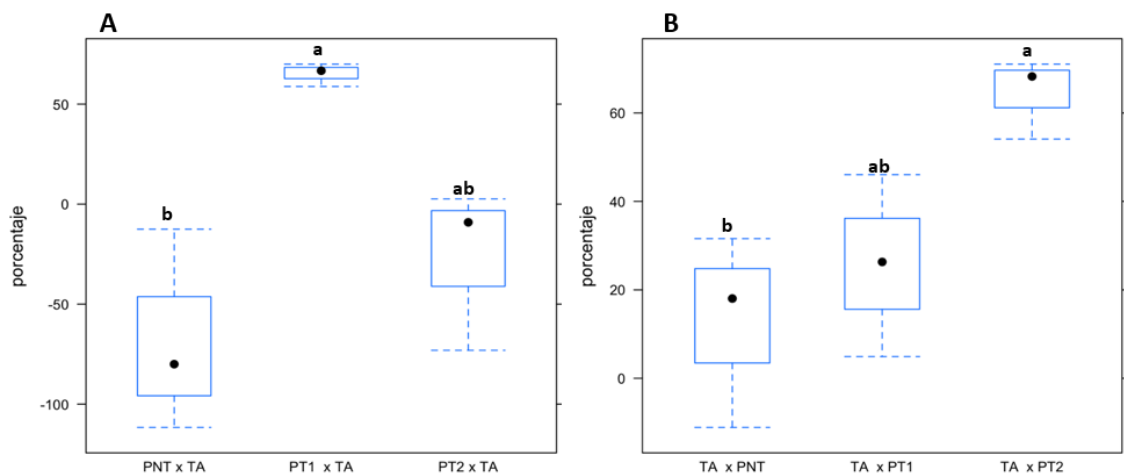


También hubo cierta coincidencia en la respuesta de *T. asperellum* cuando fue expuesto al *Penicillium* no toxigénico. Sin embargo, la germinación de esporas de *T. asperellum* fue inhibida también con los otros aislados, mientras que incentivó germinación de esporas del *Penicillium* toxigénico 2 y el *Penicillium* no toxigénico (Figura 22).

En la Figura 23 se puede corroborar que, aunque los datos también presentan en general bastante variabilidad, hubieron diferencias estadísticas significativas, siendo la respuesta del *Penicillium* no toxigénico significativamente diferente a la del *Penicillium* toxigénico 1, mientras que la respuesta de *T. asperellum* fue significativamente diferente cuando fue expuesto al *Penicillium* no toxigénico en comparación al *Penicillium* toxigénico 2.

Figura 23

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) *Penicillium* spp. (PT1, PT2 y PNT) en cultivo dual con *T. asperellum* y (B) viceversa



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

3.3. Interacción entre *Aspergillus* y *Trichoderma*

3.3.1. Interacción física

La interacción física entre los aislados de *Aspergillus* obtenidos de granos de café, y *Trichoderma harzianum* fue registrada fotográficamente de forma macroscópica (Figura 24) y microscópica (Figura 25) posterior a los 3 dds debido a que *T. harzianum* había recubierto la superficie del medio de cultivo en las placas control.

Figura 24

Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (TH) a los 3.25 dds a 25 °C

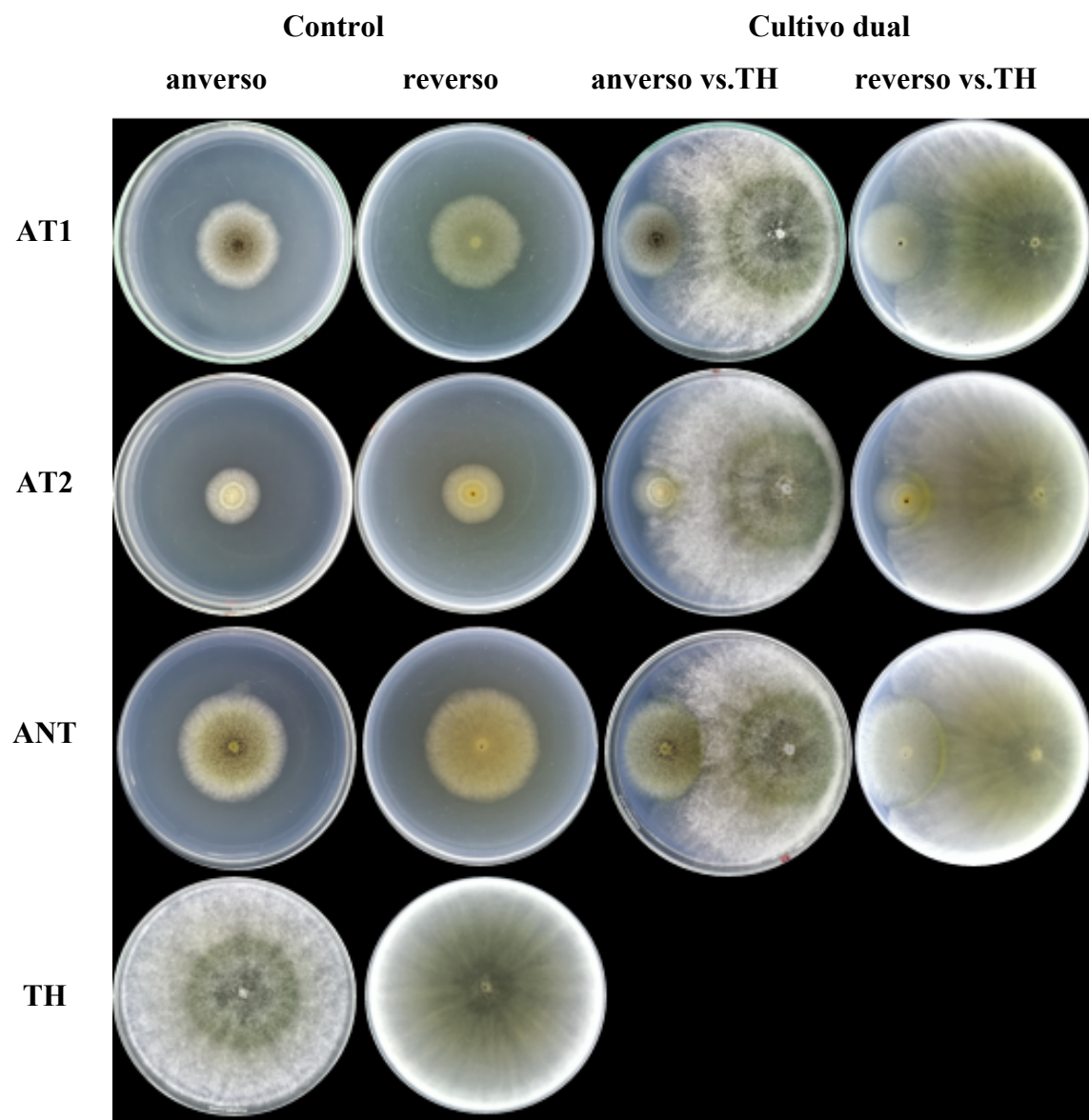
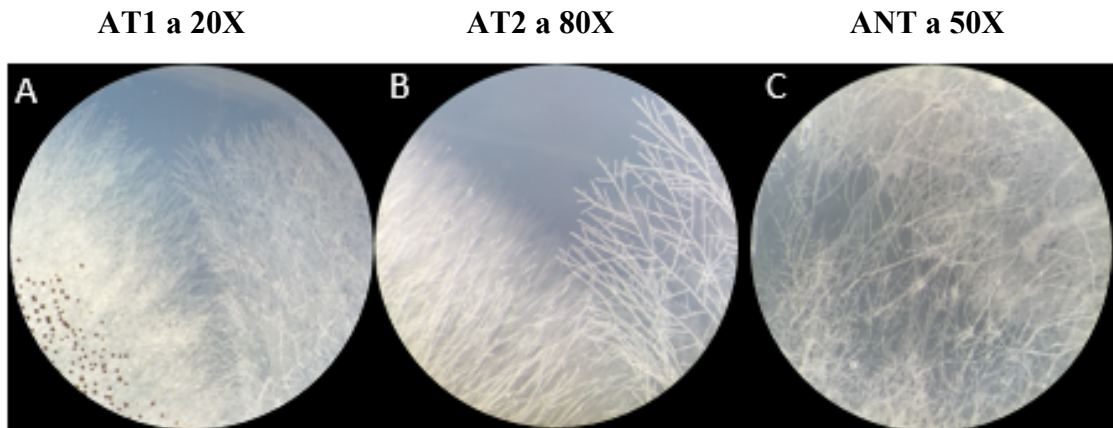


Figura 25

Borde de las colonias de *Aspergillus* toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (TH) a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio



Aparentemente, el *Aspergillus* no toxigénico crece más que el *Aspergillus* toxigénico 1 y, este a su vez, más que el *Aspergillus* toxigénico 2. Las cepas de *Aspergillus* presentaron una apariencia característica que las diferencia.

En el cultivo dual, fue evidente que todos los aislados sufrieron una reducción de su crecimiento, en comparación con las colonias no sometidas al enfrentamiento con hongos distintos. En las imágenes de la Figura 24 es posible verificar la inexistencia de halos de inhibición entre los aislados de *Aspergillus* y *T. harzianum*.

Observando más de cerca, con ayuda de un estereoscopio (Figura 25), fue posible verificar que las hifas de las cepas de *Aspergillus* y *T. harzianum* se entrecruzaban.

La respuesta de los aislados de *Aspergillus* fueron del tipo A o Bii, mientras que la respuesta de *T. harzianum* fue del tipo Bi (Tabla 2).

Con respecto a la interacción de las cepas de *Aspergillus* con *T. asperellum* no fue posible observar halos de inhibición, si no entrecruzamiento (respuesta tipo A) por parte de los aislados *Aspergillus* toxigénico 1 y *Aspergillus* toxigénico 2 (Tabla 2).

Tabla 2

Interacción física de Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y T. asperellum (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore & Dickinson (1976)

Cultivo dual	Escala	Descripción de la respuesta del primer aislado	Escala	Descripción de la respuesta del segundo aislado
AT1 × TH	A	Entremezclados	A	Entremezclados
AT2 × TH	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
ANT × TH	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
AT1 × TA	A	Entremezclados	A	Entremezclados
AT2 × TA	A	Entremezclados	A	Entremezclados
ANT × TA	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)

En el caso del *Aspergillus* no toxigénico hubo entrecruzamiento de hifas (respuesta tipo Bi) con *T. asperellum* (respuesta tipo Bii y A) y Bi para *T. asperellum*, a diferencia de los aislados toxigénicos (Figuras 26 y 27).

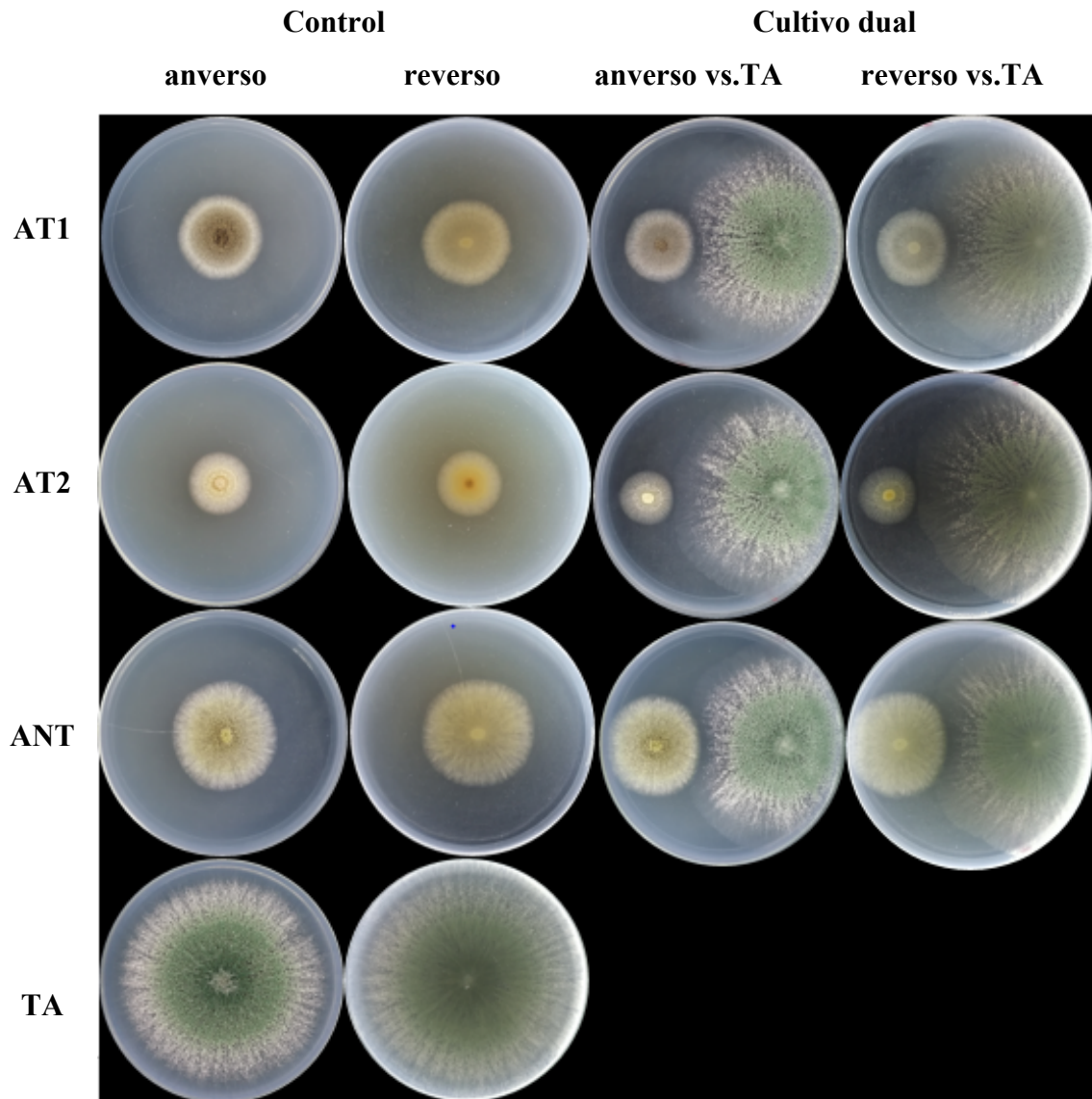
3.3.2. Inhibición de crecimiento micelial

La inhibición del crecimiento de los aislados de *Aspergillus* por parte de *T. harzianum* fue mayor en el caso del aislado no toxigénico, con 30% menor crecimiento con respecto a la colonia no enfrentada (Figura 28A). Con respecto a la respuesta de *T. harzianum*, este presentó también una leve inhibición en el crecimiento, en especial cuando estuvo en presencia del aislado *Aspergillus* toxigénico 1 hasta el primer día, pero en el segundo día fue posible ver una disminución en esa inhibición (Figura 28B).

En el análisis exploratorio de los porcentajes de inhibición del crecimiento, con los diagramas de cajas y guiándose de las medianas, que son los puntos negros, fue posible notar que no existe diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 29A). La respuesta de *Trichoderma harzianum* ante la exposición a *Aspergillus*, también no mostró aparentemente diferencias importantes en el segundo día (Figura 29B).

Figura 26

Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA) a los 3.25 dds a 25 °C



En los diagramas de cajas ya es posible percibir que podría no haber diferencias estadísticas en la respuesta de las diferentes cepas de *Aspergillus* ante *Trichoderma* y viceversa. En la Figura 29 también es posible observar que hubo una variación considerable de los datos. En este experimento, también se observó una variación no esperada pudiendo ser la misma explicación para el experimento anterior. Considerando que los experimentos fueron independientes y realizados en laboratorio, sólo puede explicarse por influencia del error experimental. Los resultados muestran la ausencia de valores atípicos.

Figura 27

Borde de las colonias de *Aspergillus toxigénico 1* (AT1), *toxigénico 2* (AT2) y no *toxigénico* (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) a los 3.25 dds a 25 °C vista en el estereoscopio

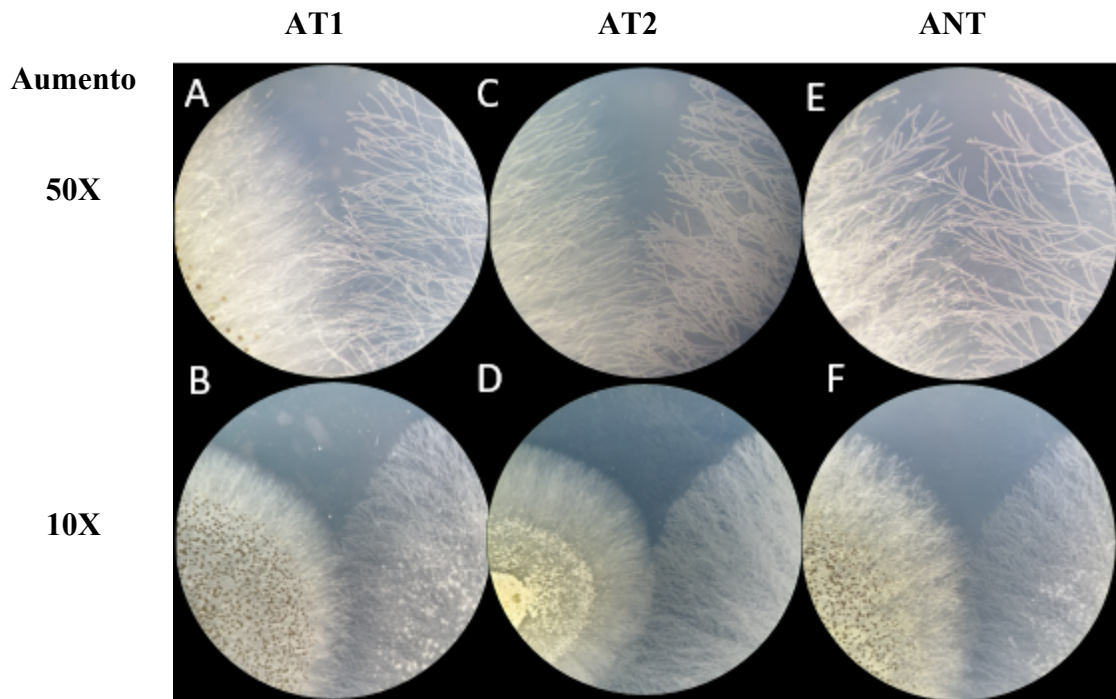


Figura 28

Inhibición de crecimiento micelial de (A) *Aspergillus toxigénico 1* (AT1), *toxigénico 2* (AT2) y no *toxigénico* (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (TH) y (B) *viceversa*, en medio PDA a 25 °C

