



UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA

Departamento de Agronomía  
Doctorado en Agricultura Protegida

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN DE *Trichoderma aggressivum f. europaeum* COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO**

Doctoranda:

Brenda Sánchez Montesinos

Directores:

Dra. Milagrosa Santos Hernández

Dr. Fernando José Diánez Martínez

Almería, España, abril 2022





UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA

Departamento de Agronomía

Doctorado en Agricultura Protegida

Ph.D. Dissertation

**CHARACTERISATION OF *Trichoderma aggressivum f. europaeum* AS A VEGETABLE GROWTH PROMOTER AND BIOLOGICAL CONTROL AGENT**

Doctoranda:

Brenda Sánchez Montesinos

Directores:

Dra. Milagrosa Santos Hernández

Dr. Fernando José Diáñez Martínez

Almería, España, abril 2022





### **Autorización de los directores**

La presente Tesis Doctoral, titulada “CARACTERIZACIÓN DE *Trichoderma aggressivum f. europaeum* COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO”, se presenta, para aspirar al grado de Doctor, por la doctoranda:

Brenda Sánchez Montesinos

Quien Bajo la dirección de la Catedrática Dra. Milagrosa Santos Hernández y el Catedrático Fernando José Díanez Martínez, ha realizado la presente en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Almería, dentro del Programa de Doctorado en Agricultura Protegida, en la línea de investigación Protección Vegetal en Agricultura Protegida. Quienes autorizan la presentación y defensa de este trabajo.

Almería, España; marzo de 2022

Dra. Milagrosa Santos Hernández

Director

Dr. Fernando José Díanez Martínez

Codirector



*“La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre”*

*Marco Tulio Cicerón*





### **Agradecimientos a Instituciones**

Quiero expresar mi agradecimiento a la Fundación Carolina, la Universidad de Almería y la Secretaría de Relaciones Exteriores de México, por otorgarme una beca para la realización y obtención de los estudios de doctorado.

Actualmente, este Proyecto de Tesis perteneciente al programa de Doctorado de Agricultura Protegida está enmarcado y financiado por los siguientes Proyectos y contratos:

Referencia del proyecto: TRFE -I-2019/ 020. Título del proyecto/contrato: Evaluación y desarrollo de nuevos formulados microbianos para el Control Biológico de Enfermedades, Gestión hídrica y Promoción del Crecimiento Vegetal. Entidad: UNIVERSIDAD DE ALMERÍA – Bucephalus Seed, S.L.

Referencia del proyecto: RTC -2017 -6486 -2RTC -2017 -6486 -2. Título del proyecto/contrato: Escalado Industrial de la Producción ACBs Microbianos para el Control Biológico de Enfermedades y la Promoción del Crecimiento Vegetal Escalado Industrial de la Producción ACBs Microbianos para el Control Biológico de Enfermedades y la Promoción del Crecimiento Vegetal. Entidad: MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES.

Referencia del proyecto: TRFE -I-2018/004. Título del proyecto/contrato: MICRONOVA - LINE Escalado Industrial de la Producción ACBs Microbianos para el Control Biológico de Enfermedades y la Promoción del Crecimiento Vegetal Escalado Industrial de la Producción ACBs Microbianos para el Control Biológico de Enfermedades y la Promoción del Crecimiento Vegetal. Entidad: UNIVERSIDAD DE ALMERÍA – ENTONOVA SL.

Referencia del proyecto: 001384 Título: Selección de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Entidad financiadora: AGRI NOVA SCIENCE, S.A.

Este trabajo está conformado, por un compendio de publicaciones científicas, a continuación, se especifican las características de cada publicación:

### **Artículos JCR publicados incluidos en la tesis doctoral**

**Brenda Sánchez-Montesinos**, Fernando Diáñez, Alejandro Moreno-Gavira, Francisco J. Gea and Mila Santos. Plant growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* by saline tolerant *Trichoderma* isolates under salinity stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16(11), 2053. <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph16112053>.

Impact Factor 2.468, Quartile Q1.

**Brenda Sánchez-Montesinos**, Fernando Diáñez, Alejandro Moreno-Gavira, Francisco J. Gea and Mila Santos. Role of *Trichoderma aggressivum f. europaeum* as Plant-Growth Promoter in Horticulture. *Agronomy* 2020, 10(7), 1004. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071004>.

Impact Factor 2.603, Quartile Q1

**Brenda Sánchez-Montesinos**, Mila Santos, Alejandro Moreno-Gavira, Teresa Marín-Rodulfo, Francisco J. Gea and Fernando Diáñez. Biological Control of Fungal Diseases by *Trichoderma aggressivum f. europaeum* and Its Compatibility with Fungicides. *J. Fungi* 2021, 7, 598. <https://doi.org/10.3390/jof7080598>.

Impact Factor 5.816, Quartile Q1

Fernando Diáñez, **Brenda Sánchez-Montesinos**, Alejandro Moreno-Gavira, Mila Santos. Global Research Trends in *Trichoderma* genus from 1960 to 2019: A bibliometric analysis.

Artículo para enviar a publicación con las adecuaciones correspondientes.

## Otros artículos JCR publicados no incluidos en la tesis doctoral

Mila Santos, Fernando Diáñez, Alejandro Moreno-Gavira, **Brenda Sánchez-Montesinos** and Francisco J. Gea. *Cladobotryum mycophilum* as Potential Biocontrol Agent. *Agronomy* 2019, 9(12),891. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120891>.

Impact Factor 2.259, Quartile Q1.

Alejandro Moreno-Gavira, Fernando Diáñez, **Brenda Sánchez-Montesinos** and Mila Santos. *Paecilomyces variotii* as A Plant-Growth Promoter in Horticulture. *Agronomy* 2020, 10(4), 597. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040597>.

Impact Factor 2.603, Quartile Q1.

Alejandro Moreno-Gavira, Victoria Huertas, Fernando Diáñez, **Brenda Sánchez-Montesinos** and Mila Santos. *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. *Plants* 2020, 9(12), 1746. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040597>.

Impact Factor 2.762, Quartile Q1.

Alejandro Moreno-Gavira, Fernando Diáñez, **Brenda Sánchez-Montesinos** and Mila Santos. Biocontrol Effects of *Paecilomyces variotii* against Fungal Plant Diseases. *Fungi* 2021, 7(6), 415. <https://doi.org/10.3390/jof7060415>.

Impact Factor 5.816, Quartile Q1

## Patente

Universidad de Almería, Santos Hernández Milagrosa, Diáñez Martínez Fernando. Este aislado fue depositado en la CECT y estuvo en estudio de patentabilidad, con el número de referencia nEPMO P201731151.

Y fue patentado con el número de patente española ES706099: Nueva cepa de *T. aggressivum* f. *europaeum*, composiciones y aplicaciones.

## **Agradecimientos**

Por medio de estas líneas me gustaría dar las gracias a las personas que han formado parte de mi vida durante esta etapa de mis estudios de doctorado, que me han apoyado, enseñado y guiado; tanto a nivel profesional como personal.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directores de Tesis Mila Santos y Fernando Díanez, que sin su confianza, apoyo y entrega no estaría finalizando este proyecto. Sin su ayuda y su guía no habría llegado hasta aquí. Gracias por haberme permitido aprender tanto de ustedes, les agradezco infinitamente la enseñanza profesional y personal que me han transmitido; así como la motivación por superarse día con día, la constancia en el trabajo y la dedicación para superar las adversidades de la vida. Gracias por permitirme formar parte de su familia y de los esclavos.

A ti Mila, te agradezco el ejemplo que me has dado, eres una gran mujer, madre, esposa y amiga, como siempre te lo he dicho, “De grande quiero ser como tú”, pues me has dejado el listón muy alto y me gustaría alcanzarlo algún día. Gracias por todas las palabras de aliento, la alegría, la paciencia y el cariño que me has demostrado durante estos años, has hecho que fuera más fácil esta etapa del otro lado del charco, me acogiste como otra hija más jaja y siempre seré mamá coco, siempre estaré agradecida por la oportunidad y todo lo bueno que me has brindado lo tendré siempre en mi corazón.

A Fernando, te agradezco ese ejemplo de superación y las ganas que transmites, por seguir aprendiendo e innovando, así como el entusiasmo que pones a tu trabajo y a tu familia.

Alejandro, ha sido un gusto compartir contigo estos años en el laboratorio y formar parte de los esclavos, me has ayudado mucho y me has inspirado con lo organizado y eres ejemplo de constancia y autocontrol. Gracias por compartir esos cafés en el CIDU y esas cervezas, que nos permitían organizar el trabajo y disfrutar de muy buenos momentos, esa personalidad que tienes es única y aunque el stress y el Pae te tenían loco, siempre fuiste muy atento conmigo y eso lo recordaré siempre, te deseo lo mejor de la vida.

Gracias. Al resto de profesores, conserjes y personal del departamento con los que he tenido el gusto de compartir estos años, gracias por los consejos, los ánimos y la ayuda. A la gente de servicios técnicos, principalmente a Belén por su apoyo.

A todos los alumnos que han colaborado en el desarrollo de los experimentos durante estos años, gracias por vuestra atención y dedicación, que como ustedes sabrán hubo algunos con los que como padecimos y otros con los que disfrutamos y mantenemos una amistad.

Habéis sido muchas las personas que me habéis acompañado durante este camino, y de una u otra manera habéis ayudado a que esto haya podido llegar a ser una realidad. Por ello, quiero aprovechar esta bonita oportunidad para expresaros mi más sincero agradecimiento, por acompañarme por mi paso en Almería, por su amistad y los buenos momentos y recuerdos que tenemos juntos; Franchesca, Momo, Emmi, Luis, Ela, Arturo por esa amistad y familia que formamos en 2017 y que aún permanece. Gema la amiga más flamenca y loca, con quien he vivido aventuras, experiencias, alegrías, que me has dejado grandes amistades como Maty. A Lola, que me has permitido conocer a Zoe y verla crecer y compartir con tu familia.

Gracias, a mi hermano maléfico, Luis, gracias por compartir y aguantar estos años conviviendo conmigo, te agradezco tu apoyo, cariño, cuidados, buenas charlas, los momentos compartidos de nuestras vidas en el salón de la casa, y que además de que me acogieras como parte de tu familia, junto con la Fili y la Nena. Y lo más importante por abrirme las puertas en casa de tus padres, Doña Encarna y Don Juan Luis me trataron como una hija más en las navidades, junto con tu hermano Jose; siempre serán mi familia Almeriense.

A mis amigos y familia durante estos años; unos han estado desde el inicio de esta etapa y otros de han incorporado al final, pero todos ustedes son muy importantes y han sido una parte fundamental para mi crecimiento y aprendizaje; me han aportado mucho cada uno con sus personalidades, sus consejos, su alegría, su cariño: Cristian (Chileno), Manuel, mis guapas (Felicitas, Sofía), mis guapos (Cristian, Alvaro), Leiby, Cristina, Francis, José, Yohan, Juan Carlos, mi frutii (Natalia) y todos los que me faltan. Gema la amiga más flamenca y loca, con quien he vivido aventuras y que me has dejado grandes amistades como Maty. Con cada uno de ustedes he vivido momentos y experiencias inolvidables y siempre estarán en mi corazón.

A todos mis amigos de México que me han dado ánimos, cariño y apoyo siempre, con quienes sigo teniendo el mismo cariño a pesar del tiempo y la distancia, y de que no he estado muy presente; L@s Chid@s (Dulcinea, Karla, Moni, Richie y Julio), mi familia salsera (Coni, Gus, Chava, Laurita, Migue, Chio, Ale y Pablo), Meche, Ernesto. Gracias por estar pendientes de mí y por su amistad.

Gracias a Chelita, que has sido una pieza clave para vivir este sueño, el universo te puso en mi camino y tu ayuda con mi mamá siempre la tendré en cuenta.

A los amigos de mí madre que han sido una familia para mí y para ella, que nos han cuidado y acompañado, con quienes hemos podido contar incondicionalmente en la buenas y las malas, (Don Roman, Mayis, Don Santiago, Doña Eloisa, La Morena y su familia) infinitas gracias de corazón. A mi tío Pedro y Florina, a Raquel (Reni, Askari y Ramiro), que siempre nos brindan sus familias y sus hogares para compartir con ustedes y así como las muestras de cariño que tuvieron conmigo y mi mamá.

A las familias Ramos: (Chave, Horacio, Nati Bebe y Fers) gracias por su apoyo, su cariño, me encanto poder compartir con ustedes mi estancia en España y esta etapa que nos ha unido de una forma tan especial. A Laura y Oscar que han estado siguiendo y compartiendo mi camino. A Magos, Lalo, Poncho, Carmelita y Vale, gracias por sus muestras de cariño. A toda la familia Montesinos (Mejía y López) principalmente a mí Tía Hermelinda, mi Tía Pachita y mi Tío Bence; somos tantos que es imposible, agradecerle a cada uno de ustedes lo que han aportado en mi vida.

Gracias sobre todo a mi familia; a mi Tío Coco, Tía Marí, Diego, Rodro y Ceci, que han estado apoyándome a lo largo de cada una de mis etapas en la vida y esta no ha sido la excepción. A mi Tío Isabel y mi Tía Jeny, gracias por los consejos, el apoyo y el afecto que me han brindado siempre, es un gusto que estén compartiendo conmigo y disfrutando mis alegrías, junto con Silvanita la manta que llamaba al Santo.

Gracias, papá por estar pendiente de mí, toda la estancia. Y gracias hasta el cielo a mi Tío Gena y a mis Abuelos (María Santos, Guillermo) que fueron un motor en mi vida y lo siguen siendo, sin sus bendiciones no sería quien soy. Y sobre todo a Dios.

Y finalmente a la mujer que ha estado conmigo caminando a mi lado en esta vida, Gracias Mamiringa por apoyarme a cumplir este sueño, por enfrentarte a tantas cosas sola, gracias a ti, a tus esfuerzos y enseñanzas, soy la mujer que soy y la vida nos ha llevado por estos rumbos para hacernos crecer y superarnos, esta etapa nos ha servido a ambas como un aprendizaje y será mejor lo que viene después.

**GRACIAS.**

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	3
Abreviaturas en el texto.....	5
Introducción .....	8
El control biológico en la agricultura .....	8
1.1. Contexto actual.....	8
1.2. Microorganismos en el control Biológico .....	11
1.3. Biofertilizantes y Bioestimulantes.....	17
Desarrollo del control Biológico .....	20
Marco legal para el registro de fitosanitarios y nuevas sustancias activas, productos autorizados	21
1.4. Marco legal del control biológico .....	23
1.5. Comercialización de productos basados en microorganismos en la agricultura, Anexo I	26
Bibliografía .....	32
Objetivos .....	56
Capítulo 1. Tendencias mundiales de investigación en el género <i>Trichoderma</i> desde 1960 hasta 2019: Un análisis bibliométrico. ....	58
1.1. Resumen .....	60
1.2. Introducción .....	60
1.3. Materiales y métodos .....	64
1.4. Resultados y discusión .....	65
1.5 Conclusiones .....	80
1.6 Bibliografía .....	80
Capítulo 2. Promoción del crecimiento de las plantas y biocontrol de <i>Pythium ultimum</i> por aislados de <i>Trichoderma</i> tolerantes a la salinidad bajo estrés salino. ....	90
2.1 Resumen.....	91
2.2. Introducción .....	91
2.3 Materiales y Métodos .....	93
2.4 Resultados .....	96
2.5 Discusión.....	101
2.6 Conclusiones .....	103
2.7 Bibliografía .....	103
Capítulo 3. El papel de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> como promotor del crecimiento de las plantas en la horticultura. ....	109

3.1 Resumen.....	111
3.2 Introducción .....	111
3.3 Materiales y Métodos.....	113
3.4 Resultados .....	117
3.5 Discusión.....	124
3.6 Conclusiones .....	127
3.7 Bibliografía .....	127
Capitulo 4. Control biológico de enfermedades fúngicas por <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y su compatibilidad con fungicidas.....	135
4.1 Resumen.....	136
4.2 Introducción .....	136
4.3 Materiales y métodos .....	139
4.4 Resultados .....	145
4.5 Discusión.....	153
4.6 Conclusiones .....	155
4.7 Bibliografía .....	156
Conclusiones Generales .....	170
General conclusions .....	173

# Índice de Tablas

## Introducción

Tabla 1. Productos Fitosanitarios a base de *Trichoderma* comercializados en España 2022 [237].. 30

Tabla 2. Productos Biofertilizantes a base de *Trichoderma* comercializados en España 2022 [237]31

## Capítulo 1

Tabla 1. Número total y distribución según el tipo de documentos sobre *Trichoderma/Hypocrea* indexados por Scopus durante 1960-2019..... 66

Tabla 2. Principales datos bibliométricos de las 15 primeras fuentes que tratan sobre *Trichoderma/Hypocrea* (Scopus 1960-2019). Clasificación por número de documentos (N)..... 69

Tabla 3. Evolución de 20 palabras clave principales sobre la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019, utilizando la base de datos Scopus. Frecuencia en documentos (F) y posición en el ranking (R) por periodo (top 20 rojo). ..... 73

Tabla 4. Principales palabras clave utilizadas en los países más productivos en la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* en todo el mundo (1960-2019). El número de documentos de cada palabra clave se muestra entre paréntesis. .... 76

Tabla 5. Ranking de las instituciones más productivas en investigación sobre *Trichoderma* a nivel mundial (1960-2019) y bibliometría de las instituciones ..... 77

Tabla 6. Principales palabras clave utilizadas en las instituciones más productivas en la investigación de *Trichoderma* a nivel mundial (1960-2019). El número de documentos de cada palabra clave se muestra entre paréntesis. .... 78

## Capítulo 2

Tabla 1. Parámetros morfológicos de las plantas de melón tratadas con diferentes dosis de NaCl y aislados de *Trichoderma*. ..... 99

## Capítulo 3

Tabla 1. Producción masiva de esporas en sustratos sólidos (UFC g-1)..... 117

Tabla 2. Producción de sideróforos y de IAA por los aislados de *Trichoderma*..... 118

Tabla 3. Efectos de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* en la germinación de semillas de tomate y pimiento a los 7 y 10 días del tratamiento, respectivamente. .... 120

Tabla 4. Parámetros morfológicos e índice de calidad de plántulas de pimiento y tomate tratadas con *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* a los 45 días de la siembra.....122

Tabla 5. Parámetros morfológicos y DQI de las plántulas y plantas de tomate tratadas con diferentes dosis (105, 106 y 107 esporas por planta): D1, D2 y D3, respectivamente de *T. aggressivum* f. *europaeum* (TA), *T. saturnisporum* (TS) y la mezcla (M) de las dos especies..... 123

## Capítulo 4

Tabla 1. Efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial de *T. aggressivum* a diferentes dosis (D1-D4). Los valores medios ( $\pm$  desviación estándar) seguidos de letras diferentes (línea) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD). (1) Citoesqueleto y proteínas motoras, (2) transducción de señales, (3) biosíntesis de esteroides en las membranas, (4) síntesis de aminoácidos y proteínas, (5) respiración, (6) síntesis o transporte

de lípidos/integridad o función de las membranas, (7) sustancias químicas con actividad multisitio, (8) inducción de la defensa de la planta huésped, (9) modo de acción desconocido, (10) metabolismo de los ácidos nucleicos y (11) biosíntesis de la pared celular. Acción fungicida/fungistática (letras rojas): F: Fungicida; f: fungistático..... 143

Tabla 2. Potencial antagonico de los aislados de *T. aggressivum* f. *europaeum* contra seis fitopatógenos en cultivo dual en medio PDA. El porcentaje de inhibición del micelio se calculó como  $PIRM = (R1 - R2) \div R1 \times 100$ , donde: PIRM: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno, R1: crecimiento radial del patógeno en placas de control, R2: crecimiento radial del patógeno en placas de cultivo dual. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ )..... 146

Tabla 3. Crecimiento micelial (cm) de los fitopatógenos en medio PDA por exposición a los volátiles de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* TAET1 frente al control de crecimiento. \* Las medias son significativamente diferentes (LSD) según la prueba T de estudiantes ( $p < 0.05$ ). ..... 147

Tabla 4. Efectos de la aplicación de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum*. Número de esclerocios recuperados, porcentaje de germinación de esclerocios y colonización de TAET1 medidos tras 25 días de incubación. \* Los valores representan las medias de cinco réplicas. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student ( $p < 0.05$ ).....149

# Índice de Figuras

## Introducción

Figura 1. Ventas de productos fitosanitarios (toneladas) en la Unión Europea, [232]. ..... 27

Figura 2. Ventas de productos fitosanitarios en España, en toneladas [233]. ..... 27

## Capítulo 1

Figura 1. Resumen de las principales aplicaciones industriales y agronómicas de *Trichoderma*. .... 61

Figura 2. Estructura de la metodología y relación con los resultados obtenidos..... 64

Figura 3. Tendencias de crecimiento de las publicaciones mundiales sobre *Trichoderma/Hypocrea* y las 10 principales especies de *Trichoderma* (A). Relevancia de las 10 principales especies de *Trichoderma* durante los últimos 60 años (B). ..... 65

Figura 4. Evolución de la categoría temática (clasificación Scopus) de los documentos mundiales sobre *Trichoderma/Hypocrea* publicados en el periodo 1960-2019. .... 67

Figura 5. Evolución del número medio de citas por documento en dos periodos de citación (1960-2019 y 2005-2019). ..... 68

Figura 6. Distribución por países de los documentos publicados (*Trichoderma/Hypocrea*) en las 15 principales revistas durante los últimos 60 años. .... 71

Figura 7. Nubes de palabras basadas en las 50 principales palabras clave relacionadas con *Trichoderma/Hypocrea* en cada década (1960-2019). ..... 74

Figura 8. Mapa de distribución de la investigación mundial sobre *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019 basado en el número de documentos..... 76

Figura 9. Co-ocurrencia de palabras clave del autor de los documentos publicados en la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* 1960-2019. .... 79

Figura 1. Aislados de *Trichoderma* examinados por microscopía electrónica y óptica. (A) Conidióforos con conidios de *Trichoderma longibrachiatum*; (B) Hifas de *Trichoderma saturnisporum*; (C) Colonización de *Trichoderma aggressivum* en la raíz del melón. (D) Micelio de *T. aggressivum* alrededor del micelio de *Pythium ultimum*. .... 94

Figura 2. Crecimiento micelial (cm) de los aislados de *Trichoderma* en función de diferentes concentraciones de NaCl (0-20 g·L<sup>-1</sup>) y temperaturas (25/35 °C). (A) *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum*. (B) *T. longibrachiatum*. (C) *T. saturnisporum*. (D) *Pythium ultimum*. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 5). Para cada aislado, las columnas marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa a p < 0.05. .... 97

Figura 3. Potencial antagonico de los aislados de *Trichoderma* contra *P. ultimum* (Py) en cultivo dual a diferentes niveles de salinidad en medio de agar papa dextrosa (PDA). El % de inhibición micelial se calculó como  $PIRG = (R1 - R2) \div R1 \times 100$ , donde: PIRG: porcentaje de inhibición del crecimiento

radial del micelio del patógeno, R1: crecimiento radial del patógeno en las placas de control, R2: crecimiento radial del patógeno en las placas de doble cultivo. a, b y c Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ).....	98
Figura 4. La incidencia de la enfermedad de <i>P. ultimum</i> en las plantas de melón se calificó 30 días después de la inoculación en base a una escala de 0-4: donde 0 = sin síntomas visibles de la enfermedad y 4 = planta muerta. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 10). a, b, c Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). .....	101
Figura 1. Producción en masa de (A) <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y (B) <i>Trichoderma saturnisporum</i> en 70 + 30% para cáscara de trigo sarraceno y avena.....	118
Figura 2. Efectos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (TA) y <i>Trichoderma saturnisporum</i> (TS) sobre la solubilización del fosfato en el caldo del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP) que contiene fosfato cálcico tribásico (10 g). T0: caldo NBRIP sin aislados de <i>Trichoderma</i> . Los resultados se muestran como la media de las tres réplicas, en g L-1. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 3). Para cada aislado, las columnas marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa a $p < 0.05$ .....	119
Figura 3. (A) Crecimiento diferencial de las plántulas de pimiento con <i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (TA), en comparación con el control. (B) Plantas de tomate cultivadas en condiciones de trasplante de campo (60 días). .....	121
Figura 4. (A) Colonización de raíces de pimiento y tomate por <i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> . (C) Micelio en raíz de pimiento (100×). (B) Conidióforos y micelio en raíz de tomate (100×). (D) Clamidosporas en raíz de pimiento (200×). .....	124
Figura 1. Moho verde en la capa de envoltura y en el hongo (A, B). Aislado de <i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> TAET1: Cultivo (C) y conidióforos (D).....	139
Figura 2. Tasa de crecimiento (cm d-1) de diferentes aislamientos de <i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> . Las letras diferentes indican diferencias significativas según el ANOVA de una vía ( $p = 0.05$ ). (Número de acceso TAET1: MW751677.1). .....	147
Figura 3. Micoparasitismo por hifas de <i>Trichoderma</i> un enrollamiento alrededor de las hifas (A-E). Formación de ganchos (C, E), enrollamiento (B, D) e hifalización (F). Las imágenes se tomaron con un objetivo $\times 40$ . .....	147
Figura 4. Síntomas de <i>B. cinerea</i> (A-C), <i>M. melonis</i> (D-F) y <i>S. clerotiorum</i> (G-I), infección en hojas desecadas tratadas con TAET1 (A, D, G), fungicida (C, F, I) o control (B, E, H). .....	148
Figura 5. Efecto de TAET1 en la germinación de esclerocios. Control: esclerocios con micelio blanco en su superficie. TAET1: Observación de <i>Trichoderma</i> en la superficie del suelo (masa verde). .	149

Figura 6. La gravedad de la enfermedad de los fitopatógenos en las plantas se calificó entre 30 y 90 días después de la inoculación en base a una escala de 0 a 5: donde 0 = sin síntomas visibles de la enfermedad y 5 = planta muerta. T0: control; TAET1: *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1; Bot: *B. cinerea*; Mym: *M. melonis*; Scle: *S. sclerotiorum*; Rz: *R. solani*; FSC: *F. solani* f. *cucurbitae*; Pya: *P. aphanidermatum*. La desviación estándar media se expresa mediante barras de error (24 plantas por repetición). Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según el ANOVA ( $p < 0.05$ ). ..... 150

Figura 7. Comparación del estado de las plantas al final del ensayo: sin inóculo FSC (A) y los tratamientos con F1 (B) y con F2 (C), con TAET1. FSC: Control sin *F. solani* f. *cucurbitae* (FSC). F1: 105 UFC·mL<sup>-1</sup>; (F2): 104 UFC·mL<sup>-1</sup>..... 151

Figura 8. Comparación del efecto de TAET1 en el porcentaje de severidad de la enfermedad tras aplicar dos dosis de FSC (F1: 105 UFC·mL<sup>-1</sup>; F2: 104 UFC·mL<sup>-1</sup>. 25, 50, 75 y 100%: porcentajes de severidad de la enfermedad superiores al 25%, 50%, 75% y 100% para F1 y F2..... 152

Figura 9. Control de *P. xanthii* mediante la pulverización de plantas de calabacín con TAET1. Proporción media de superficie foliar con síntomas de oídio por planta, porcentaje del número de hojas con síntomas por planta y porcentaje del número de pecíolos con oídio. Px: Aplicación de *P. xanthii*. Px- TAET1: aplicación de TAET1 3 días antes de la aplicación de *P. xanthii*. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student. \* significativo a  $p < 0.05$ . ..... 153



## Resumen

Almería, España, es actualmente una de las zonas más importantes en la producción intensiva de hortalizas, teniendo una gran importancia tanto en términos de superficie de producción bajo invernadero, así como una gran importancia económica derivada de la exportación.

El control de las plagas y enfermedades en los cultivos protegidos es un problema complejo que se ha agravado, por el uso de pesticidas químicos, principalmente en el manejo de enfermedades originadas por hongos, que han favorecido la aparición de resistencias. El uso de microorganismos como agentes de control biológico (ACB) de enfermedades es una de las claves para realizar una producción con menos residuos fitosanitarios, reduciendo el impacto ambiental y proporcionando una mayor seguridad alimentaria. Adicionalmente, mucho de los ACB comercializados actúan como agentes promotores del crecimiento vegetal, promoviendo el rendimiento de las cosechas y la calidad de los cultivos, reduciendo los costos de fertilización a los agricultores.

La búsqueda de nuevas herramientas que permitan reducir el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos es un objetivo que hay que alcanzar a medio plazo. En la zona de Almería, se ha producido un notable avance en el control biológico de las plagas, no así en el de las enfermedades, siendo este aún bastante dependiente del uso de agroquímicos.

El objetivo general de este trabajo fue la evaluación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* como agente promotor del crecimiento vegetal y de control biológico de enfermedades hortícolas, para el uso en la agricultura. Partiendo de que no es una cepa referenciada como agente promotor del crecimiento vegetal ni como controlador biológico de enfermedades, sino por el contrario es una cepa descrita como generadora del moho verde en cultivos de champiñón (*Agaricus bisporus*).

La utilización de microorganismos beneficiosos como el género *Trichoderma*, es una de las estrategias más prometedoras para el aumento de la productividad y la reducción del uso de fertilizantes inorgánicos, herbicidas, y pesticidas. Para lograr el objetivo general, se plantearon varios objetivos específicos, por medio de las metodologías más adecuadas para la evaluación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*, en los cultivos hortícolas de más interés en la zona de estudio. En este momento nos encontramos en un período de transición hacia un futuro reglamento europeo de fertilizantes y biocontroladores, aun a la fecha la mayoría de los microorganismos evaluados en la literatura, no llegan al mercado comercial.

A lo largo de la presente tesis se presentan los resultados obtenidos en los ensayos realizados a partir de los diferentes objetivos específicos; dando inicio con la determinación de la velocidad y capacidad de crecimiento en diferentes condiciones *in vitro*, así como la capacidad antagonista, por medio de la capacidad de inhibición de desarrollo de diversos fitopatógenos de importancia en condiciones *in vitro*. Se determinó la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en semillas y plántulas de diversos cultivos, en diferentes ambientes. Se realizó la estimación de la capacidad de la cepa como agente de control biológico de fitopatógenos *in vivo* en invernadero. Así como la producción de metabolitos, actividad enzimática, producción de ácido indolacético y sideróforos, se llevó a cabo la identificación y caracterización molecular mediante PCR y análisis de la secuenciación. Finalmente se realizó la puesta a punto de sistemas de multiplicación masiva a escala piloto. También la compatibilidad de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* con fungicidas.

Desde el punto de vista de la investigación, este trabajo permite contribuir con un nuevo microorganismo viable para la prevención y control de enfermedades fúngicas en las plantas, así como la promoción del crecimiento.

## Abstract

Almeria, Spain, is currently one of the most important areas in intensive vegetable production, having a great importance both in terms of production area under glass, as well as a great economic importance derived from exports.

The control of pests and diseases in protected crops is a complex problem that has been aggravated using chemical pesticides, mainly in the management of fungal diseases, which have favored the appearance of resistance. The use of microorganisms as biological control agents (BCA) for diseases is one of the keys to production with less phytosanitary residues, reducing environmental impact and providing greater food safety. In addition, many of the CBAs on the market act as plant growth promoting agents, promoting crop yields and crop quality, reducing fertilizer costs for farmers.

The search for new tools to reduce the use of pesticides and chemical fertilizers is an objective to be achieved in the medium term. In the Almeria area, there has been notable progress in biological pest control, but not in disease control, which is still highly dependent on the use of agrochemicals.

The general objective of this work was the evaluation of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as a plant growth promoter and biological control agent for horticultural diseases, for use in agriculture. This is since it is not a strain referenced as a plant growth promoting agent or as a biological disease controller, but on the contrary, it is a strain described as a generator of green mould in mushroom crops (*Agaricus bisporus*).

The use of beneficial microorganisms such as the genus *Trichoderma* is one of the most promising strategies for increasing productivity and reducing the use of inorganic fertilizers, herbicides, and pesticides. To achieve the general objective, several specific objectives were proposed, by means of the most appropriate methodologies for the evaluation of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, in the horticultural crops of most interest in the study area. Now we are in a transition period towards a future European regulation of fertilizers and bio-controllers, even to date most of the micro-organisms evaluated in the literature have not reached the commercial market.

Throughout this thesis, the results obtained in the tests carried out from the different specific objectives are presented; starting with the determination of the speed and capacity of growth in

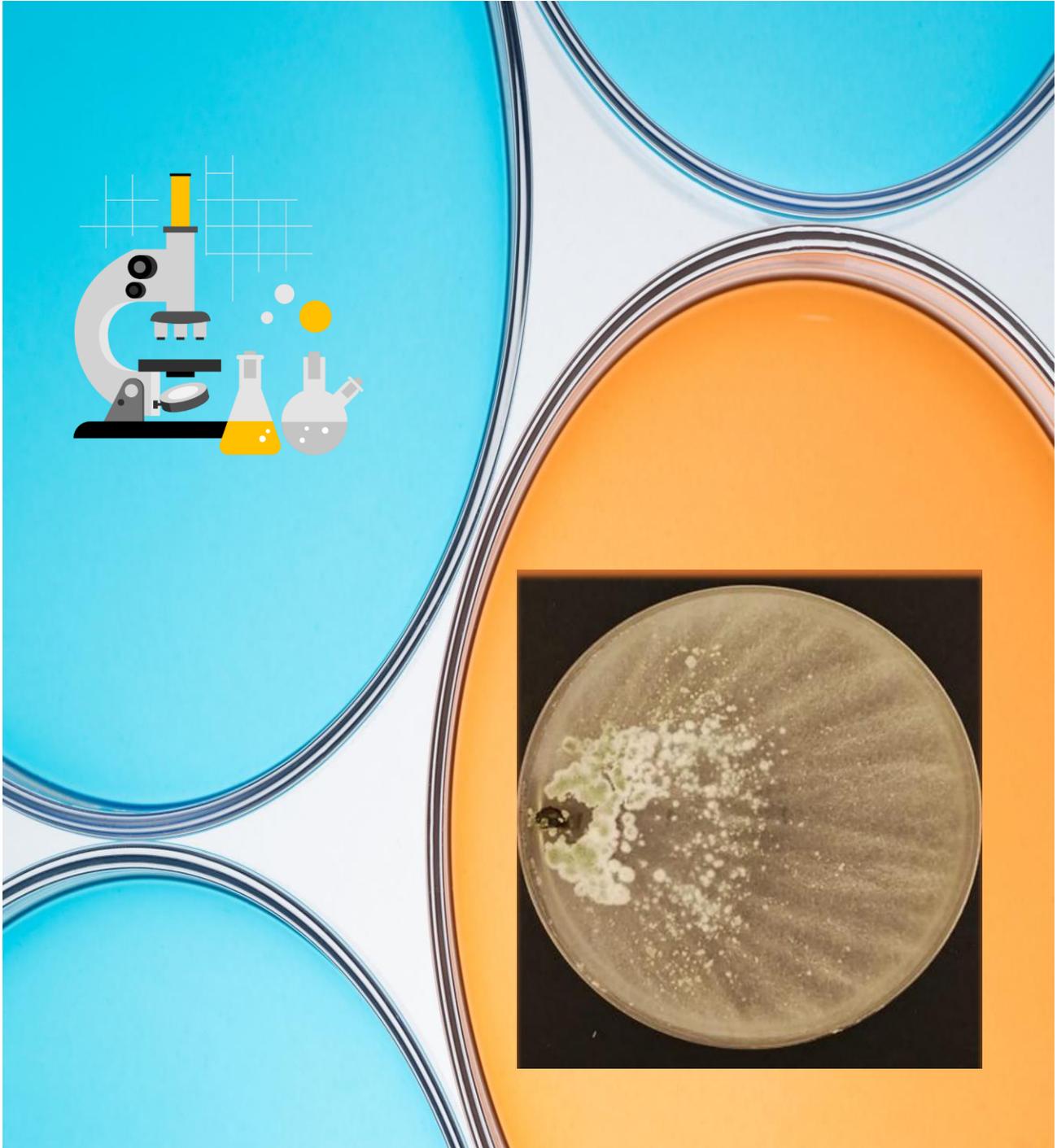
different in vitro conditions, as well as the antagonistic capacity, by means of the capacity of inhibition of the development of diverse phytopathogens of importance in in vitro conditions. The capacity to promote plant growth in seeds and seedlings of different crops in different environments was determined. The capacity of the strain as a biological control agent of phytopathogens in vivo in greenhouses was estimated. Metabolite production, enzyme activity, production of indoleacetic acid and siderophores, molecular identification and characterisation by PCR and sequencing analysis were carried out. Finally, mass multiplication systems were set up on a pilot scale. Also, the compatibility of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* with fungicides.

From a research point of view, this work allows us to contribute with a new viable microorganism for the prevention and control of fungal diseases in plants, as well as growth promotion.

## Abreviaturas en el texto

°C	Grados centígrados
ACB	Agentes de Control Biológico
AIA	Ácido Indol-3- Acético
ANOVA	Análisis de la Varianza
BH	Trigo Sarraceno
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
C	Carbono
CAS	Medio de Agar Cromo-Azurool
CE	Comunidad Europea
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
CLP	Reglamento de Nuevos Pictogramas y Frases
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus SARS-CoV-2.
CPCA	Cadena Alimentaria y de Seguridad Animal
D	Diámetro del Tallo
DAR	Proyecto de Informe de Evaluación
DO	Diario Oficial de la Unión Europea
DQI	Índice de Calidad de Dickson
ECPA	Asociación Europea para la Protección de Cultivos
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EMR	Estado Miembro Informante
EPS	Síntesis de exopolisacárido
F	Frecuencia de Documentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro de Hierro
g	Gramos
GIP	Gestión Integrada de Plagas
h	Horas
HClO <sub>4</sub>	Ácido Perclórico
HR	Humedad relativa
IBMA	Asociación Internacional de Fabricantes de Biocontrol
ISR	Resistencia Sistémica Inducida
IVS	Índice de Vigor de las Semillas
JCR	Reporte de Citas en Revistas
K <sub>2</sub> O	Óxido de Potasio
kg	Kilogramos
L	Litros
LMR	Límites Máximos de Residuos
LS	Longitud del Tallo
MBCA	Agentes de Control Biológico Microbiano
min	Minutos
MIP	Manejo Integrado de Plagas
mL	Mililitros

mm	Milímetros
MPP	Microorganismos Promotores de Plantas o Microorganismos Probióticos Vegetales
N	Número de documentos
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOCl	Hipoclorito de Sodio
NBRIP	Caldo de Fosfato Tricálcico Básico
NCBI	Centro Nacional de Biotecnología
nm	Nanómetros
O	Avena
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
P	Fosforo
P2O5	Óxido de Fósforo
PDA	Medio Agar Papa Dextrosa
PGPF	Hongos Promotores del Crecimiento Vegetal
PGPM	Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal
PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
pH	Medida de acidz
PIRG	Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno
Py	<i>Pythium ultimum</i>
R	Arroz
R	Posición en el Ranking
RDW	Peso Seco de la raíz
RM	Reconocimiento Mutuo
SDW	Peso Seco del Tallo
SNPV	Nucleopoliendrovirus simple
TA	<i>Trichoderma aggressivum</i>
TDW	Peso Seco Total
TL	<i>Trichoderma logibranchiatum</i>
TS	<i>Trichoderma saturnisporum</i>
UE	Unión Europea
WoS	Web de la Ciencia



# Introducción

## El control biológico en la agricultura

### 1.1. Contexto actual

Las nuevas tendencias de consumo se dirigen a productos libres de químicos, con mejor calidad, inocuidad y aporte de nutricional, siendo los productos bio un mercado principalmente para la población con un poder adquisitivo elevado. Por otro lado, durante 2020 se ha incrementado el número de personas que padecen hambre en el mundo, siendo entre 720 y 811 millones de personas [1]. En el caso de Europa, no se esperan grandes cambios demográficos. Sin embargo, se estima que la población mundial pasará de 7.800 millones en 2020 a 9.700 millones en 2050 y se requerirá al menos el doble de la producción actual, sin importar el daño en los recursos medioambientales y la disminución de las tierras de cultivo, debiendo adoptar el uso de sistemas de cultivo que permitan aumentar la productividad y minimicen los daños en el entorno [2].

Para lograr este reto la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2021) ha propuesto los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), donde se manifiesta que es fundamental contar con sistemas agroalimentarios eficientes, inclusivos, resilientes y sostenibles [3]. La pandemia por coronavirus (COVID-19) ha impactado en todo el mundo, principalmente a los sistemas agroalimentarios, acrecentando los problemas y contrariedades del sector agrario. Dicha pandemia representa una crisis sanitaria, socioeconómica y humanitaria que está profundizando las desigualdades de la población. Para tener una rápida recuperación del sector agrícola y como medida para hacer frente la situación mundial de la seguridad alimentaria y la nutrición es necesario alinear las producciones a los ODS, a fin de alcanzar las metas establecidas en la Agenda 2030 [3,4].

Entre las principales causas que influyen en la falta de seguridad alimentaria y aumento de la economía de muchos países, está la baja productividad agrícola y la pérdida de hasta un 30% de rendimiento en los cultivos [5,6]. La disponibilidad de nutrientes y el control de enfermedades son dos de los factores que afectan en la producción de los cultivos, siendo necesaria una mayor conciencia sobre el uso de pesticidas y plaguicidas químicos y el uso en exceso de fertilizantes inorgánicos [7]. El uso indiscriminado del control químico, entre ellos los fungicidas, pesticidas y herbicidas, han suscitado problemas en los ecosistemas, generando resistencia a su acción por parte de los microorganismos plaga o causantes de enfermedades en invernadero; además, la acumulación

de estos productos en los alimentos ha desencadenado complicaciones a la salud humana [8,9,10,11], situación que nos mantiene alejados de una producción sostenible.

Desde hace varias décadas, varias especies microbianas se están usando como agentes de control biológico (ACB) tanto para patógenos presentes en el suelo como en los cultivos [12,13], debido a su baja posibilidad de inducir resistencia en el patógeno objetivo [14,15]. Su sinónimo “biocontrol” en su forma abreviada es ampliamente utilizado en fitopatología y entomología [16].

El uso de microorganismos para controlar enfermedades o plagas en las plantas es la definición más cerrada de biocontrol [17,18,19], y una definición más amplia y actualizada comprende no sólo microorganismos, sino también los compuestos que secretan, los cuales pueden desencadenar la propia defensa de las plantas [20], definición validada por la Asociación Internacional de Fabricantes de Biocontrol (IBMA), la cual define que los organismos de biocontrol se encuentran ampliamente en la naturaleza e incluyen bacterias, hongos, virus, levaduras y protozoos, y pueden controlar enfermedades de las plantas de forma directa o indirecta [21,22,23].

La industria del control biológico desarrolla estrategias biológicas no tóxicas para el medio ambiente, que permiten el control de plagas y enfermedades [24]. Incluso, el uso de microorganismos para el control de enfermedades poscosecha. Son un producto más seguro en su aplicación y transporte, de bajo costo de producción y mínimamente dañino para el ambiente. Entre los géneros fúngicos, *Trichoderma* es el género más ampliamente utilizado dentro del control biológico en la agricultura, tanto para controlar enfermedades como plagas [25,26].

Los microorganismos han tomado el entorno de la planta como hábitat, donde se han adaptado al medio vegetal que ofrecen las plantas siendo principalmente tres: la filósfera (parte aérea de la planta) [27], la rizosfera (zona de influencia del sistema radicular) [28] y la endosfera (sistema de transporte interno) [29]. El microbioma generado en las plantas es de gran importancia para el biocontrol y la promoción del crecimiento, ya que las interacciones que se pueden dar entre los microorganismos y la planta pueden ser, neutras, benéficas o incluso perjudiciales, dependiendo de quien las cause, bacterias simbióticas, micorrizas, hongos con capacidad fitoestimulante, o interacciones con bacterias, hongos o virus patógenos que den lugar a enfermedades [30].

El termino microbioma tiene diferentes definiciones. Se puede describir como el conjunto de genomas (material genético para el desarrollo y funcionamiento) de los microorganismos de un hábitat en específico y la microbiota como el conjunto de comunidades microbianas. En el caso de las plantas, el microbioma son todas las comunidades microbianas viviendo e interactuando agrupadas en los diferentes tejidos (raíces, brotes, hojas, semillas, flores) [31,32]. El microbioma está

compuesto por varios tipos de organismos diferentes, incluyendo hongos, bacterias, protozoos y virus [33]. A la aplicación de comunidades diseñadas o derivadas de otras anteriores para modificar el microbioma, puede considerarse como un tratamiento probiótico. El éxito de estos depende de la dinámica ecológica del sistema [34,35,36]. Los probióticos han sido definidos por OMS/FAO/ONU como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped [37].

Los microorganismos probióticos vegetales (MPP), también son conocidos como bioprotectores, biocontroladores, biofertilizantes o bioestimulantes; son microorganismos beneficiosos que ofrecen una alternativa prometedora al cuidado del medio ambiente y la salud. Las plantas siempre están en interacción con microorganismos que favorecen la asimilación de nutrientes y la tolerancia al estrés abiótico, como hongos y bacterias que estimulan la promoción del crecimiento vegetal, por acción de diferentes mecanismos que facilitan el intercambio de elementos químicos del ambiente que les rodea, y permiten su intervención en diversos ciclos biogeoquímicos [38,39].

Los microorganismos pueden interactuar con la planta, ya sea que vivan fuera (rizosfera), dentro (endosfera) o sobre (filosfera) la planta. La rizosfera (epifitos) es la parte del suelo en la que influyen las raíces de las plantas [40]. El término endófitos, admite como definiciones aquellos microorganismos presentes en los tejidos de las plantas sin causar síntomas o daños [41,42] a través de diversos mecanismos como son: retraso en el desarrollo de la plaga [43,44], inhibición en el consumo de los insectos [45,46,47,48], descenso de la supervivencia larvaria [49,50] y la disminución de la tasa de reproducción [51,52].

Las bacterias endofíticas colonizan los tejidos de las plantas sin causar infecciones o efectos negativos [53], residiendo de forma transitoria en el apoplasto o el simplasma [54]. Los efectos beneficiosos son mayores que el de las rizobacterias y pueden verse agravados en condiciones de estrés abiótico y biótico [55,56]. En cambio, los hongos endófitos son aquellos que colonizan y pasan parte de su ciclo de vida en el interior de los tejidos vegetales, sin causar daños o enfermedades. En los últimos años se han descrito numerosas especies de hongos endofíticos que son capaces de reducir la alimentación de los insectos herbívoros en las plantas colonizadas y además activar las defensas de las plantas por la producción de diversos compuestos [57].

Los microorganismos benéficos pueden incrementar la producción agrícola y la reducción del uso de fertilizantes, siendo usados como Biopesticidas o Biofertilizantes y bioactivadores. Los Biopesticidas son aquellos productos formulados por organismos biológicos y utilizados como plaguicidas para controlar plagas y enfermedades en cultivos, donde se ve amenazada la

productividad. Los bioplaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas) incluyen microorganismos como bacterias, virus, protozoos, nematodos y hongos; también están catalogados como biopesticidas los insectos parasitoides depredadores, ácaros, plantas y compuestos que alteren el comportamiento de los insectos. Los mecanismos de acción incluyen el antagonismo, la competencia, la infección, la infestación, la toxicidad y la depredación [58,59]. Los bioplaguicidas son parte de los programas de gestión integrada de plagas (GIP), como medida para la reducción de plaguicidas químicos, sin interferir en el rendimiento de los cultivos.

Existen diferentes métodos de fertilización del suelo, como la fertilización química, la fertilización orgánica y el uso de microorganismos [60], utilizados para mejorar los macro y micronutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, que favorecen el crecimiento y la producción de las plantas. El uso de microorganismos para aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios para las plantas se define como biofertilización [61]. Los bioestimulantes vegetales son aquellos que contienen sustancias o microorganismos, cuya función al ser aplicados a las plantas o a la rizosfera, es estimular los procesos naturales necesarios para mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés y la calidad del rendimiento de los cultivos [62]. Los agentes de control biológico (bioplaguicidas), también se han aplicado con éxito como biofertilizantes y bioestimuladores en plantas [63,64,65].

## **1.2. Microorganismos en el control Biológico**

De acuerdo con los objetivos de esta tesis, a continuación, se describirán los microorganismos más utilizados para el control biológico y promoción de crecimiento vegetal, desde dos puntos de vista el control biológico clásico y el de microorganismos.

Un Agente de Control Biológico es un enemigo natural, antagonista o competidor, utilizado para el control de plagas [66], agentes patógenos o insectos herbívoros. En un sentido amplio, el control biológico se definió como el uso de microorganismos vivos [23]. El objetivo principal del control biológico es un control autosostenible, manteniendo a la población plaga por debajo de umbrales aceptables. Existen diferentes enfoques del control biológico entre ellos, el control biológico clásico que se refiere a la introducción de un enemigo natural no nativo, para el control de uno de origen no autóctono, estableciendo una población de enemigos naturales suficientes para el control de la plaga objetivo, desarrollado principalmente para gestionar las plagas de plagas de insectos que afectan a los cultivos agrícolas [67,68,69], ácaros y enfermedades de las plantas [70].

En general, *Beauveria spp.*, *Metarhizium spp.* [71], *Purpureocillium sp.*, *Cordyceps spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Akanthomyces spp.* (syn. *Cephalosporium spp.*) [72,73], y *Akanthomyces lecanii*

(Zimm) Spatafora (syn. *Lecanicillium lecanii* Zare & Gams) [74,75,76,77,78,79,80], se han utilizado como bioinsecticidas para el control eficaz de las plagas. *Metarhizium*, *Cordyceps* y *Trichoderma* también habitan como endófitos de plantas [81,82], produciendo una variedad de compuestos de bajo peso molecular, metabolitos secundarios, responsables de actividades biológicas, como es la insecticida [83] o fungicida [84].

Los virus, las bacterias y los nematodos también se han empleado como agentes de biocontrol microbiano para mitigar los daños causados por artrópodos plagas y enfermedades de artrópodos. Por ejemplo, el nematodo, *Steinernema carpocapsae* (*Rhabditida: Steinernematidae*) se ha utilizado para el control de las orugas [85], un nucleopoliedrovirus simple (SNPV) se ha utilizado para el control del gusano cogollero africano, *Helicoverpa armigera* Hubner (*Lepidoptera: Noctuidae*) [86] y *Serratia marcescens* Bizio, un ejemplo de bacteria usada para el control de enfermedades de la podredumbre de la raíz [87].

### **Artrópodos (depredadores y parasitoides)**

En la provincia de Almería se cuenta con al menos 31.614 hectáreas de invernaderos [88], donde se ha llevado a cabo desde hace más de 20 años, el control biológico de insectos plaga, por medio de sueltas de fauna auxiliar y artrópodos (parasitoides y depredadores). Actualmente esta provincia es una referencia por el manejo de cultivos protegidos con ayuda del control biológico, a pesar de que, en sus inicios, el uso de artrópodos en el control de plagas en cultivos de pimiento tardo más en introducirse de forma intensiva, en comparación con otras zonas, como el Campo de Cartagena, donde desde el año 2001 se aplican estas técnicas de control en la mayoría de los cultivos [89,90].

En cultivos de pimiento de la región almeriense, se tenía una situación compleja en el manejo del trips, *Frankliniella occidentalis*, al igual que la mosca blanca *Bemisia tabaci* y la oruga, *Spodoptera exigua*, contexto debido principalmente a la resistencia de las plagas a materias químicas disponibles para su control [91,92]. Por ello se optó por el uso de la chinche depredadora *Orius laevigatus* [93], y más recientemente, se han añadido al manejo el ácaro fitoséido *Amblyseius swirskii*, depredador de larvas de trips y de huevos de *Bemisia tabaci* [94].

En tomate se realizan sueltas de enemigos naturales, contra la principal plaga, *Bemisia tabaci*, soltando el parasitoide *Eretmocerus mundus* y el mírido *Nesidiocoris tenuis*. Contra el minador (*Liriomyza spp.*) se utiliza el parasitoide *Diglyphus isaea*, mientras que el control de ácaros (*Tetranychus spp.* y *Aculops lycopersici*) no se ha conseguido un buen control biológico. Los depredadores de trips que funcionan bien en otros cultivos, *Orius laevigatus* y *Amblyseius swirskii*,

no son capaces de mantenerse en tomate. Para el control de *Tuta absoluta* de momento, se realizan sueltas de míridos (*Nesidiocoris tenuis*) como depredadores y se están realizando estudios de otro heteróptero, *Nabis pseudoferus* (*Hemiptera, Nabidae*) [95]. En América Latina se conoce a especies como *Trichogramma pretiosum* (*Hymenoptera, Trichogrammatidae*), parasitoide de huevos, y a *Pseudapanteles dignus* (*Hymenoptera, Braconidae*) como parasitoides con cierta eficacia contra la plaga.

En cultivos como pepino, calabacín, judía, melón y sandía que son de ciclos cortos de duración, la gama de enemigos naturales de utilidad se limita a las especies con un ciclo de vida rápida, es decir, los ácaros depredadores y los parasitoides. Generalmente, un ciclo de cultivo de 3 meses no se presta para el establecimiento de los chinches, míridos o anthocóridos, sobre todo cuando este ciclo se produce en épocas con temperaturas bajas. El control de plagas por los enemigos naturales funciona mejor que el control químico y la planta se muestra más productiva cuando se puede prescindir de los tratamientos semanales con mezclas de plaguicidas [96].

### **Microorganismos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son especialmente adecuados para su desarrollo como bioplaguicidas, ya que, a diferencia de las bacterias y los virus, que tienen que ser ingeridos para causar enfermedades, los hongos suelen infectar a los insectos mediante la penetración directa de la cutícula, seguida de su multiplicación en el hemocele, para lo que requieren adhesinas y enzimas líticas (quitinasas, proteasas y lipasas) [97,98,99]. La ventaja que presentan estos microorganismos es la relación que mantiene con la planta que permiten la disponibilidad de los metabolitos bioactivos insecticidas o antimicrobianos secretados en los tejidos de las plantas, la cual sirve como un puente para la movilización de estos compuestos al patógeno o plaga objetivo [100,101].

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control, constituyendo un grupo con más de 100 géneros y más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y que causan infecciones fúngicas a poblaciones de artrópodos [102, 103]. Sólo 10 especies han sido explotadas comercialmente, entre ellas, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutiella thompsonii*, *Paecilomyces spp.* [104], incluyendo el conocido parasitismo de hongos fitopatógenos por especies de *Trichoderma* [105,106,73]. Los hongos entomopatógenos desarrollados como micoacaricidas, pueden encargarse de forma natural las poblaciones de ácaros [107]. Recientemente Poveda [108], ha publicado un artículo donde describe la mayoría de las especies de *Trichoderma* usadas como agente de biocontrol contra las plagas, por su capacidad entomopatógena.

El movimiento hacia una agricultura respetuosa con el medio ambiente de las últimas dos décadas ha fomentado el uso y el uso y facilitado los estudios de los hongos de biocontrol, así como desarrollo de la gestión integrada de plagas (GIP) requiere el uso de diferentes estrategias biológicas y físicas, incluyendo microorganismos, depredadores y/o parasitoides [109,110,111].

### **Microorganismos biocontroladores**

Existen evidencias que muestran como los microorganismos del suelo (hongos y bacterias de la rizosfera), pueden desempeñar un papel importante en la supresión de las enfermedades de las plantas mediante el control directo de patógenos radiculares y foliares, así como por la inducción de la resistencia sistémica en las plantas. La capacidad de estos microorganismos, para generar inmunidad a las plantas contra patógenos ha popularizado su uso para la protección de cultivos generando una disminución del uso de pesticidas [112,113,114,115].

Los microorganismos biocontroladores favorecen la agricultura sostenible, al mejorar la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico, como las temperaturas extremas (frío, heladas y calor), salinidad, estrés hídrico o mejorando las condiciones de la planta para evitar el establecimiento de microorganismos patógenos causantes de enfermedades [116,117,118,119].

Las enfermedades más importantes que causan grandes pérdidas en los cultivos agrícolas son: el moho (*Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitz, *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.* y *Rhizoctonia spp.*, la mancha foliar de *Alternaria* (*Alternaria melongenae* Rang. & Samb y *A. solani* (El. & Mart) Jones y Grout), la mancha foliar por *Cercospora* (*Cercospora melongenae* Welles y *C. solani-melongenae* Chupp) *Phomopsis blight* y pudrición de la fruta (*Phomopsis vexans* (Sacc & Syd) Harter), el tizón por *Sclerotinia* (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), el marchitamiento por *Verticillium* (*Verticillium dahlia* Kleb.), la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al. 1995), la hoja pequeña (micoplasma) y el mosaico (grupo *Tymovirus*). Todos ellos pueden causar una pérdida de rendimiento superior al 70 % [120,121,122].

Los patógenos en su mayoría se han vuelto insensibles/resistentes a los productos químicos comerciales, por lo que la aplicación de biofungicidas para controlar las plagas es una herramienta en uso [123,124]. Existen varios mecanismos por los que los microorganismos de actúan como control biológico ante las enfermedades, principalmente competición, parasitismo, antibiosis y resistencia sistémica.

### **1.2.1.1. Competición**

La competición entre los agentes de biocontrol y el patógeno se da a través de la competencia por los nutrientes o el espacio en la planta, conduciendo a una menor infección o del patógeno [105]. En los ensayos de cribado basados en el fenotipo, se evalúa el efecto antagonista directo sobre el patógeno midiendo la capacidad de inhibición de crecimiento del patógeno y su capacidad de formar estructuras infecciosas específicas (apresorios), observadas en microscopía o su efecto patógeno en la planta (la intensidad de la enfermedad o virulencia) [122,125]. El género *Trichoderma spp.* por ejemplo, compete con otros hongos por los nutrientes y los elementos esenciales en el suelo y la rizosfera y/o modifican la rizosfera acidificando el suelo, donde los patógenos no pueden crecer. [126,127].

### **1.2.1.2. Parasitismo**

El parasitismo, sólo aplica a los agentes de control biológicos vivos, debido a que implica la interacción de dos organismos, en los que el parásito en este caso el agente de biocontrol vive sobre el huésped o dentro, incluso en las células del huésped, que generalmente es el patógeno de la planta, lo que provoca efectos antagónicos en este último. Estas interacciones pueden incluir el parasitismo de virus (bacteriófagos) sobre bacterias [128], bacterias sobre hongos (micofagia) y de hongos sobre hongos (micoparasitismo) [129].

El término micoparasitismo se utiliza en referencia al fenómeno de un hongo que parasita a otro, mientras que el término hiperparasitismo se utiliza en referencia a los micoparásitos de huéspedes fúngicos, que son también, parásitos. En general, los parásitos, incluidos los micoparásitos, se dividen en necrótrofos y biotrofos; y de acuerdo con los conceptos de necrotrofia y biotrofia, se sabe que los necrótrofos obtienen su nutrición de las células muertas del huésped después de matarlo, mientras que los biotrofos no matan a su huésped. Los antagonistas que actúan a través del hiperparasitismo interfieren directamente con el patógeno, por ejemplo, el parasitismo de hongos fitopatógenos por especies de *Trichoderma* [130,131].

### **1.2.1.3. Antibiosis**

La antibiosis se define como la inhibición o destrucción del microorganismo mediante sustancias como metabolitos específicos o inespecíficos o por la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de otro microorganismo [132,133].

Los antibióticos son sustancias volátiles o no volátiles producidas por el microorganismo, que actúan a bajas concentraciones, aunque se han descrito otros compuestos antimicrobianos excretados

por los agentes de control biológico, como: las enzimas que degradan la pared celular (quitinasas y glucanasas), hidrolasas, pironas, terpenoides, sideróforos y peptaiboles. Algunos microorganismos comienzan a producir antibióticos sólo cuando hay una cantidad significativa de sustrato, principalmente de carbono, mientras que otros microorganismos comienzan a producir antibióticos cuando la disponibilidad de sustrato se reduce. Se cree que esta estrategia sirve para ampliar la actividad general de ciertos microorganismos al impedir que otros microorganismos utilicen la cantidad restante de sustrato. Por lo tanto, la antibiosis parece tener un papel importante en la capacidad competitiva de los microorganismos que producen antibióticos. La secreción de metabolitos interfiere a los factores de patogenicidad, reduciendo así virulencia del patógeno [134,135].

#### **1.2.1.4. Resistencia Sistémica**

El término resistencia inducida es un sinónimo para el estado de resistencia inducido en las plantas provocado por inductores biológicos o químicos, que protege las partes de la planta no expuestas contra futuros ataques de microorganismos patógenos e insectos herbívoros. Las plantas pueden desarrollar una resistencia inducida como resultado de la infección por un patógeno, en respuesta al ataque de insectos, tras la colonización de las raíces por microbios beneficiosos específicos o tras el tratamiento con productos químicos específicos [136,137].

El estado de resistencia inducida se caracteriza por la activación de mecanismos de defensa latentes que se expresan ante un desafío posterior de un patógeno o un insecto herbívoro. Es regulada por una red de vías de señalización interconectadas en las que las hormonas vegetales desempeñan un papel regulador importante. Las vías implicadas en las resistencias son, en muchas ocasiones, la del ácido salicílico, el ácido jasmónico, el etileno o el óxido nitroso, que inducen las señales primarias en la regulación de la respuesta inmune de las plantas que conducen a la producción de una variedad de metabolitos y proteínas con diversas funciones [138,139,140].

Las plantas a menudo son agredidas simultáneamente por patógenos y microorganismos benéficos y la activación de diferentes mecanismos de defensa de la planta, las vías ácido salicílico y ácido jasmónico, a menudo resulta en su antagonismo recíproco, que ha sido interpretado como una estrategia adaptativa de ahorro de energía ante los diferentes enemigos que son susceptibles a diferentes estrategias de defensa [141]. La resistencia sistémica inducida (ISR) es parte del mecanismo a través del cual las bacterias y los hongos promueven el crecimiento de las plantas estimulando su crecimiento y su resistencia a los patógenos [142].

La colonización de la raíz es un evento vital necesario para el inicio de la ISR. Esto es esencial, ya que los microbios beneficiosos necesitan establecer una asociación mutualista con el sistema radicular de la planta huésped de forma eficiente. Para que se produzca la sinergia, tanto la planta como los microorganismos benéficos deben responder mutuamente las señales [143,81].

Los hongos como agentes de control biológico tienen características competentes para su explotación multifacética, en la agricultura sostenible, como biofertilizantes para promover el crecimiento de las plantas y como agentes de biocontrol para la gestión de plagas y enfermedades [144,145].

### **1.3. Biofertilizantes y Bioestimulantes**

La gestión integrada de plagas GIP, es una estrategia de control biológico basada en los factores naturales. Un programa de control integrado de plagas considera todas las acciones de control disponibles, incluyendo la no acción, y evalúa la interacción potencial entre las diversas tácticas de control, las prácticas culturales, el clima, otras plagas y el cultivo a proteger [146].

Como parte de la GIP, está el uso de bioestimulantes definida en la literatura científica en 2007, donde se define a los bioestimulantes como: "Son materiales, distintos de los fertilizantes, que promueven el crecimiento de las plantas cuando se aplican en bajas cantidades", donde estos materiales son una variedad de formulaciones, incluso la mezcla de distintos ingredientes. [147].

Estos mejoran la nutrición y lo hacen independientemente de su contenido en nutrientes. Los biofertilizantes son una subcategoría de los bioestimulantes. Aumentan la eficiencia del uso de los nutrientes y abren nuevas vías de adquisición de nutrientes por parte de las plantas. Pueden ser bioestimulantes microbianos: incluyen hongos micorrícicos y no micorrícicos, endosimbiontes bacterianos (las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) y hongos (hongos promotores del crecimiento vegetal). Así, los microorganismos aplicados a las plantas pueden tener una doble función de agente de biocontrol y de bioestimulante, en beneficio de la agricultura [148].

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) forman parte de los Biofertilizantes y Bioestimulantes y pueden dividirse en dos grupos principales: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF). Estos microorganismos son capaces de aumentar las concentraciones de micronutrientes en muchos cultivos principalmente el selenio, el hierro y el zinc. Las interacciones entre las plantas y los microorganismos incrementan la biofortificación de los cultivos con micronutrientes de forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente. [149].

### **1.3.1. PGPR (Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)**

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) contribuyen en gran medida a mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas [150], forman parte de la rizosfera en asociación con las plantas, estimulan el crecimiento, cuentan con una gran adaptación a una variedad de entornos, una tasa de crecimiento rápida y versatilidad bioquímica que les permite metabolizar una amplia gama de compuestos naturales y xenobióticos [151].

Las PGPR pueden clasificarse como rizosféricas y endofíticas o extracelulares e intracelular [152]. Las extracelulares existen en la rizosfera, en los espacios entre las células de la corteza de la raíz e intracelulares dentro de las células de la raíz, generalmente en estructuras nodulares especializadas. *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia* son extracelulares [153,154,155], *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, de la familia *Rhizobiaceae*, intracelulares [156].

La mayoría de las rizobacterias pertenecientes son bacilos gram-negativos, y una proporción menor son bacilos gram-positivos, cocos o pleomórficos [157]. Las PGPR endofíticas o intracelulares generalmente colonizan las estructuras celulares nodulares especializadas de la raíz e incluyen bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico el fósforo y el hierro, que son esenciales para el desarrollo de la planta. La modulación de los niveles hormonales puede implicar a PGPR en la síntesis de una o más fitohormonas, auxinas, citoquininas y giberelinas [158].

La rizosfera, una importante interfaz entre las raíces de las plantas y el suelo, puede contribuir a la agricultura sostenible cuando se aprovecha la interacción entre las plantas y las bacterias beneficiosa por promoción directa o indirecta. Los mecanismos de promoción directa del crecimiento de las plantas, la biofertilización y la fitoestimulación, son dos ejemplos de métodos que simultáneamente minimizan el uso de fertilizantes químicos y las bacterias con propiedades tanto de biocontrol como de biofertilización y fitoestimulación ofrecen ventajas a las plantas en términos de suministro de nutrientes y el control de enfermedades [159,160,161,154]. Las PGPR comercializadas mundialmente son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia*, sin embargo, existen muchas más que han sido estudiadas, pero no han sido registradas para su comercialización [162].

### **1.3.2. PGPF (Hongos promotores del crecimiento vegetal)**

Los hongos promotores del crecimiento vegetal, al igual que las PGPR, suelen encontrarse en la rizosfera de muchas especies de plantas suprimiendo enfermedades y aumentando su crecimiento.

La supresión de los patógenos de las plantas suele llevarse a cabo mediante la producción de antibióticos, y por resistencia sistémica inducida ISR [163].

Los hongos promotores del crecimiento de las plantas (PGPF) pueden mejorar el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos a través de muchos mecanismos, como pueden ser: los niveles de ácido indol-3-acético (AIA), la secreción de celulasa y quitinasa [164,165], el incremento de la fijación de nitrógeno, la absorción de nutrientes, la producción de sideróforos, fitohormonas y metabolitos secundarios, la síntesis de exopolisacáridos (EPS), y muchos otros compuestos orgánicos además de mejorar las actividades enzimáticas [166-170]. Dichas enzimas están relacionadas con la defensa, compuestos defensivos/volátiles y fitohormonas que controlan a los patógenos, ayudando así a las plantas a afrontar a diversos estreses bióticos y abióticos [171],

El uso de los PGPF en los cultivos ha sido bien recibido por los agricultores para aumentar el crecimiento de las plantas en condiciones de invernadero y de campo [172-176]. Al colonizar la zona radicular, favorecen la adaptación a sequía, minimizan los efectos nocivos del estrés retrasando la marchitez y cambios de déficit hídrico como conductancia estomática, fotosíntesis y decoloración de las hojas, promoviendo el aumento del contenido de aminoácidos, la producción de peróxido de hidrógeno y aumento de los fenoles en las plantas [177-179].

Especies de hongos como *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Gliocladium*, *Phoma*, han sido estudiadas para la promoción de crecimiento de las plantas [180,181,182]. Se ha convertido en una forma ecológica de mejorar el rendimiento de los cultivos al mejorar la germinación de las semillas, el crecimiento de los brotes y las raíces, la producción de clorofila y el rendimiento de los frutos, etc., ya sea directa o indirectamente. El modo de acción de estos PGPF incluye la solubilización y mineralización de los micro y macronutrientes esenciales que necesitan las plantas para regular el equilibrio para varios procesos de la planta. La capacidad de colonización de las raíces ha dado lugar a un aumento de la superficie de las raíces, del número de raíces laterales y de la longitud de estas, reduciendo la degradación del suelo o sustrato y favoreciendo la absorción de nutrientes [183].

Diversos PGPF se han descrito como productores de sideróforos, además de promover el crecimiento de las plantas y el control de patógenos; como ejemplos tenemos a: *Paecilomyces variotii*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cunninghamella sp.*, *Penicillium spinulosum*, *Absidia spp.*, *Aspergillus sp.*, *Thermoascus aurantiacus*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamarii*, *A. nidulans*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Beauveria spp.*, y *Metarhizium spp.* [184-187].

Muchas PGPF son capaces de producir ácido indol acético y giberelinas que atenúan la fuerza relativa de la interacción entre la señalización de ácido salicílico y la red de fitohormonas [188]. Las respuestas de resistencia inducida, o la activación dependiente de ácido jasmónico en la defensa de la planta frente a un patógeno, hace que las plantas respondan antes o más fuertemente a los ataques [188].

Los hongos PGPF, como los hongos micorrícicos arbusculares y distintas especies de *Trichoderma*, son los agentes de control biológico (ACB) más importantes contra diferentes patógenos en la agricultura [189-190], como en el caso de infestación por nematodos, hongos y bacterias patógenos. En la actualidad, son un método respetuoso con el medio ambiente de forma sostenible [191].

### **Desarrollo del control Biológico**

En las zonas de agricultura intensiva en condiciones de invernadero como Almería, España, se tiene documentado el avance en el control biológico de plagas debido al aumento en el uso de agentes de control biológico, aunque en menor medida en las enfermedades, obteniendo producciones con menor cantidad de residuos fitosanitarios y de mayor calidad y seguridad alimentaria. Los ACB actúan sobre los cultivos como agentes promotores del crecimiento vegetal, ayudando a sobrellevar los problemas nutricionales en la producción intensiva, así como la contaminación ambiental por el uso de fertilizantes químicos en exceso [192].

Después de la pandemia por COVID-19, una de las acciones de recuperación de los de los sistemas agroalimentarios, además de asegurar el abastecimiento y seguridad alimentaria debería ser la adopción de soluciones que beneficien a la naturaleza mediante una gestión integral de tierras, agua, plagas y cultivos. Por ejemplo, la Comisión Económica para América Latina y el Caribe ha destacado a la bioeconomía como un modelo económico basado en la producción de recursos biológicos renovables y la conversión de estos recursos en productos de valor añadido, como bioproductos, bioenergía y servicios. Como lo son, las innovaciones en la producción fertilizantes microbianos (PGPF y PGPR) que estimulen el crecimiento vegetal y protejan los cultivos [1,193].

La popularidad y el uso de los bioestimulantes han aumentado drásticamente en los últimos años. Se ha predicho que los bioestimulantes tendrán un valor de mercado de más de 4.900 millones de dólares en el año 2025, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 11,24% [194]. Los principales interesados en los bioestimulantes son los agricultores, los inversores, los reguladores, los consumidores y los científicos que investigan sus formulaciones, mientras que el proceso de

aprovechamiento de los bioestimulantes en la agricultura sostenible está actualmente en curso en muchas industrias [195].

El entusiasmo en la industria comercial por elegir microorganismos beneficiosos, con los que desarrollar agentes de control, se ha expandido debido a que los bioplaguicidas microbianos son un agente importante en la gestión integrada de plagas (GIP) [196]. Para 2022 se esperaba que el mercado de plaguicidas químicos ascendiera a 66.000 millones de dólares, diez veces más que el de agentes de control biológico, y se estimaba que en el mercado de los agentes de biocontrol el control fúngico representaría el 10 y el 15% del mercado total de bioplaguicidas [197]. Sin embargo, en el informe de mercado de bioplaguicidas en la previsión mundial para 2025, se vaticina que el tamaño del mercado mundial de bioplaguicidas crezca a una tasa de crecimiento anual constante del 14,7%, pasando de un valor estimado de 4.300 millones de dólares en 2020 a 8.500 millones de dólares en 2025 [198].

A pesar del número relativamente elevado de patentes de bioplaguicidas, sólo unos pocos se han materializado en un registro para uso agrícola. La excesiva especificidad en la mayoría de los casos y las preocupaciones de bioseguridad o medioambientales en otros son los principales factores limitantes [199]. En la práctica, la formulación elegida determina el potencial de éxito del inoculante. Muchos de los microorganismos que aparecen en la literatura, no llegan al mercado, debido quizás a una formulación inapropiada [30]. Esto puede deberse a que el agente de biocontrol debe producirse a escala industrial, conservarse para su almacenamiento mediante aditivos biocompatibles a su formulación para aumentar la supervivencia de los probióticos, así como facilitar la aplicación y la estabilidad del producto final.

### **Marco legal para el registro de fitosanitarios y nuevas sustancias activas, productos autorizados**

Como ya hemos comentado anteriormente, el control biológico de las enfermedades y la bioestimulación o biofortificación, constituyen una herramienta importante para la gestión integrada de plagas (GIP). Sin embargo, uno de los factores que obstaculizan la aplicación del biocontrol es la falta de agentes de biocontrol eficaces y disponibles comercialmente. En la identificación de nuevos agentes de biocontrol, un paso decisivo lo constituye el desarrollo de productos comerciales de biocontrol, el cual requiere de métodos adecuados de selección, rápidos y consistentes para evaluar un gran número de ACB candidatos [201,202,203].

La UE promueve la gestión de enfermedades con bajos insumos de plaguicidas, como el programa de Gestión Integrada de Plagas (GIP) implementado a través de Directiva 2009/128/CE. La

FAO define la MIP como: "La consideración cuidadosa de todas las técnicas de control de plagas disponibles y la posterior integración de las medidas apropiadas que desalientan el desarrollo de las poblaciones de plagas y mantener los plaguicidas y plaguicidas y otras intervenciones a niveles que se justifiquen económicamente y reduzcan o minimizar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente". La GIP o MIP hace hincapié en el crecimiento de un cultivo sano con la menor perturbación posible de los agroecosistemas y fomenta los mecanismos naturales de control de plagas" [204,205].

Los agricultores deben cumplir con las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), siguiendo el principio básico de usar productos fitosanitarios tan poco como sea posible y solamente cuando sea necesario, además de mantener en cada explotación el registro de tratamientos fitosanitarios en el denominado cuaderno de explotación actualizado de acuerdo con el Real Decreto 1311/2012 [206], en su artículo 16; mismo que se deberá conservar al menos durante tres años. Además, deben de cumplir con los límites Máximos de Residuos (LMR) que ayudan a verificar si un producto ha sido aplicado correctamente. En la UE, los LMR son establecidos por la Comisión Europea siguiendo un proceso en el que están involucrados la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y los Estados Miembros. En Europa, el 1 de septiembre de 2008, el Reglamento (CE)396/2005 [207], entró en vigor un nuevo marco legislativo sobre residuos de plaguicidas en los alimentos, donde se invita a los productores a producir alimentos sin residuos de plaguicidas químicos detectables para seguir siendo competitivos dentro del mercado, siendo esto una oportunidad para los plaguicidas microbianos, ya que es poco probable que su uso genere residuos en los productos tratados [208].

La Asociación Europea para la Protección de los Cultivos (ECPA) representa la industria fitosanitaria a nivel europeo, en la cual, como parte sus miembros se incluyen a todas las empresas de fitosanitarios y asociaciones nacionales en Europa; las cuales deberían promover la tecnología agrícola en un contexto de desarrollo sostenible y cumplir en una normativa justa y con una base científica, como garantía de productos seguros con elevados estándares de calidad para el consumidor y el usuario de productos fitosanitarios [209,210].

Comprender el modo de acción de los ACB es esencial para lograr óptimo control de la enfermedad, así como otros riesgos potenciales para los seres humanos o el medio ambiente. Antes que un ACB pueda ser aprobado para su uso como fitosanitario, requiere ser aceptado por el actual procedimiento de evaluación y registro de la Unión Europea; el cual se enfoca en analizar un único modo de acción y en los riesgos potenciales de los metabolitos producidos in vitro, muy similar a la evaluación de los fungicidas sintéticos, formulados con un único compuesto como ingrediente activo. Paradójicamente, se requiere replantear la evaluación de los ACB, ya que en la mayoría de los casos

se debe tomar en consideración las interacciones naturales y complejas, entre los microorganismos y sus metabolitos con las plantas. Los ACB presentan bajos riesgos de resistencia, alta especificidad patógena y se adaptan a las condiciones ambientales y fisiología de los cultivos, por lo cual los riesgos toxicológicos y eco toxicológicos para las personas o el medio ambiente, pueden considerarse mínimos. Los métodos de cribado para la selección de nuevos ACB, permiten obtener resultados de la experimentación en condiciones in vitro y en cultivos, información que debería facilitar su registro. [22].

En los diferentes cultivos, los agricultores utilizan microorganismos vivos o en estado latente (ACB) para el control de enfermedades, que son productos fitosanitarios registrados y producidos por empresas de biocontrol. En otros casos, los productos contienen metabolitos antimicrobianos sin células vivas del antagonista [211]. Desde el punto de vista legal, estos compuestos son considerados activos químicos en la UE, incluidos los micovirus y los bacteriófagos. Estos están regulados por la Directiva 91/414/CEE y sus posteriores modificaciones, que se aplica a todos los productos fitosanitarios, independientemente de su tipo [212]. Los productos fitosanitarios se comercializan en diversas presentaciones, dependiendo de su origen; existen productos formulados en estado líquido (solución, emulsión y suspensión), sólido (en forma de polvo, microgránulos) y gaseoso (fumigantes, gasificación por calentamiento o combustión) [213].

#### **1.4. Marco legal del control biológico**

##### **1.4.1. Registro de fitosanitarios en la UE**

La Directiva 91/414/CEE abarca no sólo las autorizaciones de nuevos productos fitosanitarios, sino la revisión de los productos ya autorizados en la UE. El objetivo de la Directiva es armonizar el registro de los productos fitosanitarios en toda la UE. Se basa en un sistema de registro de dos niveles: las sustancias activas, las cuales se evalúan a nivel de la UE para su inclusión en el anexo I, que es la lista de sustancias que pueden utilizarse en productos fitosanitarios en la UE, y los productos podrán ser registrados por los Estados miembros pertinentes. Los requisitos de datos que deben cumplirse se presentan en los anexos de la Directiva 91/414/CEE. El anexo IIB es específico para los microorganismos y enumera los requisitos relativos a la sustancia activa del plaguicida microbiano [212].

Esta evolución ha obligado a los investigadores a explorar alternativas para controlar los patógenos. Entre las alternativas propuestas, el control biológico de patógenos ha mejorado significativamente la calidad y la cantidad de los productos agrícolas [214,215].

El desarrollo de un plaguicida microbiano requiere varios pasos. El procedimiento consiste primero en el aislamiento en cultivo puro o el enriquecimiento del microorganismo, luego identificación, caracterización y realización de bioensayos de eficacia, que pueden ser in vitro, ex vivo o in vivo dependiendo del organismo patógeno o plaga objetivo y, por último, ensayos piloto en condiciones reales de aplicación. Antes de la explotación comercial de un plaguicida microbiano, se puede asegurar su protección legal como invención biotecnológica mediante una patente. Una patente es un privilegio temporal para la explotación industrial o comercial industrial o comercial otorgado por la administración al propietario durante 20 años a partir de la fecha de solicitud. Las patentes de bioplaguicidas se consideran invenciones biotecnológicas porque incluyen productos y procesos microbianos. Sin embargo, una patente no es una autorización de uso comercial o registro fitosanitario [216].

La presentación de patentes de plaguicidas microbianos está regulada por una serie legal de tratados nacionales e internacionales. Las patentes de plaguicidas basadas en microorganismos están reguladas por el Tratado de Budapest, firmado por todos los países pertenecientes a la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, que especifica la necesidad de que un cultivo puro de la cepa del microorganismo depositado en una colección microbiana oficialmente reconocida. En la Unión Europea, el marco legal está regulado por la Directiva 98/44/CE sobre la patentabilidad de las invenciones biotecnológicas [217,218].

A pesar del número relativamente elevado de solicitudes de patentes de bioplaguicidas, sólo unos pocos se han materializado en un registro para uso agrícola. Sin embargo, se espera que en unos años se registren algunas de ellas. El registro depende de normas específicas dentro de cada país. En la Unión Europea, el registro lo lleva la Dirección de Protección de la Salud del Consumidor y está regulado por la Directiva 91/414/CEE, modificada específicamente para los bioplaguicidas por la Directiva 2001/36/CE [219].

Desde el año 2000, la sanidad vegetal está regulada a nivel comunitario a través de la Directiva 2000/29/CE, sin embargo, a partir de diciembre de 2019 ha entrado en vigor el Reglamento (UE) 2016/2031 sobre las medidas de protección contra las plagas de los vegetales [220]. La falta de voluntad y cooperación por parte de los Estados miembros a la hora de aplicar el principio de reconocimiento mutuo resulta en retrasos innecesarios en la aprobación de los productos. Además, el tiempo medio para la aprobación de dichas sustancias es más de dos años y medio desde la aplicación de la solicitud, el mismo tiempo que para cualquier otra sustancia [221].

A pesar de estos debates científicos y del deseo nuevas materias activas y productos, los requisitos de datos solo han cambiado ligeramente desde 2001. Los reglamentos fueron adaptados en 2009 Reglamento (CE) n° 1107/2009 [222] y el Reglamento (UE) No 546/2011 de la Comisión [223], sustituyó los principios uniformes publicados en la Directiva del Consejo 2005/25/CE [224]. Sin embargo, los principios para la evaluación y la toma de decisiones siguen siendo los mismos y los requisitos de datos para la evaluación de sustancias activas Reglamento (UE) n° 283/2013 de la Comisión [225] y para los productos fitosanitarios productos fitosanitarios Reglamento (UE) n° 284/2013 de la Comisión [226] tienen esencialmente el mismo enfoque, siguiendo estrictamente un principio de precaución. Debido a ello, la percepción de diversos peligros sigue domina los métodos de evaluación de riesgos de la UE.

#### **1.4.2. Registro de nuevas sustancias activas**

Una empresa con una sustancia activa nueva en la UE debe presentar una solicitud, acompañada de un expediente completo de datos e información de apoyo, a un Estado miembro (denominado Estado miembro informante (EMR)). El EMR será responsable de iniciar el proceso de comprobación de que el expediente presentado está completo y de gestionar la evaluación de riesgo. Se sigue un proceso formal de comprobación de la integridad de las solicitudes de nuevas sustancias para su primera inclusión en el anexo I. El EMR evalúa si el expediente contiene suficiente información para iniciar la evaluación detallada. Se envía un informe a la Comisión Europea y se pone a todos los demás Estados miembros y a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). También se facilitan copias del del expediente a todos los demás Estados miembros, a la Comisión Europea y a la EFSA. Si el expediente está completo, la Comisión prepara un proyecto de decisión que reconoce que se somete a votación de los Estados miembros en el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal (CPCA). Si el voto es positivo, la Decisión se adopta y se publica en el Diario Oficial de la Unión Europea (DO).

Una vez que el expediente se considera completo, puede comenzar la evaluación detallada. El EMR dispone de 12 meses a partir de la fecha de publicación de la decisión de integridad en el Diario Oficial para completar su proyecto de informe de evaluación (DAR) y presentarlo a la EFSA. El proceso para decidir si una sustancia activa puede incluirse en el anexo I de la Directiva 91/414 implica una revisión por pares de todos los Estados miembros, la EFSA y la Comisión Europea. Los miembros del público y otras partes interesadas también pueden proporcionar comentarios para su consideración en el proceso, específicamente a través del proceso de consulta pública de la EFSA. [212,227,228].

## **1.5. Comercialización de productos basados en microorganismos en la agricultura, Anexo I**

Aunque la inclusión en el Anexo I puede considerarse un obstáculo para la comercialización de bioplaguicidas en el mercado, hay varias sustancias activas incluidas en la lista, entre ellas varios plaguicidas microbianos. Como promedio, la European Crop Protection Association (ECPA) estima en nueve años el tiempo que transcurre para que un producto fitosanitario nuevo acceda al mercado de la UE, con un coste económico de inversión en investigación, desarrollo y Registro, de entre 250 y 300 millones de euros [229].

En el caso de una nueva sustancia activa, tras su inclusión en el anexo I, el solicitante puede solicitar un registro del producto en cualquier Estado miembro en el que pretenda comercializarlo. Para garantizar la coherencia de las evaluaciones entre los Estados miembros, el anexo VIB de la Directiva 91/414/CE proporciona principios uniformes específicos para la evaluación y autorización de productos fitosanitarios microbianos. También incluye una disposición para el reconocimiento mutuo (RM) de las decisiones reglamentarias sobre productos, siempre que los factores agronómicos, climáticos y medioambientales sean similares, sin embargo, la UE tiene condiciones variables y a menudo se requieren datos adicionales sobre la eficacia para cada Estado miembro en el que se vaya a comercializar el producto.

Para cada Estado miembro en el que se vaya a autorizar el uso de un producto, el solicitante debe que proporcione datos que respalden las declaraciones de eficacia y seguridad de los cultivos que figuran en la etiqueta del producto. Estos datos son probablemente necesarios para cada combinación de país/cultivo/plaga objetivo y deben generarse a lo largo de dos temporadas, aunque en algunos casos se hacen excepciones, como en el caso de los cultivos protegidos. Los ensayos deben ser realizados por organizaciones oficialmente reconocidas y los datos deben generarse a partir de una serie de ensayos de eficacia de alta calidad que aborden el uso propuesto del producto.

El coste del registro del producto por Estado miembro, incluido el desarrollo de los datos de eficacia datos de eficacia, suele ser de unos 50.000 a 100.000 euros, que varían en función de las tasas de cada país y de la cantidad de datos que se necesitan. Una solicitud de autorización provisional de un producto de control de plagas para varios Estados miembros puede hacerse al mismo tiempo que la solicitud de inclusión de la sustancia activa en el anexo I y aquellos productos que contengan sustancias activas aún no incluidas en el Anexo I pueden recibir actualmente la Autorización Provisional. Estas autorizaciones pueden concederse por tres años con posibilidad de prórroga. [230].

A partir del 1 de junio de 2015 todos los productos fitosanitarios en el mercado deberán obligatoriamente estar clasificados, envasados y etiquetados conforme con el Reglamento CLP (nuevos pictogramas y frases). A partir del 1 de junio de 2017 solo pueden existir en el mercado productos etiquetados conforme con el Reglamento (CE) nº 1272/2008 [231].

Europa a la fecha es poco especializada en la autorización de microorganismos y algunos de estos productos están formulados con dos cepas, otros con una. En España a 2019 las ventas de productos fitosanitarios en toneladas fueron de 75.190.440, y de Productos fitosanitarios-Índice de riesgo armonizado en 2018, 78.00 [232].

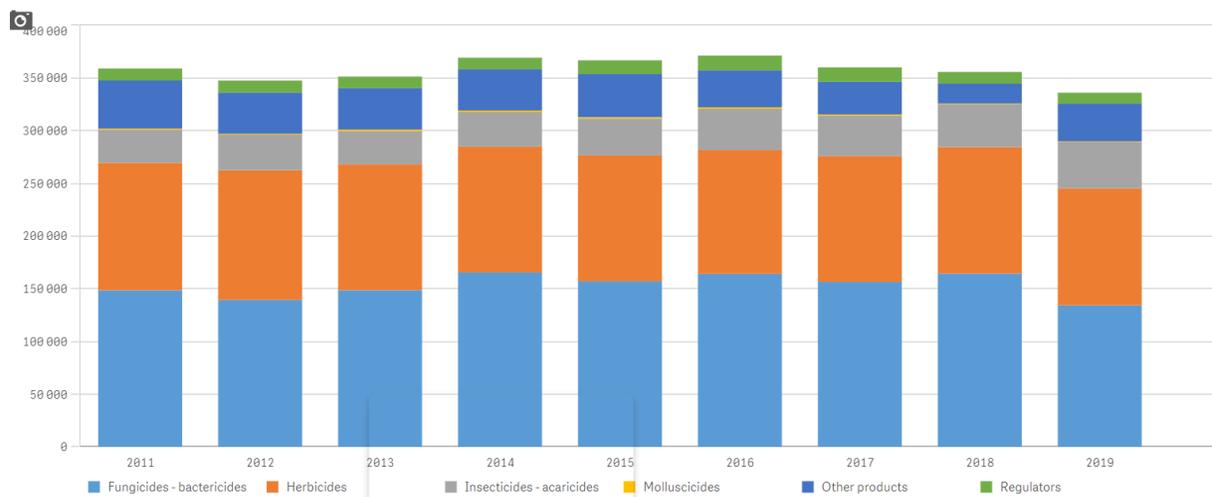


Figura 1. Ventas de productos fitosanitarios (toneladas) en la Unión Europea, [232].

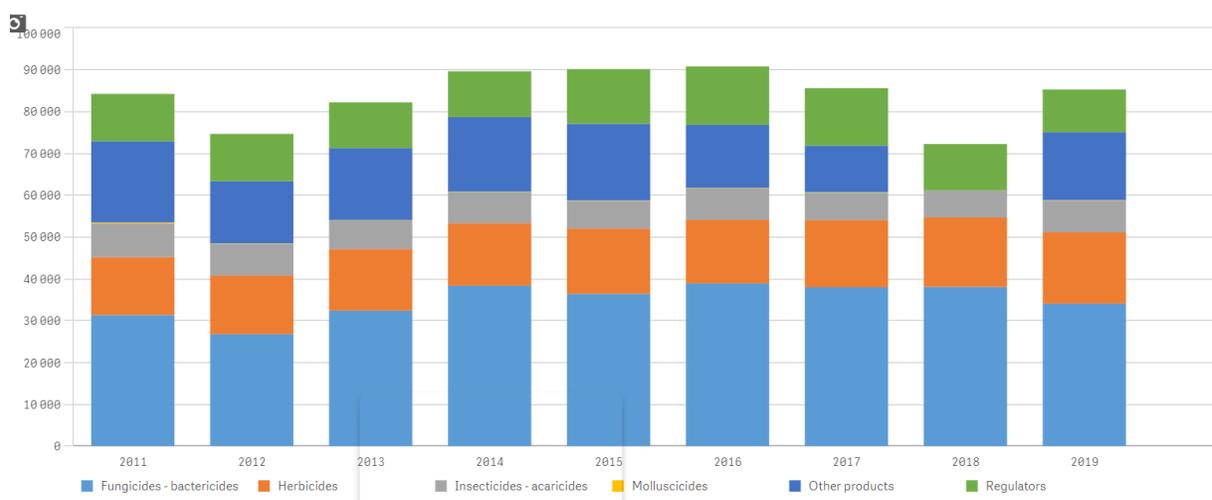


Figura 2. Ventas de productos fitosanitarios en España, en toneladas [233].

### 1.5.1. Comercialización de productos autorizados a base de *Trichoderma* en España

En la agricultura, *Trichoderma* es el agente de control biológico más utilizado, al ser un hongo de acción múltiple y poseer gran capacidad para promover el crecimiento de las plantas, así como mecanismos de control biológico. *Trichoderma* se ha descrito ampliamente como un género muy activo para colonizar en diferentes hábitats, con gran capacidad de producir metabolitos, antibióticos y enzimas. El uso de productos fitosanitarios basados en *Trichoderma*, mantiene el interés de los investigadores para continuar experimentando con diferentes cepas, en relación con las enfermedades de las plantas, la promoción de crecimiento, en la generación de enzimas, antibióticos, su intervención en la biorremediación, en la industria textil, la biotecnología y la salud. [234,235].