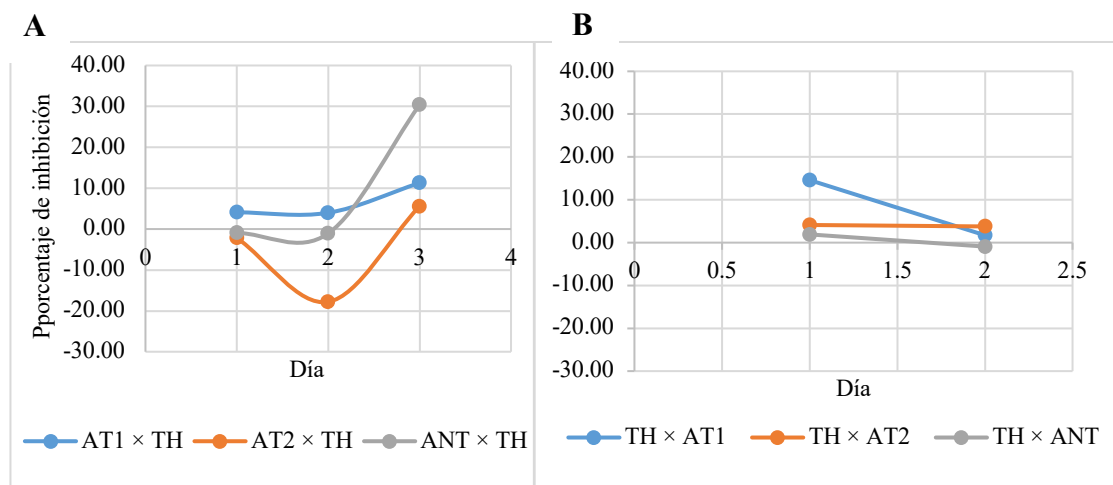
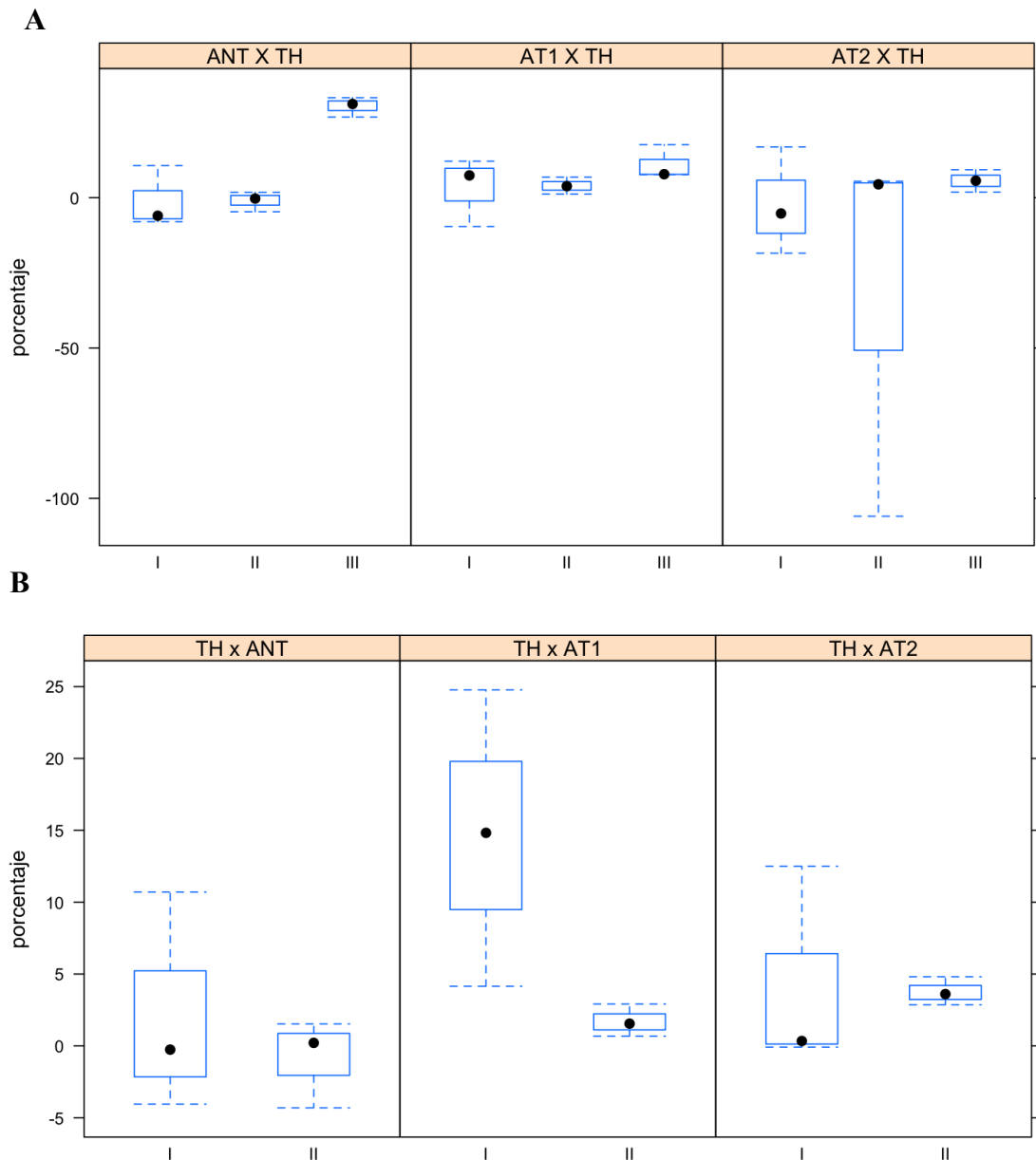


Figura 29

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Aspergillus toxigénico 1* (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos

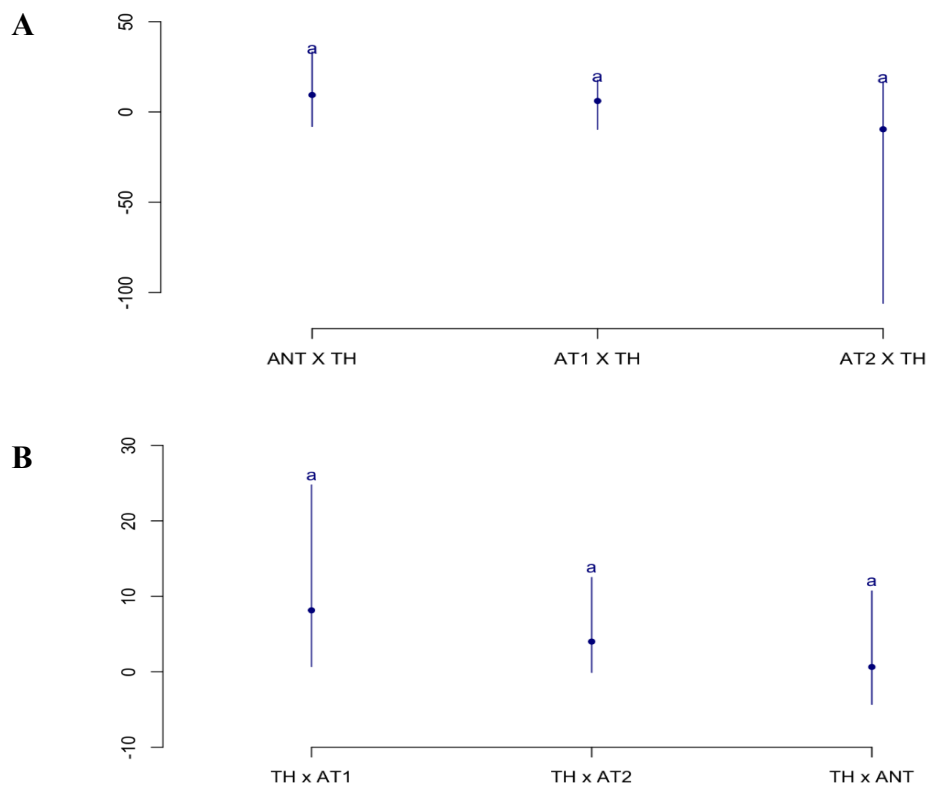


Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

En la Figura 30 se resume la respuesta de los aislados de *Aspergillus* frente a *T. harzianum* y viceversa, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre cepas.

Figura 30

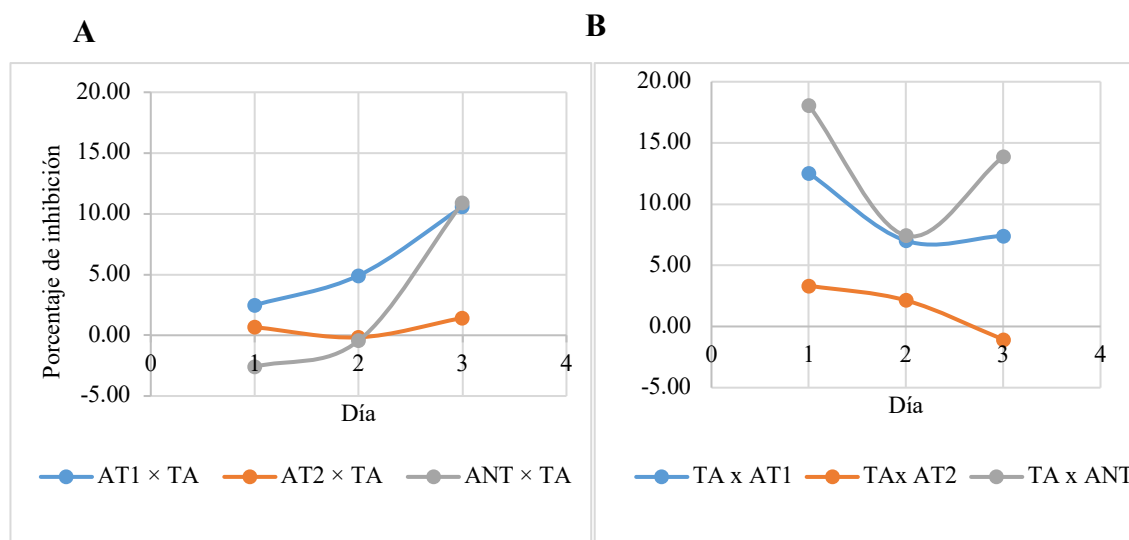
Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Aspergillus* toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación



La respuesta de crecimiento micelial de los aislados de *Aspergillus* frente a *T. asperellum* varió de 2% a más del 10%. Este último porcentaje de inhibición fue el mostrado por *Aspergillus* toxigénico 1 (Figura 31A), mientras que *T. asperellum* fue a su vez inhibido entre 7% y 13% por las cepas *Aspergillus* (Figura 31B). Así mismo, en el diagrama de cajas (Figura 32A) se observa de manera general, una tendencia a aumentar el porcentaje de inhibición del crecimiento para los aislados de *Aspergillus* no toxigénico y toxigénico 1.

Figura 31

Inhibición de crecimiento micelial de (A) *Aspergillus toxigénico 1* (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C



Hubo una mayor variación en la última evaluación para ambos y una tendencia a disminuir para el caso del aislado de *Aspergillus* toxigénico 2 con variación mayor en la primera evaluación, probablemente debido a la sensibilidad de las evaluaciones con el vernier, que depende también de una buena observación por parte del evaluador.

Se presentó una amplia variación en el *T. asperellum* expuesto a las 3 aislados de *Aspergillus* en los primeros días de evaluación, la inhibición mostrada en los primeros días se fue diluyendo en función al tiempo frente al aislado de *Aspergillus* toxigénico 1 y toxigénico 2 y se conservó frente al aislado no toxigénico (Figura 32B).

El análisis de variancia mostró diferencias en el caso de la respuesta de *T. asperellum*. Cuando fue expuesto al *Aspergillus* no toxigénico (Figura 33A) *T. asperellum* mostró la máxima inhibición en comparación a los otros dos aislados, seguido por el *Aspergillus* toxigénico 1 y el toxigénico 2 donde la inhibición se iba diluyendo respectivamente (Figura 33B). La respuesta de *T. asperellum* fue significativamente diferente ante cada aislado de *Aspergillus*.

Figura 32

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Aspergillus toxigénico 1* (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* y (B) viceversa, a 25 °C y con los días de evaluación indicados en números romanos

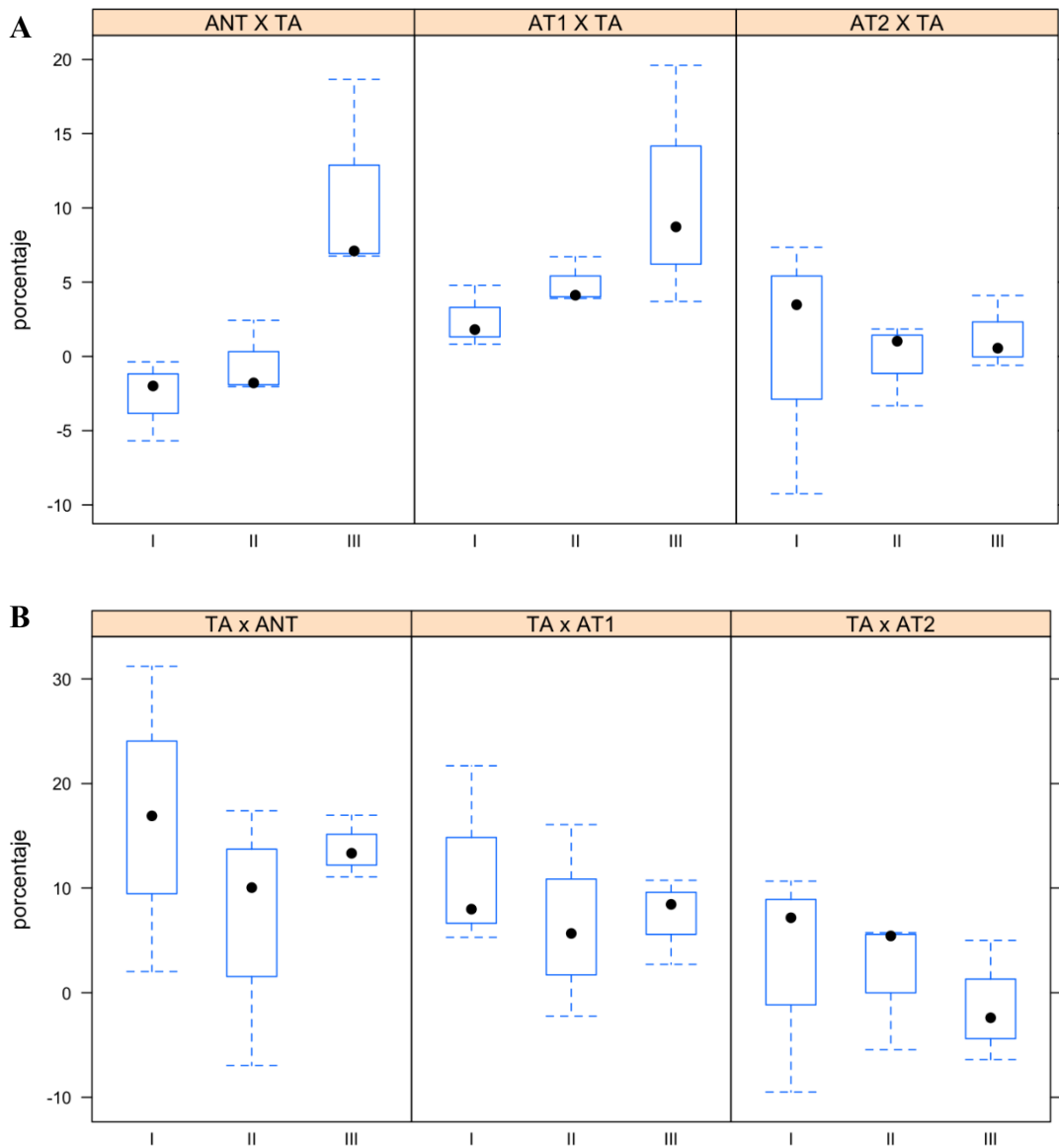
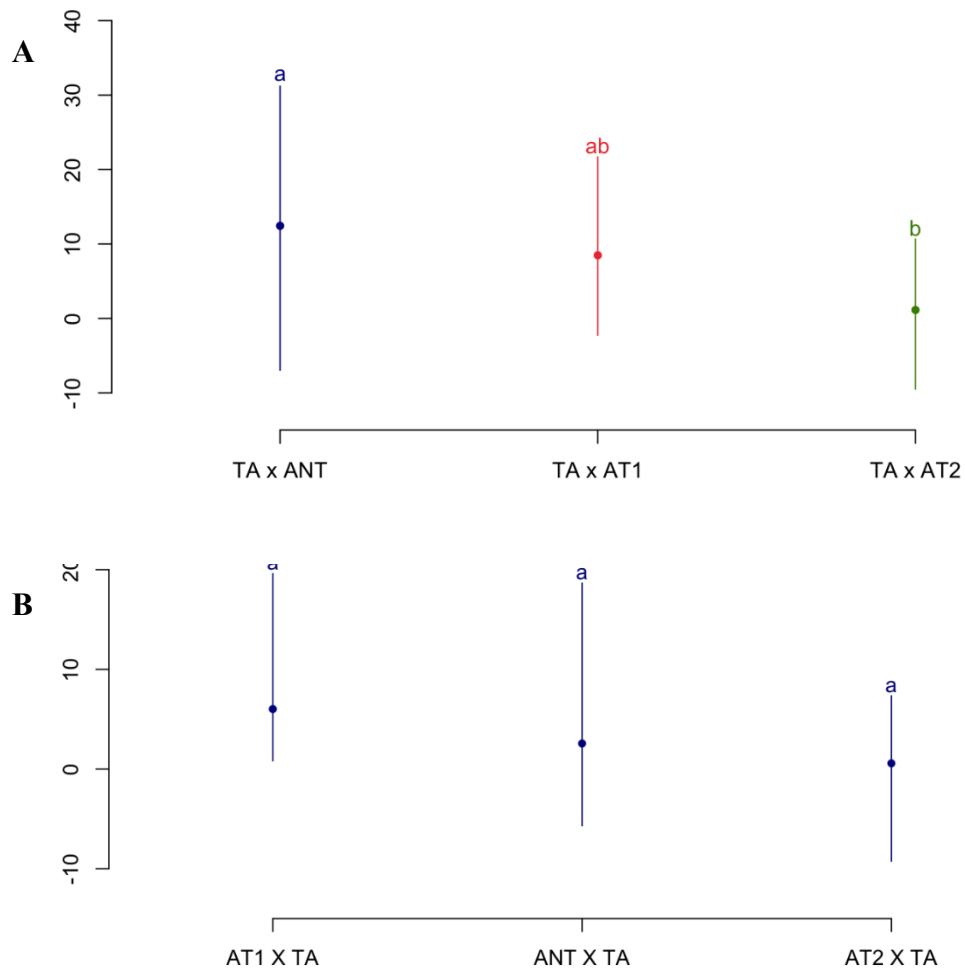


Figura 33

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum y (B) viceversa, a 25 °C e independiente del día de evaluación



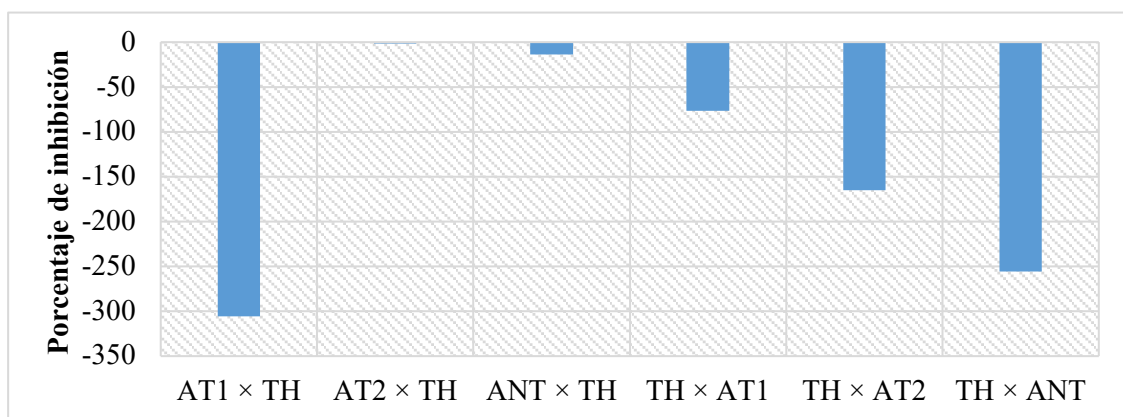
Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

3.3.3. Inhibición de la producción de esporas

Trichoderma harzianum incentivó la producción de esporas de *Aspergillus* toxigénico 1 en más del 300%. Por su parte, *Aspergillus* también causó un incentivo en la producción de esporas entre 70% y 250%, dependiendo de la cepa de *Aspergillus* (Figura 34).