Los productos comerciales basados en cepas de *Trichoderma*, se utiliza ampliamente por los agricultores no solo para mejorar el rendimiento de los cultivos y suprimir las enfermedades de las plantas, sino también en la conservación del medio ambiente. Sin embargo, existen algunas especies de *Trichoderma* catalogadas molecularmente que también pueden causar daños en los cultivos y a la salud; por ejemplo: *T. aggressivum* produce daños en cultivos de champiñón y *T. polysporum*, *T. brevicompactum* y *T. longibrachiatum* producen daños en humanos inmunodeprimidos. En la industria tienen relevancia algunas cepas productoras de enzimas como *T. reesei* y en agricultura están autorizadas distintas cepas en el anexo 1 de productos a base de microorganismos en el caso de los hongos están registradas las cepas: *T. harzianum*, *T. gamsii*, *T. atroviride* y *T. asperellum* [236].

Nombre comercial	Empresa comercializadora	Microorganismo (cepa)	Plaga/enfermedad objetivo	Dosis y momento de aplicación	Presentación y envasado
BLINDAR	ISAGRO S.P. A	<i>Trichoderma asperellum</i> (ICC012) 2% + <i>Trichoderma gamsii</i> (ICC080) 2% (3 X 10 <sup>7</sup> ufc/g)	<i>Sclerotinia</i> , <i>Phytophthora</i> , Podredumbre de la raíz, <i>Verticillium</i> , <i>Armillaria</i>	Dosis: 1 aplicación de 0,25 kg/m <sup>3</sup> de sustrato (semillero); 2 aplicaciones de 2,5 kg/ha (pulverización suelo o riego por goteo)	WP: Bolsas de Poliéster-aluminio-polietileno de 0,5 kg de capacidad (Cajas de 0,5 kg x 20 bolsas) Bolsas de Poliéster-aluminio-polietileno de 1 kg de capacidad (Cajas de 1 kg x 10 bolsas) Bolsas de Poliéster-aluminio-polietileno de 5 kg de capacidad (Cajas de 5 kg x 2 bolsas)
BIOTEN	ISAGRO ESPAÑA S.L.	<i>Trichoderma asperellum</i> (ICC012) 2% (5 X 10 <sup>7</sup> UFC/G) + <i>Trichoderma gamsii</i> (ICC080) 2% (5 X 10 <sup>7</sup> E <sup>7</sup> ufc/g)	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i>	Dosis (Kg/ha): 2,5. N° de aplicaciones: 2, cada 7 – 14 días	WP: Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 0,5 kg de capacidad (cajas de 20 bolsas x 0,5 kg/bolsa). Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 1 kg de capacidad (cajas de 10 bolsas x 1 kg/bolsa). Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 5 kg de capacidad (cajas de 2 bolsas x 5 kg/bolsa).
REMEDIER	ISAGRO S.P.A.	<i>Trichoderma asperellum</i> (ICC012) 2% (5 X 10 <sup>7</sup> UFC/G) + <i>Trichoderma gamsii</i> (ICC080) 2% (5 X 10 <sup>7</sup> E <sup>7</sup> ufc/g)	<i>Phytophthora</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Pythium</i>	Dosis (Kg/ha): 2,5. N° de aplicaciones: 2, cada 7 – 14 días	WP: Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 0,5 kg de capacidad (cajas de 20 bolsas x 0,5 kg/bolsa). Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 1 kg de capacidad (cajas de 10 bolsas x 1 kg/bolsa). Bolsas de poliéster-aluminio-polietileno de 5 kg de capacidad (cajas de 2 bolsas x 5 kg/bolsa).
TUSAL	TIMAC AGRO ESPAÑA S.A.	<i>Trichoderma asperellum</i> (T25) 0,5% (1X10 <sup>8</sup> UFC/G) + <i>Trichoderma atroviride</i> (T11) 0,5% (1X10 <sup>8</sup> ufc/g)	<i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotinia</i>	Dosis (Kg/ha): 0,5 – 1 (salvo en fresa: 1,0 – 2,0). N° de aplicaciones: 5, cada 15 – 30 días	WG: Bolsas aluminizadas de PE de 0,25 kg, 0,5 Kg, 1 kg y 2 kg. Bolsas PET transparente y metalizado de 0,25 kg, 0,5 kg, 1 kg y 2 kg. Caja de cartón de 1 y 2 Kg. Caja de embalaje y envío de 10 Kg (sobre embalaje).
T34 BIOCONTROL	BIOCONTROL TECHNOLOGIES, S.L.	<i>Trichoderma asperellum</i> (T34) 12% (1,0 x 10 <sup>12</sup> ufc/kg)	<i>Sclerotinia</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Dosis: 10 g/m <sup>3</sup> (mezclado con el sustrato); 0,5 g/m <sup>2</sup> (pulverizado en bandejas de semillero); 0,01 g/L (irrigación). Se recomienda un tratamiento recordatorio cada 2-3 meses	WP: Bolsa de polietileno dentro de una bolsa metalizada sellada de 250 g, 500 g y 5 kg
XEDAVIR	XEDA ITALIA S.R.L.	<i>Trichoderma asperellum</i> (TV-1) 2,8% (1 X 10 <sup>10</sup> ufc/kg)	Hongos del suelo	Dosis (Kg/ha): 5 (más 0,5 – 1 kg/m <sup>3</sup> de sustrato). N° de aplicaciones: 1	WP: Bolsas de PE/aluminio de 500 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 20 kg y 30 kg.

VINTEC	BIPA N.V.	<i>Trichoderma atroviride</i> (SC1) 1x10E <sup>10</sup> ufc/g	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Yesca</i>	Dosis: 5 – 10 g/HL (tomate); 0,2 Kg/ha (vid). Nº de aplicaciones: 8 cada 5 días (tomate); 4 cada 7 días (vid)	WG: Bolsa multicapa (PE/aluminio/PE) de 50 g (envase exterior: caja de cartón con 4 unidades), 100 g, 200 g, 400 g y 1 kg.
TRI-SOIL	Agrauxine S.A.	<i>Trichoderma atroviride</i> (I-1237) (1x10E <sup>8</sup> ufc/g)	<i>Fusarium</i> , <i>Rizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Pythium</i>	Dosis: 1 aplicación de 5 kg/ha; o 2 aplicaciones de 2,5 kg/ha; más 0,5 – 3,0 g/L antes de la siembra o plantación (ornamentales y hortalizas de hoja). En raíces y tubérculos, 4 kg/tonelada de patata; o 5-10 kg/ha	WP: Bolsas (LDPE) de 2,5 kg, 2 bolsas en caja de cartón. Bolsa (PET/aluminio/LDPE) de 1 kg, 2,5 kg distribuidas en cajas de cartón de 5 kg y 10 kg. Bolsa (PE/aluminio) de 250 g, 500 g distribuidas en cajas de cartón de 5 kg y 10 kg.
ESQUIVE WP	Agrauxine S.A.	<i>Trichoderma atroviride</i> (I-1237) 5% (1 X 10E <sup>8</sup> ufc/g)	<i>Eutipiosis</i> , <i>Yesca</i> , <i>Black dead arm</i> (BDA)	Dosis (Kg/ha): 4. Nº de aplicaciones: 1	WP: Sacos de 1 kg de papel-cartón con forro de polietileno y termo sellado (80x120x140 mm), (4 sacos de 1kg en un tambor de 5 L).
TRIANUM P	KOPPERT B.V.	<i>Trichoderma harzianum rafai</i> (T-22) 1% (1 X 10E <sup>9</sup> ufc/g)	<i>Pythium</i> , Hongos, Enfermedades fúngicas	Dosis: En frutales: 2 aplicaciones por año de 1,5 g/m <sup>2</sup> (en vivero); o 5 aplicaciones por año de 0,3 – 1,0 kg/1000 plantas (cultivos en producción). Ornamentales, especias, fresa, hortícolas y palmáceas: 2 aplicaciones de 0,75 – 1,50 g/m <sup>2</sup> (semillero); 1 aplicación cada 10 de 15 – 30 g/1000 plantas (cultivos en maceta); 1 aplicación cada 10 de 300 – 1000 g/1000 plantas (cultivos en suelo); y 1 aplicación de 1,0 – 2,5 kg/ha en el surco o 2,5 – 5,0 kg/ha En toda la superficie (cultivo en campo)	WG: Bolsas de polietileno metalizado en caja de cartón de 250 g, 500 g, 1 kg y 5 kg.
TRIANUM G	KOPPERT B.V.	<i>Trichoderma harzianum rafai</i> (T-22) 1% (1,5 X 10E <sup>11</sup> ufc/kg)	<i>Pythium</i> , Hongos, Enfermedades fúngicas	Dosis: 750 g/m <sup>3</sup> en la primera aplicación y 375 g/m <sup>3</sup> en la 2ª aplicación (cultivos en maceta); 1 g/planta, salvo en perennes: 3 – 10 g/planta (cultivos en líneas); y 10 – 25 kg/ha en la línea de plantación o 25 – 50 kg/ha entre las líneas (cultivo en campo)	GR: Bolsa de lámina de aluminio en caja de cartón de 5 kg, saco multicapa de polipropileno de 20 kg.

Tabla 1. Productos Fitosanitarios a base de *Trichoderma* comercializados en España 2022 [237].

Nombre comercial	Empresa comercializadora	Microorganismo (cepa)	Cultivo objetivo	Dosis y momento de aplicación	Presentación
TrichoSym Bio	SYMBORG BUSINESS DEVELOPMENT, S.L.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Hortícolas	Dosis: 2 L/ha, aplicar entre 7 – 10 días tras el trasplante, dosis de agua 25% al inicio para crear un reservorio de agua en la rizosfera, 50% con la dosis del producto y 25% al final para limpiar conducciones y asegurar que las esporas alcanzan la rizosfera	Líquido
CONTRIBUTE <sup>TM</sup> Aid	ALLTECH CROP SCIENCE IBERIA, S.L.	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Hortícolas y leñosos	Dosis: 1 Kg/ha, vía riego al inicio del ciclo de cultivo	WP Polvo
<b>MICROORGANISMOS NO MICORRÍZICOS (MIXTO: HONGOS + BACTERIAS)</b>					
CONDOR SHIELD	AGROTECNOLOGÍAS NATURALES, S.L.U.	<i>Trichoderma koningii</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	Hortícolas	Dosis: 2 Kg/ha, en agua de riego después del trasplante y dar un segundo tratamiento 4 semanas después	WP Polvo
MANVERT ACTICROP	BIOVERT, S.L.	<i>Penicillium bilaiae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Trichoderma saturnisporum</i>	Hortícolas y leñosos	Dosis: 1,5 Kg/ha, en riego por goteo, con 4 aplicaciones, la primera coincidiendo con el trasplante y las tres posteriores separadas con un intervalo de 15 días	WP Polvo
BIOBIZZ MICROBES	BIOBIZZ WORLDWIDE, S.L.	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus velezensis</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	-	Dosis: -	WP Polvo
<b>ABONO CON MICROORGANISMOS NO MICORRÍZICOS (HONGOS)</b>					
TRICOBEST	QUIMICAS MERISTEM, S.L.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Hortícolas	Dosis: 1 Kg/ha, al menos 3 aplicaciones al inicio del cultivo, con un intervalo de 7 – 10 días	WP Polvo
<b>ABONO CON MICROORGANISMOS</b>					
ASIR HORTO BIO	AGROTECNOLOGÍAS NATURALES, S.L.U.	<i>Rhizoglyphus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Trichoderma koningii</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	Hortícolas	Dosis: 4,5 gramos (1 pastilla/planta), aplicar durante el trasplante	Comprimidos
ASIR HORTO	AGROTECNOLOGÍAS NATURALES, S.L.U.	<i>Rhizoglyphus irregularis</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Trichoderma koningii</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	Hortícolas	Dosis: 4,5 gramos (1 pastilla/planta), aplicar durante el trasplante	Comprimidos

Tabla 2. Productos Biofertilizantes a base de *Trichoderma* comercializados en España 2022 [237].

## Bibliografia

1. UN. General Assembly. Agriculture development, food security and nutrition Agriculture development, food security and nutrition. **2021**. Available online: <https://undocs.org/en/A/76/216> [Accessed on 7 January 2022].
2. Parnell, J.J.; Berka, R.; Young, H.A.; Sturino, J.M.; Kang, Y.; Barnhart, D.M.; Dileo, M. V. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1–12. doi.org/10.3389/fpls.2016.01110.
3. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021: Transforming Food Systems for Food Security, Improved Nutrition and Affordable Healthy Diets for All (2021). **2021**. Available online: <https://www.fao.org/3/cb4474en/online/cb4474en.html> [Accessed on 7 January 2022].
4. FAO. Committee on World Food Security, “Impacts of COVID-19 on food security and nutrition: developing effective policy responses to address the hunger and malnutrition pandemic”, 2020. **2020**. Available online: <http://www.fao.org/3/cb1000en/cb1000en.pdf>. [Accessed on 7 January 2022].
5. Zhang, Q.; Zhu, D.; Ding, J.; Zheng, F.; Zhou, S.; Lu, T.; Zhu, Y. The fungicide azoxystrobin perturbs the gut microbiota community and enriches antibiotic resistance genes in *Enchytraeus crypticus*. *Environ. Int.* **2019**, *131*, 104965. doi.org/10.1016/j.envint.2019.104965.
6. Rashad, Y.M.; Moussa, T.A. Biocontrol agents for fungal plant diseases management. In *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications*. El-Wakeil N., Saleh M., Abuhashim M. Eds.; Springer, Cham., **2020**, 337–363. doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0\_11.
7. Olowe, O.M.; Akanmu, A.O.; Asemoloye, M.D. Exploration of microbial stimulants for induction of systemic resistance in plant disease management. *Ann. Appl. Biol.* **2020**, *177*, 282–293. doi.org/10.1111/aab.12631.
8. Barra-Bucarei, L.; Millas, P. Crossing Frontiers: Endophytic Entomopathogenic Fungi for Biological Control of Plant Diseases. In *Endophytes for a Growing World*. Hodgkinson, T.; Doohan, F.; Saunders, M.; Murphy, B. Eds.; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **2019**, 67–92. doi.org/10.1017/9781108607667.005.
9. Carvalho, F.P. Agriculture , pesticides , food security and food safety. *Environ. Sci. Policy.* **2006**, *9*, 685–692. doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002.

10. Chagnon, M.; Kreutzweiser, D.; Mitchell, E.A.D.; Morrissey, C.A.; Noome, D.A.; Van Der Sluijs, J.P. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ. Sci. Pollut.* **2015**, 119–134. doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x.
11. Huseeth, A.S.; Chappell, T.M.; Chitturi, A.; Jacobson, A.L.; Kennedy, G.G. Insecticide Resistance Signals Negative Consequences of Widespread Neonicotinoid Use on Multiple Field Crops in the U . S . Cotton Belt. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 52, 2314–2322. doi.org/10.1021/acs.est.7b06015.
12. Smolińska, U.; Kowalska, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review. *J. Plant Pathol.* **2018** 100, 1–12. doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0.
13. Newan E.; Killham K. Soil ecology. 242 pp. Cambridge: Cambridge University Press. £40 (hardback), £14.95 (paperback), *Ann. Bot.* **1995** 75,102-103. doi.org/10.1016/S0305-7364(05)80017-4.
14. Tozlu, E.; Tekiner, N.; Kotan, R. Screening of *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) isolates of domestic plant origin against different fungal plant pathogens for use as biopesticide. *Fresenius Environ. Bull.* **2018** 27, 4232–4238.
15. Melero-Vara, J.M.; Prados-Ligero, A.M.; Basallote-Ureba, M.J. Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. *Eur. J. Plant Pathol.* **2000**, 106, 581–588.
16. Pal, K.K.; Scholar, V.; Gardener, B.M. Biological Control of Plant Pathogens. **2006**, 1–25, doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02.Biological.
17. Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C. Suggestions for unifying the terminology. *BioControl* **2001**,46, 387–400. doi.org/10.1023/A:1014193329979
18. Fravel, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. rev. phytopatho.* **2005**, 43, 337–359. doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
19. Meyling, N. V; Eilenberg, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems : Potential for conservation biological control. *Biol. Control* **2007**, 43, 145–155, doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007.
20. Raymaekers, K.; Ponet, L.; Holtappels, D.; Berckmans, B.; Cammue, B.P.A. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biol. Control* **2020**, 144, 104240, doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240.

21. IBMA. Definition Bioprotection as the global term for all biocontrol technologies. Available online: <https://ibma-global.org/wp-content/uploads/2020/12/ibmadefinitionleafletweb.pdf> [Accessed on 10 February 2022].
22. Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W.J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1–19, doi.org/10.3389/fpls.2019.00845.
23. FAO. Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests, FAO Forestry Paper No. 182. **2019**. Available online: <https://www.fao.org/sustainable-forest-management/toolbox/tools/tools-details/es/c/1255281/> [Accessed on 7 January 2022].
24. Abdul-wahid, O.A.; Elbanna, S.M. Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches ; *Periplaneta Americana*. **2012**, *6*, 1024–1032, doi.org/10.5897/AJMR11.1300.
25. Bonaterra, A.; Badosa, E.; Cabrefiga, J.; Frances, J.; Montesinos, E. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. *Trees.* **2012**, *26*, 215–226. doi.org/10.1007/s00468-011-0626-y.
26. Asad, S.A. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. *Ecol. Complex.* **2022**, *49*, 100978. doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978.
27. Vorholt, J.A. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev.* **2012**, *10*, 828. doi.org/10.1038/nrmicro2910.
28. Lindow, S.E.; Brandl, M.T. Minireview Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1875–1883. doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875.
29. Peñuelas, J.; Terradas, J. The foliar microbiome. *Trends. Plant Sci.* **2014**, *19*, 278–280, doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.007.
30. Montesinos, E.; Bonaterra, A. Microbial Pesticides. In: *Encyclopedia of Microbiology*; Schaechter, M. Ed., Elsevier, Amsterdam. **2009**, 110–120. doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00125-5.
31. Bulgarelli, D.; Schlaeppi, K.; Spaepen, S.; Ver, E.; Themaat, L. Van; Schulze-lefert, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013** *64*, 807–838. doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
32. Orozco-Mosqueda, M. del C.; Rocha-Granados, M. del C.; Glick, B.R.; Santoyo, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol. Res.* **2018**, *208*, 25–31, doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005.

33. Mueller, U.G.; Sachs, J.L. Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 606–617, doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.009.
34. Vassileva, M.; Flor-Peregrin, E.; Malusá, E.; Vassilev, N. Towards Better Understanding of the Interactions and Efficient Application of Plant Beneficial Prebiotics, Probiotics, Postbiotics and Synbiotics. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–5, doi.org/10.3389/fpls.2020.01068.
35. Kehe, J.; Kulesa, A.; Ortiz, A.; Ackerman, C.M.; Gowtham, S.; Sellers, D. Massively parallel screening of synthetic microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 12804–12809. doi.org/10.1073/pnas.1900102116.
36. Hu, J.; Yang, T.; Friman, V.; Kowalchuk, G.A.; Hautier, Y.; Li, M.; Wei, Z.; Xu, Y.; Shen, Q.; Jousset, A. Introduction of probiotic bacterial consortia promotes plant growth via impacts on the resident rhizosphere microbiome. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2021**, *288*, 20211396.
37. FAO. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. **2006**. Available online: <https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s.pdf> [Accessed on 13 January 2022].
38. Sanders, M.E. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 58–61. doi.org/10.1086/523341.
39. Picard, C.; Baruffa, E.; Bosco, M. Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. *Soil. Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 106–115. doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.011.
40. Hartmann, A.; Rothballer, M.; Schmid, M. Lorenz Hiltner , a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant. Soil.* **2008**, *312*, 7–14, doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z.
41. Hyde, K.D.; Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, **2008**, *33*, 163–173.
42. Arnold, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi : progress , challenges , and frontiers. *Fungal. Biol. Rev.* **2007**, *21*, 51–66. doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003.
43. Jaber, L.R.; Araj, S. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (*Ascomycota:Hypocreales*), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (*Homoptera:Aphididae*), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (*Hymenoptera:Braconidae*). *Biol. Control* **2018**, *116*, 53–61. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.005.

44. Akello, J.; Sikora, R. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. *Biol. Control* **2012**, *61*, 215–221. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.02.007.
45. McGee, P.A. Reduced growth and deterrence from feeding of the insect pest *Helicoverpa armigera* associated with fungal endophytes from cotton. *Aust. J. Exp. Agric.* **2002**, *42*, 995–999.
46. Russo, M.L.; Scorsetti, A.C.; Vianna, M.F.; Allegrucci, N.; Ferreri, N.A.; Cabello, M.N.; Pelizza, S.A. Journal of King Saud University – Science Effects of endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota:Hypocreales) on biological , reproductive parameters and food preference of the soybean pest *Helicoverpa gelotopoeon*. *J. King Saud Univ. Sci.* **2019**, *31*, 1077–1082. doi.org/10.1016/j.jksus.2018.11.009.
47. Russo, M.L.; Scorsetti, A.C.; Vianna, M.F.; Allegrucci, N.; Ferreri, N.A.; Cabello, M.N.; Pelizza, S.A. Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera:Noctuidae). *Insects* **2019**, *10*, 110.
48. Manoussopoulos, Y.; Mantzoukas, S.; Lagogiannis, I. Effects of Three Strawberry Entomopathogenic Fungi on the Prefeeding Behavior of the Aphid *Myzus persicae*. *J. Insect Behav.* **2019**, *32*, 99–108.
49. Batta, Y.A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota:Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae:Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop Prot.* **2013**, *44*, 128–134. doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.001.
50. Vidal, S.; Jaber, L.R. Entomopathogenic fungi as endophytes : plant – endophyte – herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr. Sci.* **2015**, *109*, 46-54.
51. González-Mas, N.; Sánchez-Ortiz, A.; Valverde-García, P.; Quesada-Moraga, E. Effects of Endophytic Entomopathogenic Ascomycetes on the Life-History Traits of *Aphis gossypii* Glover and its Interactions with Melon Plants. *Insects* **2019**, *10*, 165.
52. González-Mas, N.; Cuenca-Medina, M.; Gutiérrez-Sánchez, F.; Quesada-Moraga, E. Bottom - up effects of endophytic *Beauveria bassiana* on multitrophic interactions between the cotton aphid , *Aphis gossypii* , and its natural enemies in melon. *J. Pest Sci.* **2019**, *92*, 1271–1281. doi.org/10.1007/s10340-019-01098-5.
53. Schulz, B.; Boyle, C. What are endophytes? In: *Microbial Root Endophytes*. Schulz, B.J.E.; Boye, C.I.C.; Sieber, T.N. Eds. Berlin: Springer-Verlag. **2006**, *9*, 1–13.

54. Van Overbeek, L.; Van Elsas, J.D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* **2008**, *64*, 283–96. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00469.x.
55. Hardoim, P.R.; Overbeek, L.S. Van; Elsas, J.D. Van Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends. Microbiol.* **2008**, *16*, 463–471. doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008.
56. Barka, E.A.; Nowak, J.; Cle, C. Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium , *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7246–7252. doi.org/10.1128/AEM.01047-06.
57. Bamisile, B.S.; Dash, C.K.; Akutse, K.S.; Keppanan, R.; Wang, L. Fungal Endophytes : Beyond Herbivore Management. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 544. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544.
58. Hajek, A. *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press. **2018**.
59. Manivel, S.B.; Rajkumar, G.S. Mycopesticides: Fungal based pesticides for sustainable agriculture. In: *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*. Gehlot, P.; Singh, J. Eds. Springer Nature Singapore. **2018**, 183–203. doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7\_11.
60. Karlidag, H.; Esitken, A.; Turan, M.; Sahin, F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria ( PGPR ) on yield , growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Sci. Hort. Amsterdam* **2007**, *114*, 16–20. doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.013.
61. Ilyas, N.; Bano, A. Potencial use of soil microbial community in agriculture, In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Eds. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. **2012**, 45–64. doi.org/10.1007/978-3-642-27515-9.
62. EBIC. Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agricultura more sustainable. 2013. Available online: <http://www.biostimulants.eu/> [Accessed on 14 February 2022].
63. Woo, S.L.; Ruocco, M.; Vinale, F.; Nigro, M.; Marra, R.; Lombardi, N.; Pascale, A.; Lanzuise, S.; Manganiello, G. *Trichoderma* -based Products and their Widespread Use in Agriculture. *Open Mycol. J.* **2014**, *8*, 71–126.
64. Sharma, S.; Rai, P.; Rai, S.; Srivastava, M.; Kashyap, P.L.; Sharma, A.; Kumar, S. Genomic revolution in crop disease diagnosis: a review. In: *Plants and Microbes in an Ever Changing Environment*. Singh S.S. Ed. Nov. Sci. Publ. Hauppauge. **2017**, 257–293.

65. Waghunde, R.R.; Shelake, R.M.; Sabalpara, A.N. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African J. Agric. Res.* **2016**, *11*, 1952–1965. doi.org/10.5897/ajar2015.10584.
66. FAO. International Standards for Phytosanitary Measures 1 to 24. **2006**. Available online: <https://www.fao.org/3/a0450e/a0450e00.htm> [Accessed on 5 February 2022].
67. Cruttwell McFadyen, R.E. Biological control of weeds. *Annu. Rev. Entomol.* **1998**, *43*, 369–393.
68. Van Driesche, R.G.; Carruthers, R.I.; Center, T. Classical biological control for the protection of natural ecosystems. *Biol. Control* **2010**, *54*, 52–53. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.03.003.
69. Van Lenteren, J.C. IOBC Internet Book of Biological Control, version 6. *IOBC*. **2012**. Available online: [https://www.iobc-global.org/download/IOBC\\_InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf](https://www.iobc-global.org/download/IOBC_InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf) [Accessed on 8 February 2022].
70. Cheramgoi, E.; Wanjala, F.M.E.; Sudoi, V.; Wanyoko, J; Mwamburi, L.; Nyukuri, R. Efficacy and mode of application of local *Beauveria bassiana* isolates in the control of the tea weevil. *Ann. Res. Rev. Biol.* **2016**, *10*, 1–8.
71. Canassa, F.; Esteca, F.C.N.; Moral, R.A.; Meyling, N. V; Klingen, I. Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the twospotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. *J. Pest Sci.* **2020**, *93*, 261–274, doi.org/10.1007/s10340-019-01147-z.
72. Lu, C.; Liu, H.; Jiang, D.; Wang, L.; Jiang, Y.; Tang, S. *Paecilomyces variotii* extracts (ZNC) enhance plant immunity and promote plant growth. *Plant Soil* **2019**, *441*, 383–397.
73. Fronza, E.; Specht, A.; Heinzen, H.; De, N.M.; Heinzen, H. *Metarhizium (Nomuraea rileyi)* as biological control agent. *Biocontrol Sci. Technol.* **2017**, *27*, 1243–1264. doi.org/10.1080/09583157.2017.1391175.
74. Abdel-Raheem, M.A.; Youssif, M.A.I.; Helaly, S.M.M.Y. Use of *Verticillium lecanii* and *Beauveria bassiana* against tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) and *Bemisia tabaci* (Genn.) in tomato crop. *Plant Arch.* **2020**, *20*, 479–482.
75. Litwin, A.; Nowak, M.; Ro, S. Entomopathogenic fungi : unconventional applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2020**, *19*, 23–42. doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1.

76. Jaber, L.R.; Ownley, B.H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biol. Control* **2018**, *116*, 36–45, doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.018.
77. Vega, F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control : a review. *Mycologia* **2018**, *110*, 4–30, doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578.
78. Branine, M.; Bazzicalupo, A.; Id, S.B. Biology and applications of endophytic insect-pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* **2019**, 1–7.
79. Hu, S.; Bidochka, M. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130*, 570-581. doi.org/10.1111/jam.14503.
80. Mantzoukas, S.; Eliopoulos, P.A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 360. doi.org/10.3390/app10010360.
81. Sain, S.K.; Pandey, A.K. Significance of microbial bioagents (MBCAs) in sustainable agroecosystem: an overview. In: *Microorganisms in sustainable agriculture, food, and the environment: part III environmental microbiology*. Verma, D.R.; Shrivastava, P.P. Eds. Apple Academic Press Inc, New York. **2017**, 333–370. doi.org/10.1201/9781315365824
82. Ownley, B.H.; Griffin, M.R.; Klingeman, W.E.; Gwinn, K.D.; Moulton, J.K.; Pereira, R.M. *Beauveria bassiana* : Endophytic colonization and plant disease control. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, *98*, 267–270. doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010.
83. Gao, B.; Mou, Y.; Tong, S.; Ying, S.; Feng, M. Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a wide-spectrum insect- pathogenic fungus. *Virulence* **2020**, *11*, 365–380, doi.org/10.1080/21505594.2020.1749487.
84. Vinale, F. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytother. Res.* **2020**, *34*, 2835–2842. doi.org/10.1002/ptr.6728.
85. Viteri, A.; Diego, M.; Angela, M.; Entomologist, S.F. Use of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* in Combination with Low-Toxicity Insecticides to Control Fall Armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) Larvae. *Fla. Entomol.* **2022**, *101*, 327-329.
86. Valizadeh, B.; Samarfard, S.; Sendi, J.J.; Thomas, P. Developing an *Epehstia kuehniella* Hemocyte Cell Line to Assess the Bio-Insecticidal Potential of Microencapsulated *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus Against Cotton Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larva. *J.Econ. Entomol.* **2020**, *113*, 2086–2095, doi:10.1093/jee/toaa148.

87. Purkayastha, G.D.; Mangar, P.; Saha, A.; Saha, D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 1–27.
88. Junta de Andalucía. La superficie de invernaderos de Andalucía oriental crece un 1,7 %. 2018. Available online: <https://www.juntadeandalucia.es/presidencia/portavoz/tierraymar/138208/invernaderos/plastico/agricultura/Andalucia/cultivo> [Accessed on 28 January 2022].
89. Van der Blom, J. Manejo de los enemigos naturales en cultivos protegidos: ¿Podemos hacer funcionar el control biológico? *Phytoma* **2002**, *135*, 114-116.
90. Van der Blom, J. La introducción artificial de la fauna auxiliar en cultivos agrícolas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **2002**, *28*, 109-120.
91. Espinosa, P.J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manage. Sci.* **2002**, *58*, 920–927. doi.org/10.1002/ps.573.
92. Espinosa, P.J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Manage. Sci.* **2002**, *59*, 967–971. doi.org/10.1002/ps.572.
93. Van der Blom, J.; Cabello, T. Control biológico de trips (*Thysanoptera;Thripidae*). In: *La protección fitosanitaria en Agricultura Ecológico*, I. M. Cuadrado Gómez & M. d. C. García García Eds. IFAPA , Almería. **2004**, 159-174.
94. Van der Blom, J. Control biológico en pimiento bajo abrigo. In: *Control biológico de plagas agrícolas*. Jacas, J.; Urbaneja, A. Eds. Phytoma, Valencia, España. **2008**, 399-409.
95. Lietti, M.A.; Botto, E.; Alzogaray, R.A. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop. Etomol.* **2005**, *34*.
96. Van der Blom, J. Sanidad Vegetal en la era de los productos fitosanitarios alternativos?. *Phytoma* **2002**, *138*, 13-18.
97. St, R.J.; Wang, C.; Fang, W. New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biol. Rev.* **2011**, *25*, 84–88. doi.org/10.1016/j.fbr.2011.04.005.
98. Qu, S.; Wang, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *83*, 96–103, doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010.

99. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56. doi.org/10.1038/nrmicro797.
100. Keswani, C.; Singh, H.B.; Hermosa, R.; García-Estrada, C.; Caradus, J.; He, Y.W.; Mezaache-Aichour, S.; Glare, T.R.; Borriss, R.; Vinale, F.; et al. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 9287–9303. doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2.
101. Glare, T.; Caradus, J.; Gelernter, W.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Marrone, P.; Morin, L.; Stewart, A. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*. doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003.
102. Hasan, S. Entomopathogenic Fungi as Potent Agents of Biological Control. *Int. J. Eng. Tech.Res.* **2014**, *2*, 234–237.
103. Pucheta-Díaz, M.; Flores-Macías, A.; Rodríguez-Navarro, S.; De La Torre, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI* **2006**, *31*, 856–860.
104. Kulkarni, S. Commercialisation of microbial biopesticides for the management of pests and diseases. In: *Recent Advances in the Diagnosis and Management of Plant Diseases*. Awasthi Ed. Springer, New Delhi. **2015**, 1-10.
105. Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 249–260.
106. Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.A.; Kenerley, C.M.; Monte, E.; Mukherjee, P.K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I. V.; Kubicek, C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 749–759. doi.org/10.1038/nrmicro2637.
107. Maniania, N.K.; Bugeme, D.M.; Wekesa, V.W.; Delalibera, I.; Knapp, M. Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae), pests of horticultural crops. *Exp. Appl. Acarol.* **2008**, *46*, 259–274. doi.org/10.1007/s10493-008-9180-8.
108. Poveda, J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biol. Control* **2021**, *159*, 104634. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634.
109. Vázquez, L.L. Interactions of Entomopathogenic Fungus with Entomophagous Insects in agroecosystems. In: *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems*. Souza, B.; Vazquez, L.L.; Marucci, R.C. Eds. Springer **2019**, 161- 171. doi.org/10.1007/978-3-030-24733-1.

110. Samir, M.; Abbas, T. Interactions between Entomopathogenic Fungi and Entomophagous Insects. *Adv. Entomol.* **2020**, *8*, 130–146, doi.org/10.4236/ae.2020.83010.
111. Kubicek, C.P.; Herrera-estrella, A.; Seidl-seiboth, V.; Martinez, D.A.; Druzhinina, I.S.; Thon, M.; Zeilinger, S.; Casas-flores, S.; Horwitz, B.A.; Mukherjee, P.K.; et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* **2011**, *12*.
112. Carreras-Villaseñor, N.; Sánchez-Arreaguín, J.A.; Herrera-Estrella, A.H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* **2012**, *158*, 3–16. doi.org/10.1099/mic.0.052688-0.
113. Ryder, L.S.; Harris, B.D.; Soanes, D.M.; Kershaw, M.J.; Talbot, N.J.; Thornton, C.R.; Thornton, C.R. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiology* **2012**, 84–97. doi.org/10.1099/mic.0.051854-0.
114. Harman, G.E.; Herrera-Estrella, A.H.; Horwitz, B.A.; Lorito, M. Special issue: *Trichoderma*—from Basic Biology to Biotechnology. *Microbiology* **2012**, *158*, 1–2. doi.org/10.1099/mic.0.056424-0.
115. Salas-marina, M.A.; Silva-flores, M.A.; Uresti-rivera, E.E.; Castro-longoria, E.; Herrera-estrella, A.; Casas-flores, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *131*, 15–26. doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6.
116. Abiala, M. A.; Popoola, O. O.; Olawuyi, O. J.; Oyelude, J. O.; Akanmu, A. O.; Killani, A. S.; Odebode, A. C. Harnessing the potentials of vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi to plant growth – A review. *Int. J. Pure Appl. Sci. Techno.* **2013**, *14*, 61–79.
117. Asemoloye, M.D.; Jonathan, S.G.; Ahmad, R.; Dare, M.; Jonathan, S.G.; Ahmad, R. Synergistic plant-microbes interactions in the rhizosphere: a potential headway for the remediation of hydrocarbon polluted soils. *Int. J. Phyto.* **2019**, *21*, 71–83. doi.org/10.1080/15226514.2018.1474437.
118. Olawuyi, O. J.; Odebode, A. C.; Oyewole, I. O.; Akanmu, A. O.; Afolabi, O. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on *Pythium aphanidermatum* causing foot rot disease of pawpaw (*Carica papaya* L.) seedlings. *Arch. Phyto. Plant Protec.* **2013**, *47*, 185–193.
88. Junta de Andalucía. La superficie de invernaderos de Andalucía oriental crece un 1,7 %. 2018. Available online:

<https://www.juntadeandalucia.es/presidencia/portavoz/tierraymar/138208/invernaderos/plastico/agricultura/Andalucia/cultivo> [Accessed on

119. El-Maraghy, S.S.; Tohamy, A.T.; Hussein, K.A. Plant protection properties of the Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Mechanisms and potentiality. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycology* **2021**, *11*, 391-415.
120. Upamanya, G. K.; Bhattacharyya, A.; Dutta, P. Consortia of entomo-pathogenic fungi and bio-control agents improve the agro-ecological conditions for brinjal cultivation of Assam. *Biotech.* **2020**, *10*, 450.
121. Djonović, S.; Vittone, G.; Mendoza-Herrera, A.; Kenerley, C.M. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing  $\beta$ -1, 3- and  $\beta$ -1, 6-glucanase genes. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 469–480, doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00407.X.
122. Pliego, C.; Ramos, C.; Vicente, A. De; Cazorla, F.M. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* **2011**, *34*, 505–520. doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8.
123. Fisher, M.C.; Hawkins, N.J.; Sanglard, D.; Gurr, S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **2018**, *360*, 739–742.
124. Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 338–343.
125. Ramesh, R.; Savita, G. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Prot.* **2012**, *37*, 35–41. doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.008.
126. Sales, M.D.C.; Costa, H.B.; Meira, D.D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, *6*, 26–31. doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026.
127. Irtwange, S.V. Application of Biological Control Agents in Pre- and Postharvest Operations. *Agricultural Engineering International: The CIGR Journal.* **2006**.
128. Buttimer, C.; McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Hill, C.; Mahony, J.O.; Coffey, A.; Abedon, S.T.; Chan, B.K. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–15. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034.
129. Purin, S.; Rillig, M.C. Parasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: reviewing the evidence. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *279*, 8–14. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01007.x.

130. Hernández-Rosas, F.; Figueroa-Rodríguez, K.A.; García-Pacheco, L.A.; Velasco-Velasco, J.; Sangerman-Jarquín, D.M. Microorganisms and biological pest control: An analysis based on a bibliometric review. *Agronomy* **2020**, *10*, 1–14. doi.org/10.3390/agronomy10111808.
131. Pieterse, M.J.; Zamioudis, C.; Berendsen, R.L.; Weller, D.M.; Wees, S.C.M. Van; Bakker, P.A.H.M. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 347-375. doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
132. Viterbo, A.; Inbar, J.; Hadar, Y.; Chet, I. Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites. In: *The Mycota IV: environmental and microbial relationships*. Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Eds. Springer, Heidelberg, Germany. **2007**, 127-146.
133. Haggag, W. M.; Mohamed, H. A. A. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* **2007**, *1*, 7-12.
134. Elad, Y.; Kapat, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1999**, *105*, 177–189.
135. Kapat, A.; Zimand, G.; Elad, Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1998**, *52*, 127–137. doi.org/10.1006/PMPP.1997.0140.
136. Kuc, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 7–12.
137. Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 19–28.
138. Hammerschmidt, R. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. Corfu, May 2000. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 1–6.
139. Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Re. Phytopathol.* **1998**, *36*, 453-483.
140. Pieterse, C.M.J.; Leon-reyes, A.; Ent, S. Van Der; Wees, S.C.M. Van Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 308–316. doi.org/10.1038/nchembio.164.
141. Thaler, J.S.; Humphrey, P.T.; Whiteman, N.K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 260–270. doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010.
142. Zin, N.A.; Badaluddin, N.A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann. Agric. Sci.* **2020**, *65*, 168–178. doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003.

143. Oldroyd, G.E.D.; Harrison, M.J.; Paszkowski, U. Reprogramming plant cells for Endosymbiosis. *Science* **2009**, *324*, 753–755.
144. Jaber, L.R.; Enkerli, J. Fungal entomopathogens as endophytes : can they promote plant growth? *Biocontrol Sci. Technol.* **2017**, *27*, 28–41. doi.org/10.1080/09583157.2016.1243227.
145. Lefort, M.; Mckinnon, A.C.; Nelson, T.L.; Glare, T.R. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a vertically transmitted endophyte of *Pinus radiata* and its effect on above- and below-ground insect pests. *N. Z. Plant. Prot.* **2016**, *69*, 68–77.
146. Usta, C. Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). *Curr. Prog. Biol. Res.* **2013**, doi:10.5772/55786.
147. Kauffman, G.L.; Kneivel, D.P.; Watschke, T.L. Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop. Sci.* **2007**, *47*, 261–267. doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0171.
148. Du Jardin, P. Plant biostimulants : Definition , concept , main categories and regulation. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 3–14. doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021.
149. Daly, D. H.; Velivelli, S. L.; Prestwich, B. D. The role of soil microbes in crop biofortification. In: *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture*. Meena, V.; Mishra, P.; Bisht, J.; Pattanayak, A. Eds. Springer, Singapore. 2017, 333–356.
150. Santoyo, G.; Moreno-Hagelsieb, G.; del Carmen Orozco-Mosqueda, M.; Glick, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* **2016**, *183*, 92–99. doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008.
151. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **2003**, *255*, 571–586.
152. Gray, E.J.; Smith, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant – bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 395–412. doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
153. Glick B.R. Issues Regarding the Use of PGPB. In: *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer, Cham. **2020**, 361–383. doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9\_11
154. Glick, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* **2012**.

155. Glick, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 30–39. doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009.
156. Ahemad, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* **2014**, *26*, 1–20. doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001.
157. Bhattacharyya, P.N.; Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microb. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1327–1350. doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9.
158. Antoun, H.; Prévost, D. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. Ed. Dordrecht: Springer Netherlands. **2006**, 1–38.
159. Adesemoye, A.O.; Kloepper, J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85*, 1–12. doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0.
160. Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 541-556. doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
161. Velivelli, S.L.S.; Sessitch, A.; Prestwich, B.D. The Role of Microbial Inoculants in Integrated Crop Management Systems. *Potato Res.* **2015**, *57*, 291–309, doi.org/10.1007/s11540-014-9278-9.
162. Chauhan, H.; Bagyaraj, D.J.; Selvakumar, G.; Sundaram, S.P. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Appl. Soil Ecol.* **2015**, *95*, 38–53. doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011.
163. Ryu, C.M.; Murphy, J.F.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W. A Two-Strain Mixture of Rhizobacteria Elicits Induction of Systemic Resistance Against *Pseudomonas syringae* and Cucumber Mosaic Virus Coupled to Promotion of Plant Growth on *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 280–286.
164. Cherif, H.; Marasco, R.; Rolli, E.; Ferjani, R.; Fusi, M.; Soussi, A.; Mapelli, F.; Blilou, I.; Borin, S.; Boudabous, A. Oasis desert farming selects environment-specific date palm root endophytic communities and cultivable bacteria that promote resistance to drought. *Environ. Microbiol. Rep.* **2015**, *7*, 668–678.
165. Amrani, S.; Djouadi, S.; Bouherama, A.; Mohamed, T.; Abo, F.; Mansour, S.; Gezaf, S.; El-azeem, M.A.; Abo, H.; Abdel-kader, N.; et al. Checklist of Algerian fungi -Part 5: Dothideomycetes (Ascomycota). *Microb. Biosyst.* **2021**, *5*, 83-121. doi.org/10.21608/mb.2021.2021.168841.

166. Pandey, R.N.; Jaisani, P.; Yadav, D.L. *Trichoderma* spp. in the management of stresses in plants and rural prosperity. *Indian Phytopathol.* **2021**, *74*, 453–467. doi.org/10.1007/s42360-021-00373-9.
167. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 487-511.
168. Shivanna, M.B.; Meera, M.S.; Kubota, M.; Hyakumachi, M. Promotion of growth and yield in cucumber by zoysia grass rhizosphere fungi. *Microbes Environ.* **2005**, *20*, 34–40.
169. Etesami, H.; Maheshwari, D.K. Ecotoxicology and Environmental Safety Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture : Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *156*, 225–246. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013.
170. Shores, M.; Yedidia, I.; Chet, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **2004**, *95*, 76–84. doi.org/10.1094/PHYTO-95-0076.
171. Murali, M.; Naziya, B.; Ansari, M.A.; Alomary, M.N.; Alyahya, S.; Almatroudi, A.; Thriveni, M.C.; Gowtham, H.G.; Singh, S.B.; Aiyaz, M.; et al. Bioprospecting of Rhizosphere-Resident Fungi : Their Role and Importance in Sustainable Agriculture. *J. Fung.* **2021**, *7*, 314.
172. Nagaraju, A.; Sudisha, J.; Murthy, S.M. Seed priming with *Trichoderma harzianum* isolates enhances plant growth and induces resistance against *Plasmopara halstedii* , an incitant of sunflower downy mildew disease. *Plant Pathol.* **2012**, *41*, 609–620. doi.org/10.1007/s13313-012-0165-z.
173. Sindhu, G.M.; Murali, M.; Thriveni, M.C.; Anupama, N.; Amruthesh, K.N. Asian Journal of Crop Science Research Article Growth Promotion and Disease Resistance in Muskmelon Induced by Crude Proteins of *Penicillium verruculosum* Against *Gummy Stem* Blight Disease. *J. Crop. Sci.* **2018**, *10*, 160-167. doi.org/10.3923/ajcs.
174. Mushtaq, S.; Nasim, G.; Khokhar, I. Archives Of Phytopathology And Plant Protection Effects of *Penicillium* extracts on germination vigour in subsequent seedling growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Arch. Phytopathol. Pant. Prot.* **2012**, *45*, 932-937. doi.org/10.1080/03235408.2011.603965.
175. Jogaiah, S.; Abdelrahman, M.; Tran, L.P.; Shin-ichi, I. Characterization of rhizosphere fungi that mediate resistance in tomato against bacterial wilt disease. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 3829–3842. doi.org/10.1093/jxb/ert212.

176. Basavaraj, G.L.; Murali, M.; Lavanya, S.N.; Amruthesh, K.N. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Seed priming with biotic agents invokes defense response and enhances plant growth in pearl millet upon infection with *Magnaporthe grisea*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *21*, 101279. doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101279.
177. Kumar, A.; Singh, S.; Gaurav, A.K.; Srivastava, S. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1–15. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216.
178. Arun, K.D.; Sabarinathan, K.G.; Gomathy, M.; Kannan, R.; Balachandar, D. Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria. *J. Basic Microbiol.* **2020**, *60*, 768–786.
179. Zafar-Ul-Hye, M.; Danish, S.; Abbas, M.; Ahmad, M.; Munir, T.M. ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress. *Agronomy* **2019**, *9*, 343.
180. Naziya, B.; Murali, M.; Amruthesh, K.N. Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF) Instigate Plant Growth and Induce Disease Resistance in *Capsicum annuum* L. upon Infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.). *Butl. Bisby Biomol.* **2020**, *10*, 41.
181. Hossain, M.M.; Sultana, F.; Islam, S. Plant growth-promoting fungi (PGPF): Phytostimulation and induced systemic resistance. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Ed. Springer: Singapore. **2017**, 135–191.
182. Murali, M.; Amruthesh, K.N.; Sudisha, J.; Niranjana, S.R.; Shetty, H.S. Screening for plant growth promoting fungi and their ability for growth promotion and induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *J. Phytol.* **2012**, *4*, 30–36.
183. Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2010**, *56*, 73–98.
184. Nenwani, V.; Doshi, P.; Saha, T.; Rajkumar, S. Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity. *J. Yeast Fungal Res.* **2010**, *1*, 9–14.
185. Dhara, P.; Stuti, P.; Pooja, T.; Meenu, S. Siderophore producing *Aspergillus* spp. as bioinoculant for enhanced growth of Mung Bean. *Int. J. Adv. Agric. Sci. Technol.* **2017**, *6*, 111–120.
186. Ghosh, S.K.; Banerjee, S.; Sengupta, C. Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic Fungi. *J. Biofertil. Biopestic.* **2017**, *10*, 105–112.