Figura 34

Inhibición de esporulación de Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C



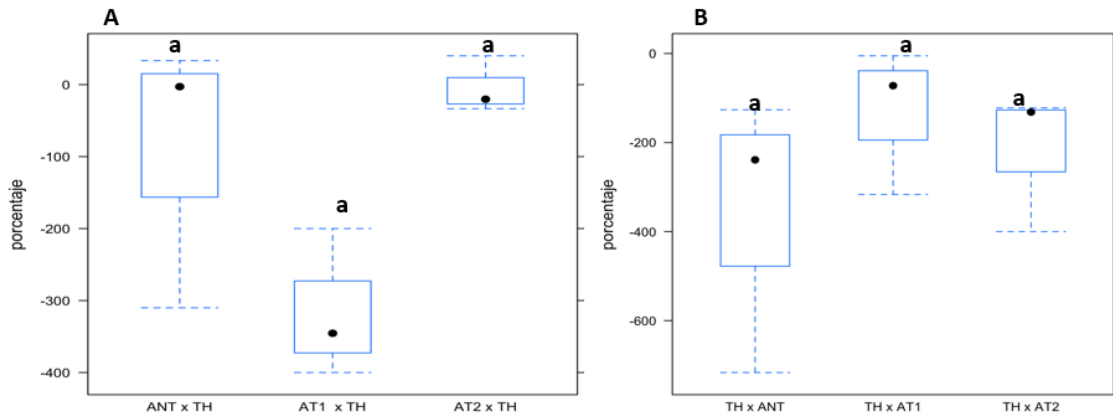
Los resultados no muestran diferencias significativas entre los tratamientos de *T. harzianum* y viceversa en cuanto al porcentaje de inhibición de esporulación. No existe presencia de valores atípicos y la mayor variación lo muestra *Aspergillus* no toxigénico confrontado con *T. harzianum* y viceversa (Figura 35A).

La agrupación de los datos y medianas en la Figura 35 lleva a pensar en posibles diferencias estadísticas en el porcentaje de inhibición de la esporulación. Sin embargo, el análisis exploratorio con el diagrama de cajas muestra bastante variación en los resultados y el análisis de variancia indicó ausencia de diferencias significativas cuando las cepas de *Aspergillus* están confrontadas a *T. harzianum* y viceversa.

Existió mayor variación cuando *T. harzianum* estuvo confrontado con *Aspergillus* no toxigénico en comparación a los otros 2 tratamientos (Figuras 34 y 35). Con respecto a la interacción entre las cepas de *Aspergillus* con *T. asperellum*, el *Aspergillus* toxigénico 1 fue el único afectado, con más de 4%.

Figura 35

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) *Aspergillus toxigénico 1 (AT1)*, toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Por el contrario, los aislados de *Aspergillus* toxigénico 2 y no toxigénico mostraron incentivo de esporulación de más de 40 y 115%, respectivamente. Con respecto a *T. asperellum*, presentó un incentivo de esporulación de 9% frente al aislado no toxigénico, solo mostrando inhibición frente a los *Aspergillus* toxigénico 1 y 2 inferiores al 4% (Figura 36).

Figura 36

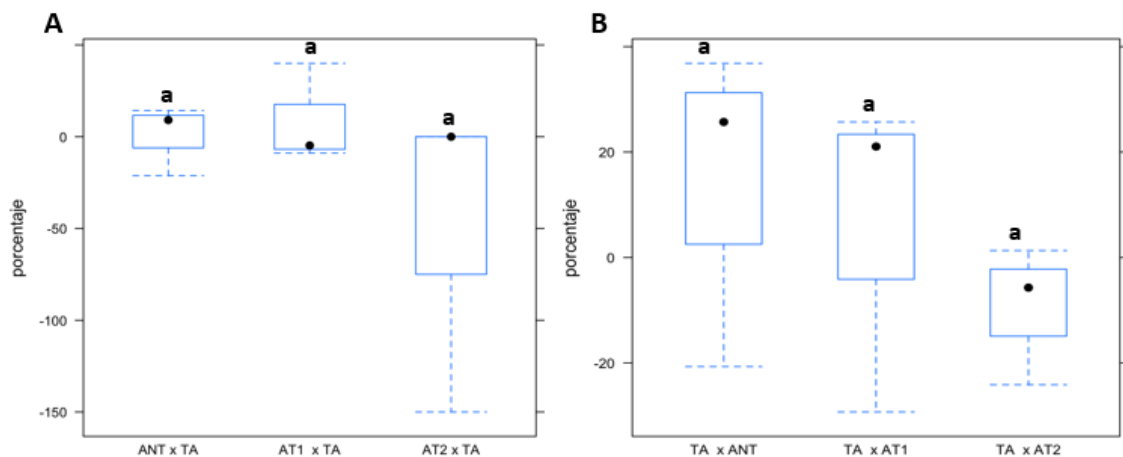
Inhibición de esporulación de *Aspergillus* toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y viceversa, en medio PDA a 25 °C



Los diagramas de cajas no mostraron la presencia de valores atípicos y no hubo aparentes diferencias en el porcentaje de inhibición de esporulación entre las cepas de *Aspergillus* ante la presencia de *T. asperellum* (Figura 37A). *Aspergillus* toxigénico 2 muestra la mayor variación en comparación a los otros dos tratamientos. La respuesta de *T. asperellum* frente a *Aspergillus* presentó un incentivo de esporulación de forma coincidente con el aislado toxigénico 2 de *Aspergillus*, demostrando la capacidad que tienen ambos de incentivar la producción de esporas de forma recíproca (Figura 37B).

Figura 37

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de la esporulación de (A) *Aspergillus* toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* y (B) viceversa, a 25 °C



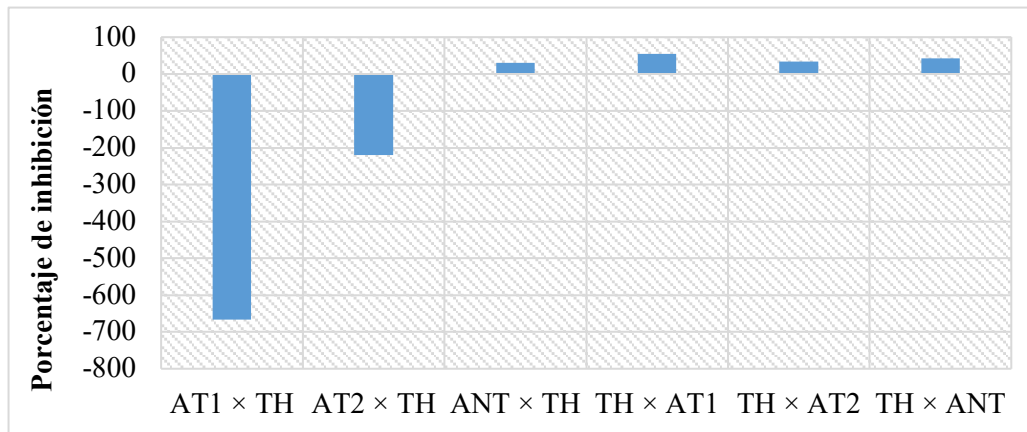
Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

3.3.4. Inhibición de la germinación de esporas

En presencia de *Trichoderma harzianum*, el *Aspergillus* toxigénico 1 también presentó un incentivo con una germinación de más del 600%, seguido de lejos por el *Aspergillus* toxigénico 2 con más de 200% de mayor germinación de esporas (Figura 38).

Figura 38

Inhibición de germinación de Aspergillus toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C

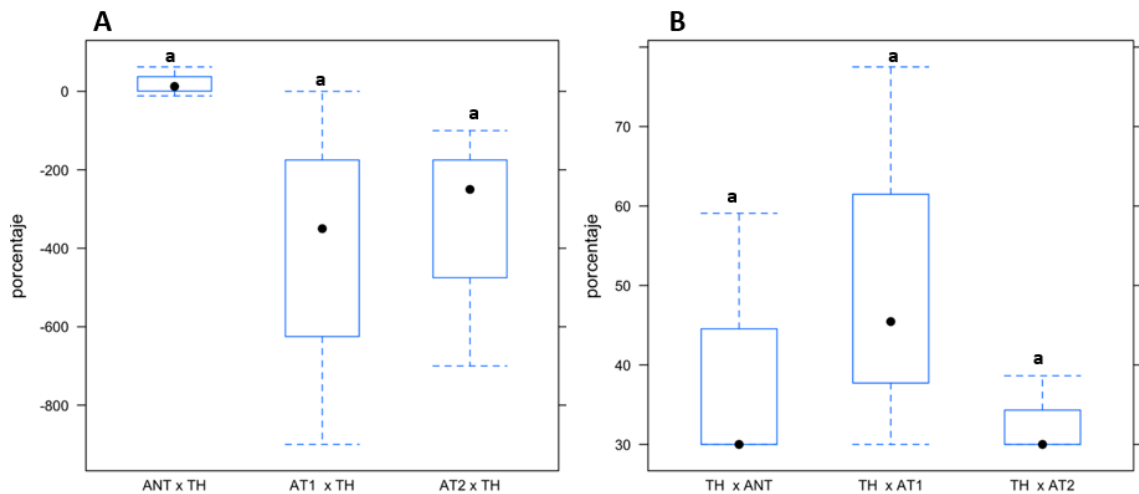


El análisis exploratorio de datos permite verificar un incentivo del porcentaje de germinación de los aislados de *Aspergillus* frente a *T. harzianum*, mostrando los niveles más altos de incentivo los aislados de *Aspergillus* toxigénico 1 y el toxigénico 2 (Figura 39A). *T. harzianum* mostró la mayor inhibición de germinación frente al aislado del *Aspergillus* toxigénico 1 (Figura 39B).

Las respuestas contrastantes podrían llevar a creer que estas son significativas. Sin embargo, el análisis de variancia mostró ausencia de diferencias estadísticas y esto podría deberse en parte a la alta variabilidad en los datos encontrados. En presencia de *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus* toxigénico 2 mostró incentivo de germinación de 100%.

Figura 39

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) *Aspergillus* spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con *T. harzianum* y (B) viceversa



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Los otros dos aislados presentaron inhibición de germinación de esporas inferiores al 10% (Figura 40). El análisis exploratorio de datos permite observar variación para el aislado de *Aspergillus* toxigénico 2 frente a *T. asperellum* (Figura 41A) en comparación a los otros dos tratamientos.

Figura 40

Inhibición de germinación de *Aspergillus* toxigénico 1 (AT1), toxigénico 2 (AT2) y no toxigénico (ANT) en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y viceversa, en medio PDA a 25 °C

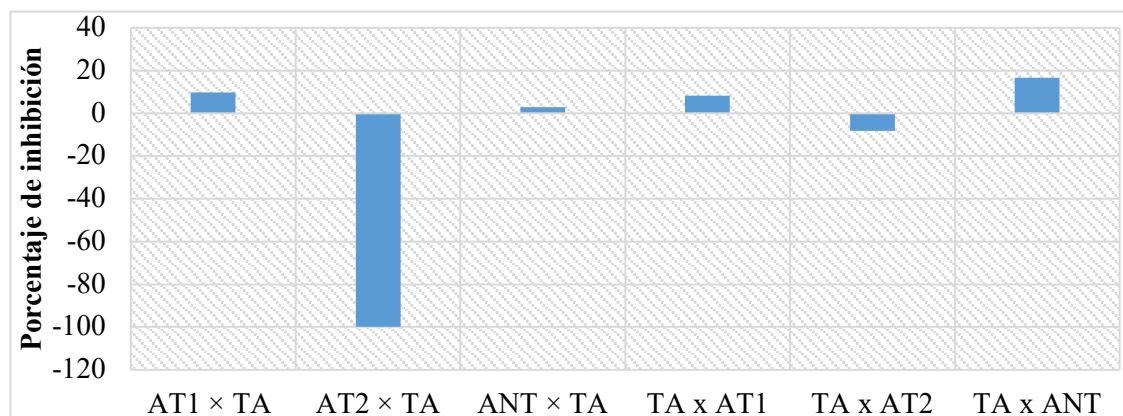
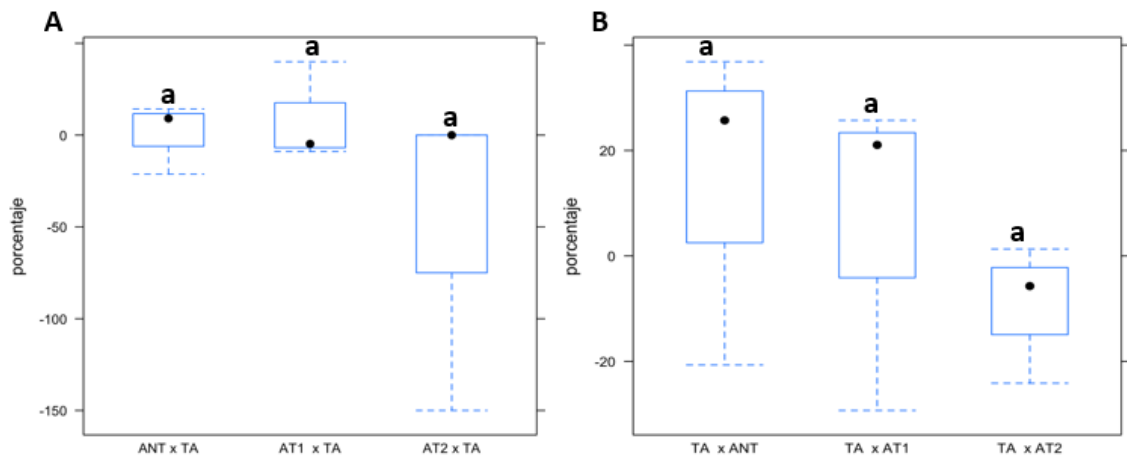


Figura 41

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición de germinación de (A) *Aspergillus* spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con *T. asperellum* y (B) viceversa



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

La respuesta de *T. asperellum* frente a los aislados de *Aspergillus* mostró incentivo de esporulación frente al *Aspergillus* toxigénico 2 (Figura 41B). El análisis de variancia mostró ausencia de diferencias estadísticas y esto podría deberse en parte a la alta variabilidad en los datos encontrados.

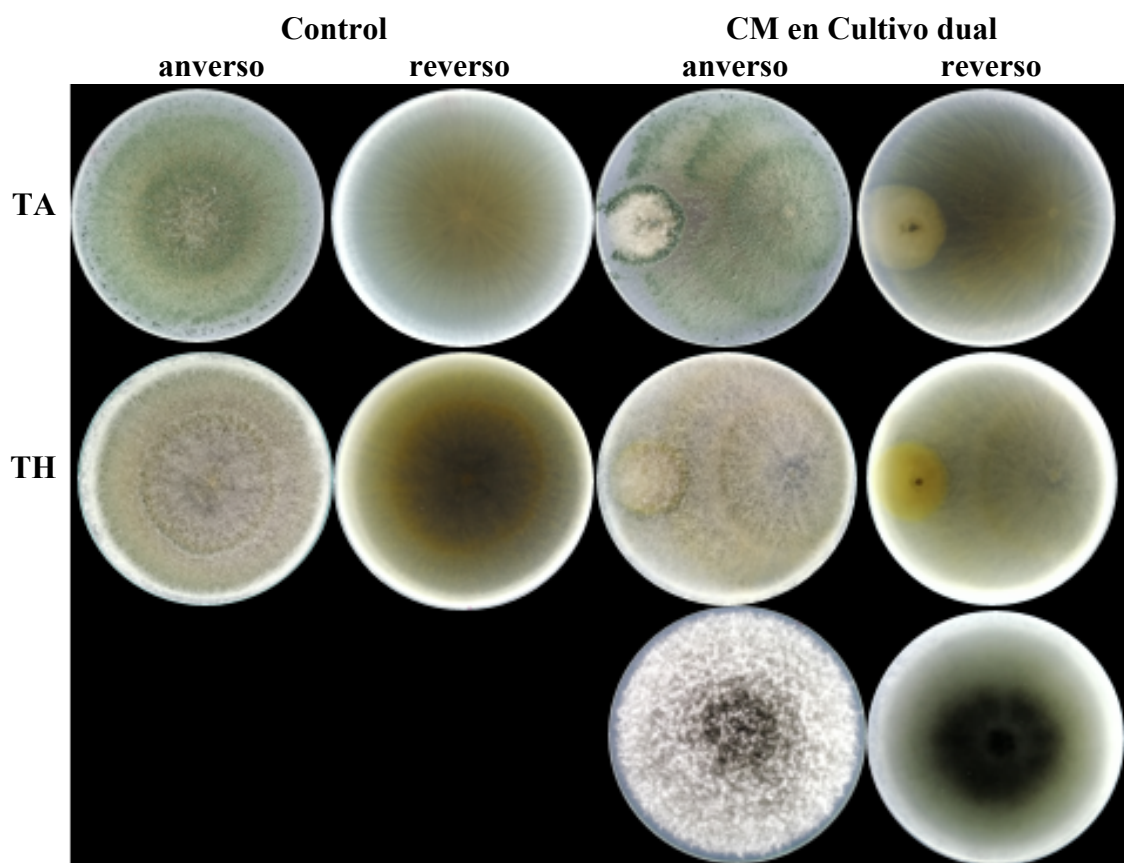
3.4. Interacción entre *Colletotrichum* y *Trichoderma*

3.4.1. Interacción física

En las Figuras 42 y 43 se resumen las imágenes de las colonias individuales y en cultivos duales de los aislados de *Colletotrichum asianum* y *Trichoderma*. Es evidente la colonización que muestran ambas especies de *Trichoderma* frente al aislado de *Colletotrichum asianum* aislado de mango, se observa sobreposición y esporulación también mostrándose aparentemente más agresivo *T. harzianum*.

Figura 42

Colletotrichum asianum aislado de mango (CM), en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y *Trichoderma harzianum* (TH) y a los 12.25 dds a 25 °C



La respuesta de los aislados de *Colletotrichum asianum* fueron del tipo Bii, mientras que la respuesta de *T. harzianum* fue del tipo Bi donde se aprecia de forma evidente la colonización que muestra *Trichoderma* spp. sobre los aislados. Esta respuesta puede ser más notoria en función al tiempo de la evaluación (Tabla 3).

Figura 43

Borde de las colonias de *Colletotrichum asianum* de mango (CM), en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y *Trichoderma harzianum* (TH) a los 12.25 dds a 25 °C y aumento de 10X

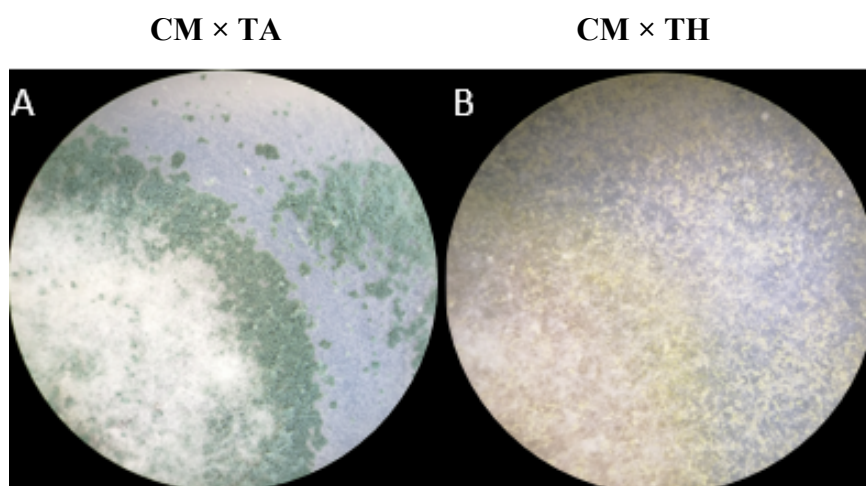


Tabla 3

Interacción física de *Colletotrichum* sp. (CR) y *C. asianum* (CM) en cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (TH) y *T. asperellum* (TA) en medio PDA, a 25 °C y de acuerdo con la escala de Skidmore y Dickinson (1976)

Cultivo dual	Escala	Descripción de la respuesta del primer aislado	Escala	Descripción de la respuesta del segundo aislado
CM x TA	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
CM x TH	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)
CR x TA	A	Entremezclados	A	Entremezclados
CR x TH	Bii	Entremezclados (cubierto)	Bi	Entremezclados (sobrepuesto)

En la interacción entre el *Colletotrichum* sp. y las especies de *Trichoderma* se aprecia una diferencia de longitud de radios de la colonia de *Colletotrichum* que está siendo confrontada, mostrando limitado crecimiento del radio en dirección opuesta al *Trichoderma asperellum* que este no se sobrepone. No obstante, la respuesta de *Trichoderma harzianum* es sobrepone y colonizar al *Colletotrichum* (Figura 44 y 45).

Figura 44

Colletotrichum sp. aislado de rocoto (CR), en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y *Trichoderma harzianum* (TH) y a los 5.25 dds a 25 °C

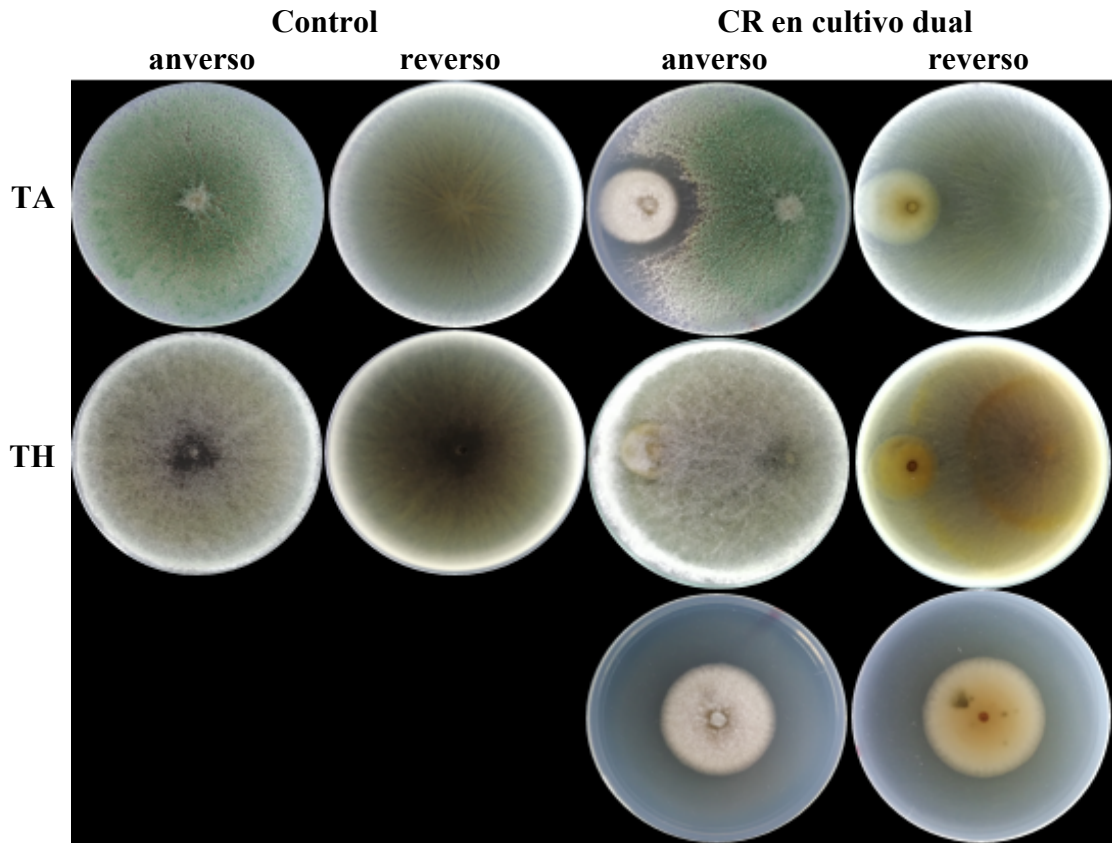
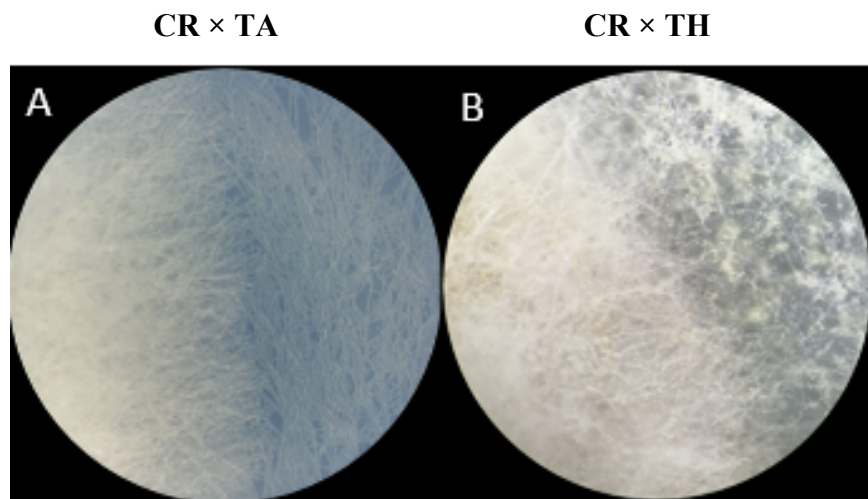


Figura 45

Borde de las colonias de *Colletotrichum* sp. aislado de rocoto (CR), en cultivo dual con *Trichoderma asperellum* (TA) y *Trichoderma harzianum* (TH) 5.25 dds a 25 °C y aumento de 10X



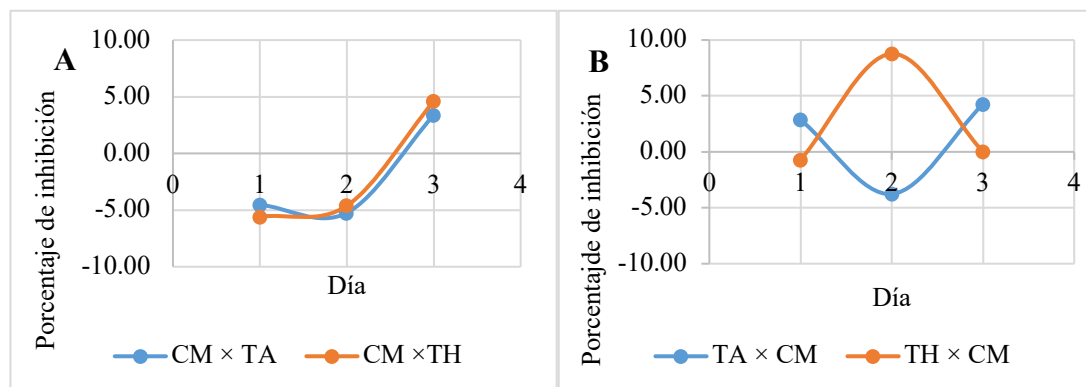
La respuesta de los aislados de *Colletotrichum* sp. fueron del tipo A y Bii, mientras que la respuesta de *T. harzianum* fue del tipo Bi y A (Tabla 3).

3.4.2. Inhibición de crecimiento micelial

En general, los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los aislados de *Colletotrichum* y *Trichoderma* fueron bajos (Figuras 46 y 47), con excepción de la interacción *Colletotrichum* sp. frente a *T. harzianum*, con más del 8% de inhibición (Figura 47A).

Figura 46

Inhibición de crecimiento micelial de (A) Colletotrichum asianum de mango (CM) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C



En el análisis exploratorio de los porcentajes de inhibición del crecimiento, con los diagramas de cajas y guiándose de las medianas, que son los puntos negros, lleva a pensar en que probablemente no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figuras 48 y 49). Ambos aislados de *Colletotrichum* frente a *T. harzianum* mostraron inhibición, siendo que esta inhibición aumentó conforme pasaban los días.

Figura 47

Inhibición de crecimiento micelial de (A) Colletotrichum sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH) y (B) viceversa, en medio PDA a 25 °C

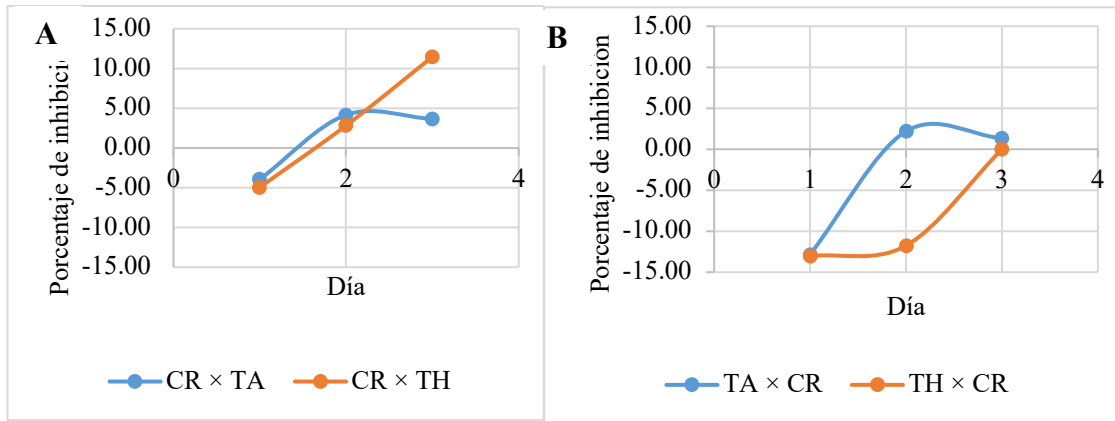
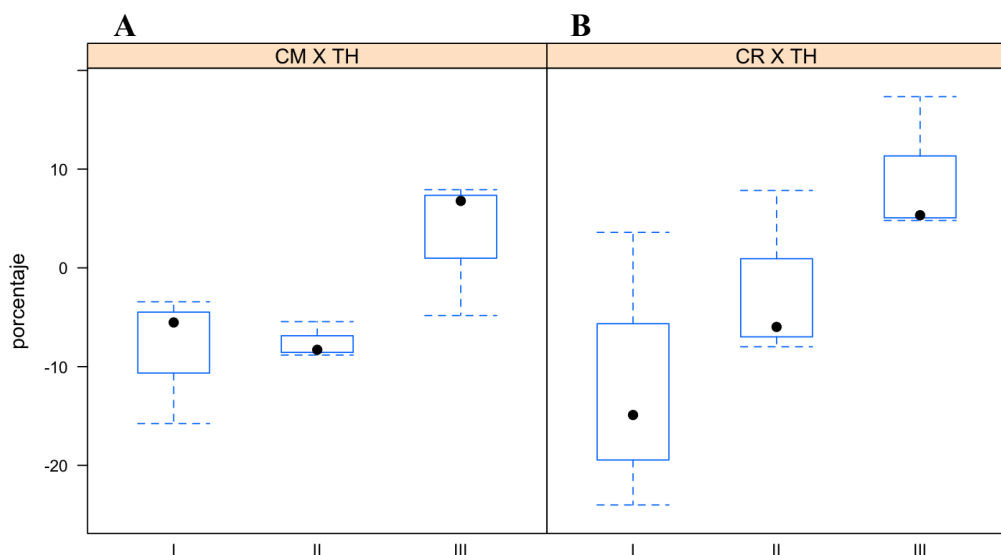


Figura 48

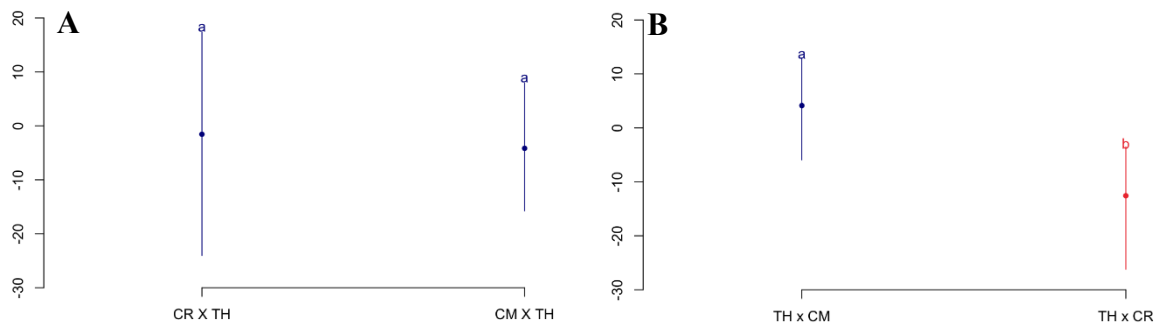
Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) Colletotrichum asianum de mango (CM) y (B) Colletotrichum sp. de rocoto (CR), ambos en cultivo dual con T. harzianum (TH), a 25 °C



Así mismo, no se apreció valores atípicos y *Colletotrichum sp.* frente a *T. harzianum* mostró la mayor variación en el primer día de evaluación en comparación al otro aislado.

Figura 49

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Colletotrichum* sp. de rocoto (CR) y *Colletotrichum asianum* de mango (CM) y en cultivo dual con *T. harzianum* y (B) viceversa, a 25 °C



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Los diagramas de cajas del porcentaje de inhibición de crecimiento cuando se compara *T. harzianum* y su respuesta frente a los dos aislados de *Colletotrichum* muestran existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. En esta interacción se puede apreciar que la inhibición de crecimiento de *T. harzianum* varía según al aislado de *Colletotrichum* siendo, en realidad no muy afectado por *C. asianum* e incentivado por *Colletotrichum* sp. (Figura 50).

Los resultados muestran que los aislados de *Colletotrichum* no fueron inhibidos en su crecimiento de forma notable por *T. asperellum* y no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 51 y 52). Al comparar la respuesta de *Trichoderma asperellum* frente a los dos aislados de *Colletotrichum* a través del diagrama de cajas se muestra la mayor variación en el primer día de evaluación cuando está frente a *Colletotrichum* sp. No se aprecian valores atípicos y el porcentaje de inhibición parece mantenerse estable entre el segundo y tercer día (Figura 53 B). En el análisis estadístico, teniendo en cuenta el factor tratamiento, muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 52 B). Sin embargo, cuando se somete a un análisis considerando el factor día, se aprecian diferencias significativas dándonos a entender que la respuesta de *T. asperellum* en función a los días es muy diferente (Figura 56).