187. Diáñez, F.; Marín, F.; Santos, M.; Gea, F.J.; María, J.; Piñeiro, M.; González, J.M. Genetic Analysis and In Vitro Enzymatic Determination of Bacterial Community in Compost Teas from Different Sources Genetic Analysis and In Vitro Enzymatic Determination of Bacterial Community in Compost Teas from Different Sources. *Compost Sci. Util.* **2018**, *0*, 1–15. doi.org/10.1080/1065657X.2018.1496045.
188. Conrath, U. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* **2011**, *16*, 524–531. doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004.
189. Kumari, S.; Bharat, N.K.; Thakur, A.K. Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Bio-Control Agents (BCAs) in Crop Production. *Int. J. Economic Plants* **2020**, *7*, 144–150.
190. Chauhan, J.; Jain, D. K. Exploring the potentiality of biocontrol agents against *Alternaria solani*: A causal agent of early blight of potato and tomato crops. *Ann. of Biol.* **2020**, *36*, 67–70.
191. Tariq, M.; Khan, A.; Asif, M.; Khan, F.; Ansari, T.; Shariq, M.; Siddiqui, M.A. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* **2020**, 507–524. doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262.
192. Van der Blom, J.; Robledo, A.; Torres, S.; Sánchez, J. A. Control Biológico en Horticultura en Almería: Un cambio radical, pero racional y rentable. In: Cuadernos de Estudios Agroalimentarios. *COEXPHAL*, Almería. **2010**, 45–60.
193. FAO. Sustainable food systems Concept and framework. Available online: <http://www.fao.org/3/ca2079en/CA2079EN.pdf> [Accessed on 7 January 2022].
194. Ortiz, R. G.; Olivero, M. N.; Meana, O. V. Natural biostimulants enhance crop resistance to abiotic stress. *J. Biotechnol.* **2019**, *305*, S69–S70.
195. BPIA. Solutions provided by biological products: Biostimulants. 2019. Available online: <https://www.bpia.org/solutions-provided-by-biological-products-biostimulants/> [Accessed on 5 February 2022].
196. Matyjaszczyk E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. *Pest Manage Sci.* **2015**, *71*, 1201–1206. doi.org/10.1002/ps.3986.
197. Pathan, E. K.; Patil, A. V.; Deshpande, M. V. Bioprospecting of fungal entomo- and mycopathogens. In: *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*. Ed. Springer, Singapore. **2019**, 497–513.

198. Markets and Markets. Biopesticides Market worth \$8.5 billion by 2025. 2020. Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biopesticide.asp> [Accessed on 10 February 2022].
199. Martínez, F.D.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J. Sci. Food. Agric.* **2015**, *96*, 1934–1944. doi.org/10.1002/jsfa.7301.
200. Diario Oficial de la Unión Europea. DIRECTIVA 2009/128/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. **2009**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:es:PDF> [Accessed on 8 January 2022].
201. Bues, R.; Bussières, P.; Dadomo, M.; Dumas, Y.; Garcia-pomar, M.I.; Lyannaz, J.P. Assessing the environmental impacts of pesticides used on processing tomato crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2004**, *102*, 155–162. doi.org/10.1016/j.agee.2003.08.007.
202. de Souza, R.M.; Seibert, D.; Quesada, H.B.; de Jesus Bassetti, F.; Fagundes-Klen, M.R.; Bergamasco, R. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. *Process Saf. Environ. Prot.* **2020**, *135*, 22–37. doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035.
203. Jyoti, S.; Singh, D.P. Fungi as biocontrol agents in sustainable agriculture. *Microbes Environ. Manag.* **2016**, *8*, 172–194.
204. FAO. Pesticide use. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP> [Accessed on 10 February 2022].
205. FAO. Plant Production and Protection Division: Integrated Pest Management. Available online: <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/> [Accessed on 10 February 2022].
206. BOE. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. **2012**. Available online: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2012/BOE-A-2012-11605-consolidado.pdf> [Accessed on 8 January 2022].
207. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) NO 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. **2005**. Available online:

<https://www.boe.es/buscar/pdf/2012/BOE-A-2012-11605-consolidado.pdf> [Accessed on 8 January 2022].

208. European Commission. Food Safety. 2022. Available online: [https://ec.europa.eu/food/index\\_en](https://ec.europa.eu/food/index_en) [Accessed on 6 January 2022].

209. AEPLA. Uso de productos fitosanitarios y seguridad alimentaria. 2014. Available online: [https://www.aepla.es/wp-content/uploads/2020/08/P0014\\_Residues\\_Brochure\\_Spanish\\_Inside.pdf](https://www.aepla.es/wp-content/uploads/2020/08/P0014_Residues_Brochure_Spanish_Inside.pdf) [Accessed on 6 January 2022].

210. AEPLA. Visión sobre el futuro de Europa Cinco pasos para promover la innovación, la competitividad y la productividad sostenible. 2014. Available online: [https://www.aepla.es/wp-content/uploads/2020/08/P0016\\_unavisiondefuturo.pdf](https://www.aepla.es/wp-content/uploads/2020/08/P0016_unavisiondefuturo.pdf) [Accessed on 6 January 2022].

211. Villaverde, J.J.; Sevilla-Morán, B.; Sandín-España, P.; López-Goti, C.; Alonso-Prados, J.L. Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation ( EC ) No . 1107 / 2009. *Pest Manag. Sci.* **2013**, *70*,2-5. doi.org/10.1002/ps.3663.

212. MAPA. Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. **2020**. Available online: [https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/programas-ue/Directiva\\_91-414-CEE\\_tcm30-72998.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/programas-ue/Directiva_91-414-CEE_tcm30-72998.pdf) [Accessed on 6 January 2022].

213. IFAPA. Bases para la correcta regulación y aplicación de productos fitosanitarios en invernadero mediante sistemas fijos. Tratamiento con pistoleta o lanza. 2012. Available online: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/25af8ce1-9812-43f7-b5ca-652dc0598eae> [Accessed on 12 January 2022].

214. Khan, M.R.; Haque, Z.; Rasool, F.; Salati, K.; Khan, U.; Mohiddin, F.A.; Zuhaib, M. Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of. *Crop Prot.* **2019**, *119*, 24–29. doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.014.

215. Ghosh, S.K.; Pal, S. Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*, 1–7. doi.org/10.1007/s10661-015-5053-x.

216. Köhl, J.; Booij, K.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W.J. Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *BioControl* **2019**, *64*, 469–487. doi.org/10.1007/s10526-019-09964-y.

217. BOE. DIRECTIVA 98/44/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de julio de 1998 relativa a la protección jurídica de las invenciones biotecnológicas. **1998**. Available online: <https://www.boe.es/doue/1998/213/L00013-00021.pdf> [Accessed on 8 January 2022].
218. Glare, T.; Caradus, J.; Gelernter, W.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Köhl, J.; Marrone, P.; Morin, L.; Stewart, A. Have biopesticides come of age?. *Trends in biotechnology* **2012**, *30*, 250–258. doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003
219. European Comission. Legislation on Plant Protection Products (PPPs) **2022**. Available online: [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/legislation-plant-protection-products-ppps\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/legislation-plant-protection-products-ppps_en) [Accessed on 6 January 2022].
220. MAPA. Nuevo Reglamento de Sanidad Vegetal. 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/nueva-normativa/> [Accessed on 6 January 2022].
221. European Comission. EU Pesticides Database 2022. Available online: [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en) [Accessed on 6 January 2022].
222. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1107/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. **2009**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:Es:PDF> [Accessed on 11 January 2022].
223. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 546/2011 DE LA COMISIÓN de 10 de junio de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los principios uniformes para la evaluación y autorización de los productos fitosanitarios. **2011**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:155:0127:0175:ES:PDF> [Accessed on 11 January 2022].
224. Diario Oficial de la Unión Europea. DIRECTIVA 2005/25/CE DEL CONSEJO de 14 de marzo de 2005 por la que se modifica el anexo VI de la Directiva 91/414/CEE en lo que se refiere a los productos fitosanitarios que contienen microorganismos. **2005**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005L0025&from=ES> [Accessed on 11 January 2022].

225. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 283/2013 DE LA COMISIÓN de 1 de marzo de 2013 que establece los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas, de conformidad con el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos. **2013**. Available online: <https://www.boe.es/doue/2013/093/L00001-00084.pdf> [Accessed on 11 January 2022].
226. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 284/2013 DE LA COMISIÓN de 1 de marzo de 2013 que establece los requisitos sobre datos aplicables a los productos fitosanitarios, de conformidad con el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. **2013**. Available online: <https://www.boe.es/doue/2013/093/L00085-00152.pdf> [Accessed on 11 January 2022].
227. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 33/2008 DE LA COMISIÓN de 17 de enero de 2008 por el que se establecen disposiciones detalladas de aplicación de la Directiva 91/414/CEE del Consejo en lo que se refiere a un procedimiento ordinario y acelerado de evaluación de las sustancias activas que forman parte del programa de trabajo mencionado en el artículo 8, apartado 2, de dicha Directiva pero que no figuran en su anexo I. **2008**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0033&from=EN> [Accessed on 11 January 2022].
228. EFSA. Pesticide evaluations: overview and procedure. 2022. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/pesticides> [Accessed on 13 January 2022].
229. Phytoma. Incidencia en el sector hortofrutícola de los trámites de registro de productos fitosanitarios. 2010. Available online: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/222-octubre-2010/incidencia-en-el-sector-hortofruticola-de-los-tramites-de-registro-de-productos-fitosanitarios-34> [Accessed on 13 January 2022].
230. MAPA. Registro de Productos Fitosanitarios. 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp> [Accessed on 6 January 2022].
231. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) no 1907/2006. **2008**. Available online: <https://www.boe.es/doue/2008/353/L00001-01355.pdf> [Accessed on 11 January 2022].
232. European Commission. Food and Health Quality Protection - (EU27) - European Union 27 (excluding UK). 2022. Available online:

[https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardIndicators/FoodHealth.html?select=EU27\\_FLAG,1](https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardIndicators/FoodHealth.html?select=EU27_FLAG,1) [Accessed on 28 January 2022].

233. European Commission. Food and Health Quality Protection - (EU27) - Spain. 2022. Available online:

[https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardIndicators/FoodHealth.html?select=EU27\\_FLAG,1](https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardIndicators/FoodHealth.html?select=EU27_FLAG,1) [Accessed on 28 January 2022].

234. Zachow, C.; Berg, G. Understanding the diversity and versatility of *Trichoderma* by next-generation sequencing. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Ed. Elsevier. 2014, 57-65. doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00004-7.

235. Schuster, A.; Schmoll, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 787–799. doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1

236. MAPA. Registro de Productos Fitosanitarios. Consultas por nº de registro y/o nombre comercial 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/conregnom.asp?e=3&cod=&nom=> [Accessed on 6 January 2022].

237. MAPA. Registro de Productos Fitosanitarios. Consultas por sustancia activa. 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/consusact.asp> [Accessed on 6 January 2022].

238. MAPA. Registro de Productos Fitosanitarios. Consulta de productos fertilizantes. 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/app/consulta-fertilizante/consulta-fertilizante.aspx> [Accessed on 6 January 2022].



## Objetivos

El **objetivo general** del proyecto de investigación de tesis doctoral es la evaluación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* como promotor del crecimiento vegetal y el control biológico de enfermedades hortícolas, para el uso en la agricultura.

### Objetivos específicos

1. Determinación de la velocidad y capacidad de crecimiento en diferentes condiciones *in vitro* de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*, hongo aislado de sustrato usado para el cultivo de champiñón.

2. Evaluación de la capacidad de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* como antagonista, a fin de evaluar la capacidad de inhibición de desarrollo de diversos fitopatógenos de importancia en los principales cultivos de la zona en condiciones *in vitro*.

3. Determinar la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en semillas y plántulas de diversos cultivos hortícolas, en diferentes ambientes.

4. Estimación de la capacidad de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* como agente de control biológico de fitopatógenos *in vivo* en cultivos hortícolas en invernadero.

5. Evaluación de la producción de metabolitos, actividad enzimática, producción de ácido indolacético y sideróforos por *Trichoderma aggressivum f. europaeum*.

6. Identificación y caracterización molecular de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* mediante PCR y análisis de la secuenciación.

7. Puesta a punto de sistemas de multiplicación masiva a escala piloto, así como su escalado industrial.

8. Evaluar la compatibilidad de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* con fungicidas.



# **Capítulo 1. Tendencias mundiales de investigación en el género *Trichoderma* desde 1960 hasta 2019: Un análisis bibliométrico.**

Se presentará (con ligeras modificaciones) como:

*Article*

## **Global Research Trends in *Trichoderma* genus from 1960 to 2019: A bibliometric analysis.**

**Fernando Diáñez\*, Brenda Sánchez-Montesinos, Alejandro Moreno-Gavira, Mila Santos.**

CIAMBITAL Research Centre for Mediterranean Intensive Agrosystems and Agrifood Biotechnology, ceiA3  
Agrifood Campus of International Excellence, University of Almería, Almería, Spain.  
[alejanmoga@gmail.com](mailto:alejanmoga@gmail.com) (A.M.); [brensam@hotmail.com](mailto:brensam@hotmail.com) (B.S.M.); [msantos@ual.es](mailto:msantos@ual.es) (M.S.).

\*Correspondence: [fdianez@ual.es](mailto:fdianez@ual.es); Tel.: +34-950-014108



## 1.1. Resumen

*Trichoderma/Hypocrea* (anamorfo/teleomorfo) es un género fúngico omnipresente que se encuentra en suelos, diferentes materiales vegetales, colonizando raíces, hojarasca, así como en madera y corteza en descomposición. Las especies de *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas por sus diversas características y varias aplicaciones industriales y agronómicas. Nuestro objetivo en este estudio fue analizar las tendencias globales en la investigación del género *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019, utilizando la base de datos Scopus. El análisis bibliométrico se realizó sobre más de 17.322 documentos que contenían "*Trichoderma/Hypocrea*" para el período estudiado, lo que demuestra que existe un considerable interés de investigación en este género fúngico. Las investigaciones publicadas se centran principalmente en la aplicación de las enzimas de *Trichoderma* en varios procesos industriales y en la agricultura como microbios promotores del crecimiento vegetal (PGPM) y agentes de control biológico microbiano (MBCA). Aunque hay muchas especies de *Trichoderma*, la mayor parte de la investigación se centra en cuatro especies, entre las que se encuentran los productores de enzimas, *T. reesei* y *T. longibrachiatum*, y los PGPM y MBCA, *T. harzianum* y *T. viride*. La investigación sobre las enzimas ha sido muy relevante en las últimas seis décadas, mientras que los estudios sobre el biocontrol se limitan a las últimas tres décadas. India, Estados Unidos y China lideran la investigación sobre *Trichoderma*, con 6,549 documentos (37.8% del total) y 8 de las 16 instituciones más relevantes en la investigación sobre *Trichoderma*.

**Palabras clave:** *Trichoderma*; *Hypocrea*; análisis bibliométrico; base de datos Scopus.

## 1.2. Introducción

*Trichoderma/Hypocrea* (anamorfo/teleomorfo) es un género fúngico que se encuentra en altas densidades en todos los hábitats [1-3]. Las especies de *Trichoderma* son ascomicetos de esporas verdes que se encuentran en diversos rangos templados y suelos tropicales [2], en diferentes materiales vegetales, colonizando raíces, hojarasca, así como en madera y corteza en descomposición [4], e incluso en condiciones nutricionales pobres.

*Trichoderma* Pers., 1794 (anamorfo) se publicó antes que *Hypocrea* Fr., 1825 (teleomorfo). La Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* indicó una fuerte preferencia por denominarla *Trichoderma* en lugar de *Hypocrea* [5]. El género *Trichoderma* consta de más de 200 especies definidas molecularmente [6]. En 2015, la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Trichoderma/Hypocrea* enumeró 254 especies [7]. Las especies

de *Trichoderma* se caracterizan por su capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones desfavorables, su alta tasa de reproducción, su eficiencia en el uso de nutrientes, su capacidad para modificar la rizosfera, su fuerte agresividad contra los hongos patógenos de las plantas, su papel crucial en la naturaleza al degradar los residuos orgánicos y mejorar el crecimiento vegetal mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, su eficiente capacidad para promover el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa, lo que ha despertado el interés de los investigadores en el campo de la agricultura [8-10]. Se han desarrollado varios productos comerciales con diversos usos utilizando diferentes especies de *Trichoderma* [11]. Especies de *Trichoderma* se han estudiado por sus diversas características y varias aplicaciones industriales y agronómicas (Figura 1).

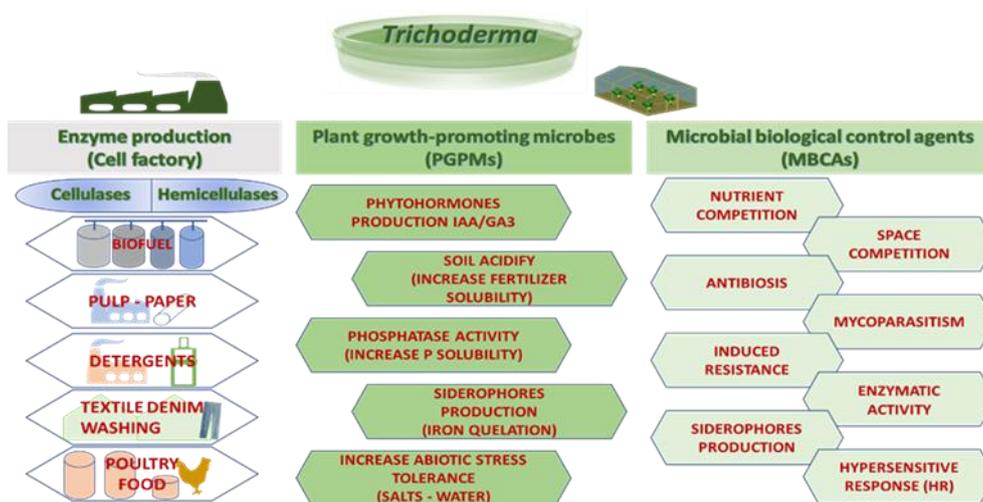


Figura 1. Resumen de las principales aplicaciones industriales y agronómicas de *Trichoderma*.

Las especies de *Trichoderma*, al igual que otros hongos filamentosos, son productores muy eficientes de muchas enzimas extracelulares y se utilizan ampliamente como fábricas de células en la producción industrial de proteínas y enzimas. *Trichoderma reesei* E.G. Simmons, *Trichoderma harzianum* Rifai y *Trichoderma viride* Pers. son las especies más utilizadas para la producción de enzimas. *T. reesei* tiene una gran capacidad de secreción de proteínas y es la principal fuente industrial de enzimas, celulasas y hemicelulasas [12,13,14]. Las celulasas son una de las enzimas más utilizadas debido a sus diversas aplicaciones industriales en las industrias de alimentos y piensos, textil, de pulpa y papel y de detergentes [15]. Otras especies como *T. harzianum* y *T. viride* se utilizan para la hidrólisis del bagazo de la caña de azúcar [16] y para la producción comercial de enzimas celulasa (suavizante de tejidos), respectivamente [17].

Las enzimas como las hemicelulasas de *Trichoderma* también se utilizan en la alimentación de las aves de corral para aumentar la digestibilidad de los polisacáridos no amiláceos de la cebada

u otros cereales. Los polisacáridos no amiláceos no son digeribles por las aves, ya que carecen de las enzimas endógenas necesarias para digerir los enlaces de tipo beta; el uso de enzimas reduce la viscosidad de la dieta y favorece la digestibilidad [18-20]. Especies como *T. longibrachiatum* Rifai se utilizan para la producción de xilanasas y hemicelulasas con aplicación en varias industrias [21]. Las especies del género *Trichoderma* también son de gran interés por sus beneficios en la agricultura y los ecosistemas naturales. En las últimas décadas, el uso de microbios promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) y de agentes de control biológico microbiano (MBCA) ha aumentado considerablemente en la agricultura, principalmente porque los consumidores y los productores están interesados en reducir los pesticidas orgánicos sintéticos y los residuos de fertilizantes químicos en los alimentos, así como en reducir el impacto medioambiental de la producción agrícola. El uso extensivo de plaguicidas sintéticos desde 1945 ha dado lugar a problemas medioambientales a largo plazo [22] y a elevados riesgos para la salud humana [23]. Cada año se utilizan entre 3 y 4.6 millones de toneladas de plaguicidas [24,25]; el uso intensivo mundial de fertilizantes químicos fue de unos 109.1, 45.5 y 37.6 millones de toneladas de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O, respectivamente, en 2017 (un aumento medio del 35.9% desde 2002) [26]; pone en peligro directamente los recursos de suelo y agua, causa contaminación ambiental [27] y provoca enfermedades a niveles alarmantes [28].

Por lo tanto, la agricultura sostenible se logrará mediante estrategias de gestión biológica de plagas y fertilizantes; ambas son soluciones alternativas más naturales y respetuosas con el medio ambiente para gestionar la producción de cultivos con un uso reducido de plaguicidas y fertilizantes. Entre los numerosos microbios utilizados como PGPM o MBCA (también denominados probióticos), las cepas bacterianas o fúngicas son las más utilizadas. La primera vez que se informó de la existencia de *Trichoderma* como agente de biocontrol por Weindling en 1932 [29]. Varias especies como *T. harzianum* [30], *T. asperellum* Samuels, Lieckf., & Nirenberg [31,32], *T. virens* Mill., Giddens, & Foster [33-35], *T. saturnisporum* Hammill [36,37], y *T. aggressivum* Samuels & Gams [38] han sido reportadas como potentes MBCA contra patógenos de plantas y como potentes PGPM para varios cultivos, entre otros.

Las especies de *Trichoderma* tienen una actividad antagónica contra varios patógenos vegetales transmitidos por el suelo y por el aire, principalmente hongos como *Fusarium oxysporum* [39], *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) [40], *Armillaria mellea* [32,41], *Chondrostereum purpureum* [42], *Phodosphaera xantii* [43], *Pythium aphanidermatum* [44] y *Pythium ultimum* [45].

Existen varios mecanismos por los que las cepas de *Trichoderma* desplazan a los patógenos de las plantas (Figura 1): competencia por recursos (espacio y nutrientes) [46], producción y

excreción de metabolitos (antibióticos, enzimas que degradan la pared celular, sideróforos) [47-51], micoparasitismo sobre hongos fitopatógenos [39], e inducción de respuestas de defensa (resistencia sistémica adquirida, resistencia sistémica inducida y respuesta hipersensible) [1,52,53]. Entre estos, la competencia, el micoparasitismo y la producción de compuestos antifúngicos se consideran los mecanismos más importantes [8,54].

El crecimiento de las plantas y la mejora del rendimiento por parte de las especies de *Trichoderma* se ha reportado en muchos cultivos, incluyendo cultivos hortícolas, como el pepino, el melón, las judías, el pimiento dulce, el tomate, la lechuga y las fresas [37,39,55,56], cultivos de grano como el maíz, el trigo y la soja, [56-58] y plantas forestales como el pino [59]. Las especies de *Trichoderma* pueden promover el crecimiento de las plantas debido a su capacidad para mejorar la solubilidad de los micronutrientes del suelo (Fe, Zn, Cu y Mn) y los macronutrientes (P); también pueden mejorar el enraizamiento mediante la producción de sideróforos, enzimas solubilizadoras de fosfato y fitohormonas [60]. Las especies de *Trichoderma* son hongos colonizadores de raíces; su aplicación a diversos cultivos produce una alteración de varios parámetros morfológicos de las plantas, mejorando la germinación, el enraizamiento y provocando una floración temprana [9].

Las técnicas de análisis bibliométrico se utilizan cada vez más para proporcionar información sobre algunos temas de investigación específicos, descubrir las tendencias futuras o analizar las tendencias durante largos periodos de tiempo [61]. Estas técnicas de análisis también se utilizan para evaluar las contribuciones de las instituciones y los países en un campo determinado, y para analizar las interrelaciones entre los distintos grupos de la comunidad científica [62].

Clarivate Analytics, Web of Science (WoS) y Scopus de Elsevier se utilizan en la evaluación de la investigación porque son las principales fuentes de datos de citas [63,64]; aunque la coincidencia entre las bases de datos puede no ser del 100% y los resultados pueden variar en función de la base de datos utilizada [64]. Hay un mayor número de revistas indexadas por Scopus en comparación con WoS [65,66]. Según la información del sitio web de Scopus y WoS en 2020, Scopus cubre más de 25,100 títulos (series de libros, revistas y revistas comerciales) con más de 77.8 millones de registros, incluyendo más de 211,000 libros y más de 9.8 millones de documentos de conferencias; WoS cubre 21,294 títulos (revistas, libros y procedimientos de conferencias) con más de 76 millones de registros, incluyendo más de 111,000 libros y más de 8 millones de documentos de conferencias.

En este estudio bibliométrico, pretendemos analizar las tendencias globales en la investigación sobre *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019 utilizando la base de datos Scopus para identificar las tendencias y las lagunas de conocimiento, en términos de palabras clave, campos de investigación, instituciones relevantes y distribuciones geográficas.

### 1.3. Materiales y métodos

Se realizó un análisis bibliométrico según la metodología descrita por Padilla et al. [67]. Se realizó una búsqueda completa en la base de datos Scopus de documentos publicados en los últimos 60 años, desde 1960 hasta 2019, utilizando los términos '*Trichoderma* o *Hypocrea*' y los subcampos de búsqueda: título, resumen y palabras clave. La estructura de la metodología se muestra en la Figura 2. Se realizaron un total de 75 consultas de búsqueda (específicas para las especies de *Trichoderma*) para el período comprendido entre 1960 y 2019; en el período seleccionado, las diez especies más referenciadas fueron citadas en un número total de documentos que osciló entre 103 y 3,937. Además, la búsqueda se redujo para las 10 especies que incluían *T. harzianum*, *T. viride*, *T. reesei*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *T. hamatum* y *T. pseudokoningii*, en orden decreciente de impacto.

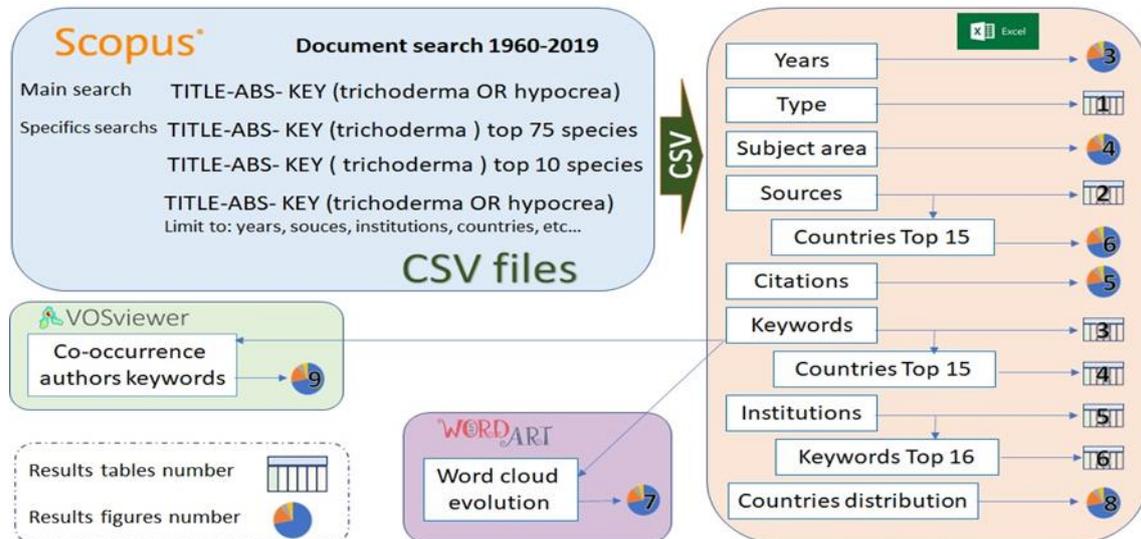


Figura 2. Estructura de la metodología y relación con los resultados obtenidos.

Se realizaron varias consultas utilizando y combinando los principales filtros de Scopus, como rango de fechas, área temática, tipo de documento, título de la fuente, afiliación y país. Los resultados se descargaron y exportaron a archivos en formato CSV para incluir toda la información necesaria (metadatos). Se utilizó Excel (Microsoft Office 365) para crear una base de datos y analizar los resultados con los datos generados por Scopus. Se utilizó el software

VOSviewer (versión 1.6.15, Universidad de Leiden, Países Bajos) para mapear la frecuencia de las redes de co-ocurrencia de palabras clave [68,69]. Se generaron nubes de palabras basadas en las 50 principales palabras clave relacionadas con *Trichoderma* (*Hypocrea*), en cada década, utilizando WordArt (wordart.com/). Las redes de co-ocurrencia de palabras clave y las nubes de palabras permiten la visualización de términos científicos importantes.

## 1.4. Resultados y discusión

### 4.1. Evolución temporal de la producción científica

Se han encontrado un total de 17,322 documentos del periodo 1960-2019 con los términos "*Trichoderma* o *Hypocrea*" en el título, resumen o palabras clave. La evolución temporal del número de documentos ha crecido desde 1960, siguiendo una función cuadrática (Figura 3). Entre 1960 y 1969 se publicaron un total de 107 documentos; la producción científica en las décadas siguientes se multiplicó por 4.3 (años 70s), 11.7 (años 80s), 22,0 (años 90s), 39.3 (años 2000s) y 83.6 (años 2010s), lo que demuestra que este género fúngico es actualmente de gran interés; el 28.2% de los documentos se publicaron en los últimos 5 años (Tabla 1).

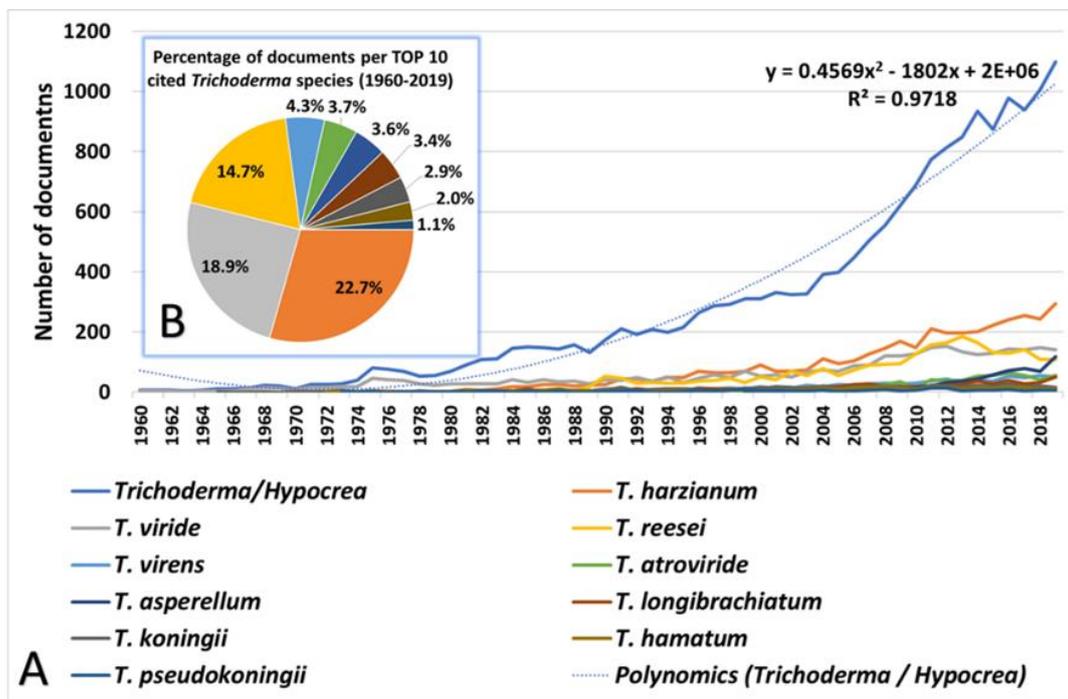


Figura 3. Tendencias de crecimiento de las publicaciones mundiales sobre *Trichoderma/Hypocrea* y las 10 principales especies de *Trichoderma* (A). Relevancia de las 10 principales especies de *Trichoderma* durante los últimos 60 años (B).

La distribución según el tipo de documento y su relevancia es la siguiente: artículos (15,647; 90.33%), comunicaciones a congresos (676; 3.90%), revisiones (468; 2.70%), capítulos de libros (266; 1.54%), libros (10; 0.06%) y otros (255; 1.47%). La evolución de las publicaciones de las diez especies más estudiadas, así como la distribución porcentual de cada especie, se representa en la figura 3. Las ocho especies con mayor interés científico (más o cerca de 500 publicaciones) son *T. harzianum* (*H. lixii*) (3,937), *T. viride* (*H. rufa*) (3,282), *T. reesei* (*H. jecorina*) (2,543), *T. virens* (746), *T. atroviride* (642), *T. asperellum* (625), *T. longibrachiatum* (588) y *T. koningii* (496).

Tabla 1. Número total y distribución según el tipo de documentos sobre *Trichoderma/Hypocrea* indexados por Scopus durante 1960-2019.

Type of documents	Percentage of documents						
	1960-1969	1970-1979	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2019	1960-2019
Article	95.33%	95.00%	91.94%	94.39%	89.25%	89.25%	90.33%
Review	0.00%	0.87%	0.88%	1.11%	3.16%	3.29%	2.70%
Conference paper	0.93%	2.83%	4.23%	2.85%	5.49%	3.48%	3.90%
Book chapter	0.00%	0.00%	0.08%	0.34%	0.81%	2.49%	1.54%
Book	0.00%	0.00%	0.16%	0.17%	0.00%	0.04%	0.06%
Others	3.74%	1.30%	2.71%	1.15%	1.28%	1.45%	1.47%

#### 4.2. Distribución de los documentos en áreas temáticas.

El análisis de los resultados por áreas temáticas de Scopus en cada década se muestra en la Figura 4. El 81.2% de los documentos que tratan sobre *Trichoderma/Hypocrea* (1960-2019) se encuentran en seis áreas: Bioquímica, Genética y Biología Molecular (23.2%; 7,405 documentos), Ciencias Agrícolas y Biológicas (21.3%; 6,818 documentos), Inmunología y Microbiología (15.4%; 4,925 documentos), Ciencias Ambientales (8.4%; 2,447 documentos), Ingeniería Química (7.7%; 2,682 documentos) y Química (5.2%; 1,655 documentos). La distribución de los documentos en las últimas 6 décadas en las tres primeras áreas mencionadas que tratan sobre *Trichoderma/Hypocrea* es 74.7% (112 documentos) en la década de 1960, 65.6% (493 documentos) en la década de 1970, 67.2% (1,585 documentos) en la década de 1980, 68.2% (2,986 documentos) en la década de 1990, 63.3% (4,819 documentos) en la década de 2000 y 59.9% (9,153 documentos) en la década de 2010. Cabe señalar que un artículo puede asignarse a más de un área; la media de esta búsqueda fue de 1.84 áreas por documento.

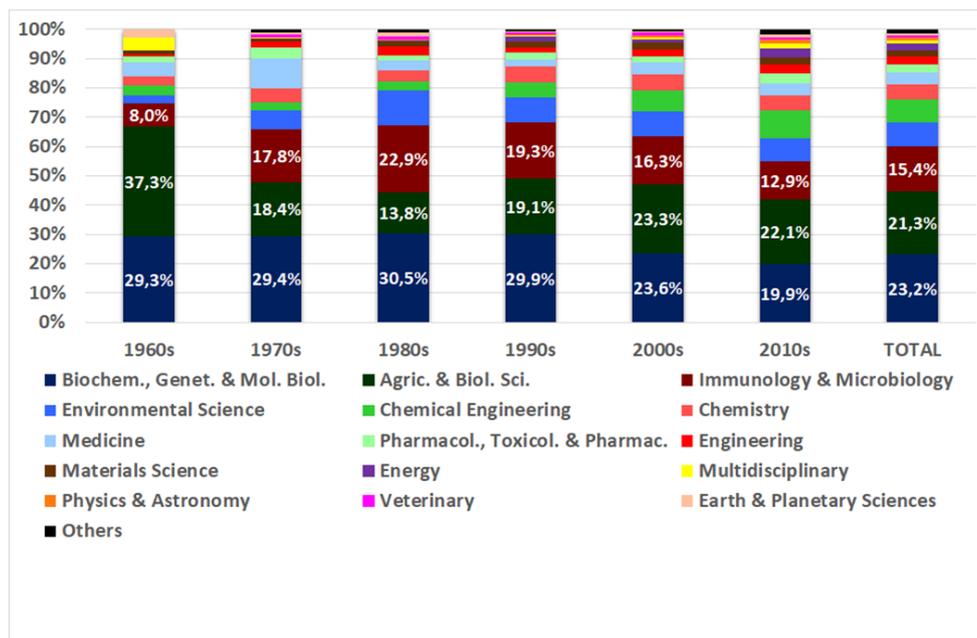


Figura 4. Evolución de la categoría temática (clasificación Scopus) de los documentos mundiales sobre *Trichoderma/Hypocrea* publicados en el periodo 1960-2019.

#### 4.3. Distribución de los documentos por fuente

La tabla 2 muestra las 15 principales fuentes que publicaron investigaciones sobre *Trichoderma/Hypocrea* durante el periodo de 60 años evaluado. Un total de 2,645 documentos están incluidos en las 15 principales revistas; el 15.27% de los documentos fueron publicados en este período. Esta lista de las 15 mejores revistas consta de doce publicaciones indexadas en el JCR (6 Q1, 3 Q2 y 3 Q3), una que estuvo indexada hasta 2013 (Q4) y dos que nunca fueron indexadas en el JCR. El número total de citas durante los últimos 15 años fue de 92,540 para 2,645 documentos, mientras que el resto de los 14,677 documentos fueron citados 212,516 veces; esto significa que el 15.27% de los documentos recibieron el 30.35% de las citas (periodo de citación 2005-2019). Las 5 primeras revistas son Applied Microbiology and Biotechnology (1.66% documentos), Bioresource Technology (1.51%), Enzyme and Microbial Technology (1.43%), Biotechnology and Bioengineering (1.17%) y Applied and Environmental Microbiology (1.17%). Cuando se realiza el mismo análisis para las 5 fuentes principales, 1,244 documentos (7.18%) recibieron un 21,17% de citas (período de citas 2005-2019).

La evolución del número medio de citas por documento publicado al año en los últimos 15 y 60 años se muestra en la figura 5. La variación interanual del número de citas (periodo de citación 1960-2019) por documento es mayor en los primeros 5 años, cuando el número de

documentos publicados por año era inferior a 10. El número de citas en el periodo de citación 2005-2019 muestra una tendencia creciente desde los años 60 hasta 2003. La tendencia es decreciente desde 2004; esto se debe a múltiples razones, entre ellas que las publicaciones recientes han tenido menos tiempo para acumular citas y también a que entre 2004-2019 se publicó un gran número de documentos (11.860; 68,47% del total de documentos).

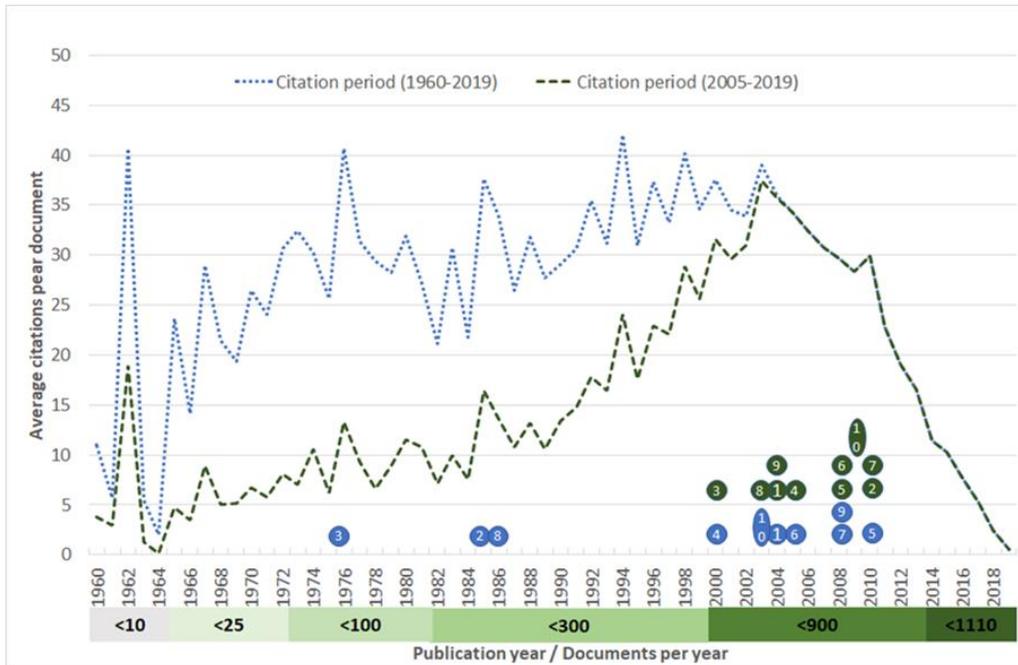


Figura 5. Evolución del número medio de citas por documento en dos periodos de citación (1960-2019 y 2005-2019).

Tabla 2. Principales datos bibliométricos de las 15 primeras fuentes que tratan sobre *Trichoderma/Hypocrea* (Scopus 1960-2019). Clasificación por número de documentos (N).

Source title	N	IF (2018)	Quartile (Category*)	h-index	Total citation (TC) 2005-19	TC/N	Cite score	SNIP	SJR
Applied Microbiology and Biotechnology	288	3.67	Q2(1)	54	12,224	42.44	3.92	1.236	1.127
Bioresource Technology	262	6.669	Q1(1) / Q1(2)/Q1(3)	61	13,739	52.44	7.08	1.824	2.157
Enzyme and Microbial Technology	247	3.553	Q2(1)	56	11,004	44.55	3.63	1.039	0.883
Biotechnology and Bioengineering	245	4.26	Q1(1)	68	15,038	61.38	4.17	1.156	1.309
Applied and Environmental Microbiology	202	4.077	Q1(1) / Q2(4)	67	12,556	62.16	4.18	1.272	1.663
Acta Horticulturae	192	-	-	14	657	3.42	0.25	0.23	0.185
Applied Biochemistry and Biotechnology	170	2.14	Q3(1) / Q3(5)	32	3,555	20.91	2.17	0.815	0.606
Biological Control	168	2.607	Q2(1) / Q1(6)	37	4,714	28.06	2.88	1.393	0.972
Archives of Phytopathology and Plant	143	-	-	11	610	4.27	0.52	0.337	0.228
Journal of Pure and Applied Microbiology	135	0.073 (2013)	Q4(1) / Q4(4)	4	102	0.76	0.18	0.157	0.124
Biotechnology Letters	132	2.154	Q3(1)	26	2,451	18.57	2.22	0.76	0.641
FEMS Microbiology Letters	122	1.994	Q3(4)	37	3,378	27.69	1.9	0.666	0.77
Journal of Biotechnology	114	3.163	Q2(1)	44	6,087	53.39	3.09	0.922	1.003
Crop Protection	113	2.172	Q1(7)	33	3,050	26.99	2.49	1.402	0.876
Biotechnology for Biofuels	112	5.452	Q1(1) / Q1(3)	34	3,375	30.13	5.84	1.451	1.762

\*Categories JCR: 1 *Biotechnology & Applied Microbiology*, 2 *Agricultural Engineering*, 3 *Energy & Fuels*, 4 *Microbiology*, 5 *Biochemistry & Molecular Biology*, 6 *Entomology*, 7 *Agronomy*. N: No. of manuscripts; IF: Impact Factor; SNIP: Source Normalized Impact per Paper; SJR: Scimago Journal Rank.

El año de publicación de los 10 documentos más citados para ambos períodos de citación también se muestra en la Figura 5. Todos los documentos más citados para el periodo de citación 2005-2019, y 7 de los 10 más citados para el periodo 1960-2019 fueron publicados entre 2000 y 2010. La distribución de las citas de los 173 (1% superior) documentos más citados en los últimos 60 años (para el período de citación 1960-2019) es: 0.58% (años 60), 4.62% (años 70), 12.72% (años 80), 23.70% (años 90), 38.73% (años 2000) y 19.65% (década de 2010); la distribución de las citas de los 173 (1% superior) documentos más citados en los últimos 15 años (para el período de citación 2005-2019) es: 0,00% (década de 1960), 0.58% (década de 1970), 4.05% (década de 1980), 14.45% (década de 1990), 56.65% (década de 2000) y 24.28% (década de 2010). Un total de 41 (23.70%; período de citación de 60 años) y 47 (27.16%; período de citación de 15 años) documentos principales se publicaron en las 5 revistas principales.

La distribución de los documentos publicados por países en las 15 principales revistas se muestra en la Figura 6. Hay grandes diferencias en el porcentaje de contribuciones por países en algunas revistas; el 31.2% (FEMS Microbiology Letters), el 44.9% (Archives of Phytopathology and Plant Protection) y el 58.1% (Journal of Pure and Applied Microbiology) de los documentos son de investigadores de la India; en la revista Biotechnology and Bioengineering, el 35.5% de los documentos son de Estados Unidos. En sólo tres revistas, el porcentaje de contribuciones es inferior al 15%: 11.3% en Applied Microbiology and Biotechnology (48 países), 11.8% en Acta Horticulturae (56 países) y 14,1% en Biotechnology Letters (42 países). La contribución media de los cinco primeros países en las 15 primeras revistas fue del 13.7% en Estados Unidos, el 12.9% en India, el 8.1% en China, el 5.0% en Finlandia y el 4.0% en Japón.