Figura 50

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* en cultivo dual con (A) *Colletotrichum asianum* de mango (CM) y (B) *Colletotrichum* sp. de rocoto (CR), en medio PDA a 25 °C

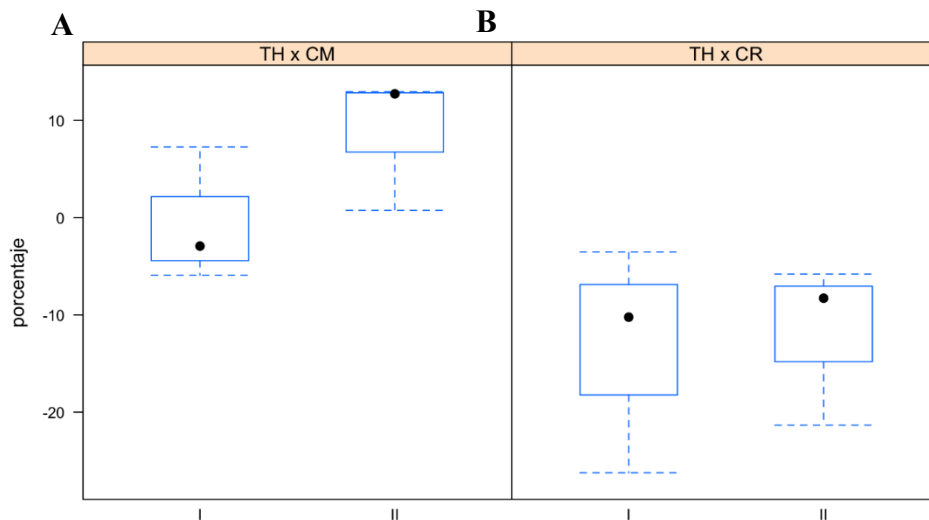


Figura 51

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de (A) *Colletotrichum* de mango (CM) en cultivo dual con *T. asperellum* (TA) y (B) *Colletotrichum* de rocoto en cultivo dual con *T. asperellum* (TA), a 25 °C

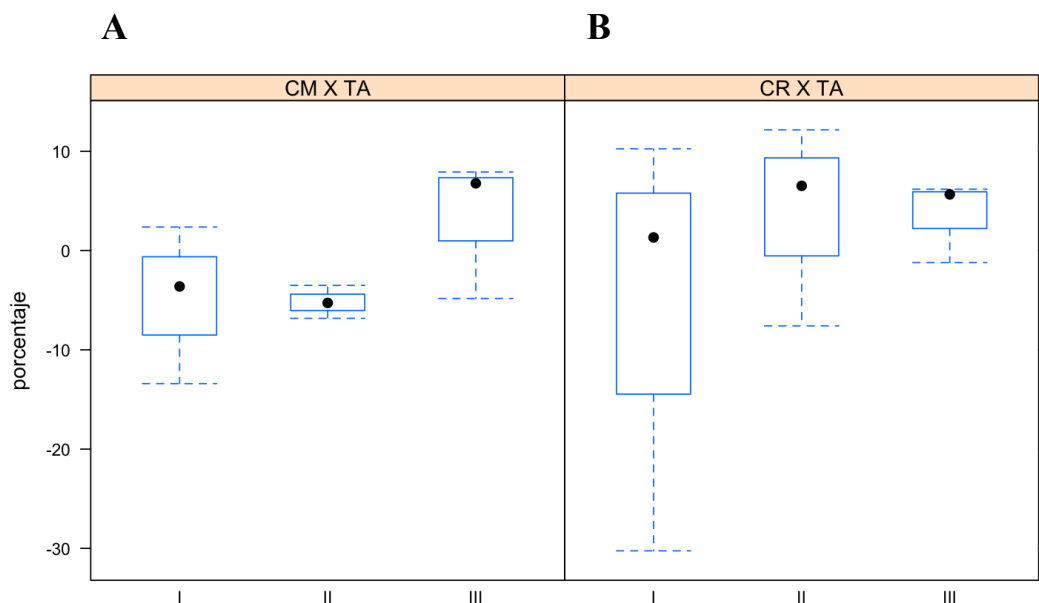
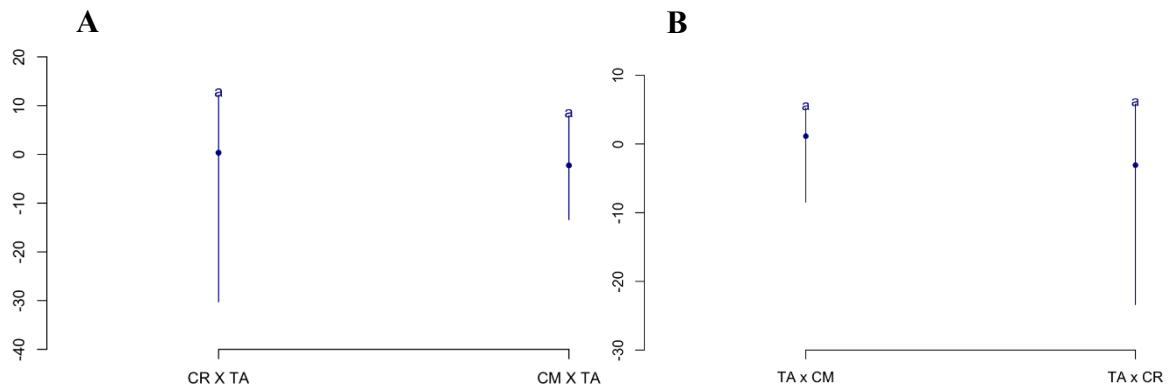


Figura 52

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp. de rocoto* (CR) y *Colletotrichum asianum* de mango (CM) y en cultivo dual con *T. asperellum* (TA), a 25 °C



Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

Figura 53

Diagrama de cajas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma asperellum* (TA) en cultivo dual con (A) *Colletotrichum asianum* de mango (CM) y (B) *Colletotrichum sp. de rocoto* (CR), en medio PDA a 25 °C

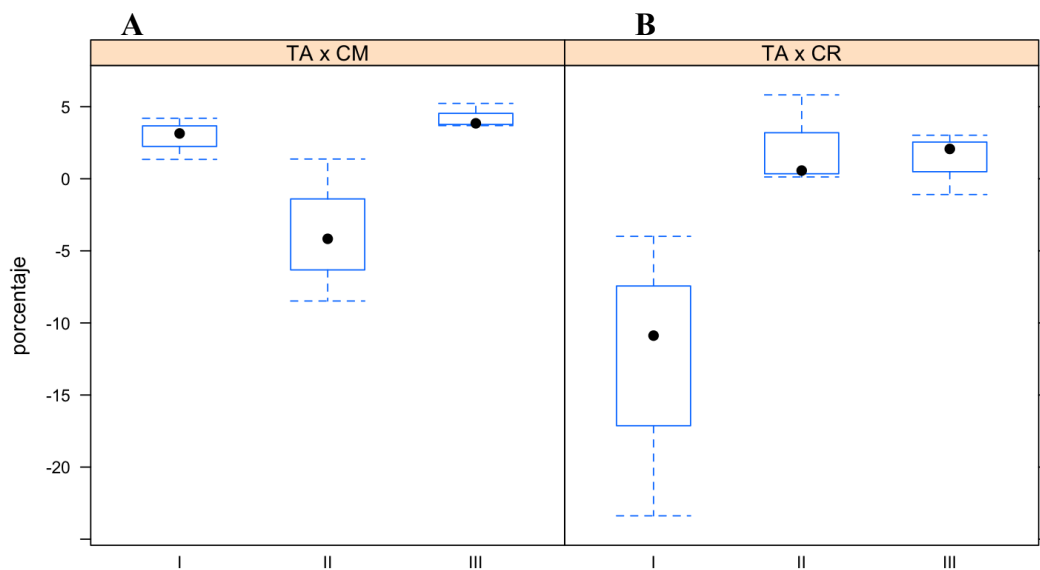
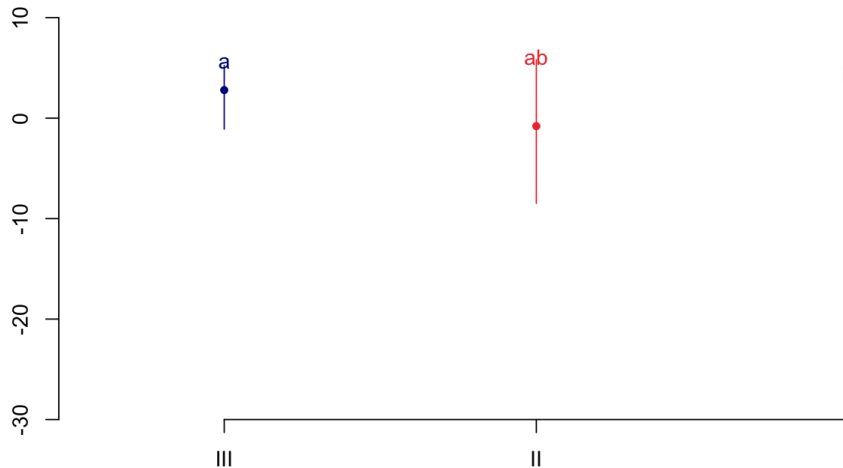


Figura 54

Grupos y rangos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de Trichoderma asperellum frente a dos aislados de Colletotrichum teniendo en cuenta el factor día



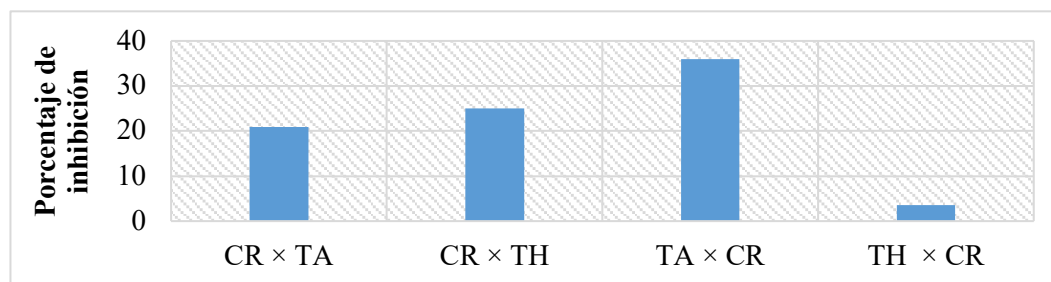
Nota. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a un 0.05 de probabilidad, de forma independiente para A y B.

3.4.3. Inhibición de la producción de esporas

A pesar de los resultados anteriores, las cepas de *Trichoderma* presentaron inhibición de 25% de la producción de esporas cuando estuvo en presencia de *Colletotrichum* sp. de rocoto. *T. asperellum* muestra mayor inhibición entre las dos cepas de más del 30%

Figura 55

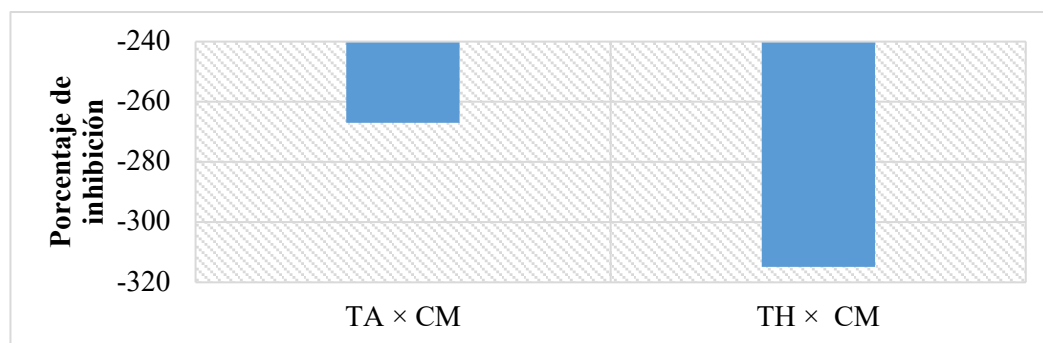
Inhibición de esporulación de Colletotrichum sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH) y viceversa, en medio PDA a 25 °C



Para el aislado de *Colletotrichum* de mango no se logró encontrar esporas y debido a ello no se muestran los resultados de la interacción con las cepas de *Trichoderma*. Las dos cepas de *Trichoderma* muestran un incentivo en la producción de esporas, con más de 300% para *T. harzianum* y más de 260% para *T. asperellum* (Figura 56)

Figura 56

Inhibición de esporulación de Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH) en cultivo dual con Colletotrichum asianum de mango (CM), en medio PDA a 25 °C



3.4.4. Inhibición de la germinación de esporas

La inhibición de germinación de esporas de *Colletotrichum* de rocoto fue observada para ambas cepas de *Trichoderma*, alcanzando la máxima inhibición frente a *T. asperellum* con más de 40%. El antagonista tuvo una respuesta contraria, incentivando su germinación en ambas cepas, con más de 6% en *T. asperellum* (Figura 57).

La germinación para el aislado de *Colletotrichum* de mango no pudo ser evaluada debido a que no se encontró esporas. Sin embargo, al igual que en el anterior caso, ambos biocontroladores mostraron un incentivo de germinación siendo *T. harzianum* quien tuvo más de 130%, seguido del *T. asperellum* con más del 80% (Figura 57). Debido a que no se encontró esporas para el aislado de *Colletotrichum* de mango y, además, las evaluaciones para cada aislado fueron llevadas a cabo en tiempos diferentes, con más de 7 días de diferencia, no fue viable hacer comparaciones de los porcentajes de inhibición de esporulación entre los aislados. No obstante, se presentan los resultados del porcentaje de inhibición de germinación de esporas de los aislados de *Trichoderma*, teniendo en

cuenta que se utilizó el mismo método de evaluación, pero es importante tener en cuenta que fue en diferentes tiempos de cultivo del microorganismo (Figura 58).

Figura 57

Inhibición de germinación de Colletotrichum sp. de rocoto (CR) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH), en medio PDA a 25°C

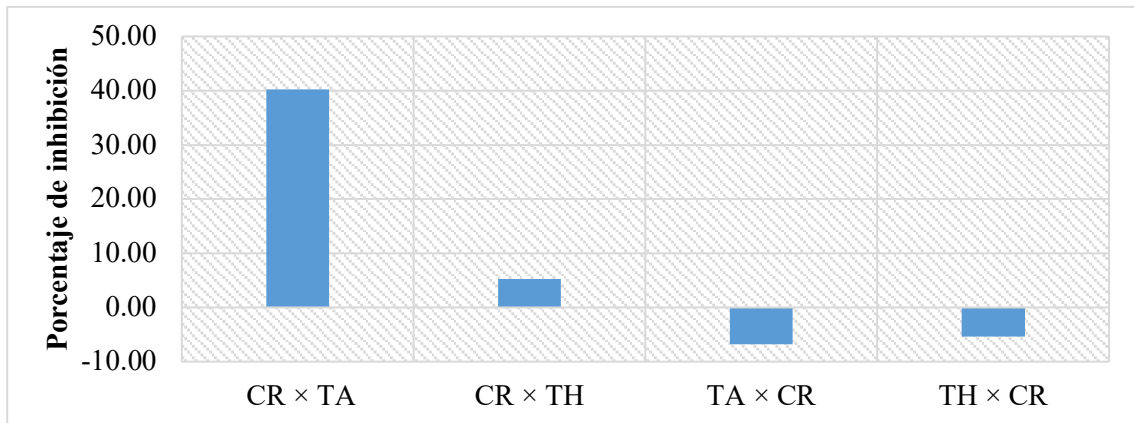
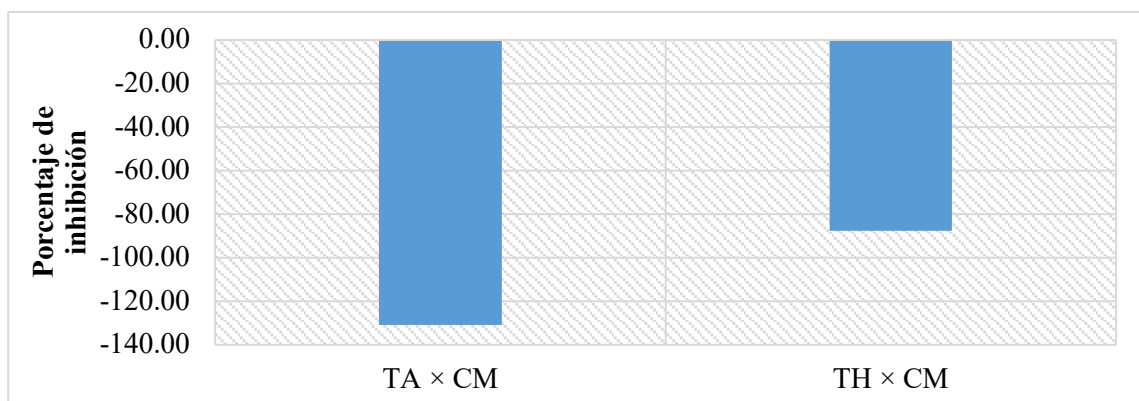


Figura 58

Inhibición de la germinación de Trichoderma asperellum (TA) y T. harzianum (TH) en cultivo dual con Colletotrichum asianum (CM) en medio PDA a 25 °C



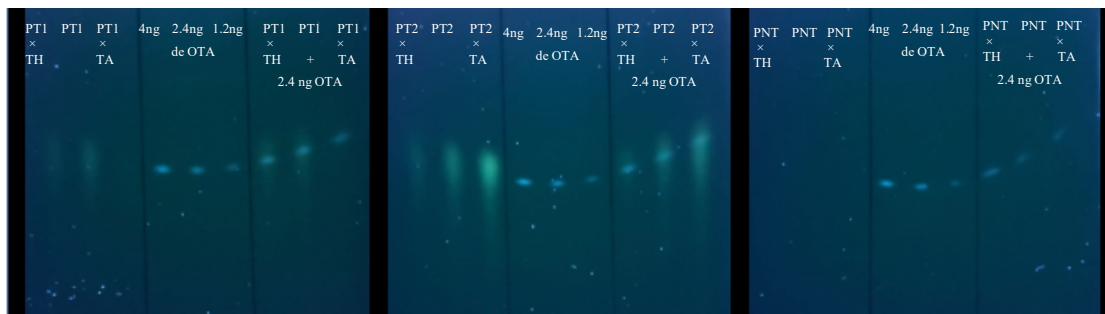
3.5. Efecto de la interacción en la producción de micotoxinas

El análisis de cromatografía en capa delgada muestra la probable producción de citrinina por parte de los aislados de *Penicillium* toxigénicos. De esta forma se confirma que los aislados toxigénicos son realmente especies con el potencial de producir toxinas. Cuando

el *Penicillium* toxigénico 1 está confrontado con *T. harzianum* la producción de la toxina disminuye en comparación al control, y al estar frente a *T. asperellum* no se verifica producción de la toxina. Ocurre lo contrario para el *Penicillium* toxigénico 2 que al estar frente a *T. asperellum* aumenta la producción de toxina, pero disminuye frente a *T. harzianum*. No se observa la producción de toxinas por el *Penicillium* no toxigénico (Figura 59). Aparentemente, el *Aspergillus* toxigénico 1 produce bajas cantidades de micotoxinas y la técnica del TLC no sería suficientemente sensible como para detectarla (Figura 60).

Figura 59

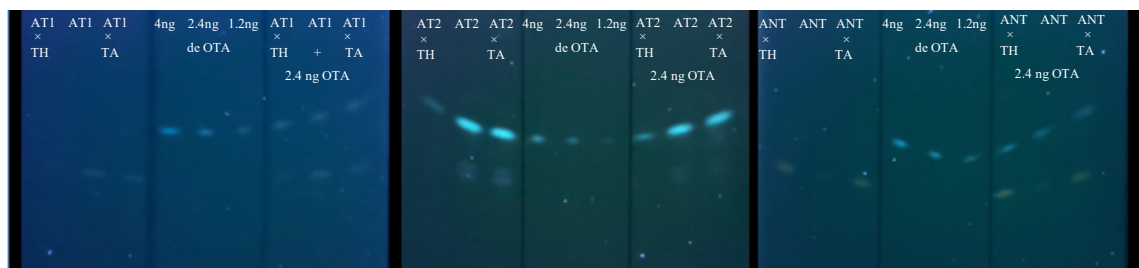
Perfil de metabolitos en placas de Cromatografía de Capa Delgada (TLC), de Penicillium toxigénico 1 (PT1), Penicillium toxigénico 2 (PT2), Penicillium no toxigénico (PNT) con y sin exposición a Trichoderma harzianum y a T. asperellum usando el estándar de OTA en diferentes concentraciones para comparación



Nota. 2.4 ng del estándar de OTA fue incluido en las muestras 7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 26, 27.

Figura 60

Perfil de metabolitos en placas de Cromatografía de Capa Delgada (TLC), de Aspergillus toxigénico 1 (AT1), Aspergillus toxigénico 2 (AT2), Aspergillus no toxigénico (ANT) con y sin exposición a Trichoderma harzianum y a T. asperellum usando el estándar de OTA en diferentes concentraciones para comparación



Nota. 2.4 ng del estándar de OTA fue incluido en las muestras 7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 26, 27.

IV. DISCUSIÓN

La investigación realizada inicialmente tuvo su origen en el interés por explorar el campo del control biológico de patógenos. Entre el 2021 y el 2022 se hicieron recolecciones que permitieron aislar hongos deterioradores de granos de café en postcosecha. Estos fueron caracterizados y pudo verificarse que algunos presentaban potencial para producir toxinas, específicamente aflatoxinas u ocratoxinas. De ellos, se seleccionaron aquellos con apariencia más semejante, pero con la característica de ser toxigénicos y sin esa capacidad. En ese período, también fueron colectados aislados de *Colletotrichum* de importancia agrícola por la antracnosis que causan en frutos de mango y rocoto. Así, esta investigación fue direccionándose en el entendimiento de la naturaleza de las interacciones, más allá del porcentaje de control de conocidos antagonistas como *Trichoderma*. La inhibición de este género por aislados patogénicos ya fue reportada en la literatura, por lo que se evaluó también la respuesta de *Trichoderma* ante la presencia de otros microorganismos.

Hay varias cosas que todavía no se conocen de los hongos toxigénicos, pero se sabe que el estrés puede activar las señales que llevan a los hongos a producir toxinas. Es por eso, como parte del estudio de las respuestas de los microorganismos al ser expuestos a la presencia de los otros, que se buscó verificar si había mayor o menor producción de toxinas ante la presencia de *Trichoderma*. Esto tiene relevancia en la seguridad alimentaria, además de generar conocimiento básico.

De los 10 aislados o cepas fúngicas utilizadas, sólo *Colletotrichum asianum* colectado de frutos de mango en Amazonas, fue recientemente identificada biológica y genéticamente con precisión, mientras que los aislados de *Trichoderma* ya están identificados como tales en las colecciones del INDES-CES. En este último caso se espera realizar una confirmación de su identidad mediante secuenciación. Así mismo, está pendiente la identificación taxonómica precisa de los demás aislados en función de su homología genética con los bancos de genes.

En la literatura se reportan diferentes métodos de la técnica de cultivo dual de microorganismos, sea en la distancia entre las cepas al sembrarlas o sobre la forma de medirlas. Se buscó realizar ensayos de la forma más clásica y simple posible. La forma de siembra de las cepas mezclando las masas de hifas y esporas con medio semilíquido

permitió evitar contaminaciones cruzadas y establecer puntos minúsculos de siembra y uniformes en el medio de cultivo. Es importante destacar que las siembras fueron realizadas en la mesa de trabajo del laboratorio con presencia de llamas producidas con mecheros de alcohol, utilizando la cámara de flujo laminar apenas para la preparación de medios de cultivo.

Con respecto a la escala de Skidmore y Dickinson (1976) utilizada para explicar la forma en que las colonias entraron en contacto, es importante tener en cuenta que esta ameritaría ser complementada con observaciones microscópicas que, aunque se realizaron a través de cortes transversales de las colonias en los puntos de encuentro y visualización microscópica (datos no presentados), se requerirían más pruebas, uso de colorantes, entre otros abordajes. Debido a la relevancia de las imágenes en la caracterización biológica, se cuidó que las fotografías fueran realizadas de forma que los ruidos fuesen mínimos.

La evaluación del crecimiento, aunque inicialmente pretendió realizarse como comúnmente se hace, midiendo dos diámetros perpendiculares de las colonias y luego promediando el valor, requirió una adaptación. El crecimiento radial consistió, en el caso de ser medido el género *Trichoderma*, en el radio en dirección al hongo opositor. En el caso de la medición del crecimiento radial de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum*, esta consistió en el diámetro de la colonia medida en sentido al *Trichoderma*. En el caso de los controles, es decir, las placas con crecimiento de un solo microorganismo, la medición del crecimiento radial consistió en el promedio de dos diámetros perpendiculares, siendo que en el caso de *Trichoderma*, este dato fue dividido entre 2 para obtener el radio y usarlo como referencia para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento, con respecto al crecimiento de la colonia de *Trichoderma* en el cultivo dual. Lo que se hizo en el caso de *Trichoderma*, fue una adaptación necesaria.

Las evaluaciones de esporulación fueron realizadas extrayendo un disco de las colonias, debido a que, al contarse con cultivos duales, el raspado con la espátula de Drigalsky, que es una técnica más convencional, habría ocasionado que las esporas de los diferentes hongos se mezclasen en la solución, causando potencialmente dificultad en su estimación. Sin embargo, esta última situación sucedió en el caso de los cultivos duales con *Colletotrichum asianum*, con la cual hubo dificultad para obtener una solución de esporas a partir de discos de medio nutritivo conteniendo a la cepa.

En la caracterización de *Trichoderma* y *Colletotrichum* se encontró que los aislados presentan características que los distinguen y que el método propuesto por (Pitt & Hocking, 2009) funciona bastante bien para ver esas diferencias. El crecimiento o falta de este en el medio CYA a 5 °C, 37 °C o en el medio G25N a 25 °C coincidió con lo esperado para esos géneros. La idea de aprovechar para la caracterización las colonias control producidas en medio PDA de los ensayos de interacción con cultivos duales, no fue muy conveniente debido a que la forma de siembra no fue en tres puntos y los momentos de evaluación no coincidieron debido a los objetivos propios de cada técnica. Las características de *T. harzianum* no fueron idénticas a las descritas en la literatura. A priori, no podemos afirmar que se trate de otra especie, ya que *T. harzianum* es inherentemente complejo. Por ello, se mantiene su designación como tal.

Es importante notar que, por la naturaleza de la investigación, cuyo enfoque estuvo más en evaluar las posibles diferencias en la respuesta de los distintos aislados, por lo pronto la magnitud de los porcentajes de inhibición no fueron la prioridad en el análisis estadístico. Además, con los primeros resultados presentados queda evidente que estos valores dependen del período evaluado (R. Verma et al., 2017), como se aprecia en los primeros diagramas de cajas presentados, donde en algunos tratamientos el porcentaje de inhibición fue cambiando progresivamente en función al tiempo.

Con respecto a los porcentajes de inhibición, Romero-Cortes et al. (2019) reportaron que los niveles de inhibición de *Aspergillus niger* por parte de *T. asperellum* podrían estar asociadas a la producción de enzimas xilanolíticas. Ellos también reportaron la ausencia de halo inhibitorio entre estos hongos.

Trichoderma es un biocontrolador con eficiencia en el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum truncatum*. En una investigación realizada por Yadav et al. (2021) la antracnosis causada por *C. truncatum* fue controlada en 78%.

Referente a la escala planteada por Skidmore & Dickinson (1976), donde también se muestran representaciones de las interacciones, en la práctica se encontraron situaciones no idénticas a las representaciones y descripciones. Con eso, queda claro que las representaciones y la escala en general es una aproximación. Por ejemplo, la escala C y D que son de interacción con formación de halos de inhibición, la escala no detalla el caso donde uno de los dos microorganismos tiene el crecimiento inhibido y el otro no. Las

diferencias contrastantes en la tasa de crecimiento de *Trichoderma* y los demás hongos estudiados en el presente trabajo, influenciaron en la dificultad para encajarse de forma idéntica a la escala, pero tomando este hecho en consideración, se pudo solucionar la confusión inicial.

El interés que se tuvo en la selección de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum* en la presente investigación reside en la capacidad antagonista ampliamente reconocida de *Trichoderma*, y la importancia de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum* como patógenos de postcosecha de cultivos de alto valor económico y social. La utilización de especies de *Trichoderma* en el control biológico como parte de los Programas de Manejo Integrado de Plagas incluye el control de patógenos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Castoria et al., 2008). Esto puede indirectamente minimizar el riesgo de la contaminación de los alimentos por micotoxinas, porque algunas especies de estos géneros son toxigénicas, como es el caso del *Penicillium verrucosum* (productor de OTA y citrinina) y de algunas especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y *Circumdati* (productores de OTA) (Pitt & Hocking, 2022; Taniwaki et al., 2003). La contaminación por toxinas afecta directamente a los vertebrados superiores, y esto incluye a los seres humanos. En este sentido, en la presente investigación hubo una preocupación por seleccionar tanto aislados toxigénicos como no toxigénicos de los géneros que pueden presentar esta característica, para verificar si la respuesta al antagonista es diferente, lo que podría presentar desafíos u oportunidades de control biológico.

El TLC es una técnica cromatográfica utilizada principalmente para análisis semicuantitativos. Tiene un límite de detección relativamente bajo y presenta cierta dificultad para la comparación de los compuestos de la muestra con los estándares de concentraciones conocidas por ser realizada visualmente. Sin embargo, puede ser empleada en el análisis de la contaminación por micotoxinas a nivel de diagnóstico. En caso necesario, se selecciona otra técnica más sensible, como el HPLC - que generalmente también es más costosa -, para confirmar la detección y cuantificar, incluso bajas concentraciones de micotoxinas (Rottinghaus et al., 1992).

La banda amarillenta observada en las corridas realizadas con los aislados de *Penicillium* toxigénico (Figura 61) no tiene la misma característica o patrón presentado por el estándar de OTA. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la OTA esté siendo enmascarada por la sustancia amarilla. Para confirmar esta sospecha, hay necesidad de

más análisis, como el TLC bi-dimensional con diferentes soluciones de fase móvil para una separación más completa y poder descartar la presencia de compuestos que se superponen (Betina, 1985). Con respecto a la identidad del compuesto amarillento, por la difuminación o arrastre de la banda, se considera que podría tratarse de la citrinina, que también es una micotoxina ácida y nefrotóxica como la OTA (Gorst-Allman & Steyn, 1979; Schmidt-Heydt et al., 2012), y también puede ser producida por especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Mohamed et al., 2013). Esta micotoxina tiene un factor de retención similar a la OTA en algunas fases móviles (Gorst-Allman & Steyn, 1979) dificultando su separación. El factor de retención es la razón de la distancia recorrida por el analito y la distancia recorrida por el solvente o fase móvil utilizada en la corrida cromatográfica. A pesar de lo mencionado y de la necesidad de confirmación de la identidad de la micotoxina usando un estándar específico, se observa una disminución en la intensidad de la banda en ambos aislados toxigénicos de *Penicillium* cuando son confrontados con *T. harzianum*. Este comportamiento también fue observado con la aflatoxina B₁ y las ocratoxinas (A y B) producidas in vitro por *Aspergillus flavus* y *A. carbonarius*, respectivamente, cuando fueron enfrentados con *T. harzianum* (Braun et al., 2018). Cuando el cultivo dual fue realizado con *T. asperellum*, el *Penicillium* toxigénico 2 presentó un comportamiento distinto. La banda tuvo mayor intensidad en comparación a su cultivo sin presencia del antagonista. Este resultado es contrario a lo reportado por Stracquadiano et al. (2021) quienes utilizaron extractos de *T. asperellum* y observaron una disminución de la producción de OTA por *Penicillium verrucosum*. Sin embargo, existen diferencias importantes en los experimentos, como el hecho de que este último fue realizado in vivo, con granos de trigo.

A pesar de que no se observaron bandas de OTA en las muestras de *Aspergillus* toxigénico 1 (Figura 62), por el mismo hecho del TLC presentar bajo límite de detección, como ya fue mencionado, otro factor es que algunas especies podrían producir la toxina in vivo, pero no en las condiciones utilizadas en el laboratorio para el análisis (Paterson et al., 2014). El *Aspergillus* toxigénico 2, identificado como siendo de la sección *Circumdati*, confrontado con *T. harzianum* presentó una reducción en la producción de OTA que no fue observada cuando confrontado con *T. asperellum*.

V. CONCLUSIONES

La respuesta de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum* tanto en los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial, producción de esporas y germinación de esporas cuando estuvieron expuestos a *Trichoderma*, mediante la técnica de cultivo dual, varió dependiendo del aislado de estos reconocidos patógenos de postcosecha, así como de la especie del propio *Trichoderma*. Estas respuestas variaron en dos extremos, inhibición y estímulo. El propio *Trichoderma* también respondió en su interacción con esos microorganismos con inhibición y estímulo en los parámetros de desarrollo y crecimiento evaluados. Con respecto a la influencia de *Trichoderma* en la producción de metabolitos secundarios por los aislados toxigénicos de los hongos evaluados, también se encontraron respuestas complejas, desde el aumento de la producción de metabolitos hasta la disminución, dependiendo de los aislados confrontados.

Biológicamente, todas las cepas fúngicas presentaron características únicas.

Trichoderma harzianum se presentó más agresivo con las cepas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum*. Causó mayor inhibición de crecimiento micelial sobre el *Aspergillus* no toxigénico y la menor inhibición en *C. asianum*, con más de 30 y menos de 4%, respectivamente. *T. asperellum* fue menos competitivo, con porcentajes de inhibición de crecimiento micelial de más de 13 y menos de 2%, del *Penicillium* toxigénico 1 y *Aspergillus* toxigénico 2, inclusive, presentó un halo de inhibición en presencia del *Penicillium* no toxigénico.

T. harzianum inhibió la esporulación de los demás géneros fúngicos, alcanzando más del 70% en el caso del *Penicillium* toxigénico 1; en el otro extremo, indujo la esporulación del *Aspergillus* toxigénico 1, en más de 300%. En el caso de *T. asperellum*, causó la máxima inhibición en *Penicillium* no toxigénico, con más del 79%, y un incentivo de más de 266% frente al aislado de *C. asianum*.

El porcentaje de inhibición de la germinación presentó respuestas semejantes. *T. harzianum* inhibió como máximo al *Penicillium* toxigénico 1 con 69% e incentivó en 666% al *Aspergillus* toxigénico 1. *T. asperellum* inhibió más del 65% al *Penicillium* toxigénico 1, e incentivó en 100% al *Aspergillus* toxigénico 2.

La reacción de *Trichoderma* cuando estuvo expuesto a los otros géneros también varió en ese extremo. *Trichoderma harzianum* presentó diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial cuando fue confrontado a las cepas de *Colletotrichum*; la producción y la germinación de esporas fue inhibida tanto para *T. asperellum* como para *Colletotrichum* sp. cuando fueron confrontados y hubo un aumento notable en los dos géneros de *Trichoderma* cuando fueron confrontados con *C. asianum*.

La OTA parece haber sido opacada en el caso de las cepas toxigénicas de *Penicillium* por la presencia de otra toxina, que podría ser la citrinina. En todo caso, se trata de un metabolito secundario. La producción de esta varió dependiendo de la cepa, así como del tipo y presencia de *Trichoderma*. En el caso del *Aspergillus* toxigénico 1, no se verificó la presencia de OTA, tal vez por estar en concentraciones muy bajas, mientras que en *Aspergillus* toxigénico 2, se detectó la micotoxina que tuvo su producción afectada por *Trichoderma harzianum*.

Se espera que los estudios de interacción de microorganismos, como el presente que utilizó hongos que pueden ser considerados modelos biológicos de estudio, permitan desarrollar estrategias de uso de los controladores biológicos, y de la prevención de riesgos toxicológicos y, en general, incrementar el conocimiento de las complejas respuestas de los seres vivos en su ambiente.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amin, F., Razdan, V. K., Mohiddin, F. A., Bhat, K. A., & Sheikh, P. A. (2010). Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant. *Journal of Phytology*, 2(10), 34–37.
- Betina, V. (1985). Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography*, 334, 211–276.
- Braun, H., Woitsch, L., Hetzer, B., Geisen, R., Zange, B., & Schmidt-Heydt, M. (2018). *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 280(April), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.021>
- Castoria, R., Wright, S. A. I., & Droby, S. (2008). Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits. In R. Barkai-Golan & N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (pp. 311–333). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00016-4>
- Celis-Perera, S. E., F., A. M.-K., Reyes-Ramirez, A., Tun Suárez, J. M., & Cristóbal-Alejo, J. (2021). Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) contra hongos patógenos de *Solanum lycopersicum* L. *Revista de Protección Vegetal*, 36(3), 1–7.
- Cheung, C. T., DeLisio, M. P., Rosenberg, J. J., Tsai, R., Kagiwada, R., & Rutledge, D. B. (2004). A single chip two-stage W-band grid amplifier. *IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest*, 1, 79–82. <https://doi.org/10.1109/mwsym.2004.1335805>
- Davila-Garcia, J. D. (2023). *Perfil de compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café preparada con granos inoculados con un hongo toxigénico y uno no toxigénico determinado por GC-MS*. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.
- De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Rodríguez-Herrera, R., Hernandez-Castillo, D., & Aguilar, C. N. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>
- Ferreira, F. V., Herrmann-Andrade, A. M., Calabrese, C. D., Bello, F., Vázquez, D., &

- Musumeci, M. A. (2020). Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 712–727. <https://doi.org/10.1111/jam.14657>
- Filtborg, O., Frisvad, J. C., & Svendsen, J. A. (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 581–585. <https://doi.org/10.1128/aem.45.2.581-585.1983>
- French, E., & Hebert, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. In *Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas*.
- Gaslac-Culqui, F. (2022). *Incidencia de hongos con potencial toxigénico presentes en café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza-Amazonas*. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- Gorst-Allman, C. P., & Steyn, P. S. (1979). Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 175(2), 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)89439-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)89439-X)
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E., Herrera-Estrella, A. H., Horwitz, B. A., & Lorito, M. (2012). Special issue: *Trichoderma*-from basic biology to biotechnology. *Microbiology*, 158(1), 1–2. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056424-0>
- Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M., & Oreshkovikj, K. B. (2018). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(3), 391–399. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000300391>
- Legesse, N. & Alemu, T. (2021). In vitro evaluation of antagonistic potential activity and assay of culture filtrates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against coffee wilt pathogen (*Gibberella xylarioides*). *Ethiopian Journal of Biological Sciences*, 9(1)(April), 67–77.