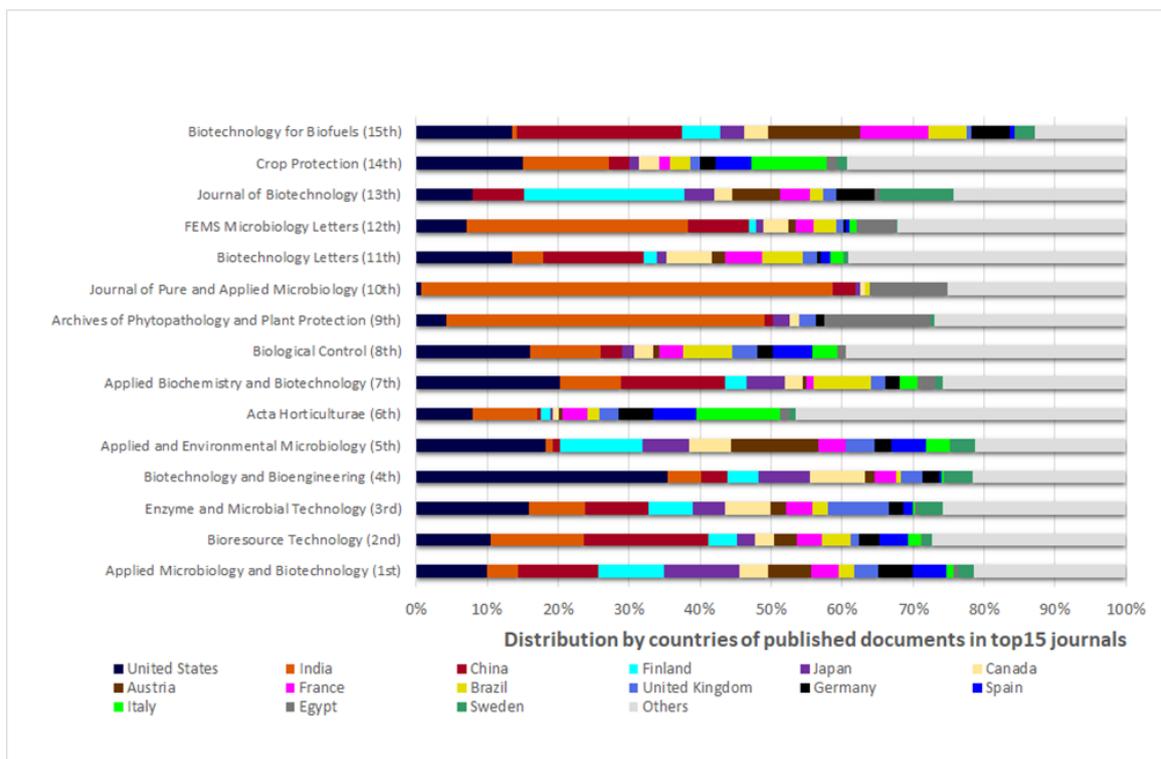


Figura 6. Distribución por países de los documentos publicados (*Trichoderma/Hypocrea*) en las 15 principales revistas durante los últimos 60 años.

#### 4.4. Análisis de palabras clave

El análisis de las palabras clave es una poderosa herramienta cuando necesitamos detectar y analizar las tendencias emergentes en las contribuciones científicas sobre un campo [70]. Los autores enumeran algunas palabras clave relevantes para el estudio y estrechamente relacionadas con el tema abordado; los revisores y editores también amplían la lista de palabras clave para destacar el contenido de los artículos. La tabla 3 muestra las 20 palabras clave de mayor frecuencia utilizadas por los autores en los últimos 60 años, junto con la frecuencia de uso y la posición en el ranking en cada periodo. Debido a la presencia de palabras clave sinónimas y al uso de los nombres científicos del estado perfecto e imperfecto de las especies fúngicas, es necesario realizar una búsqueda de las mismas y agruparlas bajo la misma categoría para tener una idea real de su uso. La evolución que se ha producido en el uso de las 20 principales palabras clave en los últimos 60 años muestra que el número de palabras clave que coinciden con las 20 principales aumenta de década en década: 3 (años 60), 6 (años 70), 10 (años 80), 15 (años 90), 17 (años 2000) y 18 (años 2010).

Esto se explica por el hecho de que la producción de documentos, como ya se ha mencionado, ha crecido siguiendo una función cuadrática desde 1960 hasta 2019. Cuando se

analizan conjuntamente las palabras clave asociadas a un mismo tema de investigación, se puede archivar una visión más clara de las principales tendencias de investigación. La mayoría de las 20 principales palabras clave pueden agruparse en dos grupos que identifican las dos principales líneas de investigación fundamental y aplicada desarrolladas con el género *Trichoderma*; en primer lugar, *Trichoderma* como fábrica celular de enzimas y proteínas extracelulares ampliamente utilizadas en las industrias y, en segundo lugar, *Trichoderma* como agente de control biológico de las enfermedades de las plantas. En el primer grupo, hay palabras clave como celulasa (celulosa, celulosa 1,4 beta celobiosidasa), *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) y *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) utilizadas en 2,686 (2º), 2,209 (3º) y 1,731 (4º) documentos, respectivamente. En el mismo grupo hay palabras clave como *Aspergillus* (*A. niger*) (6ª), *Trichoderma viride* (8ª) y *Penicillium* (15ª) que identifican a otros hongos filamentosos productores de enzimas extracelulares, y también palabras clave generales como actividad enzimática (7ª), proteínas fúngicas (9ª), enzimas (13ª), pH (18ª), procesos como hidrólisis (13ª), fermentación (14ª) e insolación y purificación (20ª). Un examen más detallado de la frecuencia cronológica de uso de las palabras clave revela que la actividad de investigación sobre este tema fue moderada en los años 60, pero aumentó notablemente en las décadas siguientes, aumentando la frecuencia y el número de palabras clave relacionadas con esta actividad.

En el segundo grupo, hay palabras clave como biocontrol (agente biológico, control biológico, BCAs, control biológico de plagas y control de enfermedades), *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) y enfermedades de las plantas utilizadas en 2,984 (5º), 1,759 (10º), 993 (16º) y 909 (17º) documentos, respectivamente; en el mismo clúster también podemos considerar las palabras clave en común con el grupo anterior, como *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) o actividad enzimática. La tendencia de la frecuencia cronológica de las palabras clave revela que la actividad de investigación sobre este tema fue moderada en los años 80 y aumentó notablemente en las últimas 3 décadas. Hay un tercer grupo de palabras clave que puede considerarse común a los dos grupos principales, como los datos de la secuencia molecular (secuencia de nucleótidos), la regulación de la expresión génica y la cepa fúngica.

La creación de una nube de palabras con las palabras clave principales aporta simplicidad y claridad y es útil para percibir rápidamente las tendencias más destacadas y la evolución de la tendencia temporal que, de otro modo, sería difícil de ver en un formato tabular.

Tabla 3. Evolución de 20 palabras clave principales sobre la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019, utilizando la base de datos Scopus. Frecuencia en documentos (F) y posición en el ranking (R) por periodo (top 20 rojo).

Keywords	1960-1969		1970-1979		1980-1989		1990-1999		2000-2009		2010-2019		1960-2019	
	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
<i>Trichoderma</i>	5.6%	11	36.3%	2	23.5%	2	46.7%	1	65.2%	1	45.0%	1	48.1%	1
Cellulase (C. 1,4 beta cellobiosidase)	11.2%	2	42.6%	1	48.8%	1	40.5%	2	33.0%	2	30.0%	2	32.1%	2
<i>Trichoderma reesei</i> ( <i>Hypocrea jecorina</i> )					21.5%	3	38.4%	3	32.8%	3	24.7%	3	27.2%	3
<i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>Hypocrea lixii</i> )					4.2%	11	17.1%	4	29.8%	4	19.3%	5	19.8%	4
Biocontrol (Biological agent, Biological control, Biological					0.9%	79	11.2%	7	27.3%	5	20.9%	4	17.2%	5
<i>Aspergillus</i> ( <i>Aspergillus niger</i> )	2.8%	28	11.1%	6	5.3%	9	8.0%	13	18.0%	6	17.9%	6	15.4%	6
Enzyme activity							9.9%	8	13.7%	10	15.0%	8	12.4%	7
<i>Trichoderma viride</i>			19.6%	4	9.3%	5	12.1%	6	15.8%	7	10.5%	9	12.0%	8
Fungal protein			3.5%	32	0.9%	80	7.5%	14	10.9%	12	15.1%	7	11.6%	9
<i>Fusarium</i> ( <i>Fusarium oxysporum</i> )	1.9%	38	5.4%	18	1.4%	49	5.4%	16	15.4%	8	10.5%	10	10.2%	10
Molecular sequence data (Nucleotide sequence)					0.9%	78	13.2%	5	14.7%	9	7.8%	14	9.5%	11
Hydrolysis			3.3%	36	2.7%	17	8.5%	10	9.2%	13	9.9%	11	8.8%	12
Enzymes			1.1%	112	5.9%	8	8.3%	12	11.5%	11	8.6%	12	8.5%	13
Fermentation			3.0%	41	2.7%	18	4.9%	17	6.8%	17	8.3%	13	6.9%	14
<i>Penicillium</i>			5.7%	17	1.7%	36	4.2%	23	9.2%	14	6.3%	17	6.3%	15
<i>Thanatephorus cucumeris</i> ( <i>Rhizoctonia solani</i> )							6.4%	15	7.6%	15	1.9%	103	5.7%	16
Plant disease									6.7%	18	6.7%	16	5.2%	17
pH	8.4%	8	2.6%	50	1.2%	55	4.3%	21	5.6%	23	5.9%	20	5.0%	18
Gene expression regulation fungal							2.0%	58	5.9%	21	5.7%	21	4.8%	19
Isolation and purification	3.7%	23	5.0%	21	3.8%	14	2.2%	52	3.8%	41	6.1%	18	4.8%	20

La figura 7 muestra la nube de palabras basada en las 50 principales palabras clave relacionadas con *Trichoderma* (*Hypocrea*) en cada década. Esta figura muestra la evolución en el uso de las palabras clave; algunas como "hongos mitospóricos" ocupaban la primera posición en la década de 1960, la tercera en la de 1970, la cuarta en la de 1980 y la 102 en la de 1990, y se utilizaron en 383 documentos (72.8%) publicados en las tres primeras décadas. Las principales palabras clave como "celulasa" o "*Trichoderma*" están presentes en 6 nubes de palabras, pero otras como "biocontrol" se encuentran en las investigaciones de los últimos 30 años. Las palabras clave de los nombres de las especies son un grupo importante que hay que analizar para identificar especies interesantes y útiles y saber cuándo se ha desarrollado la investigación de cada una a lo largo del tiempo. Hay cinco especies en el rango de las 50 primeras palabras clave en el periodo de estudio 1960-2019, *T. reesei* (*H. jecorina*) (3ª), *T. harzianum* (*H. lixii*) (4ª), *T. viride* (*H. rufa*) (8ª), *T. virens* (40ª) y *T. atroviride* (47ª). La evolución de la posición por orden cronológico en las últimas 6 décadas (1960 a 2010) fue *T. reesei* (-, -, 3ª, 3ª, 3ª), *T. harzianum* (-, -, 11ª, 4ª, 4ª, 5ª), *T. viride* (-, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 9ª), *T. virens* (-, 45ª, -, 16ª, 25ª, -), y *T. atroviride* (-, -, -, 44ª, 43ª). La investigación sobre algunas especies de *Trichoderma* en los últimos 60 años ha sido más intensiva que la de otras con una posición de rango inferior o una distribución temporal más débil.

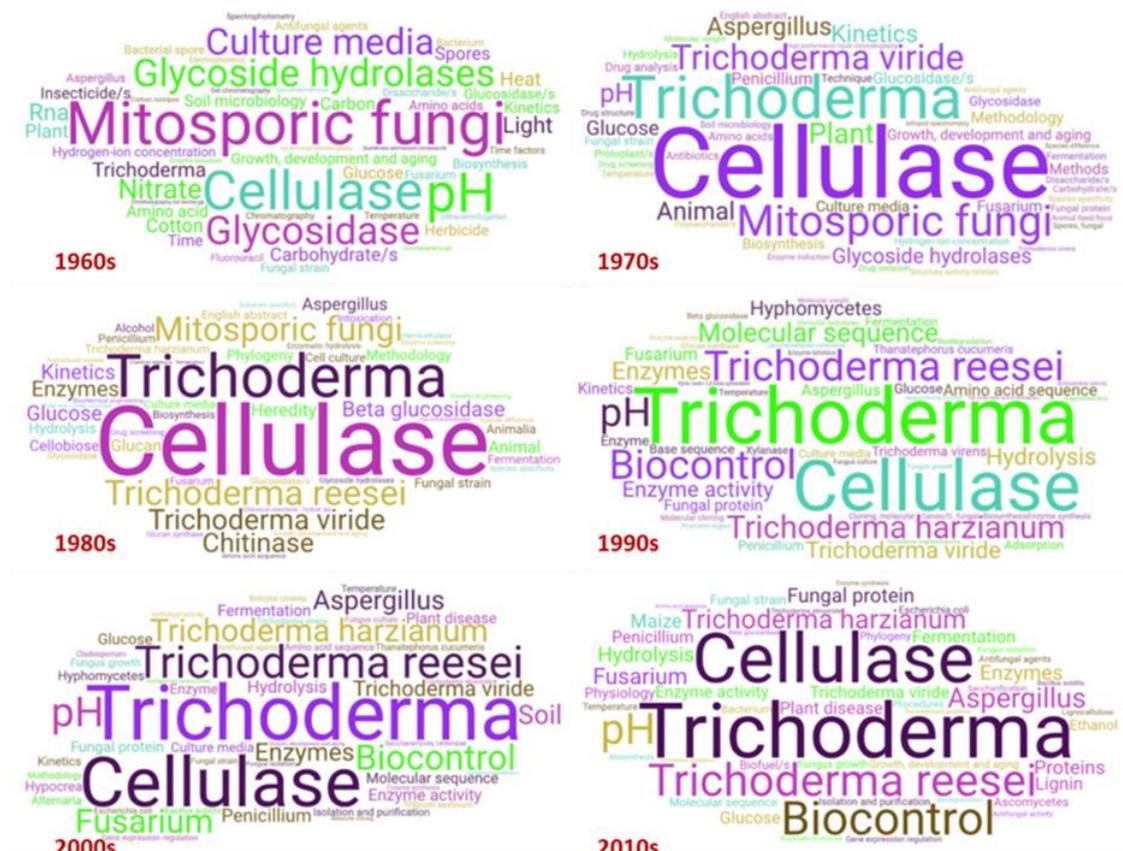


Figura 7. Nubes de palabras basadas en las 50 principales palabras clave relacionadas con *Trichoderma/Hypocrea* en cada década (1960-2019).

#### 4.5. Distribución de las publicaciones por países

Un total de 140 países han publicado documentos sobre *Trichoderma/Hypocrea* en los últimos 60 años (Figura 8). Por consiguiente, existe un interés mundial por el estudio de este género [1]. El rango de los 10 primeros países por documentos publicados es India (2,501), Estados Unidos (2,209), China (1,838), Japón (929), Brasil (803), Reino Unido (661), Finlandia (647), Alemania (591), España (583) y Austria (545).

Los 10 primeros países publicaron el 53.2% de los documentos en el periodo de estudio. También hay que destacar la autoría multinacional de los documentos; la media de esta búsqueda fue de 1.23 países por documento. En la década de 2010 se produjo un importante aumento en la producción de documentos de varios países como India (1,700 documentos), China (1,458), Estados Unidos (847) y Brasil (597). El análisis de las principales palabras clave (top 5) en los 15 países más productivos (Tabla 4) permite identificar los campos de palabras que rodean un tema de investigación en el género *Trichoderma/Hypocrea* e identificar las tendencias que muestran las prioridades en cada país. Palabras clave como celulosa, *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), proteínas fúngicas o actividad enzimática pueden agruparse en la tendencia de investigación "*Trichoderma* como fábrica de células", mientras que otras como *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) o biocontrol en la tendencia "*Trichoderma* como agente de control biológico". Otras palabras clave no son específicas y sólo identifican el género (*Trichoderma/Hypocrea*); algunas otras como *T. viride* pueden vincularse a las dos tendencias de investigación mencionadas. Según este criterio, la investigación sobre *Trichoderma* en la primera tendencia se discute principalmente en países como China, Japón, Finlandia, Austria, Canadá, Egipto y Suecia. En países como Estados Unidos, Brasil, Reino Unido, Alemania y Francia, ambas tendencias son importantes, pero la primera lo es más. En India y España, ambas tendencias son relevantes, pero la segunda es más importante. Las mismas tendencias principales se encuentran en todos los países cuando el análisis se realiza utilizando las 10 principales palabras clave.

Tabla 4. Principales palabras clave utilizadas en los países más productivos en la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* en todo el mundo (1960-2019). El número de documentos de cada palabra clave se muestra entre paréntesis.

Country	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>
India	<i>Trichoderma</i> (1,030)	<i>T. harzianum</i> (684)	Biocontrol (616)	<i>T. viride</i> (604)	Cellulose (337)
United States	<i>Trichoderma</i> (1,173)	Cellulose (1,166)	<i>T. reesei</i> (848)	Fun. proteins (370)	Biocontrol (350)
China	<i>Trichoderma</i> (907)	Cellulose (886)	<i>T. reesei</i> (710)	Enz. activity (381)	Fun. proteins (380)
Japan	Cellulose (510)	<i>Trichoderma</i> (468)	<i>T. reesei</i> (326)	Enz. activity (252)	<i>T. viride</i> (207)
Brazil	<i>Trichoderma</i> (393)	Cellulose (309)	<i>T. harzianum</i> (241)	<i>T. reesei</i> (218)	Biocontrol (185)
U. Kingdom	<i>Trichoderma</i> (328)	Cellulose (176)	<i>T. reesei</i> (147)	Biocontrol (133)	<i>T. harzianum</i> (124)
Finland	<i>T. reesei</i> (728)	Cellulose (523)	<i>Trichoderma</i> (392)	Fun. proteins (223)	Enz. activity (145)
Germany	<i>Trichoderma</i> (301)	<i>T. reesei</i> (179)	Cellulose (155)	<i>T. harzianum</i> (97)	Fun. proteins (84)
Spain	<i>Trichoderma</i> (363)	Biocontrol (221)	<i>T. harzianum</i> (219)	<i>T. reesei</i> (104)	Enz. activity (88)
Austria	<i>T. reesei</i> (438)	<i>Trichoderma</i> (350)	Cellulose (291)	Fun. proteins (238)	<i>Hypocrea</i> (133)
Italy	<i>Trichoderma</i> (617)	<i>T. reesei</i> (468)	Cellulose (326)	Biocontrol (293)	Fun. proteins (284)
Canada	<i>Trichoderma</i> (615)	<i>T. reesei</i> (567)	Cellulose (502)	Fun. proteins (277)	Enz. activity (171)
Egypt	<i>Trichoderma</i> (520)	<i>T. reesei</i> (469)	Cellulose (330)	Fun. proteins (252)	Biocontrol (200)
France	<i>T. reesei</i> (598)	<i>Trichoderma</i> (586)	Biocontrol (254)	Enz. Activity (174)	Genetics (163)
Sweden	<i>T. reesei</i> (729)	Cellulose (702)	<i>Trichoderma</i> (546)	Fun. proteins (296)	Enz. activity (179)
Total Top 15	<i>Trichoderma</i> (8,589)	<i>T. reesei</i> (6,811)	Cellulose (6,738)	Fun. proteins (3,165)	<i>T. harzianum</i> (2,800)
Others	<i>Trichoderma</i> (2,355)	Cellulose (1,163)	<i>T. harzianum</i> (1,097)	Biocontrol (986)	<i>T. reesei</i> (778)

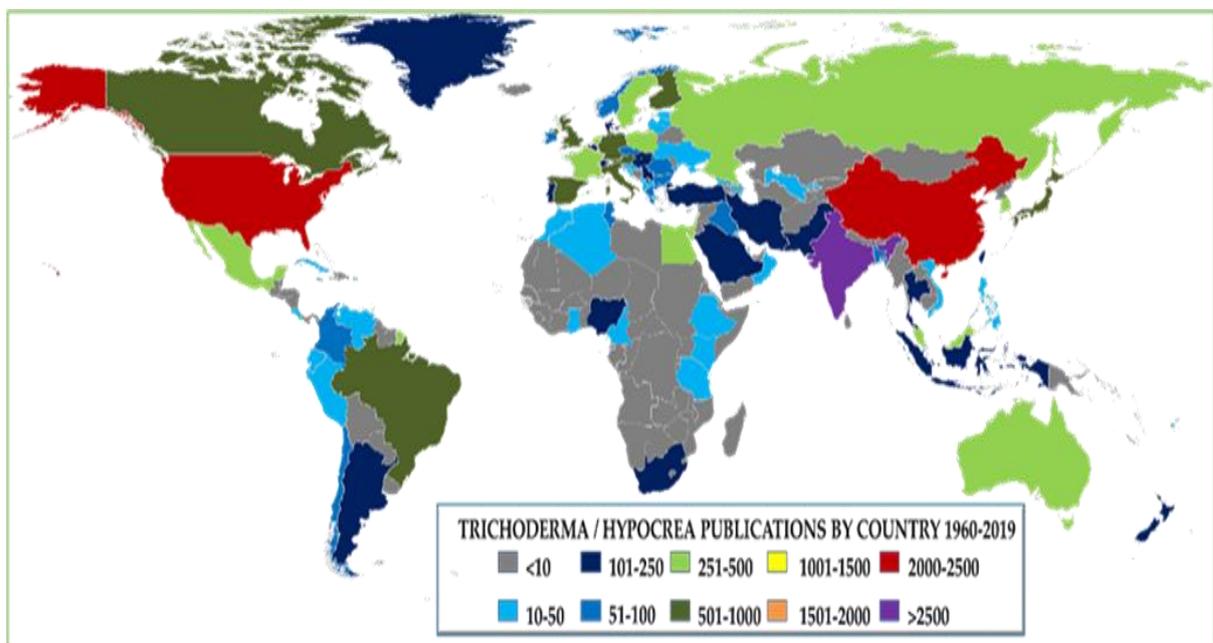


Figura 8. Mapa de distribución de la investigación mundial sobre *Trichoderma/Hypocrea* desde 1960 hasta 2019 basado en el número de documentos.

## 4.6. Distribución de publicaciones por institución y análisis de palabras clave

Las 16 instituciones más productivas en términos de volumen de documentos de investigación sobre *Trichoderma/Hypocrea* en el período de estudio se muestra en la tabla 5. Las 16 primeras instituciones publicaron 3,094 documentos con 112,300 citas; esto significa que publicaron el 17.86% de los documentos en el periodo de 60 años con el 29.88% de las citas. Quince de las 16 instituciones más productivas están ubicadas en 9 de los 15 países más productivos.

Tabla 5. Ranking de las instituciones más productivas en investigación sobre *Trichoderma* a nivel mundial (1960-2019) y bibliometría de las instituciones.

Rank	Institution	Country	h-index	N	Total citations	ACD
1	VTT Technical Res. Centre Finland	Finland	94	480	28,825	60.05
2	Technische Universitat Wien	Austria	71	369	17,332	46.97
3	Chinese Academy of Sciences	China	30	241	3,699	15.35
4	Ministry of Education China	China	24	191	2,212	11.58
5	USDA Agr. Res. Serv., Washington	USA	47	189	9,258	48.98
6	Univ. de Sao Paulo – USP	Brazil	31	181	3,839	21.21
7	Indian Agric. Res. Inst., N. Delhi	India	22	155	2,019	13.03
8	National Research Centre	Egypt	18	155	1,064	6.86
9	U. S. Depart. of Agriculture	USA	41	151	7,388	48.93
10	Univ. Studi di Napoli Federico II	Italy	43	148	7,918	53.50
11	CSIC	Spain	43	147	5,801	39.46
12	Shandong University	China	28	143	2,683	18.76
13	Russian Academy of Sciences	Russia	23	141	1,935	13.72
14	Banaras Hindu University	India	22	135	1,926	14.27
15	Helsingin Yliopisto	Finland	44	134	6,164	46.00
16	Cornell University	USA	48	134	10,237	76.40

N: No. of manuscripts; ACD: Average citation per document.

La institución más relevante es el Centro de Investigación Técnica VTT de Finlandia, con el 2.77% de los documentos publicados en los últimos 60 años, junto con el 7.67% de las citas; le sigue la Technische Universitat Wien (Viena, Austria) con el 2.13% de los documentos y el 4.61% de las citas. Se observa una elevada colaboración en la actividad investigadora entre el Centro de Investigación Técnica VTT de Finlandia y Helsingin Yliopisto, con 85 documentos en común; esto significa que cerca del 63% de los documentos fueron publicados por este último. Las principales colaboraciones entre las instituciones de la lista de las 16 primeras se establecen con instituciones de sus países.

El análisis de las principales palabras clave (top 5) en las 16 instituciones más productivas (Tabla 6) permite identificar los campos de palabras que rodean una determinada tendencia de investigación en cada institución, según el criterio de agrupación de palabras clave utilizado anteriormente; la investigación sobre *Trichoderma* es el foco principal en "*Trichoderma* como fábricas de células" en 7 de las 16 instituciones más productivas (instituciones en la posición 1,

2, 3, 4, 11, 12 y 14),; ambas tendencias son importantes en las otras nueve instituciones, pero principalmente "'*Trichoderma* como agente de biocontrol" es importante en seis 6 de 9 (5<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> y 16<sup>a</sup>), y '*Trichoderma* como fábricas de células' es importante en tres 3 de 9 (6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> y 15<sup>a</sup>) principalmente como fábrica de células.

Tabla 6. Principales palabras clave utilizadas en las instituciones más productivas en la investigación de *Trichoderma* a nivel mundial (1960-2019). El número de documentos de cada palabra clave se muestra entre paréntesis.

Institution	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>
VTT Technical Res. Centre	<i>T. reesei</i> (581)	Cellulase (454)	<i>Trichoderma</i> (298)	Fun. proteins (123)	Enz. activity (110)
Technische Universitat Wien	<i>T. reesei</i> (328)	<i>Trichoderma</i> (254)	Cellulase (179)	<i>Hypocrea</i> (110)	Fun. proteins (109)
Chinese Academy of Sciences	Cellulase (151)	<i>Trichoderma</i> (132)	<i>T. reesei</i> (124)	Metabolism (62)	Enz. activity (54)
Ministry of Education China	<i>T. reesei</i> (94)	<i>Trichoderma</i> (88)	Cellulase (80)	Metabolism (45)	Enz. Activity (42)
USDA Agr. Res. Serv.,	<i>Trichoderma</i> (93)	Biocontrol (116)	Cellulase (28)	<i>T. reesei</i> (27)	Metabolism (26)
Univ. de Sao Paulo – USP	Cellulase (112)	<i>Trichoderma</i> (103)	<i>T. reesei</i> (101)	<i>T. harzianum</i> (52)	Metabolism (49)
Indian Agric. Res. Inst., N.	<i>T. harzianum</i> (57)	<i>Trichoderma</i> (48)	<i>T. viride</i> (35)	Cellulase (24)	<i>Bacillus subtilis</i> (23)
National Research Centre	<i>Trichoderma</i> (71)	Cellulase (37)	<i>T. reesei</i> (30)	Biocontrol (34)	<i>T. virens</i> (18)
U. S. Depart. of Agriculture	<i>Trichoderma</i> (105)	Biocontrol (75)	<i>T. harzianum</i> (45)	Metabolism (40)	<i>T. atroviride</i> (25)
Univ. Studi di Napoli	<i>Trichoderma</i> (99)	<i>T. harzianum</i> (79)	Biocontrol (54)	Mol. sequence (31)	Enz. activity (29)
CSIC	Cellulase (158)	<i>T. reesei</i> (130)	<i>Trichoderma</i> (86)	Enz. activity (53)	Metabolism (45)
Shandong University	Cellulase (73)	<i>Trichoderma</i> (72)	<i>T. reesei</i> (48)	Hydrolysis (27)	<i>Penicillium</i> (25)
Russian Academy of Sciences	Biocontrol (73)	<i>Trichoderma</i> (55)	<i>T. harzianum</i> (50)	Metabolism (18)	<i>Aspergillus niger</i>
Banaras Hindu University	<i>T. reesei</i> (156)	Cellulase (87)	<i>Trichoderma</i> (68)	Enz. activity (36)	Hydrolysis (36)
Helsingin Yliopisto	<i>Trichoderma</i> (83)	Cellulase (55)	<i>T. harzianum</i> (50)	<i>T. reesei</i> (32)	Enz. activity (22)
Cornell University	<i>Trichoderma</i> (83)	<i>T. harzianum</i> (50)	Cellulase (44)	Biocontrol (41)	<i>T. reesei</i> (32)
<b>Total top 16 (3094 documents)</b>	<b><i>Trichoderma</i> (1,738)</b>	<b><i>T. reesei</i> (1,716)</b>	<b>Cellulase (1,510)</b>	<b>Biocontrol (497)</b>	<b><i>T. harzianum</i> (487)</b>

#### 4.7. Análisis de co-ocurrencia de palabras clave

El análisis de co-ocurrencia de palabras clave ha sido utilizado para estudiar el trabajo conceptual en diferentes dominios por muchos investigadores [71]. El mapa de red de la matriz de co-ocurrencia se muestra en la Figura 9 para los 17,322 documentos publicados en el periodo de estudio. Se estableció que el número mínimo de ocurrencias de una palabra clave era de 50 utilizando las 500 palabras clave principales; se creó un archivo de tesoro para realizar la limpieza de los datos. Se excluyeron las palabras clave generales como *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Trichoderma* sp., fungí o fungus, y se sustituyeron las palabras clave sinónimas por una sola palabra clave. Las palabras clave seleccionadas finalmente fueron 90.

El tamaño de los nodos refleja la frecuencia de las palabras clave y el grosor de la línea es proporcional a la cercanía de las conexiones entre dos palabras clave. Según el mapa que se muestra en la figura 9, hay cuatro grupos de palabras clave de co-ocurrencia.

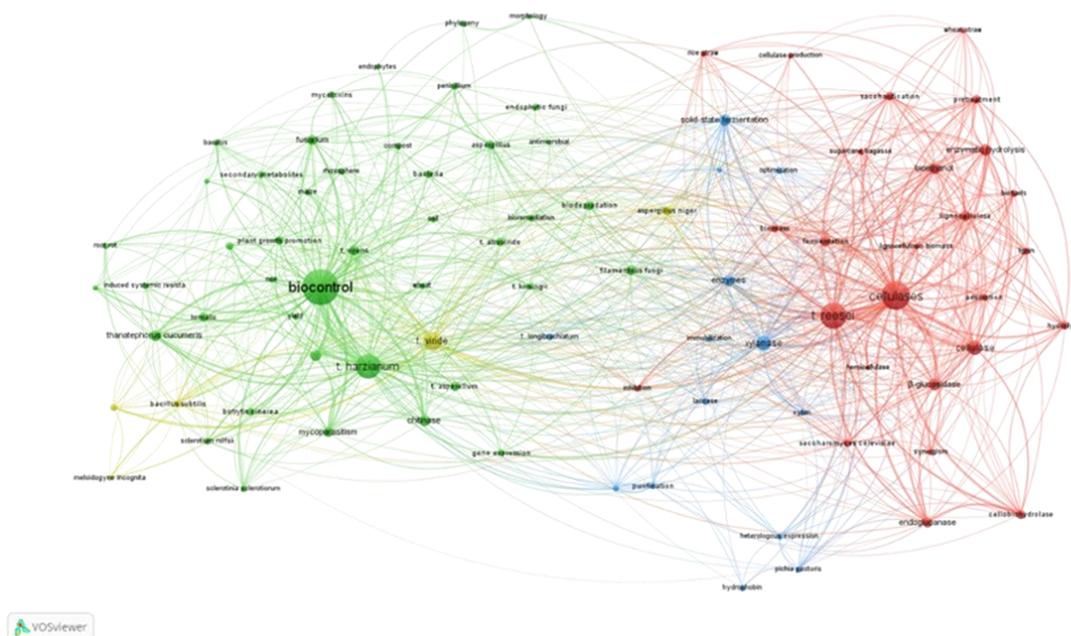


Figura 9. Co-ocurrencia de palabras clave del autor de los documentos publicados en la investigación de *Trichoderma/Hypocrea* 1960-2019.

Clúster 1 (verde) con 43 palabras clave, clúster 2 (rojo) con 26 palabras clave, clúster 3 (azul) con 14 palabras clave, y clúster 4 (amarillo) con 5 palabras clave; los principales clústeres son los clústeres 1 y 2. El grupo 1 puede identificarse como "Investigación relacionada con el control biológico"; los principales nodos son biocontrol (70 enlaces/1999 ocurrencias), *T. harzianum* (82/927) y *T. virens* (52 /161). En este grupo, hay nodos que identifican los mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*, como el antagonismo (40/185), la quitinasa (46/181), el micoparasitismo (37/167) y la resistencia sistémica inducida (18/65); otros identifican patógenos de plantas como *Fusarium* (51 /198), *Thanatephorus cucumeris* (31/190) y *Botrytis cinerea* (27/98); también hay otras especies de *Trichoderma* como *T. asperellum* (39 /136) y *T. koningii* (38/84). El crecimiento de las plantas y la mejora del rendimiento mediante *Trichoderma* también se incluyen en el grupo 1, con nodos como la promoción del crecimiento de las plantas (34/111), el rendimiento (26/65), y nombres de cultivos como el tomate (36/119), el trigo (26/65), el maíz (31/62) y el arroz (24/55). El grupo 2 puede identificarse como "*Trichoderma* como fábricas de células para la investigación relacionada con la producción de celulasa"; los principales nodos son celulasa (67/1.255), *T. reesei* (66/1.031) y celulosa (54/338). En este grupo, hay nodos que identifican la tecnología de bioprocesos o sus parientes cercanos, como la hidrólisis enzimática (45/224), el bioetanol (43/190), la fermentación (48/154), la sacarificación (41/116), la hidrólisis (31/112) y la adsorción (29/85). Hay palabras clave que se relacionan con los principales sustratos utilizados en los bioprocesos, como lignocelulosa (47/158), paja de arroz

(27/70), bagazo de caña de azúcar (32/59) y paja de trigo (25/52). El grupo 3 puede identificarse como "*Trichoderma* como fábricas de células para la investigación relacionada con la producción de xilanas (hemicelulosa)"; los principales nodos son xilanas (59/332), fermentación en estado sólido (43/200) y enzimas (52/177). Hay palabras clave que enlazan con los microorganismos que producen estas enzimas, como *T. longibrachiatum* (26/53); las xilanas de *T. longibrachiatum* se utilizan en la industria del papel y en la de los piensos y alimentos [21]; *Pichia pastoris* (24/64) se utiliza para la expresión heteróloga (24/67). El grupo 4 puede identificarse como "Investigación relacionada con *Trichoderma viride* como agente de control biológico"; los principales nodos son *T. viride* (75/520) y patógenos de plantas como *Aspergillus niger* (54/144) y *Meloidogyne incognita* (13/50). En este clúster, hay otros agentes de control biológico como *Bacillus subtilis* (29/88) y *Pseudomonas fluorescens* (21/78) que están relacionados con el biocontrol de *Meloidogyne incognita* [72,73].

## 1.5 Conclusiones

El análisis bibliométrico sobre más de 17.322 documentos contenidos en la base de datos Scopus, realizado para identificar la tendencia global de la investigación sobre *Trichoderma/Hypocrea* para el periodo estudiado, muestra que existe un gran interés en la investigación sobre este género fúngico, principalmente debido a la aplicación de las enzimas de *Trichoderma* en varios procesos industriales, y por su uso en la agricultura como microbios promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) y agentes de control biológico microbiano (MBCA). La investigación sobre enzimas ha sido muy relevante durante las últimas seis décadas, mientras que la relevancia del biocontrol se limita a las últimas tres décadas. Aunque hay muchas especies, la mayor parte de la investigación se centra en cuatro especies, *T. reesei* y *T. longibrachiatum* como productoras de enzimas, y *T. harzianum* y *T. viride* como PGPM y MBCA. Se ha podido definir un grupo de co-ocurrencias de palabras clave asociadas a cada especie. India, Estados Unidos y China lideran la investigación sobre *Trichoderma*, con 6.549 documentos (37,8% del total); 8 de las 16 instituciones más relevantes en la investigación sobre *Trichoderma* están asignadas en estos países.

## 1.6 Bibliografía

1. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56. doi.org/10.1038/nrmicro797.

2. Samuels, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathol.* **2006**, *96*, 195–206. doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195.
  
3. López-Bucio, J.; Pelagio-Flores, R.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 109–123. doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043.
  
4. Lee, J.; Huh, N.; Hong, J.H.; Kim, B.S.; Kim, G.H.; Kim, J.J. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. *Holzforschung* **2012**, *66*, 883–887. doi.org/10.1515/HF.2011.187.
  
5. Rossman, A.Y.; Seifert, K.A.; Samuels, G.J.; Minnis, A.M.; Schroers, H.J.; Lombard, L.; Crous, P.W.; Pöldmaa, K.; Cannon, P.F.; Summerbell, R.C.; Geiser, D.M.; Zhuang, W.Y.; Hirooka, Y.; Herrera, C.; Salgado-Salazar, C.; Chaverri, P. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (*Hypocreales*) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus.* **2013**, *4*, 41–51. doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.0.
  
6. Atanasova, L.; Crom, S.L.; Gruber, S.; Coulpier, F.; Seidl-Seiboth, V.; Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics.* **2013**, *14*, 121. doi.org/10.1186/1471-2164-14-121.
  
7. Bissett, J.; Gams, W.; Jaklitsch, W.; Samuels, G.J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus.* **2015**, *6*, 263–295. doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02.
  
8. Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y.; Valéro, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 1–20. doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012.
  
9. Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiol.* **2012**, *158*, 17–25. doi.org/10.1099/mic.0.052274-0.
  
10. Mukherjee, M.; Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Zachow, C.; Berg, G.; Zeilinger, S. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: Advances in genetics of biological control. *Indian J. Microbiol.* **2012**, *52*, 522–529. doi.org/10.1007/s12088-012-0308-5.

11. Kumar, S.; Manibhushan, T.; Archana, R. *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Afr. J. Agric. Res.* **2014**, *9*(53), 3838-3853.
12. Kubicek, C.P.; Mikus, M.; Schuster, A.; Schmoll, M.; Seiboth, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol. Biofuels.* **2009**, *2*, 19. doi.org/10.1186/1754-6834-2-19.
13. De Paula, R.G.; Antoniêto, A.C.C.; Nogueira, K.M.V.; Ribeiro, L.F.C.; Rocha, M.C.; Malavazi, I.; Almeida, F.; Silva, R.N. Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 146. doi.org/10.1186/s13068-019-1487-7.
14. Puranen, T.; Alapuranen, M.; Vehmaanperä, J. *Trichoderma* enzymes for textile industries. In *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. **2014**, pp. 351–362. doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00026-6.
15. Shahid, M.; Zhou, Y.; Tang, R.C.; Chen, G. Enzymatic washing of denim: greener route for modern fashion. In *Textiles and clothing sustainability. Textile science and clothing technology*. Muthu S. Eds.; Springer: Singapore, Singapore, **2017**, pp. 67-83. doi.org/10.1007/978-981-10-2474-0\_3.
16. Méndez Arias, J.; Modesto, L.F.; Polikarpov, I.; Pereira, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. *Biotechnol. Prog.* **2016**, *32*(5), 1222-1229. doi:10.1002/btpr.2306.
17. Wösten, H.A.B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *59*, 65–70. doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.010.
18. Morgan, A.J.; Bedford, M.R. Advances in the development and application of feed enzymes. *Australian Poultry Science Symposium.* **1995**, *7*, 109–115.
19. Muramatsu, T.; Morishita, T.; Niva, N.; Furuse, M.; Okumura, J. Growth improvement by fiber degrading enzyme supplement in chicken. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*. **1992**, *63*(4), 368-375.

20. Raza, A.; Bashir, S.; Tabassum, R. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon* **2019**, *5*, e01437. doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01437.
21. Polizeli, M.L.; Rizzatti, A.C; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*(5), 577-591. doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7Ge.
22. Arora, N.K.; Tewari, S.; Singh, S.; Lal, N.; Maheshwari, D.K. PGPR for protection of plant health under saline conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*; Maheshwari, D. K. Ed. Springer, Berlin, Germany. **2012**, pp. 239-258. doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1\_12.
23. FAO. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. FAO Plant Production and Protection Paper 228, 2016 (FAO/WHO joint work). Rome.
24. Pimentel, D. Pesticides and pest control. In *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*; Rajinder, P., Dhawan, A., Eds.; Springer, Netherlands, **2009**, *1*, pp 83-87. doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3\_3.
25. Zhang, W.; Jiang, F.; Ou, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.*, **2011**, *1*(2), 125-144.
26. FAO. FAOSTAT 2017. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/> [Accessed on 10 April 2020]. Rome.
27. Sun, B.; Zhang, L.; Yang, L.; Zhang, F.; Norse, D.; Zhu, Z. Agricultural non-point source pollution in China: Causes and mitigation measures. *Ambio*, **2012**, *41*, 370–379.
28. Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 338–343. doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8.
29. Weindling, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathol.* **1932**, *22*, 837-845.
30. Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 377–393. doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377.

31. Smith, A.; Beltrán, C.A.; Kusunoki, M.; Cotes, A.M.; Motohashi, K.; Kondo, T.; Deguchi, M. Diversity of oil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *J. Gen. Plant Pathol.* **2013**, *79*, 74-85. doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1.
32. El-Komy, M.H.; Saleh, A.A.; Eranthodi, A.; Molan, Y.Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* **2015**, *31*, 50–60. doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087.
33. Roberts, D.P.; Lohrke, S.M.; Meyer, S.L.F.; Buyer, J.S.; Bowers, J.H.; Jacyn Baker, C.; Li, W.; De Souza, J.T.; Lewis, J.A.; Chung, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Prot.* **2005**, *24*, 141–155. doi.org/10.1016/j.cropro.2004.07.004.
34. Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1579–1592. doi.org/10.1104/pp.108.130369.
35. Salas-Marina, M.A.; Isordia-Jasso, M.I.; Islas-Osuna, M.A.; Delgado-Sánchez, P.; Jiménez-Bremont, J.F.; Rodríguez-Guez-Kessler, M.; Rosales-Saavedra, M.T.; Herrera-Estrella, A.; Casas-Flores, S. The Ep11 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different lifestyle pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 77.
36. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1934–1944. doi.org/10.1002/jsfa.7301.
37. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. Biostimulant Activity of *Trichoderma saturnisporum* in melon (*Cucumis melo*). *HortScience* **2018**, *53*, 810–815. doi.org/10.21273/HORTSCI13006-18.
38. Sánchez-Montesinos, B.; Diáñez, F.; Moreno-Gavira, A.; Gea, F.J.; Santos, M. Plant Growth Promotion and Biocontrol of *Pythium ultimum* by Saline Tolerant *Trichoderma* Isolates under Salinity Stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2019**, *16*, 2053. doi.org/10.3390/ijerph16112053.

39. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L.; Lorito, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 1–10. doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
40. Pandey, S.; Pundhir, V.S. Mycoparasitism of potato black scurf pathogen (*Rhizoctonia solani* Kuhn) by biological control agents to sustain production. *Indian J. Hort.* **2013**, *70*(1), 71-75.
41. Pertot, I.; Gobbin, D.; De Luca, F.; Prodorutti, D. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial–temporal pattern in northern Italy. *Crop Protec.* **2008**, *27*, 1061–1070.
42. Schubert, M.; Fink, S.; Schwarze, F.W.M.R. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biol. Control* **2008**, *45*, 111–123. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.001.
43. Elad, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.* **2000**, *19*, 709–714.
44. Le, H.T.; Black, L.L.; Sikora, R.A. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol of tomato sudden caused by *Pythium aphanidermatum* following flooding in tropical hot season. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2003**, *68*, 463–474.
45. Ramesh, R. Management of damping off in brinjal using biocontrol agents. *J. Mycol. Plant Pathol.* **2004**, *34*, 666–669.
46. Wells, H.D. *Trichoderma* as biocontrol agent. In *Biocontrol of plant diseases*; Mukerji, K.G., Garg, K.L. Eds.; CRC Press, New York, United States, **1988**, pp. 71–82.
47. Lewis, K.; Whipps, J.M.; Cooke, R.C. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. In *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Whipps, J.M., Lumsden, R.D. Eds.; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1989**, pp. 191–217.
48. Suwan, S.; Isobe, M.; Kanokmedhakul, S.; Lourit, N.; Kanokmedhakul, K.; Soyong, K.; Koga, K. Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1438–1451.

49. Monte, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **2001**, *4*, 1–4. doi.org/ 10.1007/s101230100001.
50. Mohiddin, F.A.; Khan, M.R.; Khan, S.M.; Bhat, B.H. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? *Plant Pathol. J.* **2010**, *9*(3), 92–102. doi.org/10.3923/ppj.2010.92.102.
51. Vinale, F.; Nigro, M.; Sivasithamparam, K.; Flematti, G.; Ghisalberti, E.L.; Ruocco, M.; Varlese, R.; Marra, R.; Lanzuise, S.; Eid, A.; Woo, S.L.; Lorito, M. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microb. Lett.* **2013**, *347*(2), 123–129. doi.org/10.1111/1574-6968.12231.
52. Harman, G.E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* **2006**, *96*, 190–194. doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190.
53. Haggag, W.M. Biotechnological aspects of plant resistant for fungal diseases management. *Am. Eur. J. Sustain. Agric.* **2008**, *2*, 1–18.
54. Harman, G.E.; Kubicek, C.P. Eds. *Trichoderma and Gliocladium*; CRC Press. London, UK, 1998 doi.org/10.1201/9781482267945.
55. Porras, M.; Barrau, C.; Romero, F. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 782–787.
56. Lo, C.T.; Lin, C.Y. Screening Strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* **2002**, *11*, 215–220.
57. Colla, G.; Roupael, Y.; Bonini, P.; Cardarelli, M. Coating seeds with endophytic fungi enhances growth, nutrient uptake, yield and grain quality of winter wheat. *Int. J. Plant Prod.* **2015**, *9*, 171–190. doi.org/10.22069/IJPP.2015.2042.
58. Bononi, L.; Chiamonte, J.B.; Pansa, C.C.; Moitinho, M.A.; Melo, I.S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2858. doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8.