- Li, Y., Sun, R., Yu, J., Saravanakumar, K., & Chen, J. (2016). Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(3), 318–327. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0581-9>
- Mohamed, S., Flint, S., Palmer, J., Fletcher, G. C., & Pitt, J. I. (2013). An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. *Letters in Applied Microbiology*, *57*(3), 214–219. <https://doi.org/10.1111/lam.12102>
- Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M., & Karakozova, M. V. (2020). Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae*, *12*(3), 46–59. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>
- Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, *61*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Paul, N. C., Park, S., Liu, H., Lee, J. G., Han, G. H., Kim, H., & Sang, H. (2021). Fungi associated with postharvest diseases of sweet potato storage roots and in vitro antagonistic assay of *Trichoderma harzianum* against the diseases. *Journal of Fungi*, *7*(11). <https://doi.org/10.3390/jof7110927>
- Pelser, P. D. T., & Eckert, J. W. (1977). Constituents of orange juice that stimulate germination of conidia of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*, *67*(6), 747–754.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). *Fungi and Food Spoilage* (Fourth Edi). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, *3*(10), 582–586. <https://doi.org/10.1002/mabi.200350024>
- Ren, X., Branà, M. T., Haidukowski, M., Gallo, A., Zhang, Q., Logrieco, A. F., Li, P., Zhao, S., & Altomare, C. (2022). Potential of *Trichoderma spp.* for Biocontrol of

- Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 14(2), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/toxins14020086>
- Rodríguez, I. C., & Flores, J. (2018). Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*, 30(1), 49–58. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Pérez España, V. H., Medina-Toledo, A. K., Aparicio-Burgos, J. E., & Cuervo-Parra, J. A. (2019). Confrontation of *Trichoderma asperellum* VSL80 against *Aspergillus niger* via the effect of enzymatic production. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 35(1), 68–80.
<https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000202>
- Rondoy, M. G., & Severino, N. V. (2019). Antagonistic capacity of *Trichoderma harzianum* compared to *Rhizotectnia*, *Nakataea sigmoidea*, *Sclerotium rolfsii* and its effect in native strains of *Trichoderma* isolated from rice crops. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 199–206. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.05>
- Rottinghaus, G. E., Coatney, C. E., & Minor, H. C. (1992). A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of Fumonisin B 1 and B 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3), 326–329.
<https://doi.org/10.1177/104063879200400316>
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2019). Food and indoor fungi: Second Edition. In *CBS Laboratory Manual Series 2*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt-Heydt, M., Cramer, B., Graf, I., Lerch, S., Humpf, H.-U., & Geisen, R. (2012). Wavelength-dependent degradation of ochratoxin and citrinin by light in vitro and in vivo and its implications on *Penicillium*. *Toxins*, 4(12), 1535–1551.
<https://doi.org/10.3390/toxins4121535>
- Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference

- between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57–64. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80092-7)
- Stracquadiano, C., Luz, C., La Spada, F., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2021). Inhibition of mycotoxigenic fungi in different vegetable matrices by extracts of *Trichoderma* species. *Journal of Fungi*, 7(6), 445. <https://doi.org/10.3390/jof7060445>
- Suanthie, Y., Cousin, M. A., & Woloshuk, C. P. (2009). Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.001>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Verma, R., Dutta, A., Kumar Choudhary, A., & Maurya, S. (2017). *Trichoderma asperellum*, a potential fungal biocontrol agent against *Aspergillus niger*. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 8(4), 74–78. <https://e-journal.sospublication.co.in>
- Vilcarrromero-Ramos, R. L., Díaz-Valderrama, J. R., Caetano, A. C., Huamán-Pilco, J., & Mansilla-Córdova, P. J. (2022). First report of anthracnose caused by *Colletotrichum asianum* on mango (*Mangifera indica*) in Peru. *Plant Disease*, 1–6. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-22-2357-PDN>
- Yadav, M., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2021). Systemic resistance in chilli pepper against anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*. *Journal of Fungi*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/jof7040307>

ANEXOS

Figura 61

Procedimiento para la preparación de suspensión de esporas. a) materiales, b) filtrado de zumo de naranja, c) obtención de disco de 5 mm conteniendo esporas, d) preparación de suspensión en solución de Tween 20 al 0.05% con el zumo, e) montaje en cámara de Neubauer y f) estimación del número de esporas bajo el microscopio a 400X

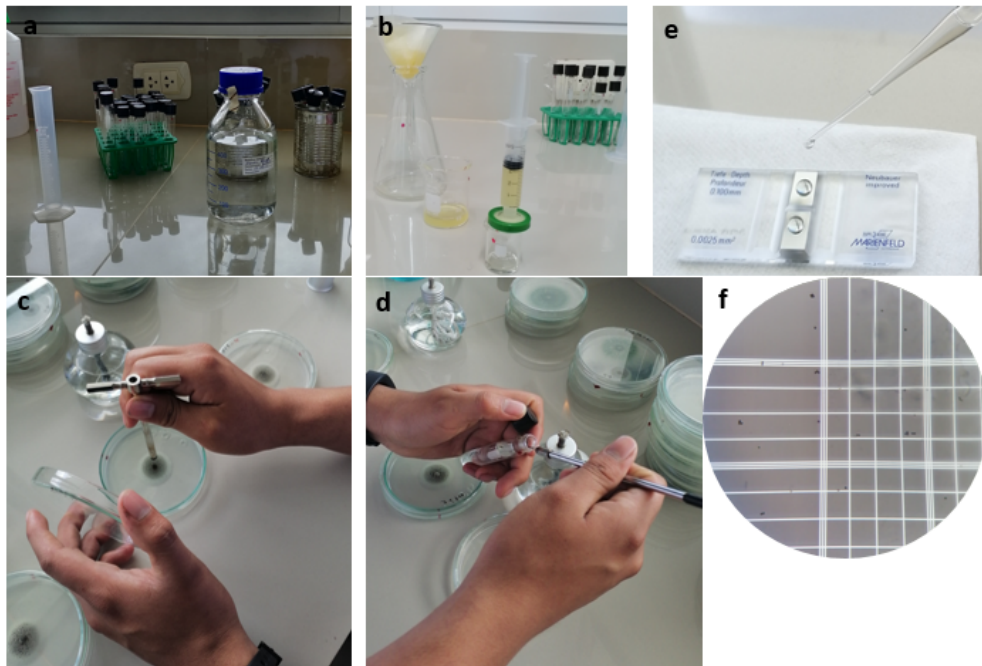


Figura 62

*Representaciones de las estructuras microscópicas de *T. harzianum*, a) conidióforo, b) hifas septadas, c) conidios*

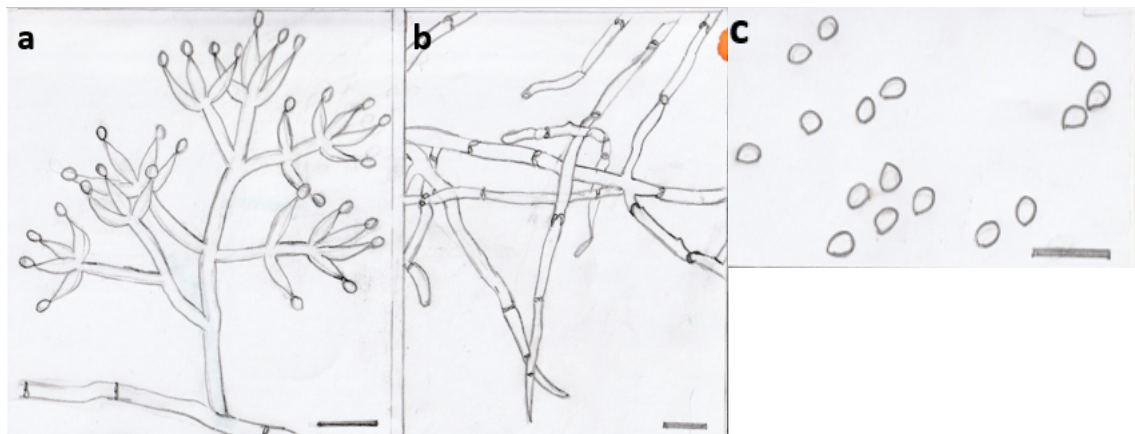


Figura 63

Procedimiento para la estimación del número de esporas germinadas a) Preparación de solución de azul de toluidina y transferencia placas de Petri con solución de esporas y previamente esparcidas en la superficie e incubadas, b) distribución del colorante mediante movimientos circulares, c) Reposo, d) obtención de porción de medio de cultivo con dimensiones ligeramente menores a la lámina portaobjeto, e) montaje del medio de cultivo conteniendo las esporas, f) visualización sin uso de lámina cubreobjeto, g) campo visual mostrando esporas y sus tubos germinativos

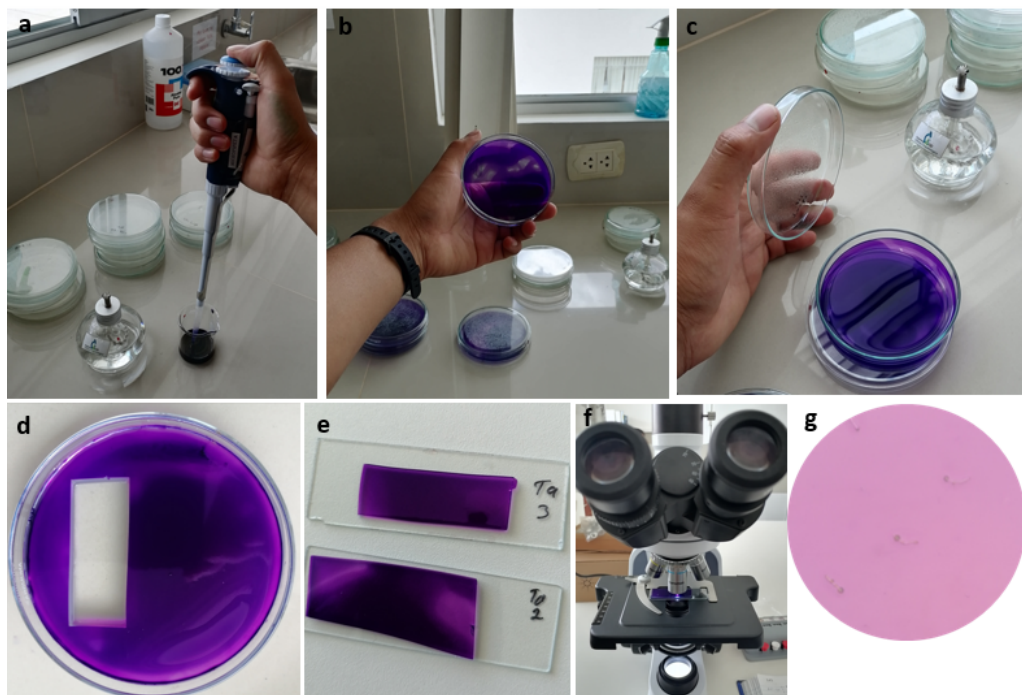


Figura 64

Representaciones de las estructuras microscópicas de T. asperellum a) conióforo b) clamidosporas y c) conidios

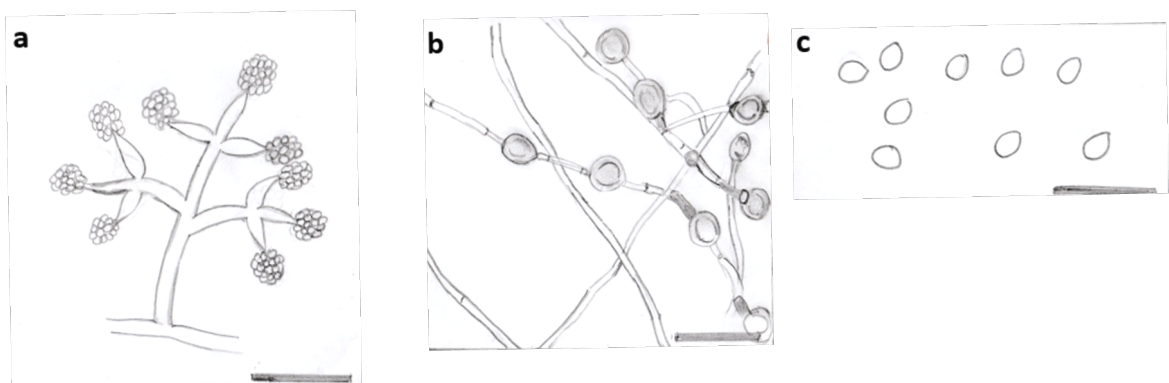


Figura 65

Estructuras de reproducción de Aspergillus toxigénico 1 (a, b), Aspergillus toxigénico 2 (c, d), Aspergillus no toxigénico (e, f), siendo las imágenes de los conidióforos (a, c, e) y de las esporas (b, d, f), barra = 150 μ m

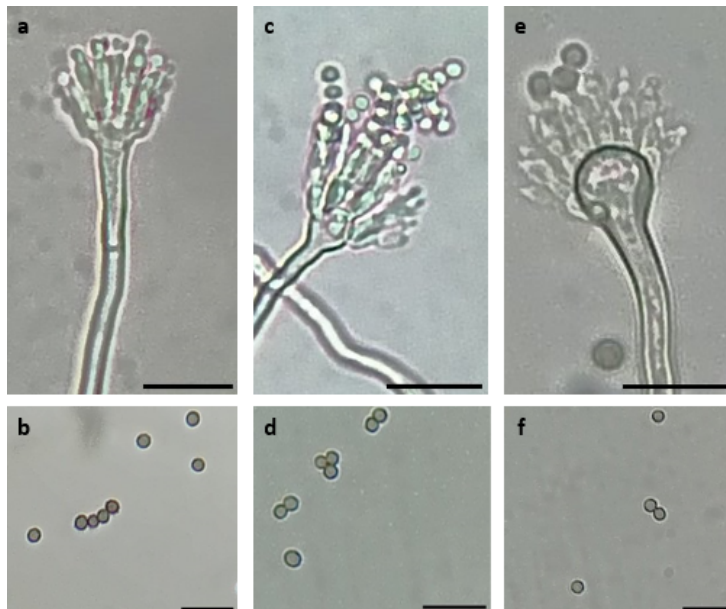


Figura 66

Estructuras de reproducción de Penicillium toxigénico 1 (a, b), Penicillium toxigénico 2 (c, d), Penicillium no toxigénico (e, f), siendo las imágenes de los conidióforos (a, c, e) y de las esporas (b, d, f), barra = 150 μ m

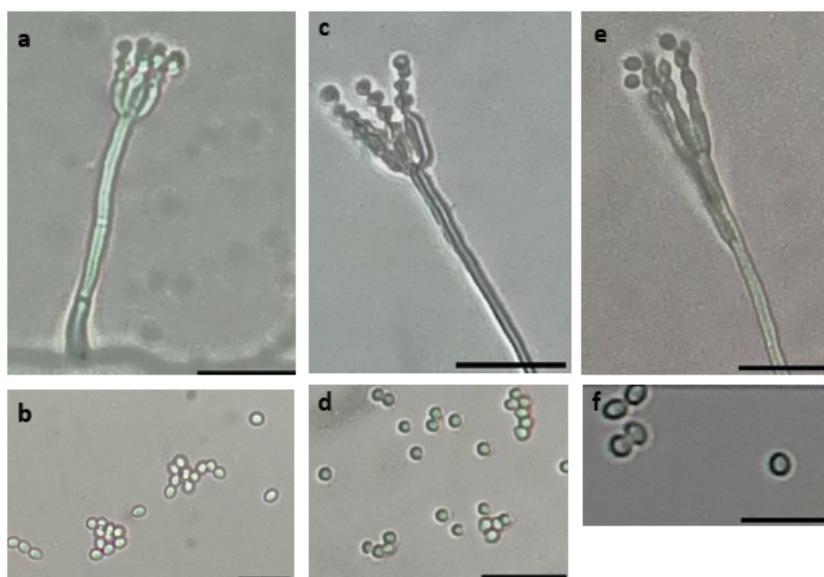


Figura 67

Penicillium toxigénico 1 (PT1), en cultivo dual con *T. harzianum* en medio YESA a los 40 dds



Figura 68

Aspergillus no toxigénico (ANT), en cultivo dual con *T. asperellum* en medio YESA a los 6 dds (A) y *Colletotrichum de rocoto*, en cultivo dual con *T. asperellum* en medio PDA a los 5 dds a 25 °C (B)

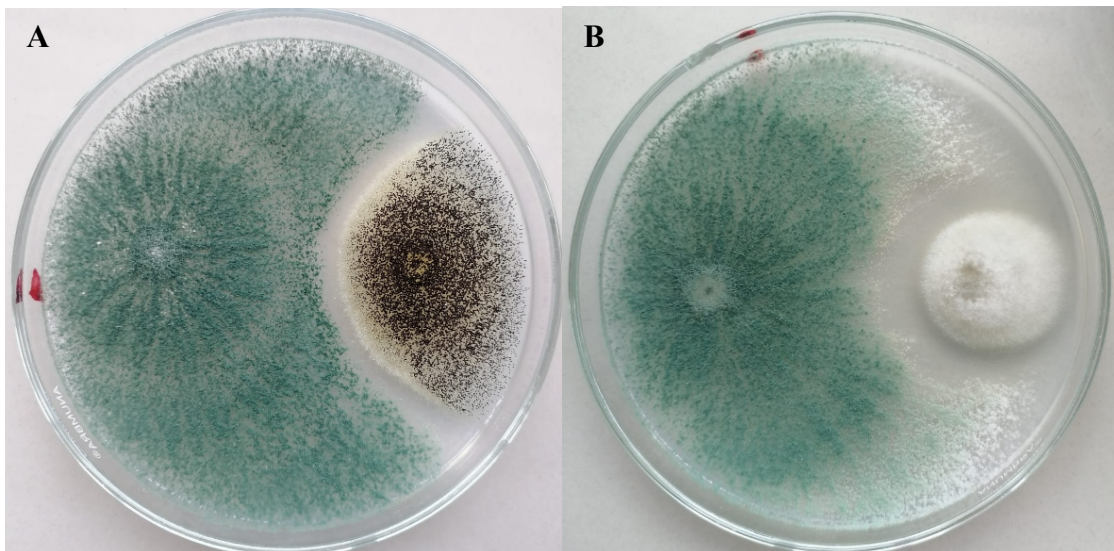


Figura 69

Interacción de Penicillium spp. (PT1, PT2 y PNT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH)