59. Halifu, S.; Deng, X.; Song, X.; Song, R. Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. *Forests* **2019**, *10*, 758. doi.org/10.3390/f10090758.
60. Doni, F.; Al-Shorgani, N.K.N.; Tibin, E.M.M.; Abuelhassan, N.N.; Isahak, A.; Zain, C.R.C.M.; Yusoff, W.M.W. Microbial involvement in growth of paddy. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2013**, *5*, 285–290. doi.org/10.19026/crjbs.5.5430.
61. Ellegaard, O.; Wallin, J.A. The bibliometric analysis of scholarly production: How great is the impact? *Scientometrics*. **2015**, *105*, 1809–1831. doi.org/10.1007/s11192-015-1645-z.
62. Barth, M.; Haustein, S.; Scheidt, B. The life sciences in German – Chinese cooperation: an institutional-level co-publication analysis. *Scientometrics*. **2014**, *98*, 99–117. doi.org/10.1007/s11192-013-1147-9.
63. Chadegani, A.A.; Salehi, H.; Yunus, M.M.; Farhadi, H.; Fooladi, M.; Farhadi, M.; Ebrahim, N.A.A comparison between two main academic literature collections: Web of Science and Scopus databases. *Asian Soc. Sci.* **2013**, *9*. doi.org/10.5539/ass.v9n5p18.
64. Cabeza, L.F.; Chàfer, M.; Mata, É. Comparative analysis of Web of Science and Scopus on the energy efficiency and climate impact of buildings. *Energies*. **2020**, *13*, 409. doi.org/10.3390/en13020409.
65. Falagas, M.E.; Kouranos, V.D.; Arencibia-Jorge, R.; Karageorgopoulos, D.E. Comparison of SCImago journal rank indicator with journal impact factor. *FASEB J.* **2008**, *22*, 2623–2628. doi:10.1096/fj.08-107938.
66. Padilla, F.M.; Gallardo, M.; Manzano-Agugliaro, F. Global trends in nitrate leaching research in the 1960–2017. *Period. Sci. Total Environ.* **2018**, *643* (2), 400–413. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.215.
67. Van Eck, N.J.; Waltman, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics* **2010**, *84*, 523–538. doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3.
68. Van Eck, N.J.; Waltman, L. VOSviewer version 1.6.15. <http://www.vosviewer.com/>. [Accessed on 28 April 2020].

69. Choi, J.; Yi, S.; Lee, K.C. Analysis of keyword networks in MIS research and implications for predicting knowledge evolution. *Inf. Manag.* **2011**, *48*, 371–381. doi.org/10.1016/j.im.2011.09.004.
70. Mongeon, P.; Paul-Hus, A. The journal coverage of Web of Science and Scopus: a comparative analysis. *Scientometrics*. **2016**, *106*, 213–228. doi.org/10.1007/s11192-015-1765-5.
71. Chen, X.; Chen, J.; Wu, D.; Xie, Y.; Li, J. Mapping the research trends by co-word analysis based on keywords from funded project. *Procedia Comput. Sci.* **2016**, *91*, 547–555. doi.org/10.1016/j.procs.2016.07.140.
72. Adam, M.; Heuer, H.; Hallmann, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS ONE*. **2014**, *9*, e90402. doi.org/10.1371/journal.pone.0090402.
73. Colagiero, M.; Rosso, L.C.; Ciancio, A. Diversity and biocontrol potential of bacterial consortia associated to root-knot nematodes. *Biol. Control* **2018**, *120*, 11–16. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.010.



## Capítulo 2. Promoción del crecimiento de las plantas y biocontrol de *Pythium ultimum* por aislados de *Trichoderma* tolerantes a la salinidad bajo estrés salino.



International Journal of  
*Environmental Research  
and Public Health*



Article

### Plant Growth Promotion and Biocontrol of *Pythium ultimum* by Saline Tolerant *Trichoderma* Isolates under Salinity Stress

Brenda Sánchez-Montesinos <sup>1</sup>, Fernando Diáñez <sup>1</sup>, Alejandro Moreno-Gavira <sup>1</sup>,  
Francisco J. Gea <sup>2</sup>  and Mila Santos <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agronomía, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería, 04120 Almería, Spain; brensam@hotmail.com (B.S.-M.); fdianez@ual.es (F.D.); alejanmoga@gmail.com (A.M.-G.)

<sup>2</sup> Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey, 16220 Cuenca, Spain; fjgea.cies@dipucuenca.es

\* Correspondence: msantos@ual.es; Tel.: +34-950-015511

Received: 15 May 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 10 June 2019



## 2.1 Resumen

El presente estudio evalúa tres aislados de *Trichoderma* como agentes promotores del crecimiento vegetal o de control biológico: *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum*, *Trichoderma saturnisporum*, y el aislado marino obtenido de *Posidonia oceanica*, *Trichoderma longibrachiatum*. El objetivo es contribuir a una reducción global de los residuos de plaguicidas en el fruto y en el medio ambiente y a una disminución de los fertilizantes químicos, cuyo exceso agrava uno de los estreses abióticos más graves, la salinidad. Se evaluó in vitro la tolerancia de los distintos aislados a concentraciones crecientes de cloruro sódico, así como su capacidad antagonica contra *Pythium ultimum*. También se analizó la capacidad de promoción del crecimiento de la planta y los efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre la severidad de *P. ultimum* en las plántulas de melón en condiciones de salinidad. Los resultados revelan que los tres aislados de *Trichoderma*, independientemente de su origen, alivian el estrés producido por la salinidad, dando lugar a plantas de mayor tamaño con un porcentaje de peso seco al aire superior al 80% en condiciones de estrés salino para *T. longibrachiatum*, o un aumento del peso seco de las raíces cercano al 50% cuando se aplicó *T. aggressivum* f. sp. *europaeum*. Asimismo, los tres aislados mostraron actividad antagonica contra *P. ultimum*, reduciendo la incidencia de la enfermedad, siendo la respuesta más alta la encontrada para *T. longibrachiatum*. Se reporta por primera vez el control biológico de *P. ultimum* por *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* y *T. saturnisporum*, reduciendo la severidad de la enfermedad en un 62.96% y 51.85%, respectivamente. Esta es la primera descripción de *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* como agente de control biológico y promotor del crecimiento. La aplicación de estos aislados puede ser muy beneficiosa para los cultivos hortícolas, tanto en semilleros como en invernaderos.

**Palabras clave:** *Pythium ultimum*; tolerancia a la sal; *Trichoderma*; control biológico; estrés abiótico y biótico.

## 2.2. Introducción

La creciente preocupación de los consumidores por la seguridad de los alimentos y por la sostenibilidad social y medioambiental de los sistemas de cultivo repercute especialmente en los sectores de producción de frutas y hortalizas. Estos sectores se enfrentan a las restricciones cada vez más estrictas que las grandes cadenas de distribución establecen en sus pliegos de condiciones de compra en cuanto a la presencia de materias activas en los análisis de plaguicidas multiresiduos. Éstas son mucho más restrictivas que las establecidas por la propia legislación comunitaria, tanto por la cantidad (inferior al límite máximo de residuos, LMR) como por el número de sustancias activas detectadas que permiten [1]. Esta circunstancia obliga a buscar

nuevas herramientas para la protección de los cultivos que no se basen en el control químico. En la actualidad, en zonas importantes de producción intensiva de hortalizas como Almería (España), se ha producido un notable avance en el control biológico de plagas, pero no en el de enfermedades, siendo estas últimas todavía bastante dependientes del uso de agroquímicos. El uso de microorganismos como agentes de control biológico (ACB) de enfermedades es una de las claves para una producción con menos residuos fitosanitarios y mayor seguridad alimentaria. Además, muchos de los ACB comercializados actúan como promotores del crecimiento de las plantas. Esta circunstancia permite actuar sobre otro de los importantes problemas de los sistemas de producción intensiva, la contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes. La búsqueda de nuevas herramientas para reducir el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos es un objetivo que debe alcanzarse a medio plazo.

La productividad de las tierras agrícolas en entornos áridos y semiáridos se ve afectada por la acumulación de sales y la pérdida de materia orgánica del suelo [2]. La salinidad del suelo, así como el uso de agua con alto contenido en sales para el riego, conlleva una reducción del crecimiento de las plantas y del rendimiento de los cultivos [3,4]. Asimismo, la presencia de sales afecta a la asimilación de nutrientes por parte de las plantas y a la actividad microbiana del suelo. Además, aumenta la gravedad de los efectos de los fitopatógenos e influye en los agentes de control biológico y en la interacción entre ellos. Existen numerosas referencias al papel amortiguador de los microorganismos en la rizosfera de las plantas [4-6]. Generalmente, este efecto se debe a cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos en la planta provocados por los microorganismos [7]. *Paecilomyces formosus* mitiga el impacto negativo del estrés salino en las plantas de pepino mediante la producción de giberelinas y ácido indolacético [8]. Asimismo, la asociación con hongos endofíticos como *Penicillium* sp. y *Phoma glomerata* altera los niveles de ácido jasmónico, aumenta los valores de ácido salicílico y reduce la síntesis de ácido abscísico, reduciendo los efectos perjudiciales de la salinidad [9]. La coinoculación de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* alivia los efectos deletéreos del estrés salino en las plántulas de trigo mediante la solubilización del P y la producción conjunta de ácido indolacético [10]. Yasmineen y Siddiqui [11] detectaron que la presencia de *Trichoderma* en un ambiente salino aumentaba la actividad de las enzimas antioxidantes. Estudios realizados con *T. harzianum* confirmaron su alta colonización del suelo y su rendimiento en la producción de tomates cultivados bajo plástico con riego de alta salinidad [12]. Sin embargo, hay microorganismos que no están adaptados a condiciones de alta salinidad. Tal es el caso de algunos aislados de *Trichoderma*, cuyo papel biofungicida y promotor de plantas puede verse comprometido por su baja osmotolerancia [13,14]. Por este motivo, se han realizado numerosos estudios en la búsqueda de agentes de control biológico halotolerantes. Gal-Hemed et al. [15] aislaron *T. atroviride* y *T. asperelloides* de la esponja mediterránea *Psammocinia* sp. capaces de reducir la enfermedad de damping-off de

*Rhizoctonia solani* en judías y también de inducir respuestas de defensa en plántulas de pepino contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Asimismo, se han obtenido aislados de *Trichoderma* de sedimentos marinos, invertebrados y algas [16,17]. Por otro lado, se ha llevado a cabo la cría de *Trichoderma*, con el mismo objetivo de aumentar los beneficios del control biológico, así como de resistir condiciones adversas [13].

Por lo tanto, los objetivos del presente estudio fueron: (a) evaluar la tolerancia de diferentes concentraciones de NaCl en tres aislados de *Trichoderma* obtenidos de suelos supresivos, sustratos de cultivo de hongos y *Posidonia oceanica*; (b) evaluar la capacidad antagonista in vitro de estos aislados contra *Pythium ultimum*; (c) estudiar la capacidad de promover el crecimiento de plántulas de melón de las cepas de *Trichoderma* bajo concentraciones crecientes de salinidad; y finalmente, (d) evaluar el control biológico de la enfermedad causada por *P. ultimum* en plántulas de melón, ejercido por las cepas de *Trichoderma* bajo distintos niveles de estrés salino.

## 2.3 Materiales y Métodos

### 3.1. Aislados fúngicos

Los aislados seleccionados en este estudio se han obtenido de diferentes ambientes. *Trichoderma saturnisporum* (TS), obtenido de suelos supresivos, fue seleccionado por su conocida actividad antagonista y de promoción del crecimiento vegetal en pimiento y melón [18,19]. *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum* Tae52481 (TA) se aisló a partir de muestras de sustrato utilizadas para el cultivo de *Agaricus bisporus* procedentes de explotaciones de hongos situadas en Castilla-La Mancha (España). *Trichoderma longibrachiatum* (TL) se aisló de las raíces de la hierba marina endémica, *Posidonia oceanica*, muestreada en el Mediterráneo en Almería, España, siguiendo el procedimiento de Vohník et al. [20]. Ambos se aislaron mediante la técnica de dilución en serie en medio de agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25 °C durante 5-7 días. La morfología de las colonias de los aislados puros TL y TA en agar papa dextrosa (PDA, Difco) y la morfología de los conidióforos examinada por microscopía de luz y microscopía de barrido electrónico de criofractura (criosem) [18] fueron consistentes con el género *Trichoderma* (Figura 1). La identificación molecular de los hongos seleccionados se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Diáñez et al. [18]. La secuencia se analizó mediante una búsqueda BLAST en la base de datos GenBank del National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se alineó con los vecinos más cercanos. Las secuencias no se han depositado en la base de datos GenBank porque están sujetas de patentes.

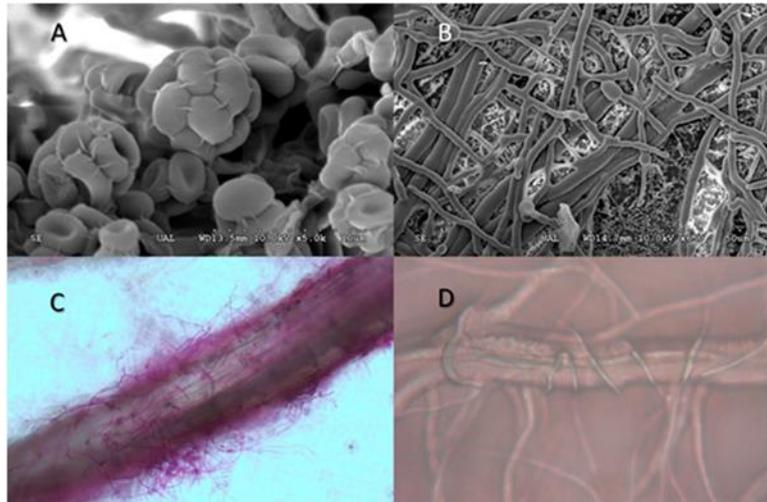


Figura 1. Aislados de *Trichoderma* examinados por microscopía electrónica y óptica. (A) Conidióforos con conidios de *Trichoderma longibrachiatum*; (B) Hifas de *Trichoderma saturnisporum*; (C) Colonización de *Trichoderma aggressivum* en la raíz del melón. (D) Micelio de *T. aggressivum* alrededor del micelio de *Pythium ultimum*.

Las plántulas de melón que mostraban lesiones causadas por *Pythium ultimum* se seleccionaron para obtener el inóculo, que se utilizó como patógeno de prueba en los ensayos antagónicos in vitro e in vivo.

Cada aislado se cultivó en PDA durante 5 o 15 días a  $25-27 \pm 2$  °C en condiciones de oscuridad. Las suspensiones de esporas de los aislados de *Trichoderma* se prepararon inundando placas de cultivos de 15 días con agua destilada estéril, raspando con una varilla de vidrio estéril y filtrando, y se ajustaron a una concentración de  $1-10^8$  esporas/mL con un hemocitómetro de Neubauer.

3.2. Condiciones de crecimiento de las cepas fúngicas en PDA con diferentes concentraciones de NaCl.

Las cepas de *Trichoderma* y del fitopatógeno se cultivaron a 25 °C durante 7 días en PDA. Se obtuvieron discos de micelio (5 mm de diámetro) de los bordes de las placas de PDA y se inocularon en un nuevo PDA, enmendado con distintas concentraciones de NaCl (0, 1, 2, 5, 10, 15 o 20 g·L<sup>-1</sup>). Las placas se incubaron durante 7 días a 25 y 35 °C. Los diámetros de las colonias se registraron cada día durante el cultivo. El experimento fue completamente aleatorio con cinco réplicas. La capacidad de tolerancia a la sal de los aislados de *Trichoderma* se midió como el porcentaje de reducción del crecimiento lineal calculado por  $(C-N)-100/C$ , donde N es el radio

máximo de los aislados cultivados en medio suplementado con NaCl y C es el radio de los aislados cultivados en medio sin NaCl.

### 3.3. Ensayos de antagonismo en doble cultivo

Los aislados de *Trichoderma* fueron evaluados por su antagonismo contra *Pythium ultimum* mediante el ensayo de confrontación de Santos y Diáñez [21]. Se prepararon placas de Petri (9 cm de diámetro) conteniendo 15 mL de PDA, enmendadas con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1, 2, 5, 10, 15 o 20 g·L<sup>-1</sup>).

Las placas Petri se sellaron con parafilm y se incubaron en la oscuridad a 25 °C durante 4-7 días, hasta que el crecimiento en las placas de control alcanzó el borde de las mismas. A continuación, se evaluaron las placas midiendo las distancias entre los cultivos de patógenos y de hongos. Los resultados se transformaron en porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio. Estas pruebas se realizaron por quintuplicado.

### 3.4. Evaluación de los efectos promotores del crecimiento de los aislados de *Trichoderma* en plántulas de melón bajo estrés por salinidad.

Para determinar el efecto promotor de los diferentes aislados de *Trichoderma*, se desinfectaron semillas de melón de la variedad Piñonet (Piel de sapo) con hipoclorito al 2% durante 3 min y se lavaron abundantemente con agua del grifo para eliminar los residuos. Posteriormente, las semillas fueron pregerminadas en la oscuridad en una sala húmeda a 25 °C y trasplantadas a macetas de 300 mL en una mezcla de turba comercial, con una semilla por maceta. Simultáneamente a la siembra, se colocaron 5 mL de agua (T0) o 5 mL de suspensión de esporas de cada aislado de *Trichoderma* (TS, TA o TL) en cada maceta a razón de  $50 \times 10^6$  propágulos/planta. El experimento se realizó en condiciones de invernadero. Cada tratamiento constaba de 25 repeticiones. Las plantas se abonaron diariamente con un fertilizante comercial de nutrientes complejos. Cuando la primera hoja verdadera se había expandido completamente, se administraron cuatro niveles diferentes de concentraciones de NaCl, 0, 0.5, 1, 1.5 o 2 g·L<sup>-1</sup>, empapando manualmente el medio con aproximadamente 50 mL de las soluciones, una vez al día durante 30 días, y con 100 mL al día durante los días siguientes, mientras las plantas crecían. La conductividad eléctrica (CE) de las soluciones se registró como 2.1, 3.87, 5.30, 6.6 y 7.16 dS·m<sup>-1</sup>. Tras 45 días de cultivo, se analizaron 10 plantas por tratamiento y control. Se determinó el peso seco y fresco de la parte aérea y de las raíces.

### 3.5. Efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre la severidad de *Pythium Ultimum* en plántulas de melón en condiciones salinas

Para la obtención de zoosporas de *Pythium ultimum* se siguió el procedimiento descrito por Marin et al. [22]. La concentración de la suspensión de zoosporas se ajustó a aproximadamente  $10^3$  zoosporas·mL<sup>-1</sup>, utilizando un hemocitómetro. El inóculo se utilizó inmediatamente y se aplicaron 5 mL de la suspensión uniformemente sobre la superficie de la turba en cada maceta utilizando una micropipeta estéril. La prueba de patogenicidad de *P. ultimum* en las plántulas de melón se llevó a cabo en condiciones de invernadero, de la misma manera que la descrita anteriormente. La aplicación de *P. ultimum* se realizó tras la completa expansión de la segunda hoja verdadera. La aplicación de las diferentes concentraciones de sal se llevó a cabo de la misma manera que para la prueba de promoción del crecimiento descrita anteriormente. La severidad de los síntomas se calificó periódicamente, y se estimó un índice final de severidad de la enfermedad de acuerdo con la siguiente escala [23]: 0-planta sana; 1-inicio de síntomas; 2-síntomas moderados; 3-planta severamente afectada; y 4-planta muerta. Los experimentos se llevaron a cabo mediante diseños de bloques completamente aleatorios.

### 3.6. Análisis estadístico

Todos los datos presentados son la media de cinco réplicas de ensayos in vitro y diez réplicas de experimentos en maceta. Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza, realizado con el software Statgraphics Centurion ver. XVI. Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  error estándar de la media. Se consideraron significativos los valores p inferiores a 0.05.

## 2.4 Resultados

### 4.1. Efectos de la salinidad y la temperatura en el crecimiento de las colonias de los aislados de *Trichoderma*

En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos del crecimiento micelial de TS, TA y TL a diferentes concentraciones de sal y temperaturas (25 y 35 °C). Como se esperaba, no hubo inhibición del crecimiento micelial de TL en las diferentes concentraciones de sal probadas, ni tampoco hubo diferencias en el crecimiento a 25 y 35 °C. Sin embargo, tanto para TS como para TA, la presencia de sal en el medio condicionó el crecimiento. Esto dio lugar a una drástica reducción del crecimiento micelial, del 66.9 (TS) y del 76.75% (TA) a partir de 2 y 10 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente. La temperatura de 35 °C inhibió completamente el crecimiento micelial de TA.

No se observó ninguna reducción del crecimiento de *P. ultimum* se observó a 25 °C a medida que aumentaba la concentración de sal, excepto a 20 g·L<sup>-1</sup>. No hubo crecimiento a 35 °C (Figura 2).

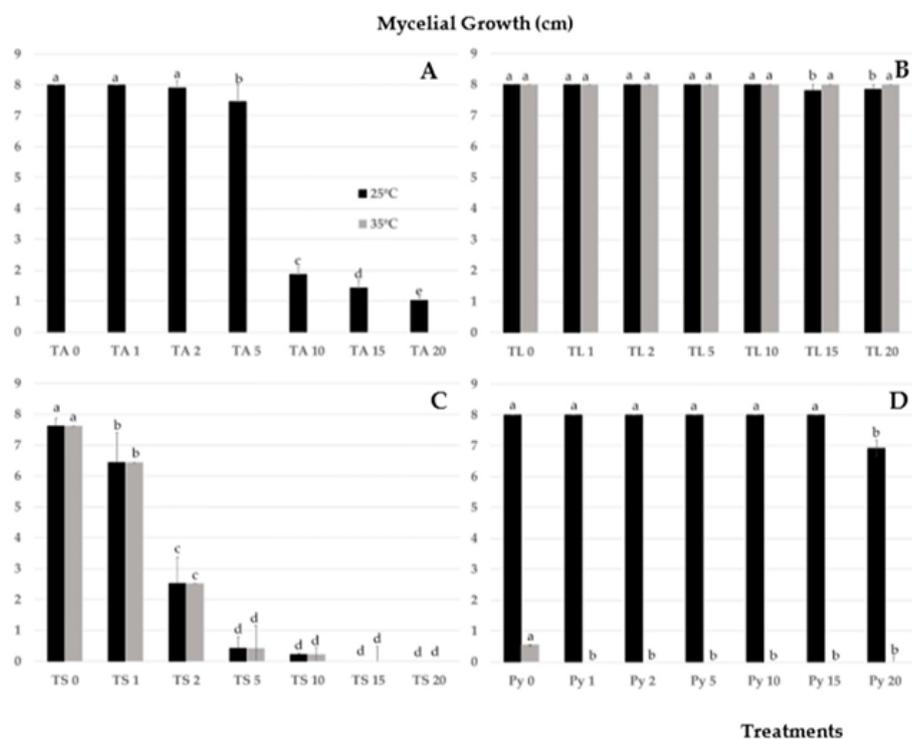


Figura 2. Crecimiento micelial (cm) de los aislados de *Trichoderma* en función de diferentes concentraciones de NaCl (0-20 g·L<sup>-1</sup>) y temperaturas (25/35 °C). (A) *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum*. (B) *T. longibrachiatum*. (C) *T. saturnisporum*. (D) *Pythium ultimum*. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 5). Para cada aislado, las columnas marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa a p < 0.05.

#### 4.2. Efectos de los aislados de *Trichoderma* en el crecimiento radial de *P. ultimum*

En la Figura 3, se observan los resultados obtenidos del antagonismo microbiano para *P. ultimum*. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial correspondieron a los enfrentamientos con TL, que no se vieron afectados en condiciones de salinidad creciente. La disminución del crecimiento de los aislados antagonistas de TA y TS repercutió en el antagonismo microbiano detectado al aumentar la concentración de sal del medio. A pesar de ello, los valores de antagonismo microbiano fueron elevados, teniendo en cuenta la tasa de crecimiento micelial característica de este patógeno a cualquier concentración de sal.

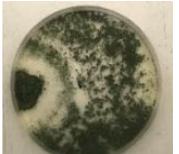
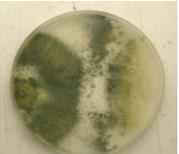
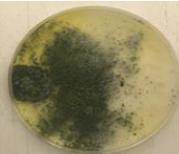
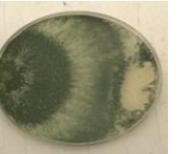
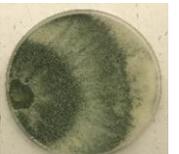
	NaCl (0-20 g·L <sup>-1</sup> )						
Dual Culture	0	1	2	5	10	15	20
TS-Py	 58.50±2.05 <sup>a</sup>	 50.75±2.73 <sup>b</sup>	 45.50±3.60 <sup>c</sup>	-	-	-	-
TL-Py	 59.50±11.65 <sup>c</sup>	 66.00±9.81 <sup>bc</sup>	 72.50±3.42 <sup>ab</sup>	 60.75±9.95 <sup>c</sup>	 79.75±1.63 <sup>a</sup>	 68.40±2.84 <sup>bc</sup>	 71.15±4.39 <sup>ab</sup>
TA-Py	 53.50±4.48 <sup>a</sup>	 51.25±6.84 <sup>a</sup>	 55.00±13.32 <sup>a</sup>	 37.00±3.26 <sup>b</sup>	-	-	-

Figura 3. Potencial antagonístico de los aislados de *Trichoderma* contra *P. ultimum* (Py) en cultivo dual a diferentes niveles de salinidad en medio de agar papa dextrosa (PDA). El % de inhibición micelial se calculó como  $PIRG = (R1 - R2) \div R1 \times 100$ , donde: PIRG: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno, R1: crecimiento radial del patógeno en las placas de control, R2: crecimiento radial del patógeno en las placas de doble cultivo. a, b y c Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ).

4.3. Efectos promotores de los aislados de *Trichoderma* sobre las plántulas de melón y los tratamientos de salinidad

El efecto de la aplicación de los aislados de *Trichoderma* mediante riego sobre los parámetros morfológicos se muestra en la Tabla 1. La aplicación de TS, TL y TA produjo incrementos tanto en la parte aérea como en la radical de la planta. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos en algunos casos. Esta promoción del crecimiento de la planta también se produce en condiciones de estrés salino.

Tabla 1. Parámetros morfológicos de las plantas de melón tratadas con diferentes dosis de NaCl y aislados de *Trichoderma*.

Treatments Isolate/NaCl (g·L <sup>-1</sup> )	Aereal Fresh Weight (g)	Root Fresh Weight (g)	Aereal Dry Weight (g)	Root Dry Weight (g)
T0-0	6.74 ± 1.93 <sup>c</sup>	1.61 ± 0.70 <sup>b,c</sup>	0.48 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.06 <sup>b</sup>
TS-0	7.92 ± 1.79 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>a</sup>
TA-0	7.01 ± 0.98 <sup>b,c</sup>	1.59 ± 0.85 <sup>b,c</sup>	0.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>a</sup>
TL-0	7.27 ± 1.71 <sup>b</sup>	1.74 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.04 <sup>a,b</sup>
T0-0.5	6.94 ± 1.80 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.42 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>b</sup>
TS-0.5	7.19 ± 1.77 <sup>a,b</sup>	1.68 ± 0.54 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a,b</sup>
TA-0.5	7.49 ± 1.34 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.61 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.16 <sup>a,b</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>a</sup>
TL-0.5	7.05 ± 1.22 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.48 <sup>a,b</sup>	0.69 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
T0-1	5.32 ± 1.45 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.55 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
TS-1	6.01 ± 1.30 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.35 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>c</sup>
TA-1	5.90 ± 1.05 <sup>a,b</sup>	1.46 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>
TL-1	6.30 ± 2.43 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
T0-1.5	5.26 ± 1.40 <sup>c</sup>	0.67 ± 0.35 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.04 <sup>a,b</sup>
TS-1.5	5.57 ± 1.03 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>
TA-1.5	7.43 ± 1.79 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>a</sup>
TL-1.5	5.07 ± 0.87 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>
T0-2	5.22 ± 1.12 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>
TS-2	5.82 ± 0.83 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>
TA-2	6.35 ± 1.00 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>
TL-2	5.42 ± 1.18 <sup>b,c</sup>	0.82 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.12 <sup>a,b</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c</sup> Los valores de una columna seguidos de las mismas letras no presentan diferencias significativas al 5% (prueba LSD).

Los valores más altos se detectaron para la TS a  $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde se produjo un incremento en el peso fresco y seco de la parte aérea y radical de 17,5, 62.11, 44.02 y 46.51%, respectivamente. Para las diferentes concentraciones de salinidad ensayadas, también se observó una promoción del crecimiento de la planta en el peso seco de la parte aérea, que disminuyó a medida que aumentaba el contenido de sal en el agua (de 50.13% a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 17.16% a  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Sin embargo, hubo una disminución muy marcada en la raíz, pasando de un aumento del 5.4% en la raíz a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a una disminución del 20% a  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en relación con la del control.

La aplicación de TL también promovió el crecimiento de las plántulas de melón, aumentando el peso seco de la parte aérea en un 58.17, 87.94, 94.92, 27.10 y 12.12% en concentraciones de NaCl de 0-2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Asimismo, también se observó un incremento en el peso seco de la raíz para todos los tratamientos ensayados, alcanzando un máximo del 22% para una concentración a  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En el caso de la aplicación de TA, se produjo un aumento tanto de la parte aérea como de la parte radical muy importante, respecto al control, en todos los tratamientos ensayados. Así, se obtuvieron incrementos del 48, 80.54, 93.90, 61.89 y 32.72% para el peso seco de la parte aérea, y aumentos de 41.80, 16.21, 56.92, 32.35 y 0%, para el peso seco de la raíz, para concentraciones de NaCl entre 0 y  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.4. Efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre la severidad de *Pythium ultimum* en plántulas de melón bajo condiciones salinas

La aplicación de cloruro sódico en el agua de riego no ha provocado un aumento significativo ( $p = 0.4699$ ) de los síntomas causados por *P. ultimum* en las plántulas de melón en relación con el control ( $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Tal y como se determinó en los experimentos de invernadero, tres cepas (TA, TS y TL) redujeron significativamente el índice de enfermedad de la podredumbre de la raíz de *P. ultimum* en las plántulas de melón, en comparación con el alcanzado por el control T0, para las diferentes concentraciones de NaCl ensayadas (Figura 4).

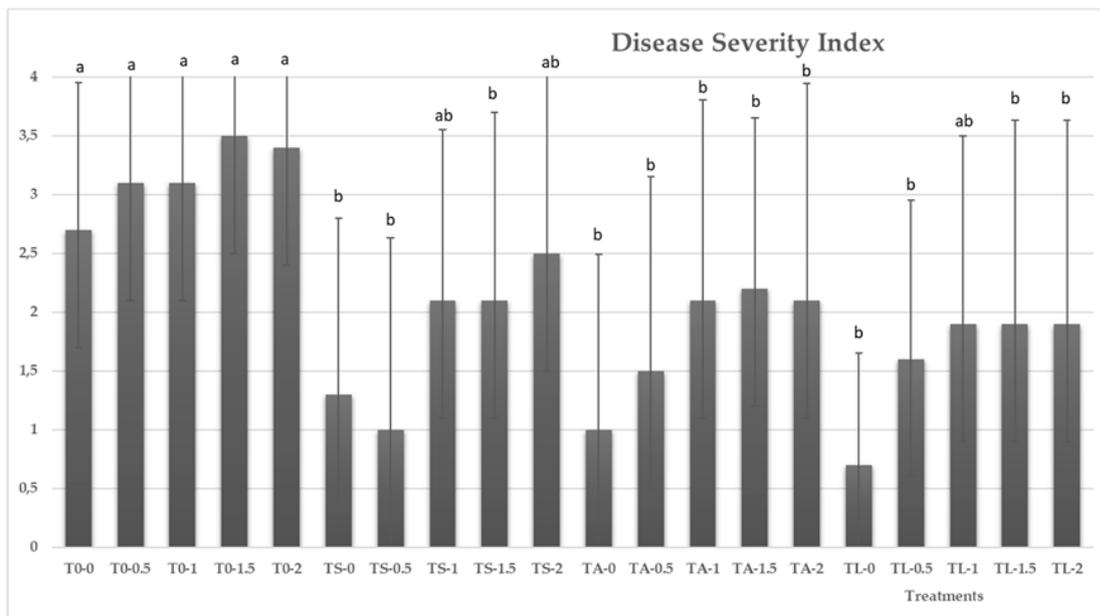


Figura 4. La incidencia de la enfermedad de *P. ultimum* en las plantas de melón se calificó 30 días después de la inoculación en base a una escala de 0-4: donde 0 = sin síntomas visibles de la enfermedad y 4 = planta muerta. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 10). a, b, c Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Así, a  $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , la severidad de la enfermedad se redujo en un 74% por el aislado marino TL, seguido de TS y TA, con lecturas de 51.85% y 62.96%, respectivamente, en relación con la del control ( $p = 0.0086$ ). No hubo diferencias significativas en la capacidad de controlar la aparición de los síntomas en los tres aislados de *Trichoderma* ensayados. En general, al aumentar el contenido de sal en el agua de riego, no hubo diferencias significativas en el control de la enfermedad causada por *P. ultimum* para los tres aislados de *Trichoderma* ensayados, reduciendo significativamente los síntomas con respecto al control (T0). TL realizó un mayor control del desarrollo de la enfermedad, alcanzando una reducción del 44.11% para  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaCl.

## 2.5 Discusión

La capacidad de utilizar aislados fúngicos para el control biológico de enfermedades o la promoción del crecimiento de las plantas en condiciones de cultivo puede estar condicionada por el manejo, las condiciones del suelo o la fertirrigación, la temperatura, la salinidad y la presencia de metales pesados o pesticidas, entre otros muchos factores. Las condiciones de salinidad, provocadas en muchos casos por la excesiva fertilización química en la horticultura intensiva, pueden poner en duda la eficacia de estos ACB. En este estudio, hemos analizado la capacidad de los aislados de *Trichoderma* obtenidos de diferentes ambientes para promover el desarrollo de

plántulas de melón y controlar la podredumbre de la raíz causada por *P. ultimum* en condiciones de estrés salino. Los aislados de Los sustratos de cultivo de setas y los rizomas de *Posidonia oceanica* se identificaron como *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* y *T. longibrachiatum*, respectivamente.

Con la excepción de TL, el crecimiento micelial de TA y TS se vio influenciado por la salinidad y la temperatura. La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* depende en muchos casos de la especie y del origen del aislamiento. Así, TA mostró diferencias considerables en el crecimiento, dependiendo de la temperatura (25 y 35 °C). Resultados similares fueron obtenidos por Sobieralski et al. [24], cuyos aislamientos de *T. aggressivum* f. *europaeum* mostraron un crecimiento muy pobre a una temperatura de 35 °C. Tanto la TS como la TA redujeron drásticamente el crecimiento del micelio en un medio salino. Dado el origen del TA, es lógico suponer que tiene una baja tolerancia a la presencia de sal en el medio. Sin embargo, esto no es así para la TS, ya que fue aislada de la arena del fondo marino de la costa de Cádiz (España), que mostró supresividad frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* [25]. A 30 g·L<sup>-1</sup>, su crecimiento y esporulación fue óptimo tras su aislamiento (Diáñez F., comunicación personal), aunque esta capacidad de crecimiento se redujo tras su crecimiento in vitro. De la Cruz et al. [26] consideran que no existe una correlación significativa entre el hábitat marino y la tolerancia a la sal de los hongos aislados, por lo que no está claro por qué los hongos marinos tienen diferentes grados de tolerancia a la sal, o por qué pierden esa tolerancia.

Hemos demostrado que TA, TS y TL pueden inhibir el desarrollo de *P. ultimum* in vitro y son eficaces en la reducción de la gravedad de la enfermedad en las plántulas de melón, incluso en condiciones de estrés salino. Dada la capacidad de crecimiento de *P. ultimum* a concentraciones de 20 g·L<sup>-1</sup>, es necesario aplicar microorganismos tolerantes al estrés salino que no pierdan sus capacidades antagónicas contra los fitopatógenos. Migheli et al. [27] mostraron la capacidad de *T. longibrachiatum* CECT2606 para reducir la incidencia del damping-off en pepino, y el papel de las celulasas en el control de esta enfermedad. Recientemente, Yuan et al. [28] mostraron la capacidad de *T. longibrachiatum* H9 como promotor del crecimiento de las plantas de pepino y como ACB, reduciendo el índice de enfermedad del moho gris causado por *Botrytis cinerea* mediante la resistencia inducida. El TL ha sido denominado probiótico gracias a los múltiples beneficios que aporta a las plantas de tomate huésped asociadas y en el control de enfermedades [29]. Los microorganismos probióticos vegetales (MPP), también conocidos como bioprotectores, biocontroladores, biofertilizantes o bioestimulantes, son microorganismos beneficiosos que proporcionan una alternativa al uso de pesticidas y fertilizantes, reduciendo los problemas medioambientales y de salud pública [30].

*Trichoderma saturnisporum* ha sido descrito como bioestimulante en plantas de pimiento, melón y *Arabidopsis thaliana* [18,19,31], así como ACB contra *Phytophthora parasitica*, *P. capsici* [18] y *Fusarium oxysporum* [31]. Recientemente se han descrito nuevos aislamientos de TS marinos de la esponja *Dictyonella incisa*, caracterizando nuevos metabolitos secundarios de esta especie implicados en el control de enfermedades [32].

En este trabajo se describe por primera vez la promoción del crecimiento de las plantas y el control de *P. ultimum* mediante *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum*. En Europa, este hongo produce disminuciones muy importantes en el rendimiento de los champiñones [33,34]. No existen referencias a este hongo como agente fitopatógeno. Su elevado crecimiento micelial y esporulación, así como su alto poder como patógeno, hacen de TA un prometedor ACB.

Existen numerosas referencias basadas en el importante papel que desempeñan diferentes especies de *Trichoderma* tanto en la promoción de las plantas como en el control biológico de enfermedades. La caracterización de los mecanismos implicados está bien estudiada y en continuo desarrollo [35-37]. Sin embargo, en la horticultura intensiva bajo plástico, los beneficios de la aplicación de bioestimulantes o biofungicidas basados en *Trichoderma* u otros microorganismos están en entredicho, debido a la percepción que tienen los agricultores de la baja eficacia de estos productos como controladores de enfermedades cuando se comparan con la rápida respuesta que presentan los fertilizantes o fungicidas químicos. Los cambios actuales en la legislación en cuanto a la reducción de las materias activas [38] y la comercialización de bioestimulantes y bioplaguicidas, junto con la necesidad de aumentar la sostenibilidad de la agricultura en términos de salud pública y medio ambiente, requieren el uso de PPM como un elemento clave en la horticultura intensiva.

## 2.6 Conclusiones

Los tres aislados de *Trichoderma* estudiados han mostrado diferentes grados de tolerancia a la presencia de NaCl, demostrando antagonismo in vitro contra *P. ultimum*. El aislado marino *T. longibrachiatum* no perdió la actividad antagonista a altas concentraciones de sal (20 g·L<sup>-1</sup>). Los presentes resultados demuestran claramente que *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum*, *T. saturnisporum* y *T. longibrachiatum* fueron eficaces promotores del crecimiento de la planta y redujeron la tasa de putrefacción radicular causada por *P. ultimum* en plántulas de melón bajo condiciones de estrés salino. Este trabajo es la primera descripción de *Trichoderma aggressivum* f. sp. *europaeum* como promotor de plantas y ACB.

## 2.7 Bibliografía

1. Riesgos Asociados a la Presencia Simultánea de Plaguicidas en Alimentos: La Importancia de Los Análisis Multi-Residuo. Available online: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/riesgos-asociados-a-la-presencia-simultanea-de-plaguicidas-en-alimentos/> (accessed on 12 May 2019).
2. Munns, R. Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytol.* **2005**, *167*, 645–663.
3. Paul, D. Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *J. Basic Microbiol.* **2012**, *53*, 101–110.
4. Qin, Y.; Druzhinina, I.S.; Pan, X.; Yuan, Z. Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1245–1259.
5. Shrivastava, P.; Kumar, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 123–131.
6. Zhang, F.; Wang, Y.; Liu, C.; Chen, F.; Ge, H.; Tian, F.; Yanga, T.; Ma, K.; Zhang, Y. *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *170*, 436–445.
7. Kaushal, M.; Wani, S.P. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *231*, 68–78.
8. Khan, A.L.; Hamayun, M.; Kang, S.M.; Kim, Y.H.; Jung, H.Y.; Lee, J.H.; Lee, I.J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: An example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 3.
9. Waqas, M.; Khan, A.L.; Kamran, M.; Hamayun, M.; Kang, S.M.; Kim, Y.H.; Lee, I.J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* **2012**, *17*, 10754–10773.
10. Gai, S. Phosphate dissolving fungi: Mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiol. Res.* **2016**, *193*, 94–102.
11. Yasmeen, R.; Siddiqui, Z.S. Ameliorative effects of *Trichoderma harzianum* on monocot crops under hydroponic saline environment. *Acta Physiol. Plant.* **2018**, *40*, 4.

12. Daliakopoulos, I.N.; Apostolakis, A.; Wagner, K.; Deligianni, A.; Koutskoudis, D.; Stamatakis, A.; Tsanis, I.K. Effectiveness of *Trichoderma harzianum* in soil and yield conservation of tomato crops under saline irrigation. *Catena* **2019**, *175*, 144–153.
13. Mohamed, H.; Haggag, W. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz. J. Microbiol.* **2006**, *37*, 181–191.
14. Bheemaraya, P.M.B.; Ramesh, Y.S.T.; Amaresh, Y.S.; Naik, M.K. Salinity stress tolerance in native *Trichoderma* isolates. *Environ. Ecol.* **2013**, *31*, 727–729.
15. Gal-Hemed, I.; Atanasova, L.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I.S.; Viterbo, A.; Yarden, O. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-Zone agriculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 5100–5109.
16. Ji, N.Y.; Wang, B.G. Mycochemistry of marine algicolous fungi. *Fungal Divers.* **2016**, *80*, 301–342.
17. Blunt, J.W.; Carroll, A.R.; Copp, B.R.; Davis, R.A.; Keyzers, R.A.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 8–53.
18. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1934–1944.
19. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. Biostimulant activity of *Trichoderma saturnisporum* in melon (*Cucumis melo*). *Hortscience* **2018**, *53*, 810–815.
20. Vohník, M.; Borovec, O.; Župan, I.; Vondrášek, D.; Petrýl, M.; Sudová, R. Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Mycorrhiza* **2015**, *25*, 663–672.
21. Santos, M.; Diáñez, F. Los Antagonistas Microbianos en el Manejo de Micosis de la Parte Aérea de la Planta. In *Organismos Para el Control de Patógenos en los Cultivos Protegidos. Prácticas Culturales Para una Agricultura Sostenible*; Tello, J.C., Camacho, F., Eds.; Fundacion Cajamar: Almeria, Spain, **2010**; pp. 523–528.
22. Marín, F.; Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Gea, F.J.; Castañeda, C.; Navarro, M.J.; Yau, J.A. Control of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper (*Capsicum annuum*

- L.) with compost teas from different sources, and their effects on plant growth promotion. *Phytopathol. Med.* **2014**, *53*, 216–228.
23. Santos, M.; Diáñez, F.; González, M.; Tello, J.C. Grape marc compost: Microbial studies and suppression of soilborne mycosis in vegetable seedlings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 1493–1505.
24. Sobieralski, K.; Siwulski, M.; Frużyńska-Jóźwiak, D. Growth of aggressive isolates of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* in dependence on temperature and medium. *Phytopathologia* **2009**, *53*, 11–18.
25. Santos, M.; Diáñez, F.; Carretero, F.; Gea, F.J. Evaluation of selected soils for suppression of *Fusarium* diseases. *Phytopathol. Med.* **2017**, *56*, 278–378.
26. Dela Cruz, T.E.; Wagner, S.; Schulz, B. Physiological responses of marine *Dendryphiella* species from different geographical locations. *Mycol. Prog.* **2006**, *5*, 108–119.
27. Migheli, Q.; González-Candelas, L.; Dealessi, L.; Camponogara, A.; Ramón-Vidal, D. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the  $\beta$ -1,4-Endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Biol. Control* **1998**, *88*, 673–677.
28. Yuan, M.; Huang, Y.; Ge, W.; Jia, Z.; Song, S.; Zhang, L.; Huang, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 144–157.
29. De Palma, M.; D'Agostino, N.; Proietti, S.; Bertini, L.; Lorito, M.; Ruocco, M.; Caruso, C.; Chiusano, M.L.; Tucci, M. Suppression subtractive hybridization analysis provides new insights into the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) response to the plant probiotic microorganism *Trichoderma longibrachiatum* MK1. *J. Plant. Physiol.* **2016**, *190*, 79–94.
30. Porto de Souza, L.; Blandon, L.M.; Rodrigues, C.; Cândido, M.; de Melo, G.V.; Pereira, G.; de Oliveira, J.; Soccol, C.R. Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. *AIMS Microbiol.* **2017**, *3*, 629–648.
31. Sharma, V.; Shanmugam, V. Unraveling the multilevel aspects of least explored plant beneficial *Trichoderma saturnisporum* isolate GITX-Panog. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *152*, 169–183.