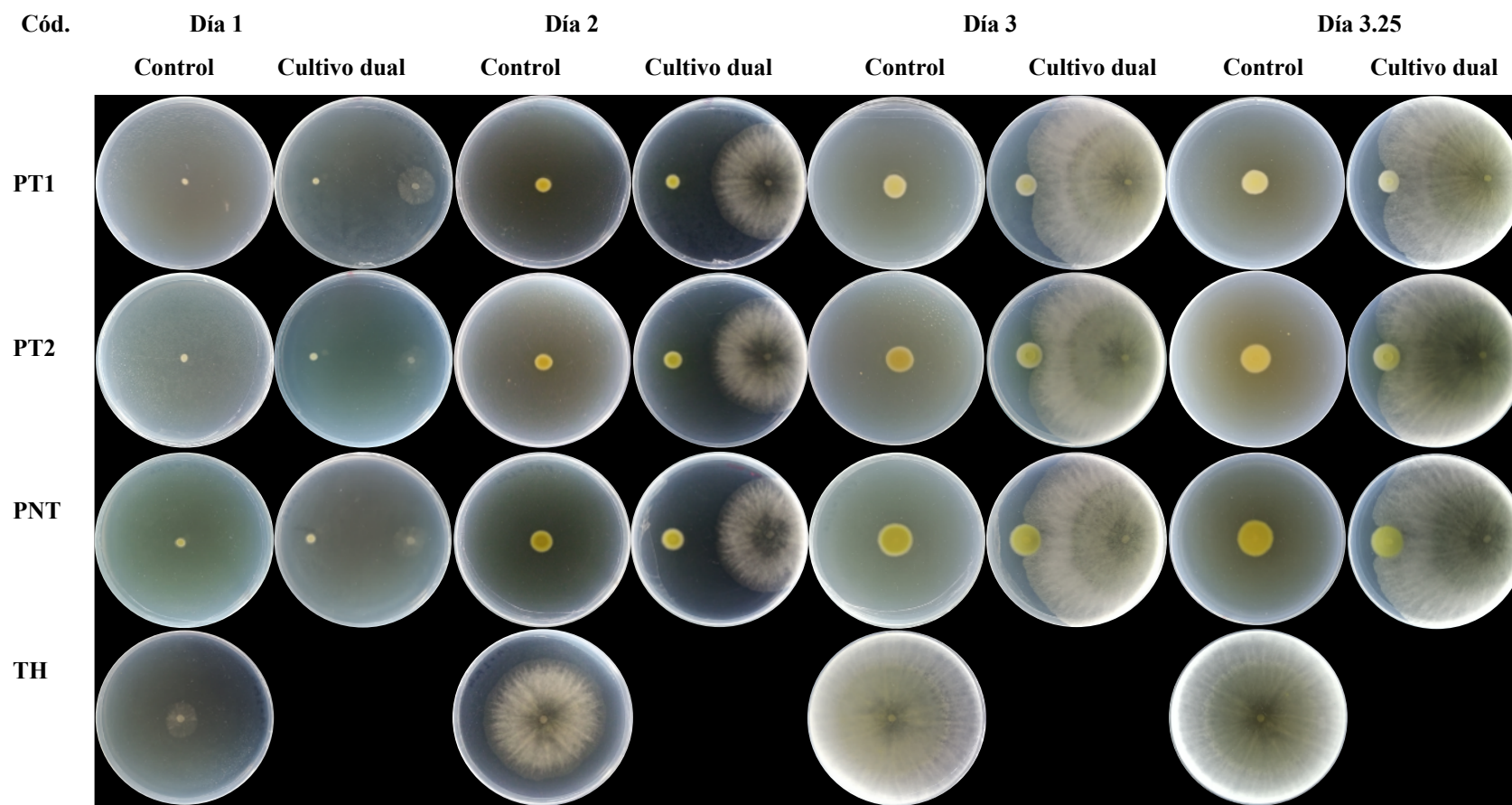


Figura 70

Interacción de Penicillium spp. (PT1, PT2 y PNT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA)

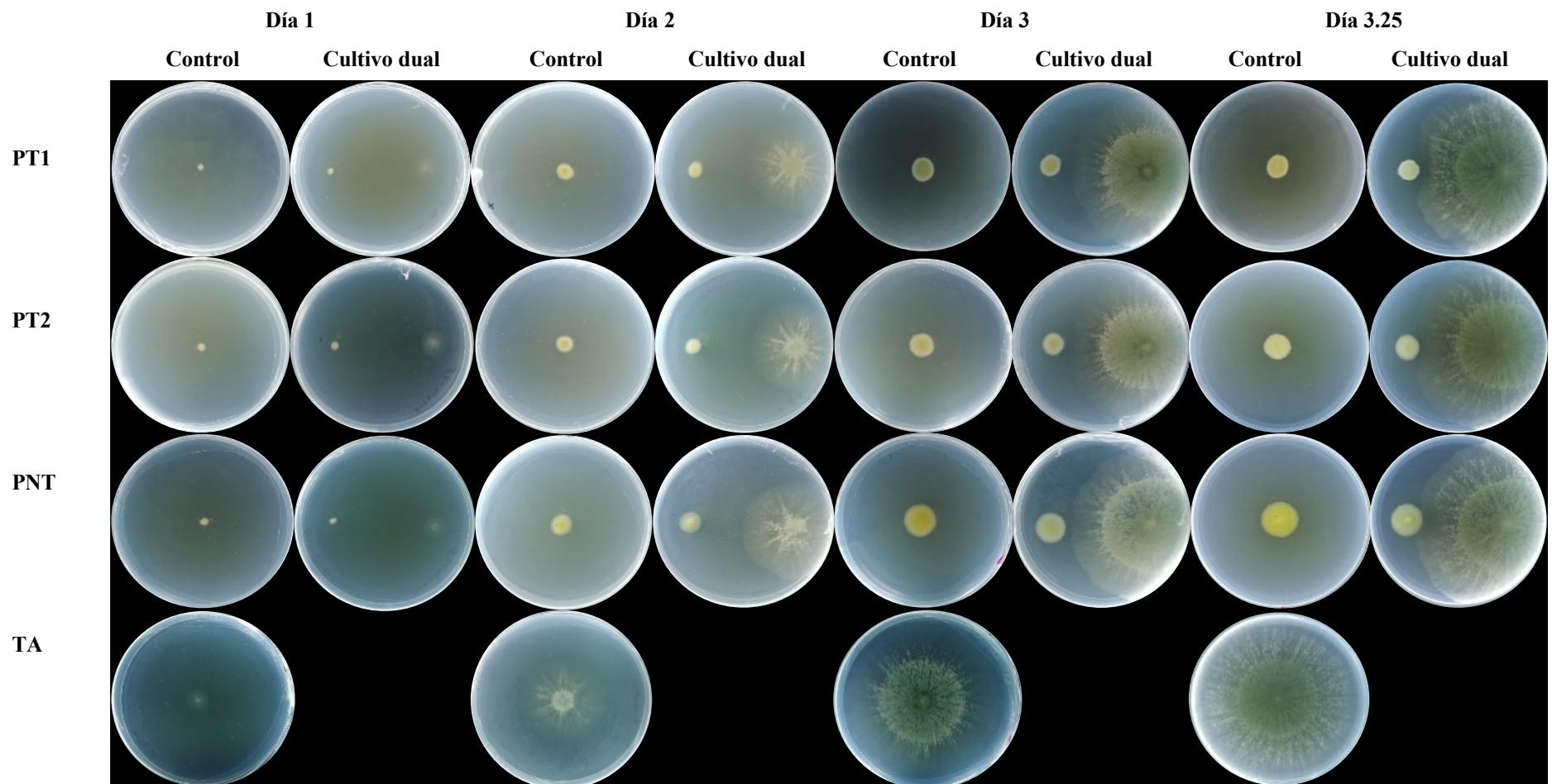


Figura 71

Seguimiento de crecimiento de Aspergillus spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con Trichoderma harzianum (TH)

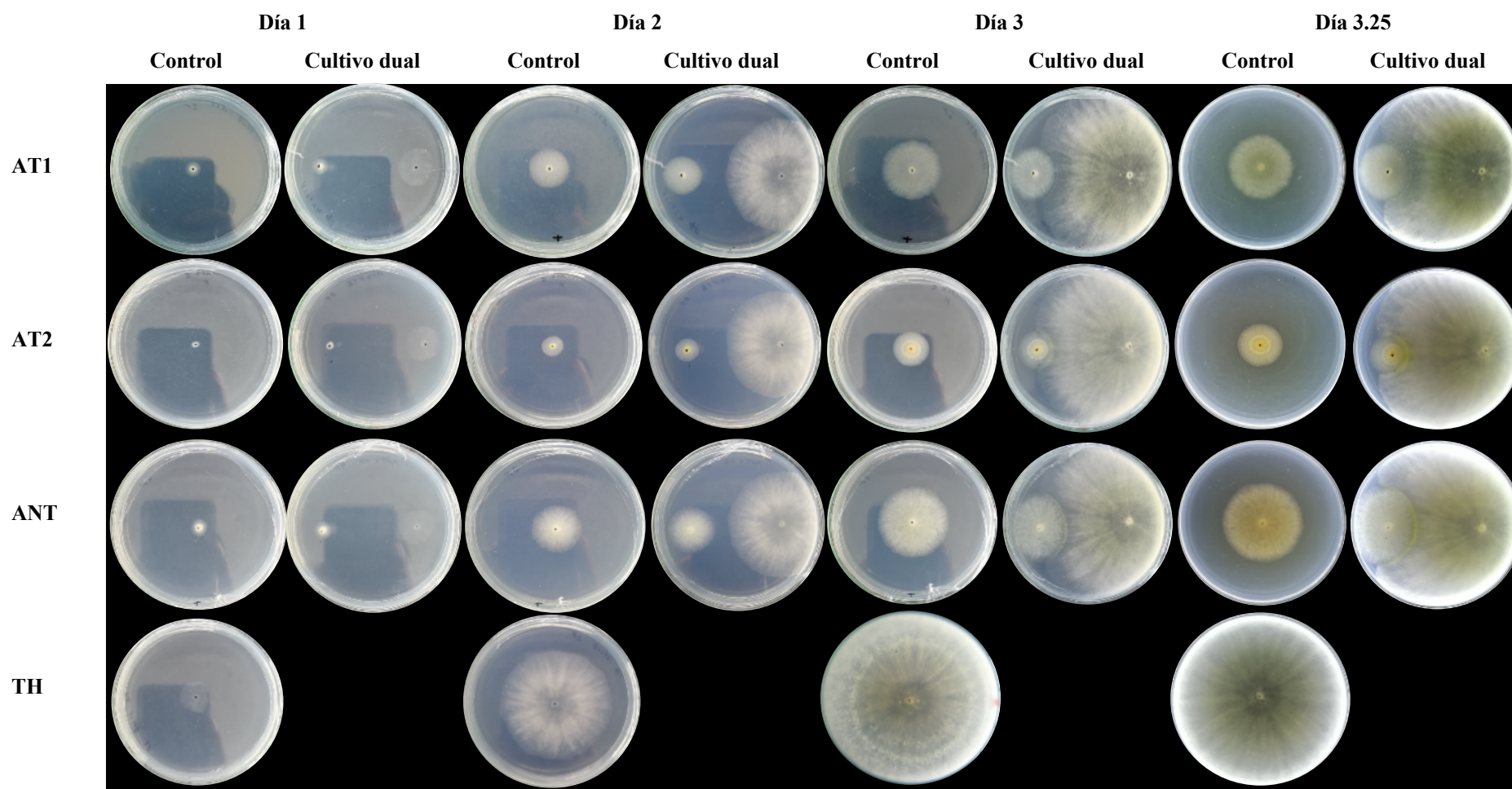


Figura 72

Seguimiento de crecimiento de Aspergillus spp. (AT1, AT2 y ANT) en cultivo dual con Trichoderma asperellum (TA)

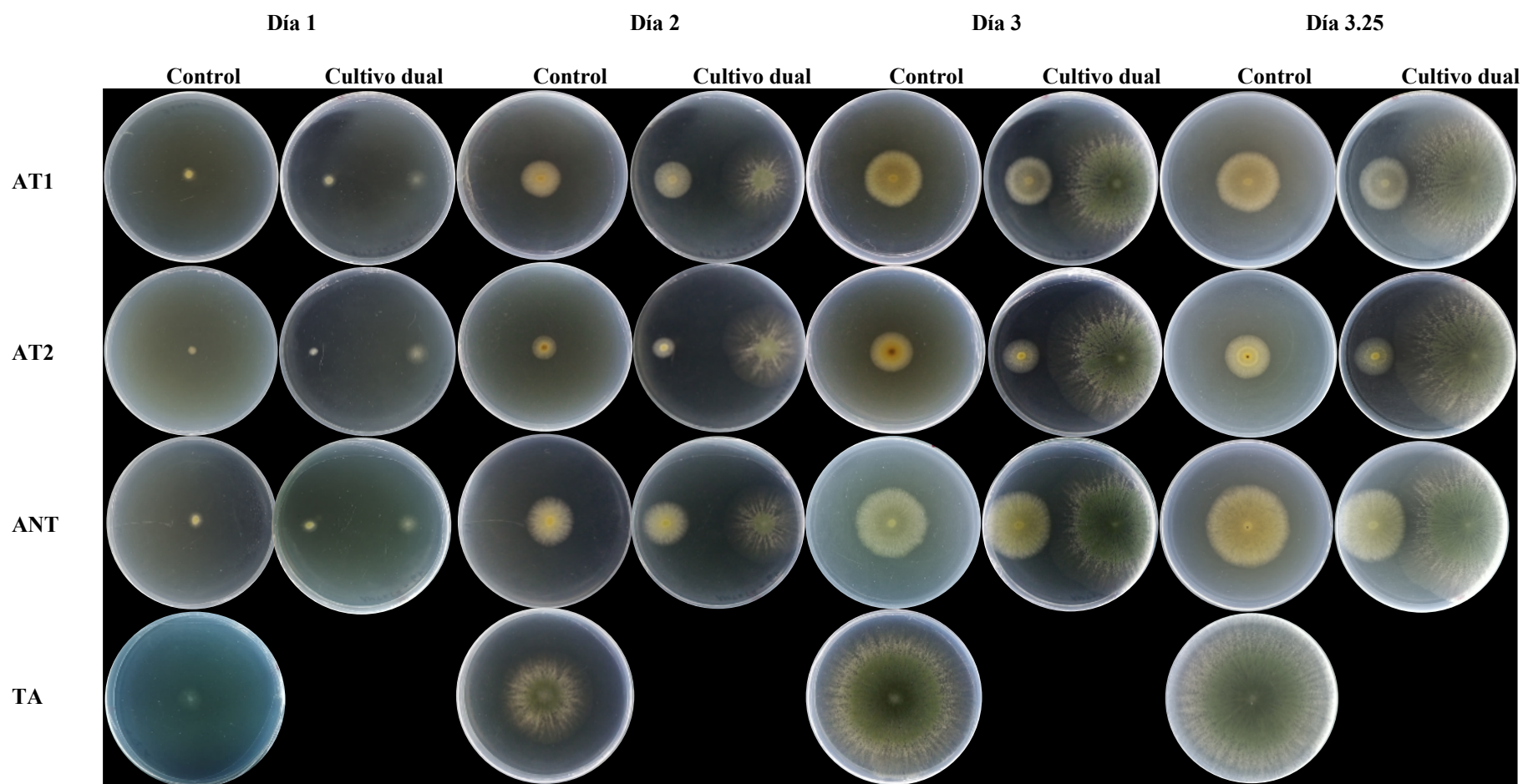


Figura 73

Seguimiento de crecimiento de Colletotrichum asianum (CM) en cultivo dual con Trichoderma asperellum y T. harzianum

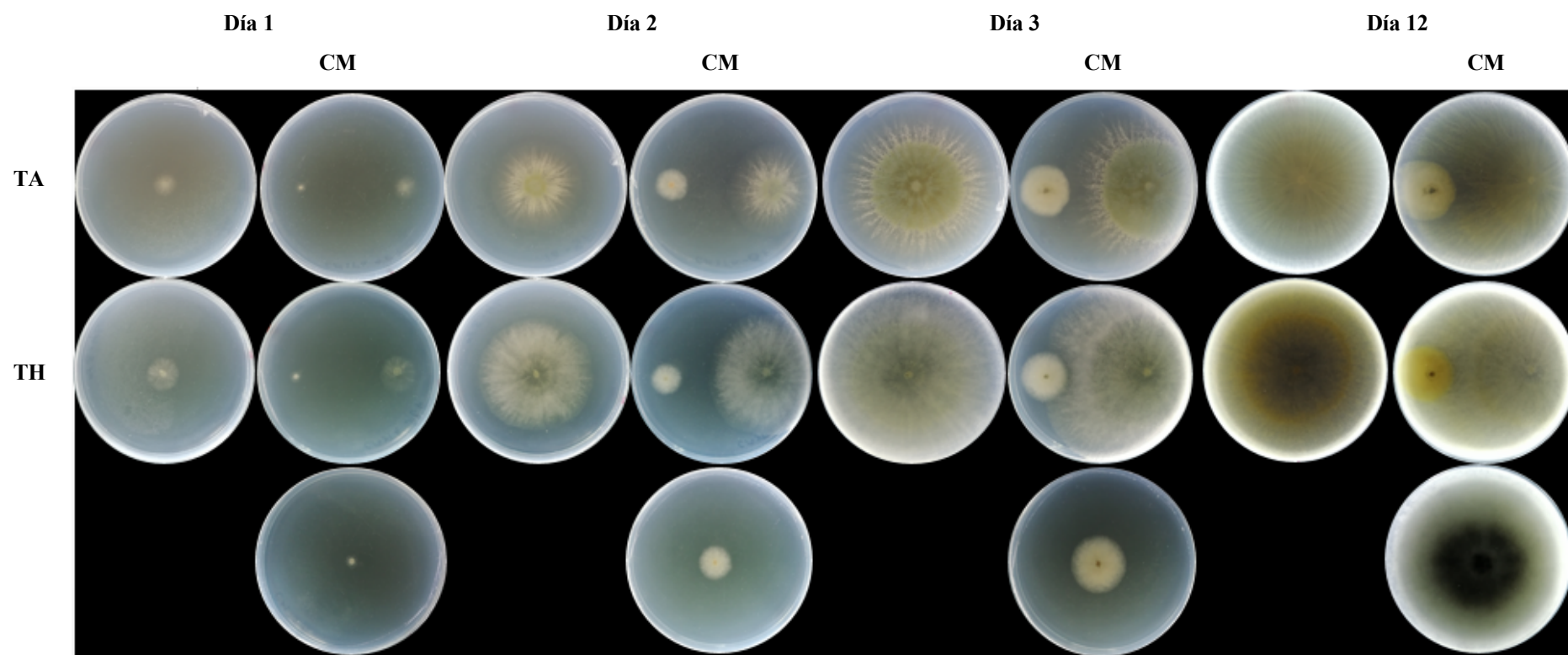


Figura 74

Seguimiento de crecimiento de Colletotrichum sp (CR) en cultivo dual con Trichoderma asperellum y T. harzianum