32. Meng, J.; Cheng, W.; Heydari, H.; Wang, B.; Zhu, K.; Konuklugil, B.; Lin, W. Sorbicillinoid-based metabolites from a sponge-derived fungus *Trichoderma saturnisporum*. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 226–241.
33. Ospina-Giraldo, M.D.; Royse, D.M.; Thon, M.R.; Chen, X.; Romaine, C.P. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. *Mycologia* **1998**, *90*, 76–81.
34. Samuels, G.J.; Dodd, S.L.; Gams, W.; Castlebury, L.A.; Petrini, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **2002**, *94*, 146–170.
35. Gajera, H.; Domadiya, R.; Patel, S.; Kapopara, M.; Golakiya, B. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—A review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *1*, 133–142.
36. Khan, M.R.; Mohiddin, F.A. *Trichoderma*: Its Multifarious Utility in Crop Improvement. In *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Aligarh Muslim University: Aligarh, India; Srinagar, India, **2018**; Chapter 13; pp. 263–291.
37. Adnan, M.; Islam, W.; Shabbir, A.; Khan, K.A.; Ghramh, H.A.; Huang, Z.; Chen, H.Y.H.; Lu, G. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microb. Pathog.* **2019**, *129*, 7–18.
38. European Comission. Sustainable Use of Pesticides. Available online: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/sustainable\\_use\\_pesticides](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/sustainable_use_pesticides) (accessed on 12 May 2019).



## Capítulo 3. El papel de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* como promotor del crecimiento de las plantas en la horticultura.



Article

### Role of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as Plant-Growth Promoter in Horticulture

Brenda Sánchez-Montesinos <sup>1</sup>, Fernando Diáñez <sup>1,\*</sup> , Alejandro Moreno-Gavira <sup>1</sup>, Francisco J. Gea <sup>2</sup>  and Mila Santos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agronomía, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería, 04120 Almería, Spain; brensam@hotmail.com (B.S.-M.); alejanmoga@gmail.com (A.M.-G.); msantos@ual.es (M.S.)

<sup>2</sup> Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey, 16220 Cuenca, Spain; fjgea.cies@dipucuenca.es

\* Correspondence: fdianez@ual.es; Tel.: +34-628188359

Received: 4 June 2020; Accepted: 8 July 2020; Published: 13 July 2020





### 3.1 Resumen

El objetivo principal de este estudio fue determinar la capacidad de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* para promover el crecimiento de plántulas de pimiento y tomate en comparación con la de *T. saturnisporum*, una especie recientemente caracterizada como bioestimulante. En consecuencia, se realizaron pruebas de germinación de semillas y crecimiento de plántulas in vitro en condiciones de semillero comercial. Además, se determinaron los efectos de diferentes dosis y de una mezcla de ambas especies sobre el crecimiento de las plántulas en vivero y, posteriormente, en condiciones de invernadero. Además, se determinó la producción masiva de esporas en diferentes sustratos, así como su producción de sideróforos y ácido indolacético y su capacidad de solubilización de Fósforo (P). La aplicación directa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* a las semillas in vitro no aumenta el porcentaje de germinación de las semillas de pimiento y tomate ni mejora su índice de vigor. Sin embargo, el riego del sustrato utilizando diferentes dosis en condiciones de vivero comercial aumenta la calidad de las plántulas de tomate y pimiento. Las raíces del tomate aumentaron en un 66.66% a dosis de  $10^6$  esporas por planta. La aplicación de *T. aggressivum* f. *europaeum* o *T. saturnisporum* en condiciones de vivero añadió valor a las plántulas porque su efecto promotor del crecimiento se mantiene en condiciones de invernadero hasta tres meses después del trasplante. La aplicación combinada de las dos especies no tuvo ningún efecto beneficioso en relación con la del control. El presente estudio demuestra la capacidad bioestimulante de *T. aggressivum* f. *europaeum* en plantas de pimiento y tomate en condiciones comerciales de vivero e invernadero.

**Palabras clave:** *Trichoderma*; promoción del crecimiento vegetal; tomate; pimiento; bioestimulante.

### 3.2 Introducción

El éxito de la aplicación de *Trichoderma* en la agricultura se debe a los múltiples beneficios que genera en las plantas. Así, el género *Trichoderma* se caracteriza por su fuerte potencial competitivo y reproductivo, presentando altas tasas de supervivencia en condiciones de estrés desfavorables o abióticas, como la salinidad [1], el estrés hídrico [2], o la presencia de diversos productos químicos tóxicos, incluyendo fungicidas [3], entre otros. Asimismo, *Trichoderma* presenta una alta eficiencia en la promoción de la absorción de nutrientes [4], la capacidad de modificar la rizosfera y la estructura de la raíz en la que se establece el hongo [5,6], una alta agresividad contra hongos patógenos de las plantas, eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas [7-12], y la capacidad de inducir mecanismos de defensa de las plantas, entre otros muchos beneficios adicionales [8,9,13]. Las propiedades de *Trichoderma* han generado un considerable interés en la investigación de estos hongos para su uso en la agricultura, y se ha

desarrollado un gran número de productos comerciales utilizando diferentes especies de *Trichoderma* [10,14]. Muchas formulaciones contienen mezclas de diferentes especies que proporcionan una gama más amplia de efectos beneficiosos directos e indirectos para las plantas. Numerosos estudios han informado de los beneficios de la aplicación de *Trichoderma* para el crecimiento de las plantas e incluso el aumento del rendimiento de la producción. Así, la aplicación de especies de *Trichoderma*, tanto en el suelo como en las semillas, permite la multiplicación del hongo junto con el sistema radicular en desarrollo [15]. Su capacidad de colonizar las raíces de las plantas desde la estructura tipo apresorio mejora directamente el vigor de la semilla [16] y la germinación y promueve el crecimiento de las plántulas [10,11,17]; por lo que se sugiere que estos hongos se apliquen desde la etapa de vivero en el caso de especies hortícolas, ornamentales o forestales, lo que permitiría la colonización temprana de las raíces por *Trichoderma*, antes de trasplantar las plántulas en el campo.

Se ha informado de que el crecimiento de las plantas aumenta en asociación con las especies de *Trichoderma* similar al de otros microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM), pero los efectos son mayores con *Trichoderma* cuando las plantas están bajo condiciones de estrés biótico, abiótico o fisiológico [9,18-21]. Recientemente, se ha descrito que *T. aggressivum* f. *europaeum* es un promotor del crecimiento de las plántulas de melón en condiciones de estrés salino, además de su capacidad para controlar *Pythium ultimum*, disminuyendo la severidad de la enfermedad en las plántulas [1]. *Trichoderma aggressivum* Samuels & W. Gams es el agente causal de la enfermedad del moho verde, que causa pérdidas económicas en el cultivo de champiñones de botón blanco (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) en todo el mundo. Existen dos subespecies, *T. aggressivum* f. *aggressivum* y *T. aggressivum* f. *europaeum* que se encuentran en Norteamérica y Europa respectivamente [22]. *Trichoderma aggressivum*, un hongo filamentoso de rápido crecimiento, coloniza el compost y las tripas utilizadas como sustratos de crecimiento en el cultivo de hongos y produce densas colonias de micelio blanco que cambian de color a verde después de la esporulación [23]. Se sabe que este competidor agresivo produce metabolitos que son tóxicos para *A. bisporus* [24,25]. En las zonas colonizadas por *T. aggressivum*, la formación del cuerpo del fruto se retrasa, y los cuerpos del fruto pueden ser de mala calidad debido a los daños o a la decoloración [23]. Se han aislado numerosas especies de *Trichoderma* en sustratos de *Agaricus* y *Pleurotus*, como *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Trichoderma ghanense*, *T. asperellu* y *T. atroviride*, aunque no se ha determinado su agresividad [26]. Sánchez-Montesinos et al. [1] demostraron su alto crecimiento micelial y esporulación sobre las raíces. Por tanto, *T. aggressivum* f. *europaeum* es un potencial biofertilizante para diferentes cultivos. En nuestro estudio se ha analizado la capacidad promotora del crecimiento de esta especie en comparación con la de *T. saturnisporum* Ca1606, recientemente caracterizada como agente de biocontrol y promotor del crecimiento de

plántulas de diferentes plantas hortícolas [11,16,27]. Dado que la eficacia de los microorganismos como promotores del crecimiento dependerá del cultivo, la dosis y el método de aplicación, entre otros muchos factores, es necesario realizar más estudios sobre *T. aggressivum* f. *europaeum* para determinar su eficacia. En consecuencia, en el presente estudio, *T. aggressivum* f. *europaeum* Tae52481 y *T. saturnisporum* Ca1606, fueron probados para evaluar (a) los efectos de la aplicación directa a las semillas de una suspensión del hongo sobre la colonización de las raíces de tomates y pimientos y el posterior vigor de la planta; (b) la promoción del crecimiento y la calidad de las plántulas de pimiento y tomate bajo un sistema de producción convencional; y (c) los efectos de la aplicación de diferentes dosis y el efecto sinérgico de ambos aislados sobre las plántulas de tomate y sobre su posterior trasplante en condiciones de invernadero.

### 3.3 Materiales y Métodos

#### 3.1. Aislados fúngicos

El *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (TS), ya conocido por sus propiedades de promoción del crecimiento de las plantas, fue extraído de suelos supresivos. Los TS se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a 25 °C en condiciones de ausencia de luz. Los resultados de crecimiento medidos se utilizaron para establecer un valor de comparación.

Para este estudio se aisló *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Tae52481 (TA) a partir de muestras de sustrato utilizadas para el cultivo de *Agaricus bisporus* en granjas de hongos. Estas muestras de esporas de hongos se cultivaron de forma similar en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a 25 °C en condiciones de oscuridad. Se registraron los resultados de crecimiento correspondientes. Las suspensiones de esporas para ambas muestras se prepararon utilizando agua destilada estéril. Se alcanzó una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/mL con un hemocitómetro Neubauer.

#### 3.2. Análisis de los atributos promotores del crecimiento de las plantas

De acuerdo con el método de Louden et al. [28], mediante la transferencia de discos de micelio fúngico (5 mm) de cultivo activo al medio de agar Cromo-Azurol S (CAS), se determinó la producción de sideróforos. A las 24, 48 y 72 h se midió el diámetro de la colonia de sideróforos indicativo de halos anaranjados sobre azul.

La producción de ácido indol-3-acético (IAA) se estimó según el procedimiento descrito por Diánez et al. [16]. Se analizaron cinco réplicas independientes de TA y TS. Este proceso se describe como sigue. Se preparó un caldo de peptona de glucosa (GPB) de 50 mL, enmendado

con o sin L-triptófano (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>. Los frascos que contenían este caldo inoculado con TA y TS se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm en condiciones de oscuridad durante 7 días a 25 °C.

Posteriormente, los sobrenadantes de cada matraz, tras ser centrifugados durante 30 minutos a 12,000×g y filtrados a través de membranas Millipore estériles (tamaño de poro 0.22 µm), se recogieron en tubos de ensayo estériles. Para determinar la cantidad de IAA, se realizaron pruebas de densidad óptica y se compararon con una curva estándar de IAA. Tanto para la TA como para la TS, se utilizaron 3 mL del sobrenadante del cultivo y 2 mL (0.5 mol L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> + 98 mL de HClO<sub>4</sub> al 35%) del reactivo de Salkowski y se dejaron durante 30 minutos. La intensidad de la densidad de pigmentación roja resultante se midió a 530 nm utilizando un espectrofotómetro de barrido para cada una de las muestras.

Para determinar la estimación cuantitativa de la solubilización de fosfatos, se siguió una versión modificada del procedimiento de Lima-Rivera [29]. Para ello, frascos de 250 mL de capacidad que contenían 50 mL de caldo de fosfato del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas (NBRIP), inoculados con dos discos de agar de 5 mm de aislados de *Trichoderma* puros, fueron agitados a 100 rpm e incubados a 26 °C durante 3, 5, 7, 10 y 15 días. Como control, el procedimiento se llevó a cabo en frascos sin inocular que contenían el mismo caldo NBRIP. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Utilizando el método de Fiske y Subbarow [30] se estimaron las concentraciones de fosfato en los sobrenadantes del cultivo como fosfato equivalente (µg mL<sup>-1</sup>), se expresaron los valores medios y se analizó el pH. El P total (fosfato) en los frascos fue de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.3. Producción masiva de TA y TS en sustratos sólidos

Se probó una mezcla de dos tipos de sustratos, uno que contenía cáscara de trigo sarraceno (BH) y avena (O), y el otro que contenía BH y arroz (R) para la multiplicación en masa de AT y TS [31]. Diferentes proporciones de BH-O (90-10%, 80-20% y 70-30% v/v) y BH-R (90-10%, 80-20% y 70-30% v/v) se sumergieron en 30% v/v de agua durante 24 h. Cada mezcla se esterilizó durante 1 h a 125 °C dos veces en días consecutivos. Cada mezcla se colocó en una bandeja y se inoculó asépticamente pulverizando 5 mL de suspensión de esporas que contenía 1 × 10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup> de cada aislado. Las bandejas se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad durante 15 días. En total, se extrajeron de las bandejas tres muestras (2 g) del sustrato colonizado por el hongo en cada tratamiento. Las muestras se diluyeron sucesivamente en agua destilada estéril + 0.01% de Tween 20® y se cuantificó el número de conidias g<sup>-1</sup> del sustrato sólido para cada réplica

utilizando un hemocitómetro de Neubauer. Hubo tres réplicas por tratamiento. Las esporas recogidas se utilizaron en los diferentes experimentos realizados en este estudio.

3.4. Análisis de los efectos de la TA y la TS en la germinación de las semillas en condiciones de laboratorio

En este estudio se aplicaron tres tratamientos (control, TA y TS) y cuatro repeticiones siguiendo un diseño experimental de bloques al azar. Para cada repetición de los tres tratamientos se germinaron 50 semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Red Cherry') y de pimiento (*Capsicum annuum* 'Largo de Reus') en dos hojas de papel de filtro Whatman n° 1 humedecidas con agua destilada estéril en placas Petri (150 mm). Estas semillas se esterilizaron primero en la superficie durante 5 minutos con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,5%, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron bajo flujo de aire laminar en papel estéril [16]. La germinación se logró tratando las semillas con 50 µl de suspensión de esporas ( $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup>) de TA, TS o 50 µl de agua estéril (control). Las bandejas se colocaron en una incubadora sin luz a  $25 \pm 1$  °C, 7 días para el tomate y 10 días para las semillas de pimiento. Para cada caja de Petri tratada con una de las tres soluciones (control, TA y TS), se registró el porcentaje de germinación, la longitud de la raíz y la longitud del brote de las semillas de tomate y pimiento. Se calculó el índice de vigor de las semillas (IVS) de la siguiente manera  $IVS (\text{longitud}) = \text{porcentaje de germinación de la semilla} (\text{longitud media de la raíz} + \text{longitud media del brote})$  [32].

3.5. Análisis de los efectos promotores de TA y TS en las plántulas de pimiento y tomate:

## Experimento 1

El siguiente experimento se realizó en otoño utilizando un diseño completamente aleatorio en un vivero comercial (Almería, España). Las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* 'Largo de Reus') y de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Red Cherry') se sembraron en bandejas de poliestireno de vivero de 96 celdas llenas de mezcla de turba comercial (70 mL de volumen) y cubiertas con vermiculita. Las bandejas se trasladaron a un invernadero y se enjuagaron con agua destilada estéril (control), o con una suspensión de esporas de 5 mL (TA o TS) por celda a  $10^5$  esporas por planta, después de un período de 2 días (tomate) o 4 días (pimiento) en una sala de germinación (humedad relativa (HR) = 95%; 25 °C). Se cultivaron cuatro bandejas de plántulas para cada tratamiento en condiciones estándar de cultivo en vivero (18-28 °C;  $75.4 \pm 6.7\%$  HR). A continuación, se seleccionaron al azar 20 plantas por tratamiento y control de las cuatro réplicas a los 45 días de la siembra en las cuatro réplicas. Se midieron diferentes parámetros de

crecimiento: número de hojas, longitud del tallo, diámetro de la base del tallo, área foliar total y peso seco de las raíces, así como el área foliar utilizando el WINDIAS 3.1 de las plantas. La fórmula:  $DQI = TDW / ((LS/D) + SDW/RDW)$  donde TDW es el peso seco total (g), LS es la longitud del tallo (cm), D es el diámetro del tallo (mm), SDW y RDW son el peso seco del tallo y de la raíz (g), respectivamente; se emplearon para determinar el Índice de Calidad de Dickson (DQI) [33].

3.6. Análisis de los efectos de la aplicación de diferentes dosis de TA y TS a los tomates:

## Experimento 2

El procedimiento experimental seguido para el experimento 2 fue similar al descrito para el experimento 1, aunque realizado en invierno. De nuevo, propagadas en sustrato adecuadamente regado según las necesidades climáticas y de cultivo en condiciones comerciales de vivero y suplementadas con un fertilizante comercial de nutrientes complejos, 96 plántulas de tomate por réplica de cuatro fueron tratadas con tres soluciones de suspensión de esporas, cada una con 5 mL de TA, conidias de TS y TA + TS (M) (TA D1, TS D1 y M D1:  $10^5$  esporas  $mL^{-1}$ ; TA D2, TS D2 y M D2:  $10^6$  esporas  $mL^{-1}$ ; y TA D3, TS D3 y M D3:  $10^7$  esporas  $mL^{-1}$ ). Después de 30 días de la siembra, se seleccionaron al azar veinte plantas de cada uno de los tres lotes de tratamiento y del control para la cosecha. Se midieron las plantas y se registraron los datos de los mismos parámetros descritos en el experimento 1. A mediados de febrero se trasplantaron otras 25 plantas a un suelo arenoso y se analizaron a mediados de mayo.

En todos los ensayos, las raíces inoculadas con aislados de *Trichoderma* se recogieron al final de los mismos.

Las raíces se esterilizaron superficialmente en hipoclorito de sodio al 0.1% y se lavaron con agua esterilizada. Los fragmentos de raíz se colocaron en medio PDA para determinar la colonización de la raíz por el aislado fúngico.

3.7. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se presentan como las medias y el error estándar ( $\pm$  SE) para las diferentes réplicas. La separación de medias se realizó mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher. Los datos se probaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) o una prueba t de Student con significación definida como valores p inferiores a 0,05 ( $p < 0.05$ ). Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion 18.

### 3.4 Resultados

#### 4.1. Producción en masa de aislados de *Trichoderma* en sustratos sólidos

Los resultados se resumen en la Tabla 1. Ambos aislados crecieron y esporularon bien en todas las mezclas probadas. La proporción de 70 + 30% para la cáscara de trigo sarraceno y la avena (Figura 1), respectivamente, y de 80 + 20% para la cáscara de trigo sarraceno y el arroz, dio lugar a una producción de esporas significativamente mayor para ambas especies, seguida de 90 + 10% and 70 + 30% of BH + 10% R (Table 1). La tasa de producción de esporas más baja se observó para 80 BH + 20% O.

Tabla 1. Producción masiva de esporas en sustratos sólidos (UFC g-1).

Treatments	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	<i>T. saturnisporum</i>
90% BH + 10% O	$6.65 \cdot 10^8 \pm 3.04 \cdot 10^7$ c	$6.48 \cdot 10^8 \pm 2.84 \cdot 10^7$ c
80% BH + 20% O	$5.63 \cdot 10^8 \pm 3.20 \cdot 10^7$ d	$5.17 \cdot 10^8 \pm 6.60 \cdot 10^7$ d
70% BH + 30% O	$1.04 \cdot 10^9 \pm 1.44 \cdot 10^7$ a	$9.98 \cdot 10^8 \pm 5.69 \cdot 10^7$ a
90% BH + 10% R	$8.32 \cdot 10^8 \pm 1.61 \cdot 10^7$ b	$7.88 \cdot 10^8 \pm 6.45 \cdot 10^7$ b
80% BH + 20% R	$1.04 \cdot 10^9 \pm 1.04 \cdot 10^7$ a	$1.02 \cdot 10^8 \pm 6.26 \cdot 10^7$ a
70% BH + 30% R	$8.00 \cdot 10^8 \pm 5.00 \cdot 10^7$ b	$7.12 \cdot 10^8 \pm 4.25 \cdot 10^7$ bc
p-value	0.0000	0.0000

BH: cáscara de alforfón; O: avena; R: arroz; UFC: unidad formadora de colonias. Los datos se analizaron mediante ANOVA y las medias de los tratamientos se compararon según el procedimiento estadístico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (prueba F a  $p < 0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía ( $p = 0.05$ ).

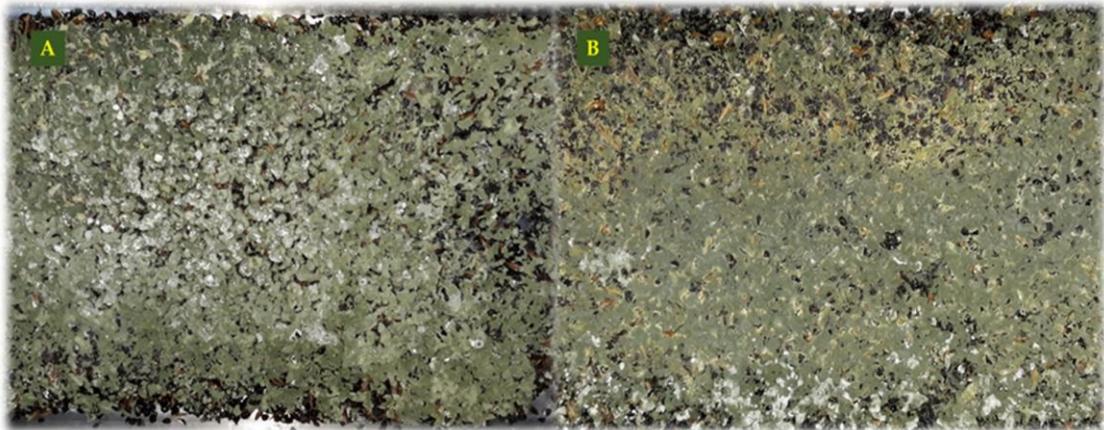


Figura 1. Producción en masa de (A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y (B) *Trichoderma saturnisporum* en 70 + 30% para cáscara de trigo sarraceno y avena.

#### 4.2. Producción de sideróforos, IAA y solubilización de P

La producción de sideróforos de TA y TS se observó en la formación de una zona de color naranja alrededor de las colonias fúngicas a las 24 y 48 h, y la producción de TA fue mayor, en ambos casos. No se detectó un aumento del diámetro del halo (mm) a las 72 h en ningún aislado (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de sideróforos y de IAA por los aislados de *Trichoderma*.

Treatment	Radius of Siderophores Production (mm)			IAA (mg mL <sup>-1</sup> )	
	24 h	48 h	72 h	+Trp	-Trp
<i>p</i> -value	0.0000	0.0000	-	0.0068	0.0304
<i>T. aggressivum</i>	9.73 ± 0.89	18.50 ± 1.70	-	0.145 ± 0.011	0.085 ± 0.009
<i>T. saturnisporum</i>	5.45 ± 0.31	9.82 ± 0.56	-	0.199 ± 0.014	0.129 ± 0.021

Los valores son la media de cinco réplicas; los valores tras ± representan la desviación estándar. IAA: ácido indol-3-acético; +Trp: con L-triptófano; -Trp: sin L-triptófano.

Aunque ambas cepas de *Trichoderma* mostraron una capacidad in vitro de producir IAA en medio suplementado con y sin 100 mg L<sup>-1</sup> de triptófano durante un periodo de 7 días, la producción de *T. saturnisporum* fue mayor en ambas condiciones probadas (Tabla 2). Tanto en TA como en TS, la producción de IAA aumentó en el medio suplementado con triptófano.

Los efectos de la TA y la ST sobre la concentración de fosfato soluble se muestran en la Figura 2. La concentración inicial de P en el medio se utilizó para cuantificar la concentración de P solubilizada por ambos aislados.

Como se muestra en la Figura 2, la solubilización de P fue significativa a partir del quinto día de incubación, sin que hubiera diferencias significativas entre los dos aislados. Además, no se detectó ningún cambio en el pH del medio, que se mantuvo aproximadamente en 6.5-7.

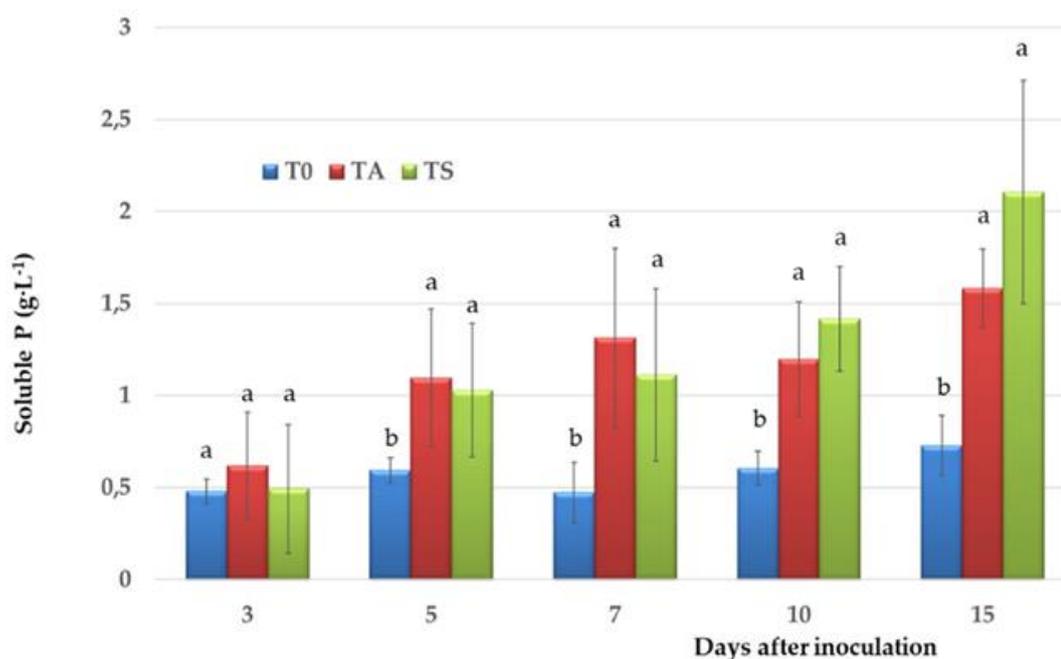


Figura 2. Efectos de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (TA) y *Trichoderma saturnisporum* (TS) sobre la solubilización del fosfato en el caldo del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP) que contiene fosfato cálcico tribásico (10 g). T0: caldo NBRIP sin aislados de *Trichoderma*. Los resultados se muestran como la media de las tres réplicas, en g L<sup>-1</sup>. La desviación estándar media se expresa en la barra de error (n = 3). Para cada aislado, las columnas marcadas con letras diferentes indican una diferencia significativa a  $p < 0.05$ .

#### 4.3. Efectos del tratamiento de TA y TS sobre la germinación y el índice de vigor

Los resultados de la aplicación in vitro de las esporas de TA y TS a las semillas de tomate y pimiento se resumen en la Tabla 3. No se observaron efectos significativos sobre los porcentajes de germinación de las semillas de pimiento y tomate en ninguno de los dos tratamientos. Sin embargo, la aplicación de ambos aislados de *Trichoderma* provocó una disminución de los

parámetros de longitud de la radícula y del hipocótilo (crecimiento) y disminuyó significativamente el IVS en los pimientos. El índice de vigor de las semillas de tomate no se vio afectado por el tratamiento TA o TS ( $p = 0.1918$ ).

Tabla 3. Efectos de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* en la germinación de semillas de tomate y pimiento a los 7 y 10 días del tratamiento, respectivamente.

Treatment	% Germination	Root Length (cm)	Shoot Length (cm)	Seed Vigour Index
Pepper				
p-value	0.5420	0.0126	0.0010	0.0030
<i>T. aggressivum</i>	83 ± 6.83a	0.64 ± 0.18b	1.66 ± 0.55b	138.14 ± 35.48b
<i>T. saturnisporum</i>	80 ± 3.26a	0.91 ± 0.11b	1.29 ± 0.17b	176.50 ± 18.14b
Control	78 ± 4.61a	2.16 ± 1.01a	1.98 ± 0.56a	320.32 ± 83.36a
Tomato				
p-value	0.5268	0.0020	0.3154	0.1918
<i>T. aggressivum</i>	89 ± 6.83a	4.53 ± 0.31a	2.97 ± 0.47a	671.80 ± 112.91a
<i>T. saturnisporum</i>	92 ± 7.30a	3.25 ± 0.37b	2.55 ± 0.27a	536.29 ± 76.26a
Control	85 ± 8.32a	3.95 ± 0.28b	2.81 ± 0.29a	580.13 ± 96.37a

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía ( $p=0.05$ ).

#### 4.4. Efectos de la inoculación de *Trichoderma* en plántulas de tomate y pimiento

Los efectos de la aplicación de TA y TS sobre los parámetros morfológicos y DQI se muestran en la Tabla 4. A diferencia de los resultados de la aplicación directa de ambos *Trichoderma* a las semillas, la aplicación al sustrato incrementó los parámetros de estudio en comparación con el control, y los resultados fueron mejores en pimientos que, en tomates, con plántulas de mejor calidad, según los valores de DQI (Figura 3). No hubo diferencias significativas tras la aplicación de TA y TS en ambas plantas hortícolas. El porcentaje de aumento evaluado en las plántulas de pimiento para cada especie (AT/ET) fue de 8%/8.5% para la longitud del tallo, 12.32/-0.01 para el diámetro del tallo, 7.77/5.5 para el número de hojas, 22.22/25 para el peso seco de los brotes, 36.36/63.63 para el peso seco de las raíces y 13.83/13.74 para el área foliar, respectivamente. En las plántulas de tomate, los porcentajes fueron 9/6 para la longitud del tallo, 0.5/1.5 para el diámetro del tallo, 6/8.8 para el número de hojas, 12.5/5.3 para el peso seco del brote, 0/-6.6 para el peso seco de la raíz y 8/9.2 para el área foliar. No se encontraron diferencias significativas en el DQI de las plántulas de tomate para ningún tratamiento aplicado con respecto al del control.



Figura 3. (A) Crecimiento diferencial de las plántulas de pimiento con *T. aggressivum* f. *europaeum* (TA), en comparación con el control. (B) Plantas de tomate cultivadas en condiciones de trasplante de campo (60 días).

#### 4.5. Efectos de la dosis de aplicación de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum*

Dado que no se encontraron resultados significativos de promoción del crecimiento vegetal en plántulas de tomate, se determinaron los efectos de la aplicación de tres dosis de ambas especies por separado, así como de forma conjunta. Los resultados se recogen en la Tabla 5, donde los valores significativamente superiores a los del control se destacan en verde, y los negativos en rojo, para su mejor visualización.

El incremento de la dosis de ambas especies mejoró la calidad de las plántulas, aumentando todos los parámetros de estudio en los tratamientos TA D2 y TS D3, respecto al control. En el tratamiento TA D2, la longitud del tallo aumentó un 14.37%, el diámetro de la planta un 9.4%, el número de hojas un 21.58%, el peso seco de los brotes un 16.66% y el peso seco de las raíces un 66.66%. En el tratamiento TS D3, la longitud del tallo aumentó un 39.05%, el diámetro de la planta un 15.22%, el número de hojas un 11.55%, el peso seco de los brotes un 12.5% y el peso seco de las raíces un 33.33%. Aunque la mayoría de los tratamientos favorecieron el desarrollo de los brotes de las plántulas, no se encontraron resultados favorables en las raíces; por lo tanto, la calidad de las plántulas no mejoró. La combinación o mezcla de las dos especies para las tres dosis ensayadas no mejoró los resultados respecto a su aplicación por separado.

Los resultados de los parámetros de estudio tras el trasplante de las plántulas al suelo se recogen en la Tabla 5 (Figura 3). Los tres tratamientos, TA D1, TA D2 y TS D2, condujeron a una buena relación entre los brotes y las raíces del tomate, con una calidad de planta significativamente mayor, comparada con la del control, sin una nueva aplicación de *Trichoderma*. Así, el peso seco de los brotes aumentó un 43.20%, 22.84% y 29.58% y el peso seco de las raíces aumentó un 29.94%, 39.32% y 31.51% tras el tratamiento TA D1, TA D2 y TS D2, respectivamente. El establecimiento del hongo endofítico en la raíz (Figura 4) permitió que sus efectos persistieran después del trasplante.

Tabla 4. Parámetros morfológicos e índice de calidad de plántulas de pimiento y tomate tratadas con *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* a los 45 días de la siembra.

Treatment	Length of Stem (cm)	Diameter (mm)	Number of Leaves	Aerial Dry Weight (g)	Root Dry Weight (g)	Leaf Area (mm <sup>2</sup> )	DQI
<u>Pepper</u>							
<i>p</i> -value	0.0000	0.0000	0.0092	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000
<i>T. aggressivum</i>	29.18 ± 1.36a	4.10 ± 0.24a	7.22 ± 0.76a	0.44 ± 0.06a	0.15 ± 0.30b	86.38 ± 12.58a	0.06 ± 0.01a
<i>T. saturnisporum</i>	29.31 ± 1.75a	3.68 ± 0.22b	7.07 ± 0.82a	0.45 ± 0.06a	0.18 ± 0.09a	86.31 ± 13.22a	0.06 ± 0.01a
Control	27.01 ± 2.07b	3.65 ± 0.23b	6.70 ± 0.72b	0.36 ± 0.04b	0.11 ± 0.03c	75.88 ± 11.15b	0.04 ± 0.01b
<u>Tomato</u>							
<i>p</i> -value	0.0000	0.4387	0.0031	0.0232	0.0245	0.0295	0.0793
<i>T. aggressivum</i>	27.93 ± 1.99a	3.86 ± 1.84a	4.45 ± 0.50a	0.63 ± 0.09a	0.15 ± 0.02ab	74.63 ± 10.99a	0.06 ± 0.01a
<i>T. saturnisporum</i>	27.17 ± 1.62a	3.90 ± 0.24a	4.57 ± 0.50a	0.59 ± 0.10ab	0.14 ± 0.02b	75.52 ± 13.40a	0.06 ± 0.01a
Control	25.61 ± 2.07b	3.84 ± 0.26a	4.20 ± 0.46b	0.56 ± 0.10b	0.15 ± 0.02a	69.12 ± 6.96b	0.06 ± 0.00a

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía (p=0.05). DQI: Índice de Calidad de Dickson.

Tabla 5. Parámetros morfológicos y DQI de las plántulas y plantas de tomate tratadas con diferentes dosis (105, 106 y 107 esporas por planta): D1, D2 y D3, respectivamente de *T. aggressivum* f. *europaeum* (TA), *T. saturnisporum* (TS) y la mezcla (M) de las dos especies.

Tomato Seedling						
Treatment	Length of Stem (mm)	Diameter (mm)	N° Leaves	Aerial Dry Weight (g)	Root Dry Weight (g)	DQI
<i>p</i> -value	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TA D1	135.21 ± 28.79de	3.91 ± 0.46ab	4 ± 0.65b	0.27 ± 0.09a	0.03 ± 0.02cd	0.025 ± 0.01de
TA D2	143.80 ± 32.58d	3.81 ± 0.34b	4 ± 0.51b	0.28 ± 0.07a	0.05 ± 0.018a	0.034 ± 0.01a
TA D3	127.02 ± 25.41e	3.76 ± 0.46b	3.98 ± 0.64b	0.27 ± 0.10a	0.04 ± 0.02ab	0.030 ± 0.01ab
TS D1	141.25 ± 19.83d	3.55 ± 0.49c	3.65 ± 0.60cd	0.23 ± 0.10b	0.03 ± 0.01cd	0.024 ± 0.01de
TS D2	188.44 ± 30.29a	4.07 ± 0.33a	4.25 ± 0.73a	0.28 ± 0.07a	0.03 ± 0.01d	0.021 ± 0.01e
TS D3	174.83 ± 27.78b	4.01 ± 0.45a	3.67 ± 0.63cd	0.27 ± 0.09a	0.04 ± 0.02a	0.030 ± 0.01ab
M D1	157.25 ± 29.14c	3.5 ± 0.39c	3.56 ± 0.62de	0.27 ± 0.061a	0.04 ± 0.01bc	0.026 ± 0.00bcd
M D2	99.08 ± 21.02b	3.13 ± 0.23b	3.35 ± 0.39bc	0.28 ± 0.08a	0.04 ± 0.01bcd	0.029 ± 0.00bcd
M D3	98.54 ± 21.37f	3.11 ± 0.45d	3.33 ± 0.63ef	0.18 ± 0.08c	0.04 ± 0.01ab	0.029 ± 0.00abc
Control	125.73 ± 22.3e	3.48 ± 0.31c	3.29 ± 0.62f	0.24 ± 0.07b	0.03 ± 0.01cd	0.025 ± 0.01cde
Tomato Plants						
Treatment	Length of Stem (cm)	Diameter (mm)	Internodes	Aerial Dry Weight (g)	Root Dry Weight (g)	DQI
<i>p</i> -value	0.0000	0.5379	0.0159	0.0015	0.2769	0.5373
TA D1	101.40 ± 15.06ab	12.11 ± 0.90a	15.00 ± 1.15ab	61.19 ± 11.27a	4.99 ± 0.68ab	3.23 ± 0.24a
TA D2	102.80 ± 9.47a	12.11 ± 1.24a	14.10 ± 1.29ab	52.49 ± 11.26	5.35 ± 0.57a	3.20 ± 0.46a
TA D3	92.00 ± 9.82bc	11.26 ± 1.17ab	14.40 ± 0.84abc	54.74 ± 13.09abc	4.70 ± 1.10abc	3.01 ± 0.58ab
TS D1	77.55 ± 7.76e	11.74 ± 1.18ab	13.90 ± 1.37bc	49.26 ± 14.78bcde	4.40 ± 1.04bc	2.91 ± 0.56ab
TS D2	88.75 ± 10.63cd	11.92 ± 1.57ab	15.20 ± 1.03a	55.37 ± 8.24ab	5.05 ± 1.23ab	3.19 ± 0.42a
TS D3	81.00 ± 12.39de	11.58 ± 1.37ab	13.20 ± 2.57c	51.71 ± 7.97abcd	4.34 ± 1.17bc	3.01 ± 0.94ab
M D1	79.05 ± 13.20e	10.87 ± 1.38b	13.90 ± 1.29bc	47.00 ± 11.38bcde	4.14 ± 1.11bc	2.73 ± 0.64ab
M D2	76.18 ± 11.91e	11.61 ± 0.95ab	13.20 ± 1.23c	45.30 ± 9.79cde	4.23 ± 0.99bc	2.85 ± 0.59ab
M D3	78.45 ± 8.08e	11.22 ± 1.18ab	14.30 ± 1.16abc	40.91 ± 11.56e	4.28 ± 1.37bc	2.72 ± 0.86ab
Control	77.96 ± 7.29e	11.52 ± 2.03ab	14.25 ± 1.16abc	42.73 ± 6.46de	3.84 ± 0.62c	2.60 ± 0.43b

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía ( $p=0.05$ ). Verde: favorable, Rojo: desfavorable, Naranja: ningún efecto comparado con el control. DQI: Índice de Calidad de Dickson.

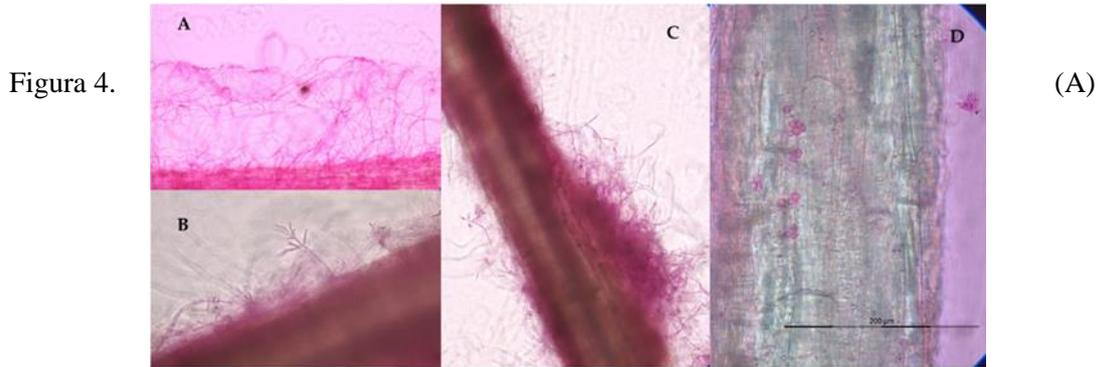


Figura 4. Colonización de raíces de pimienta y tomate por *T. aggressivum* f. *europaeum*. (C) Micelio en raíz de pimienta (100×). (B) Conidióforos y micelio en raíz de tomate (100×). (D) Clamidosporas en raíz de pimienta (200×).

### 3.5 Discusión

Se han descrito numerosas especies de *Trichoderma* como promotoras del crecimiento de las plantas, incluyendo *T. harzianum*, *T. longipile*, *T. tomentosum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. aureoviride* y *T. saturnisporum*, entre otras [34]. Esta capacidad de promover el crecimiento depende de varios factores, como la existencia de aislados de la misma especie que pueden o no promover el crecimiento de la planta o, por ejemplo, el cultivo y/o la variedad a la que se aplica la especie [34]. Asimismo, se ha estudiado y comercializado ampliamente el uso de una mezcla de especies para aumentar esta actividad [10]. En este estudio se analizó la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una nueva especie, *T. aggressivum* f. *europaeum*, que se caracteriza por su rápido crecimiento y esporulación, y se comparó con la de *T. saturnisporum*, especie caracterizada como promotora del crecimiento vegetal por Diánez et al. [16,18]. Aunque Allaga et al. [35] recomiendan no utilizar especies que produzcan la enfermedad del moho verde, estas especies no crean ningún problema en los cultivos hortícolas ni suponen ningún peligro para los cultivos de champiñón, siempre que se apliquen en zonas geográficas diferentes. Además, los hongos se producen en lugares cerrados y en condiciones completamente diferentes. Además, los restos de plantas en producción hortícola no se utilizan para preparar sustratos para el cultivo de hongos, como se ha demostrado en muchas especies comerciales; tampoco se utilizan restos de plantas estudiadas con promotores del crecimiento vegetal, que también pueden causar la enfermedad del moho verde, como *T. harzianum* [36] o *T. longibrachiatum* [37].

El primer objetivo era obtener esporas viables con un alto rendimiento en sustratos de bajo coste. Este producto se utilizó para pruebas adicionales, que demostraron que la composición nutricional de los sustratos utilizados no afectaba a la capacidad bioestimulante de ninguna de las dos especies de *Trichoderma*. Lane [38] determinó que los nutrientes aportados en el medio

podían afectar a la capacidad biocontroladora o bioestimulante del agente. Se han utilizado diferentes sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma*, incluyendo paja de cebada [39], trigo, arroz, granos de maíz [40] o una mezcla de sustratos, como paja de trigo, salvado, yuca, almidón de patata y remolacha azucarera [41,42], entre otros. En general, en nuestro estudio, se evaluaron altos rendimientos, expresados como unidad formadora de colonias (UFC) g<sup>-1</sup>, en todas las mezclas de sustratos probadas; los rendimientos aumentaron tanto en el 80% de cáscara de trigo sarraceno + 20% de arroz como en el 70% de cáscara de trigo sarraceno + 30% de avena. Aunque en las pruebas de laboratorio, la extracción pudo realizarse sin problemas en todas las mezclas, en el tanque extractor, las mezclas que contenían arroz se adhirieron a las paredes y a los tubos, complicando los procesos posteriores de extracción y filtración. Por esta razón, para desarrollar métodos de producción de bajo coste para el escalado industrial, se rechazó el arroz como constituyente del sustrato de producción de TA y TS. En nuestro estudio se demostró una alta producción de sideróforos e IAA y solubilización de P por parte de TA y TS en comparación con otras especies o aislados de *Trichoderma*. Estos tres componentes juegan un papel clave en la bioestimulación de las plantas al aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, como para la producción de hormonas [43,44]. Sin embargo, la relación directa entre la producción de IAA y la promoción del crecimiento de las plantas aún no está clara porque numerosas especies pueden producir IAA, pero no promueven el crecimiento de las plantas [45]. Hoyos et al. [45] concluyeron que la producción de IAA no es una calidad dependiente de la especie de *Trichoderma* y no encontraron ninguna correlación directa entre la bioestimulación y la producción de IAA y sideróforos o la solubilización de P. Por su parte, Vinale et al. [46] destacaron los efectos de la producción de sideróforos (ácido harziano) en la germinación de semillas de tomate y la mejora del crecimiento de las plántulas incluso en condiciones de deficiencia de hierro. Del mismo modo, Qi y Zhao [47] demostraron que la aplicación de *T. asperellum* mejoraba el crecimiento del pepino al inducir una protección fisiológica bajo estrés salino, y sus sideróforos desempeñaban un papel clave en la mitigación de los efectos negativos de la salinidad.

Muchas especies de *Trichoderma* pueden producir IAA, y la alta secreción de IAA en presencia de triptófano indica la importancia del triptófano como precursor para la producción de IAA [48,49]. Gravel et al. [50] reportaron que la producción de IAA inducida por L-triptófano incrementó el peso fresco de los brotes y raíces de tomate. Nuestros resultados indican que el TA y el TS producen cantidades de IAA mucho mayores que las evaluadas por otros autores. Por lo tanto, Saber et al. [48] describieron la producción de IAA de los aislados de *T. harzianum* que eran 10 veces menores que los de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* evaluados en este estudio. Bader et al. [51] informaron que la producción de IAA osciló entre 13.38 y 21.14 µg mL<sup>-1</sup> en *T. brevicompactum*, *T. gamsii* y *T. harzianum*. Diáñez et al. [16] describieron una

producción de IAA para *T. saturnisporum*; por tanto, la capacidad de producción in vitro de IAA se conservó a pesar de mantener el aislado en el laboratorio durante 10 años. Del mismo modo, la solubilización de fosfatos por parte de las especies de *Trichoderma* se ha descrito tanto in vitro como in vivo [52-54]. Recientemente, Tandon et al. [55] evaluaron la solubilización de P de diferentes aislados de *Trichoderma koningiopsis* bajo condiciones de estrés abiótico y determinaron un rango de 1.6 a 71  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Bononi et al. [12] encontraron que *Trichoderma* aislado de suelos de la selva amazónica demostró un alto potencial de solubilización de fosfato, que varió de 51.7 a 90.3% 10 días después de la inoculación. A pesar de su alta capacidad de solubilización de P, algunos de estos aislados inhibieron la germinación de las semillas de soja. En nuestro estudio, el rango de solubilización de P de ambos aislados fue el más bajo en el décimo día de incubación, con un 5.9% y un 6.16% para TA y TS, respectivamente.

La aplicación de PGPM a las semillas permite utilizar una menor concentración de esporas, al tiempo que garantiza que los PGPM sean fácilmente accesibles en la germinación y durante las primeras etapas de desarrollo de la planta, estimulando un establecimiento sano y rápido y, en consecuencia, maximizando la producción del cultivo [43]. Sin embargo, la aplicación directa de diferentes aislados o especies de *Trichoderma* a las semillas (bioimprimación) no siempre ha tenido efectos beneficiosos. En este estudio, la tasa de germinación de las semillas no se vio afectada por *T. aggressivum* f. *europaeum* o *T. saturnisporum*. Azarmi et al. [18] obtuvieron resultados similares tras después de aplicar aislados de *T. harzianum* a las semillas de tomate. Hajieghrari et al. [56] demostraron que la exposición directa de las semillas de maíz a las esporas de *Trichoderma* disminuía el porcentaje de germinación de las semillas, así como la longitud de las radículas y los brotes. Sin embargo, You et al. [57] demostraron que los aislados de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* mejoraban significativamente el índice de vigor de las semillas de tomate cuando se utilizaban para tratarlas. Nuestros resultados demostraron que la aplicación directa de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* disminuyó el vigor de las semillas, de forma significativa en pimientos pero no en tomates. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las dos especies en condiciones de vivero comercial, a través del riego del sustrato, mejoró de forma similar la calidad de las plántulas de pimiento de forma significativa, aunque de nuevo no fue significativa para los tomates. La optimización de la dosis de aplicación para cada especie es un factor que debería considerarse, entre otros, para que las empresas y los productores puedan adoptar esta tecnología con mayor seguridad [58]. El aumento de la dosis de *T. aggressivum* f. *europaeum* y *T. saturnisporum* aplicada a las plántulas de tomate aumentó la mayoría de los parámetros de estudio, así como el valor del DQI en los tratamientos TA D2, TA D3 y TS D3. El establecimiento endofítico de *Trichoderma* en los viveros puede asegurar su colonización una vez trasplantado. Así, en el tratamiento TA D2, las plantas de tomate siguieron mostrando una mejor calidad, sin ninguna aplicación adicional de *Trichoderma*, y la calidad de las plantas mejoró en

otros tratamientos con *Trichoderma* aplicado por separado. Los resultados más pobres se obtuvieron para las mezclas de ambas especies, sin que se produjera una mejora en los parámetros de estudio para ninguna de las dosis ensayadas, e incluso una reducción del 21.62%, 10.63% y 25% en la longitud del tallo, el diámetro y el peso seco de los brotes de las plántulas de tomate en el tratamiento MD3, respectivamente. Resultados similares fueron encontrados por Liu et al. [59], quienes reportaron que la combinación de tres especies, *T. afroharzianum*, *T. pseudoharzianum* y *T. asperelloides*, disminuyó los efectos de biocontrol y de promoción del crecimiento en comparación con la aplicación de cada especie por separado.

Aunque en la actualidad es difícil reducir de forma importante el uso de fertilizantes químicos sin que se produzcan pérdidas de producción en muchos sistemas agrícolas, su disminución gradual acompañada del uso de bioestimulantes o biofertilizantes es una herramienta que puede optimizar el uso de insumos químicos a la vez que reduce la contaminación ambiental y la de los cultivos alimentarios.

### 3.6 Conclusiones

El presente estudio ha demostrado, por primera vez, la capacidad bioestimulante de *T. aggressivum* f. *europaeum* en plantas de pimiento y tomate en condiciones de vivero comercial e invernadero, con resultados similares a los de *T. saturnisporum*.

### 3.7 Bibliografía

1. Sánchez-Montesinos, B.; Diáñez, F.; Moreno-Gavira, A.; Gea, F.J.; Santos, M. Plant growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* by saline tolerant *Trichoderma* isolates under salinity stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2053.
2. Khoshmanzar, E.; Aliasgharzad, N.; Neyshabouri, M.R.; Khoshru, B.; Arzanlou, M.; Asgari Lajayer, B. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2020**, *17*, 869–878.
3. Adnan, M.; Islam, W.; Shabbir, A.; Khan, K.A.; Ghramh, H.A.; Huang, Z.; Chen, H.Y.H.; Lu, G. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microb. Pathog.* **2019**, *129*, 7–18.
4. Halifu, S.; Deng, X.; Song, X.; Song, R. Effects of Two *Trichoderma* Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var.

mongolica Annual Seedlings. *Forests* **2019**, *10*, 758.

5. Vargas, W.A.; Crutcher, F.K.; Kenerley, C.M. Functional characterization of a plant-like sucrose transporter + from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytol.* **2010**, *189*, 777–789.

6. Garnica-Vergara, A.; Barrera-Ortiz, S.; Muñoz-Parra, E.; Raya-Gonzalez, J.; Mendez-Bravo, A.; Macias-Rodriguez, L.; Ruiz-Herrera, L.F.; Lopez-Bucio, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytol.* **2016**, *209*, 1496–1512.

7. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56.

8. Shores, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 21–43.

9. Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **2012**, *158*, 17–25.

10. López-Bucio, J.; Pelagio-Flores, R.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 109–123.

11. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. Biostimulant activity of *Trichoderma saturnisporum* in melon (*Cucumis melo*). *Hortscience* **2018**, *53*, 810–815.

12. Bononi, L.; Chiamonte, J.B.; Pansa, C.C.; Moitinho, M.A.; Melo, I.S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* pp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2858.

13. Yuan, M.; Huang, Y.; Ge, W.; Jia, Z.; Song, S.; Zhang, L.; Huang, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 144–157.

14. Sanjeev, K.; Manibhushan, T.; Archana, R. *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Afr. J. Agric. Res.* **2014**, *9*, 3838–3852.
15. Khan, M.R.; Mohiddin, F.A. *Trichoderma*: Its Multifarious Utility in Crop Improvement. In *Crop Improvement through Microbial Biotechnology. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Aligarh Muslim University: Aligarh, India; Srinagar, India, 2018; Volume 13, pp. 263–291.
16. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1934–1944.
17. Rocha, I.; Ma, Y.; Souza-Alonso, P.; Vosátka, M.; Freitas, H.; Oliveira, R.S. Seed coating: A tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1357.
18. Azarmi, R.; Hajieghrari, B.; Giglou, A. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 5850–5855.
19. Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.A.; Kenerley, C.M.; Monte, E.; Mukherjee, P.K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I.V.; Kubicek, C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 749–759.
20. Bimenya, G.S.; Kaviri, D.; Mbona, N.; Byarugaba, W. Monitoring the severity of iodine deficiency disorders in Uganda. *Afr. Health Sci.* **2002**, *2*, 63–68.
21. Berg, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biot.* **2009**, *84*, 11–18.
22. Samuels, G.J.; Dodd, S.L.; Gams, W.; Castlebury, L.A.; Petrini, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **2002**, *94*, 147–170.
23. Largeteau, M.L.; Savoie, J.M. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: Biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *App.*

*Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 63–73.

24. Krupke, O.A.; Castle, A.J.; Rinker, D.L. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **2003**, *102*, 1467–1475.

25. Guthrie, J.L.; Castle, A.J. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *96*, 961–967.

26. Hatvani, L.; Antal, Z.; Manczinger, L.; Szekeres, A.; Druzhinina, I.S.; Kubicek, C.P.; Nagy, A.; Nagy, E.; Vagvolgyi, C.; Kredics, L. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* **2007**, *97*, 532–537.

27. Sharma, V.; Shanmugam, V. Unraveling the multilevel aspects of least explored plant beneficial *Trichoderma saturnisporum* isolate GITX-Panog. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *152*, 169–183.

28. Louden, B.C.; Harmann, D.; Lynne, A.M. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J. Microbiol. Biol. Educ.* **2011**, *12*, 51–53.

29. Lima-Rivera, D.L.; Lopez-Lima, D.; Desgarenes, D.; Velázquez-Rodríguez, A.S.; Carrion, G. Phosphate solubilization by fungi with nematicidal potential. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2016**, *16*, 507–524.

30. Fiske, C.H.; Subbarow, Y. The colorimetry determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* **1925**, *66*, 375–400.

31. Moreno-Gavira, A.; Diánez, F.; Sánchez-Montesinos, B.; Santos, M. *Paecilomyces variotii* as a plant-growth promoter in horticulture. *Agronomy* **2020**, *10*, 597.

32. Murali, M.; Amruthesh, K.N.; Sudisha, J.S.; Niranjana, R.; Shetty, H.S. Screening for plant growth promoting fungi and their ability for growth promotion and induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *J. Phytol.* **2012**, *4*, 30–36.

33. Dickson, A.; Leaf, A.L.; Hosner, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine

seedling stock in nurseries. *Forest Chron.* **1960**, *36*, 10–13.

34. Stewart, A.; Hill, R. Applications of *Trichoderma* in Plant growth promotion. In *Biology and Applications of Trichoderma*; Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M., Schmoll, M., Eds.; CABI: Wallingford, CT, USA, 2013; pp. 415–425.

35. Allaga, H.; Bóka, B.; Poór, P.; Nagy, V.D.; Szuzs, A.; Stankovics, I.; Takó, M.; Manczinger, L.; Vágvölgyi, C.; Kredics, L.; et al. Composite Bioinoculant Based on the Combined Application of Beneficial Bacteria and Fungi. *Agronomy* **2020**, *10*, 220.

36. Wang, G.; Cao, X.; Ma, X.; Guo, M.; Liu, C.; Yan, L.; Bian, Y. Diversity and effect of *Trichoderma* spp. Associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *Microbiologyopen* **2016**, *5*, 709–718.

37. Zhang, T.; Lu, M.Z.; Zhang, C.L.; Xu, J.Z. First Report of *Trichoderma longibrachiatum* Causing Green Mold Disease on *Ganoderma lingzhi*. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 156.

38. Lane, B.S.; Trinci, A.P.J.; Gillespie, A.T. Influence of culture conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycol. Res.* **1991**, *95*, 829–833.

39. Serna-Díaz, M.G.; Mercado-Flores, Y.; Jiménez-González, A.; Anducho-Reyes, M.A.; Medina-Marín, J.; Seck Tuoh-Mora, J.C.; Téllez-Jurado, A. Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *26*, e00445.

40. Flodman, H.R.; Noureddini, H. Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distiller grain with *Trichoderma reesei*. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *81*, 24–28.

41. Deschamps, F.; Giuliano, C.; Asther, M.; Huet, M.C.; Roussos, S. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 1385–1388.

42. Michel-Aceves, A.C.; Otero-Sánchez, M.A.; Martínez-Rojero, R.D.; Rodríguez-Morán, N.L.; Ariza-Flores, R.; Barrios-Ayala, A. Producción masiva de *Trichoderma harzianum*

- Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **2008**, *14*, 185–191.
43. Zhang, F.G.; Yuan, J.; Yang, X.M.; Cui, Y.Q.; Chen, L.H.; Ran, W.; Shen, Q.R. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indoleacetic acid and plant colonization. *Plant Soil* **2013**, *368*, 433–444.
44. Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Phys.* **2009**, *149*, 1579–1592.
45. Hoyos-Carvajal, L.; Orduz, S.; Bissett, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol. Control.* **2009**, *51*, 409–416.
46. Vinale, V.; Nigro, M.; Sivasithamparam, K.; Flematti, G.; Ghisalberti, E.L.; Ruocco, M.; Varlese, R.; Marra, R.; Lanzuise, S.; Eid, A.; et al. Harzianic acid: A novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *347*, 123–129.
47. Qi, W.; Zhao, L. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53*, 355–364.
48. Saber, W.I.A.; Ghoneem, K.; Rashad, Y.M.; AlAskar, A.A. *Trichoderma Harzianum* WKY1: An indole acetic acid producer for growth improvement and anthracnose disease control in sorghum. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2017**, *27*, 654–676.
49. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Woo, S.L.; Nigro, M.; Marra, R.; Lombardi, N.; Pascale, A.; Ruocco, M.; Lanzuise, S.; et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* **2014**, *8*, 127–139.
50. Gravel, V.; Antoun, V.; Tweddell, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indoleacetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* **2007**, *39*, 1968–1977.
51. Bader, A.N.; Salerno, G.L.; Covacevich, F.; Consolo, V.F. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. King Saud Univ.-*

*Sci.* **2020**, *32*, 867–873.

52. Altomare, C.; Norvell, W.A.; Bjorkman, T.G.; Harman, E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2926–2933.

53. Kapri, A.; Tiwari, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 787–795.

54. Tandon, A.; Fatima, T.; Gautam, A.; Yadav, U.; Srivastava, S.; Singh, P.C. Effect of *Trichoderma koningiopsis* on chickpea rhizosphere activities under different fertilization regimes. *Open J. Soil Sci.* **2018**, *8*, 261–275.

55. Tandon, A.; Fatima, T.; Shukla, D.; Tripathi, P.; Srivastava, S.; Singh, P.C. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *J. King Saud Univ.-Sci.* **2020**, *32*, 791–798.

56. Hajieghrari, B. Effects of some Iranian *Trichoderma* isolates on maize seed germination and seedling vigor. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 4342–4347.

57. You, J.; Zhang, J.; Wua, M.; Yang, L.; Chen, W.; Li, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biol. Control* **2016**, *101*, 31–38.

58. Diniz, K.A.; Silva, P.A.; Oliveira, J.A.; Evangelista, J.R.E. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. *Sci. Agric.* **2009**, *66*, 293–297.

59. Liu, B.; Jib, S.; Zhang, H.; Wang, Y.; Liu, Z. Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. *Microbiol. Res.* **2020**, *235*, 126445.



# Capítulo 4. Control biológico de enfermedades fúngicas por *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y su compatibilidad con fungicidas.



Article

## Biological Control of Fungal Diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and Its Compatibility with Fungicides

Brenda Sánchez-Montesinos <sup>1</sup>, Mila Santos <sup>1,\*</sup>, Alejandro Moreno-Gavira <sup>1</sup>, Teresa Marín-Rodulfo <sup>1</sup>, Francisco J. Gea <sup>2</sup> and Fernando Diáñez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agronomía, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería, 04120 Almería, Spain; brensam@hotmail.com (B.S.-M.); alejanmoga@gmail.com (A.M.-G.); tere\_rodu@hotmail.com (T.M.-R.)

<sup>2</sup> Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey, 16220 Cuenca, Spain; fgea.cies@dipucuenca.es

\* Correspondence: msantos@ual.es (M.S.); fdianez@ual.es (F.D.); Tel.: +34-628188339 (M.S.)

#### 4.1 Resumen

Nuestro propósito fue evaluar la capacidad de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* como agente de control biológico contra enfermedades de fitopatógenos fúngicos. Se obtuvieron doce aislamientos de *T. aggressivum* f. *europaeum* se obtuvieron de varios sustratos utilizados para el cultivo de *Agaricus bisporus* procedentes de explotaciones de Castilla-La Mancha (España). Se determinaron las tasas de crecimiento de los 12 aislados y se analizó su actividad antagonista in vitro frente a *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani* f. *cucurbitae*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Mycosphaerella melonis*, y todos los aislados presentaron altas tasas de crecimiento. *T. aggressivum* f. *europaeum* mostró una elevada actividad antagonista para diferentes fitopatógenos, superior al 80%, excepto para *P. aphanidermatum*, con un 65% aproximadamente. El aislado más eficaz, *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1, inhibió el crecimiento de *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* y *M. melonis* en un 100% en el ensayo de hojas desprendidas e inhibió la germinación de los esclerocios de *S. sclerotiorum*. La incidencia y la gravedad de la enfermedad en los ensayos de plantas para los patosistemas oscilaron entre el 22% para *F. solani* y el 80% para *M. melonis*. Este aislado redujo la incidencia de *Podosphaera xanthii* en las hojas de calabacín en un 66,78%. La alta compatibilidad de este aislado con los fungicidas podría permitir su uso en combinación con diferentes estrategias de manejo de plagas. En base a los resultados, *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 debería ser considerado para estudios en invernaderos comerciales como agente de control biológico.

**Palabras clave:** control biológico; *Trichoderma*; hongos fitopatógenos; enfermedades; fungicidas

#### 4.2 Introducción

En las últimas décadas, el uso de microbios promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) y de agentes de control biológico microbiano (MBCA) ha aumentado considerablemente en la agricultura, principalmente porque los consumidores y los productores están interesados en reducir los residuos de pesticidas orgánicos sintéticos y de fertilizantes químicos en los alimentos, y en reducir el impacto medioambiental de la producción agrícola. El amplio uso de plaguicidas sintéticos desde 1945 ha provocado problemas medioambientales a largo plazo [1] y altos riesgos para la salud de los seres humanos [2]. Cada año se utilizan entre 3 y 4.6 millones de toneladas de plaguicidas, y el uso intensivo mundial de fertilizantes químicos fue de unos 109.1, 45.5 y 37.6 millones de toneladas de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O, respectivamente, en 2017 (un aumento medio del 35.9% desde 2002) [3-5]; pone en peligro directamente el suelo y las fuentes de agua, causa

contaminación ambiental [6] e inflige enfermedades a niveles alarmantes [7]. Por lo tanto, la agricultura sostenible se logrará mediante estrategias de gestión biológica de plagas y fertilizantes; ambas son soluciones alternativas más naturales y respetuosas con el medio ambiente para gestionar la producción de cultivos con un uso reducido de pesticidas y fertilizantes.

Entre los numerosos microbios utilizados como PGPM o MBCA (también denominados probióticos), las cepas bacterianas o fúngicas son las más utilizadas contra los agentes causales de las enfermedades aéreas y del suelo en las plantas. Sin embargo, *Trichoderma* sigue siendo el estándar de oro del control biológico. Numerosas especies de este género, como *T. harzianum* Rifai; *T. viride* Pers; *T. atroviride* P. Karst; *T. virens* J.H. Mill, Giddens y A.A. Foster; *T. longibrachiatum* Rifai; *T. polysporum* Rifai; *T. stromaticum* Samuels y Pardo-Schulth; *T. hamatum* Bainier; *T. asperellum* Samuels, Lieckf y Nirenberg; *T. citrinoviride* Bissett; *T. saturnisporum* Hammill; *T. aggressivum* Samuels y W. Gams han sido descritas como agentes de control biológico (ACB) contra fitopatógenos [8-24]. Varios estudios han demostrado que las especies de este género presentan la mayoría de los mecanismos identificados en el control biológico, a saber, la competencia por los recursos (espacio y nutrientes) [25], la producción y excreción de metabolitos (antibióticos, enzimas que degradan la pared celular, sideróforos) [26-30], el micoparasitismo sobre los hongos fitopatógenos [31] y la inducción de respuestas de defensa (resistencia sistémica adquirida, resistencia sistémica inducida y respuesta hipersensible) [32-37]. Entre ellos, la competencia, el mico parasitismo y la producción de compuestos antifúngicos se consideran los mecanismos más importantes [38,39]. El micoparasitismo se basa en el reconocimiento, la unión y la ruptura de la pared celular del hongo hospedador por parte de numerosas enzimas, principalmente quitinolíticas y glucanolíticas [28,40]. Como resultado del micoparasitismo, muchas especies de *Trichoderma*, incluyendo las indicadas anteriormente, han sido identificadas como agentes causantes de la enfermedad conocida como moho verde en los cultivos de hongos en diferentes países [41-47]. Se han detectado *T. pleurotum* y *T. pleuroticola* en *P. ostreatus* [48], *T. aggressivum* en *Agaricus bisporus* [49], y *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Trichoderma ghanense*, *T. asperellum* y *T. atroviride* en sustratos de compost de *Agaricus* y *Pleurotus*, aunque no son particularmente agresivos [41]. Una de estas especies, *T. aggressivum* f. *europaeum* Samuels & W. Gams, anteriormente conocida como *T. harzianum* Th2 biotipo, es responsable de los problemas de moho verde de *Agaricus* en Europa [50]. El enrollamiento de las hifas y la formación de estructuras similares a los apresorios se asocia normalmente con el micoparasitismo de las especies de *Trichoderma* [32]. Sin embargo, este tipo de interacción entre *T. aggressivum* y *A. bisporus* se ha observado raramente [51]. Su mecanismo de acción más exitoso es su tolerancia competitiva al efecto inhibitorio de numerosas bacterias y hongos, lo que explica su rápido crecimiento y esporulación [52,53], aunque *T. aggressivum*

puede considerarse un micopatógeno dado su efecto sobre las hifas de *A. bisporus*, así como su inducción de una respuesta de estrés oxidativo [54]. O'Brien et al. [55] informaron de un cambio en la producción de proteínas intracelulares en presencia de *A. bisporus* directamente relacionado con la tolerancia al estrés, la señalización celular, la longevidad y la estructura. Estas funciones pueden ser parte de la capacidad de *T. aggressivum* para desplazar a *A. bisporus* y disminuir el rendimiento del hongo. Crece rápidamente ( $1 \text{ mm h}^{-1}$ ) a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , produciendo una capa algodonosa de micelio aéreo. La esporulación comienza sólo después de 4 d y se produce en la zona central, en bandas verdes concentradas. Esta especie compite eficazmente por el espacio y los nutrientes, y produce enzimas extracelulares, metabolitos secundarios tóxicos y compuestos orgánicos volátiles, lo que provoca drásticas pérdidas en los cultivos.

Al igual que otras *Trichoderma*, esta especie puede considerarse un agente de control biológico o un promotor del crecimiento de la planta. Así, Ordaz-Ochoa et al. [56] describieron la inhibición del crecimiento micelial en cultivos duales de diferentes aislados de *Armillaria* spp. del aguacate por parte de *T. aggressivum*. Recientemente, Sánchez-Montesinos et al. [24] destacaron la capacidad de *T. aggressivum* f. *europaeum* para promover el crecimiento de la planta de melón en condiciones salinas. Estos autores también informaron del control del damping-off causado por *Pythium ultimum* en plántulas de melón después de aplicar *T. aggressivum* f. *europaeum*, reduciendo la severidad de la enfermedad en un 63%. Rodríguez et al. [57] aislaron e identificaron a *T. aggressivum* como micoparásito de la roya del café causada por *Hemileia vastatrix*, que fue descrita por primera vez en los trópicos. Este beneficio también se ha observado en la germinación y el desarrollo de plántulas de tomate y pimiento, lo que ha supuesto un aumento del peso seco de las raíces en un 66.66% y un 36.36%, respectivamente [58]. Del mismo modo, Lee et al. [59] han informado de la promoción del crecimiento de *Arabidopsis* a través de los compuestos volátiles producidos por *T. aggressivum*, con un aumento del 37.1% en el peso fresco de los brotes y un 82.5% en clorofila. Sin embargo, se sabe poco sobre el papel que *T. aggressivum* puede desempeñar en la lucha contra diferentes fitopatógenos tanto in vitro como in vivo.

Por lo tanto, los principales objetivos de este estudio son (a) aislar y seleccionar cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* (TAE), obtenidas de sustratos de cultivos de *A. bisporus* y de carpóforos con moho verde, (b) determinar la actividad antagónica in vitro de los aislados de TAE contra diferentes fitopatógenos de interés en la agricultura, (c) evaluar la capacidad in vivo para controlar el desarrollo de la enfermedad causada por los fitopatógenos en diferentes patosistemas en condiciones de invernadero, y (d) determinar la compatibilidad de TAE con diferentes fungicidas comúnmente utilizados para controlar las enfermedades fúngicas.

### 4.3 Materiales y métodos

#### 3.1. Aislamiento e identificación de los aislados de *Trichoderma*

Se obtuvieron un total de 12 aislados de explotaciones de champiñón situadas en Castilla-La Mancha (España) que presentaban síntomas de la enfermedad del moho verde (Figura 1). Los aislados se mantuvieron en medio de agar papa dextrosa (PDA) a 25 °C en la oscuridad y se caracterizaron taxonómicamente y molecularmente. La morfología de los conidióforos se examinó mediante microscopía óptica y fue consistente con el género *Trichoderma* (Figura 1).

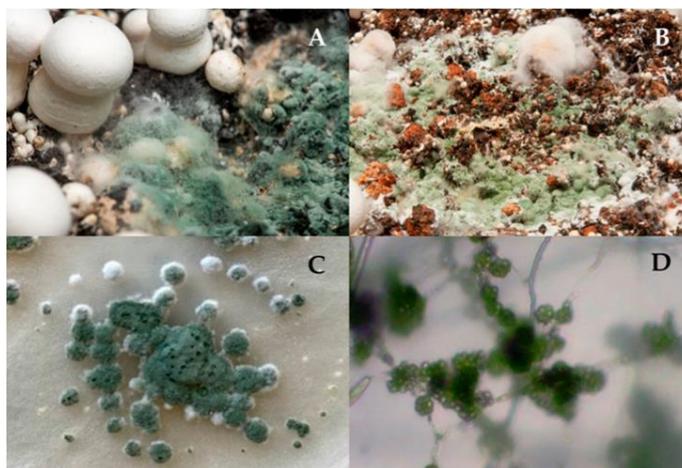


Figura 1. Moho verde en la capa de envoltura y en el hongo (A, B). Aislado de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1: Cultivo (C) y conidióforos (D).

La identificación molecular se realizó siguiendo el procedimiento de Carrasco et al. [60]. La secuenciación de la región de ADNr, incluyendo los espaciadores ITS1 e ITS2 y el ADNr 5.8S, se realizó mediante secuenciación automatizada de ADN con terminadores fluorescentes utilizando un secuenciador ABI 377 Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) por el Servicio Técnico de la Universidad de Almería. Se utilizó el software de análisis ChromasPro® (Technelysium Pty. Ltd., Tewantin, Australia) para editar cada muestra de secuencia. Las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en la base de datos GenBank (NCBI) mediante búsquedas MegaBLAST para su identificación [61,62]. Las secuencias se depositaron en la base de datos EMBL.

#### 3.2. Crecimiento de los aislados de *Trichoderma* en PDA

El crecimiento de cada aislado se evaluó in vitro colocando un tapón de 5 mm del borde de un cultivo de PDA puro de 7 días, a 0.5 cm del borde de la placa de Petri. Los aislados se incubaron

en una cámara de crecimiento a 25 °C en la oscuridad. Los diámetros de las colonias fueron registrados cada día durante el cultivo. El experimento fue completamente aleatorio con cinco réplicas.

### 3.3. Prueba de doble cultivo

Los aislados de *Trichoderma* fueron examinados por su antagonismo contra *B. cinerea* Pers, *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *F. solani* f. *cucurbitae* W.C. Snyder & H.N. Hansen, *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *R. solani* J.G. Kühn y *M. melonis* (Pass.) adoptando el ensayo de confrontación de Santos et al. [63]. Se prepararon cajas de Petri (9 cm de diámetro) que contenían 17 mL de PDA (Bioxon, Becton Dickinson, México). A continuación, se cortaron tapones de 0.5 cm de micelio de todos los hongos del borde de crecimiento de cultivos de siete días con crecimiento activo de cada aislado. Los tapones se colocaron en los extremos de las placas Petri con una distancia de 7.5 cm entre los dos hongos, antagonista-fitopatógeno. Todas las placas se sellaron con Parafilm® y se cubrieron en la oscuridad a 25 °C durante 3 a 10 días. Se midió diariamente el crecimiento radial de las colonias de hongos. Los resultados se transformaron en porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio (PIRM: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno, R1: crecimiento radial del patógeno en placas de control, R2: crecimiento radial del patógeno en placas de doble cultivo). Estas pruebas se realizaron por quintuplicado. Las zonas de encuentro entre el antagonista y el patógeno se observaron también mediante microscopía óptica y microscopía de barrido electrónico de criofractura (criosem) según el procedimiento de Diánez et al. [23]. Para las pruebas posteriores se seleccionó sólo un aislado, es decir, el que presentaba una mayor tasa de crecimiento, así como una mayor capacidad antagonista frente a un mayor número de fitopatógenos.

### 3.4. Bioensayo de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos

Se determinaron los efectos de inhibición in vitro de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 contra diferentes hongos fitopatógenos. Para ello, se cortó un disco (de 0.5 cm de diámetro) de los bordes de crecimiento activo de las placas TAET1 y se colocó a una distancia de 0,5 cm del borde en una mitad de una placa dividida que contenía medio PDA. Tras un periodo de incubación de 48 horas a  $25 \pm 1$  °C, se colocaron tapones de micelio de 0,5 cm para cada patógeno en la otra mitad de la placa dividida, que contenía PDA, y las placas se envolvieron inmediatamente en Parafilm®. Las mediciones del crecimiento radial del micelio se realizaron diariamente para los hongos de crecimiento rápido (*B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *P. aphanidermatum* y *R. solani*) y cada 2 días para los de crecimiento más lento (*M.*

*melonis* y *F. solani*) hasta alcanzar el borde de la placa [23]. El experimento se realizó cinco veces con cinco réplicas.

### 3.5. Ensayo de hoja desprendida

Los efectos supresores de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 sobre *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* y *M. melonis* se evaluaron mediante un ensayo de hoja desprendida, tal y como describen Novak et al. [64] y Patial et al. [65]. Las hojas de las plántulas de pepino (variedad, Super Marketer, Mascarell), pimiento (var. Pimiento del Padrón, Mascarell) y tomate (var. Red Cherry, Fitó) se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 30 s y se lavaron dos veces para eliminar los residuos. Las hojas se sumergieron durante 3 minutos en una solución que contenía esporas TAET1 a una dosis de  $10^6$  esporas·mL<sup>-1</sup> o se sumergieron en una solución acuosa que contenía el fungicida Switch (ciprodinil 37.5% y fludioxonil 25% (WG) p/p; Syngenta, Basilea, Suiza) a 600 ppm para comparar la eficacia. Las hojas enteras o los fragmentos se colocaron en papel de filtro húmedo en bandejas de plástico, y el centro de la hoja o del fragmento de hoja se pinchó cuidadosamente con una aguja esterilizada. En el lugar de la punción se colocó un disco de 0.5 cm que contenía el patógeno correspondiente. A continuación, se incubaron las placas de Petri a 25 °C y se contó el número de hojas con síntomas y se fotografió 72 horas después de la inoculación. Este experimento se repitió dos veces.

### 3.6. Degradación de esclerocios de *Sclerotinia Sclerotiorum* por *T. aggressivum* f. *europaeum*

Se evaluó la eficacia de TAET1 para colonizar y destruir esclerocios en el suelo. El suelo humedecido hasta su capacidad de campo se esterilizó a 120 °C durante 60 minutos dos veces en dos días consecutivos. Los esclerocios se desinfectaron con NaOCl al 1% durante 2 minutos. Se mezclaron cinco esclerocios (0.5-1 cm) con la tierra y se transfirieron a una placa de Petri. Los cultivos de TAET1 se cultivaron en PDA durante 7 d. El suelo se infestó con un tapón de 0.5 cm colocado en la superficie del suelo. Las placas se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad. Después de 25 d, se recuperaron los esclerocios del suelo y se enjuagaron en agua del grifo. Se determinó el número de esclerocios recuperados y la presencia de micelio blanco en su superficie. El experimento se realizó dos veces con cinco replicados.

### 3.7. Compatibilidad de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 con fungicidas

La compatibilidad in vitro de TAET1 con diferentes fungicidas seleccionados (Tabla 1) para la inhibición del crecimiento micelial se estableció utilizando la técnica del alimento

envenenado [66,67]. La dosis mínima recomendada (D2), la dosis máxima recomendada (D3),  $0.5 \times D2$  y  $1.5 \times D3$  (Tabla 1) de cada fungicida. Utilizando un sacabocados estéril, se cortaron discos de micelio (de 0,5 cm de diámetro) de cultivos fúngicos de siete días de edad que estaban en crecimiento activo y se colocaron en el centro de una placa de Petri que contenía PDA suplementado con varios pesticidas. Se utilizaron cinco réplicas por tratamiento. Los efectos fungicidas o fungistáticos de cada fungicida se determinaron transfiriendo el disco inicial de TAET1, que no creció con el fungicida, a una placa de PDA sin fungicida.

La toxicidad, es decir, la compatibilidad de TAET1 y el fungicida, se clasificó utilizando la escala de la Organización Internacional de Control Biológico (OILB) [68]. Esta clasificación agrupa la compatibilidad entre los microorganismos y los fungicidas en función de la proporción de inhibición en comparación con un control (<30%: inocuo; 30-75%: ligeramente tóxico; 75-90%: moderadamente tóxico; >90%: tóxico).

### 3.8. Evaluación de *T. aggressivum* f. *europaeum* sobre la gravedad de siete fitopatógenos

Se determinó el efecto de biocontrol de TAET1 sobre diferentes patógenos: *B. cinerea*-melón, *S. sclerotiorum*- pimiento, *R. solani*-tomate, *F. solani*-calabacín, *P. aphanidermatum*-melón, *M. melonis*-melón y *P. xanthii*-calabacín.

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito al 2% durante 3 minutos y se lavaron a fondo con agua del grifo para eliminar los residuos. Posteriormente, las semillas se sembraron en macetas de 500 mL con una mezcla de turba comercial, a razón de una semilla por maceta.

A continuación, se añadieron 5 mL de suspensión de esporas de TAET1 en cada maceta a razón de  $1-10^6$  propágulos/planta; los tratamientos de control recibieron 5 mL de agua. Para evaluar las enfermedades de las partes aéreas, se realizó una pulverización foliar a la misma dosis para mojar toda la planta con la solución de TAET1. La pulverización se llevó a cabo tres días antes de la aplicación de conidios/micelios del patógeno respectivo.

Tabla 1. Efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial de *T. aggressivum* a diferentes dosis (D1-D4). Los valores medios ( $\pm$  desviación estándar) seguidos de letras diferentes (línea) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD). (1) Citoesqueleto y proteínas motoras, (2) transducción de señales, (3) biosíntesis de esteroides en las membranas, (4) síntesis de aminoácidos y proteínas, (5) respiración, (6) síntesis o transporte de lípidos/integridad o función de las membranas, (7) sustancias químicas con actividad multisitio, (8) inducción de la defensa de la planta huésped, (9) modo de acción desconocido, (10) metabolismo de los ácidos nucleicos y (11) biosíntesis de la pared celular. Acción fungicida/fungistática (letras rojas): F: Fungicida; f: fungistático.

FUNGICIDE—ACTION MECHANISMS	Doses (ppm)									
	D2	D3	D1 (0.5 × D2)		D2		D3		D4 (1.5 × D3)	
			Growth	Inhib.	Growth	Inhib.	Growth	Inhib.	Growth	Inhib.
Thiophanate-methyl 70% (WP) <i>w/w</i> - (1) (F: D1 D2 D3 D4)	500	1000	0 ± 0a	100.0%	0 ± 0a	100.0%	0 ± 0a	100.0%	0 ± 0a	100.0%
Pencycuron 25% (SC) <i>w/v</i> - (1)	5000	8000	55.8 ± 3.3a	19.1%	52 ± 1.6b	24.6%	50.8 ± 1.3b	26.4%	46 ± 0.7c	33.3%
Iprodione 50% (SC) <i>w/v</i> - (2)	1000	1500	63 ± 2.3a	8.7%	53 ± 1.6b	23.2%	43.6 ± 4.5c	36.8%	33.4 ± 5d	51.6%
Flutriafol 12.5% (SC) <i>w/v</i> - (3)	2000	2500	23.4 ± 1.7a	64.7%	19.4 ± 1.3b	70.7%	18.3 ± 1.2bc	72.4%	16.6 ± 2.6c	74.9%
Triadimenol 25% (EC) <i>w/v</i> - (3)	250	500	61.8 ± 3.7a	6.6%	55 ± 4.5b	16.9%	39 ± 3.1c	41.1%	34.2 ± 1.3d	48.3%
Myclobutanil 24% (EC) <i>w/v</i> - (3)	200	400	23.8 ± 0.8a	52.2%	16 ± 1.4b	67.9%	5.6 ± 0.5c	88.8%	3.4 ± 0.5d	93.2%
Fenhexamid 50% (WG) <i>w/w</i> - (3)	1500	2000	30 ± 0.7a	53.6%	26.8 ± 0.8b	58.5%	25.2 ± 0.4c	61.0%	23.4 ± 0.5d	63.8%
Pyrimethanil 40% (SC) P/V- (4)	1500	2000	5 ± 0a	92.7%	3.62 ± 0.4b	94.7%	2.28 ± 0.4c	96.7%	1.5 ± 0.9c	97.8%
Azoxystrobin 25% (SC) <i>w/v</i> - (5)	800	1000	35.3 ± 2.3a	46.7%	33.3 ± 1b	49.7%	31.2 ± 0.8bc	52.9%	30.7 ± 1.2c	53.6%
Kresoxim-methyl 50% (WG) <i>w/w</i> - (5)	200	500	60.4 ± 6.1a	14.0%	58.8 ± 7.7a	16.2%	49.3 ± 1.2b	29.8%	45.9 ± 0.7b	34.6%
Propamocarb 60.5% (SL) <i>w/v</i> - (6)	2500	5000	66.4 ± 1.5a	3.8%	54.6 ± 9.3b	20.9%	29.8 ± 4.1c	56.8%	21 ± 2.9d	69.6%
Copper hydroxide 35% (WG) <i>w/w</i> - (7)	2000	3000	24 ± 1.2a	62.8%	16.8 ± 1.5b	74.0%	15.2 ± 1.3b	76.5%	9.4 ± 0.5c	85.4%
Mancozeb 80% (WG) <i>w/w</i> - (7) (f: D2D3) (F:D4)	2000	3000	7 ± 7.3a	85.9%	0 ± 0b	100.0%	0 ± 0b	100.0%	0 ± 0b	100.0%
Chlorothalonil 50% (SC) <i>w/v</i> - (7)	2500	3000	3.6 ± 1.5a	94.6%	3 ± 1.2ab	95.5%	1.8 ± 0.8bc	97.3%	1 ± 1.2c	98.5%
Fosetyl-AL 80% (WG) <i>w/w</i> - (8)	2500	3000	45.2 ± 1.8a	9.2%	33 ± 0.7b	33.7%	27.8 ± 1.8c	44.2%	19.2 ± 1.3d	61.4%
Cymoxanil 60% (WG) <i>w/w</i> - (9)	200	300	70 ± 1a	-8.4%	65.8 ± 1.3b	-1.9%	61.2 ± 2.8c	5.3%	57.8 ± 2.4d	10.5%
Cyprodinil 37.5% + Fludioxonil 25% (WG) <i>w/w</i> - (4 + 2)	600	1000	7.8 ± 1.8a	84.3%	6.4 ± 0.5a	87.1%	4.6 ± 0.5b	90.8%	4.7 ± 1b	90.6%
Folpet 40% + Metalaxyl-M 10% (WP) <i>w/w</i> - (7 + 10)	2000	2500	14.6 ± 0.5a	78.8%	12.3 ± 0.7b	82.2%	10.2 ± 0.8c	85.2%	7.4 ± 0.5d	89.3%
Dimethomorph 7.5% + Mancozeb 66.7% (WG) <i>w/w</i> - (11 + 7)	2000	3000	53.6 ± 1.5a	22.3%	49.8 ± 1.3b	27.8%	45.8 ± 0.8c	33.6%	43.4 ± 1.1d	37.1%

Para preparar los inóculos de *P. aphanidermatum* se siguió el procedimiento descrito por Marin et al. [69]. Los inóculos de los demás fitopatógenos se prepararon por raspado y filtración subsiguiente, aparte de *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *P. xanthii*. Los fitopatógenos se inocularon cuando las plantas mostraron una segunda hoja verdadera, y utilizando una micropipeta estéril, la inoculación se realizó aplicando uniformemente la suspensión de zoosporas/conidios (5 mL) a una concentración de  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup> de manera uniforme sobre la superficie de la turba. En el caso de *B. cinerea* y *M. melonis*, el patógeno se aplicó rociando la planta cinco veces a la misma concentración. Antes, se cortó la primera hoja verdadera para facilitar la entrada del patógeno. La inoculación con *R. solani* se realizó mezclando el micelio en el sustrato; la inoculación con *S. sclerotiorum* se realizó mediante el método de pulverización del micelio, tal y como describen Chen y Wang [70]. Se hirió el tallo para facilitar la entrada del patógeno. La severidad de los síntomas se registró continuamente y 30-60 días después de la inoculación, se estimó un índice final de severidad de la enfermedad de acuerdo con la siguiente escala: 0 = planta sana; 1 = síntomas iniciales; 2 = síntomas moderados (25%); 3 = planta afectada (50%); 4 = planta gravemente afectada (75%); y 5 = planta muerta.

Además, se realizó un segundo ensayo para comprobar el efecto de biocontrol de TAET1 sobre el patosistema *Fusarium solani* f. *cucurbitae*-calabacín, utilizando dos dosis diferentes  $10^5$  (F1) y  $10^4$  (F2) UFC·mL<sup>-1</sup>.

Para determinar el efecto de control de TAET1 sobre el oídio, se preparó un inóculo de *P. xanthii* a partir de hojas de calabacín recogidas en el campo y afectadas por el oídio de las cucurbitáceas. Utilizando un pulverizador, se roció agua destilada estéril a presión para eliminar los conidios del hongo. Se recogió la suspensión y se inocularon inmediatamente las plantas experimentales a una concentración de  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Para determinar el efecto supresor de TAET1 sobre la enfermedad, se determinó el área foliar afectada por el oídio utilizando el software WinDIAS 3.1.lnk (Dynamax, Fresno, CA, USA) para calcular la proporción del área foliar afectada con respecto al área foliar total. Además, se contó el número de hojas y pecíolos afectados por planta.

Todas las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en condiciones de invernadero y en diferentes estaciones del año para proporcionar condiciones ambientales óptimas para cada patógeno. Las unidades experimentales consistieron en cuatro repeticiones con 24 plantas por sistema patológico. Se realizaron dos experimentos utilizando un diseño de bloques completamente aleatorizados.

### 3.9. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza con el programa informático Statgraphics Centurion versión XVI. La separación de medias se realizó mediante la diferencia mínima significativa de Fisher prueba. Los datos se probaron mediante un análisis de varianza de una vía o una prueba t de Student; la significación estadística se indica con  $p < 0.05$ .

## 4.4 Resultados

### 4.1. Identificación morfológica y molecular

Las observaciones macroscópicas y microscópicas de todos los aislados procedentes de las explotaciones de setas confirmaron que los diferentes aislados pertenecían al género *Trichoderma* (Figura 1). Los resultados del análisis de identidad de las secuencias obtenidas para las 12 cepas permitieron confirmar que pertenecían a *T. aggressivum f. europaeum*.

### 4.2. Crecimiento de los aislados de *Trichoderma*

En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos del crecimiento micelial de 12 aislados de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*. El crecimiento de la colonia de la mayoría de los aislados fue rápido, alcanzando el extremo opuesto de la placa de Petri en 96-120 h. Los aislados TAET1, TAE493 y TAE1409 fueron los más rápidos, con una tasa de crecimiento de 1.76, 1.74 y 1.73  $\text{cm d}^{-1}$ , respectivamente. No se descartó ningún aislamiento para determinar la actividad antagonista de *T. aggressivum* contra los fitopatógenos.

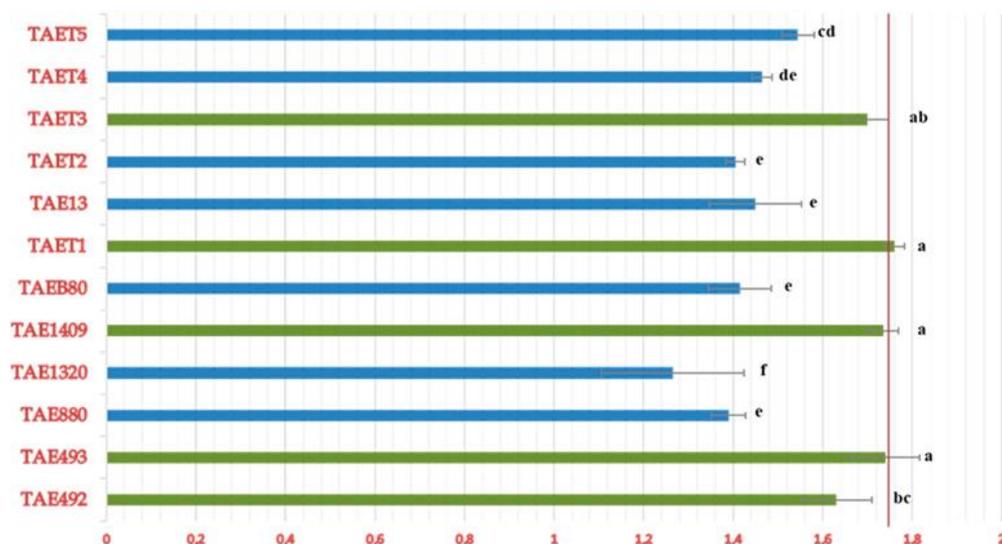


Figura 2. Tasa de crecimiento (cm d-1) de diferentes aislamientos de *T. aggressivum* f. *europaeum*. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el ANOVA de una vía (p = 0.05). (Número de acceso TAET1: MW751677.1).

#### 4.3. Efectos de los aislados de *T. aggressivum* f. *europaeum* sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos

Los resultados de la comparación de los 12 aislados de *T. aggressivum* f. *europaeum* (TAE) con los diferentes fitopatógenos se muestran en la Tabla 2.

Todos los aislados de TAE mostraron una elevada actividad antagonista in vitro contra todos los hongos fitopatógenos ensayados. Los mayores porcentajes de inhibición se detectaron para *F. solani* y *M. melonis*, que alcanzaron valores cercanos al 90%. Por el contrario, los valores de inhibición más bajos se detectaron para *P. aphanidermatum*, con una inhibición que osciló entre el 53 y el 65%. Para los demás fitopatógenos, la inhibición del crecimiento micelial osciló entre el 70 y el 90%. Se observó un proceso de micoparasitismo de *Trichoderma* con enrollamiento de hifas alrededor de los fitopatógenos (Figura 3).

Tabla 2. Potencial antagonístico de los aislados de *T. aggressivum* f. *europaeum* contra seis fitopatógenos en cultivo dual en medio PDA. El porcentaje de inhibición del micelio se calculó como  $PIRM = (R1 - R2) \div R1 \times 100$ , donde: PIRM: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno, R1: crecimiento radial del patógeno en placas de control, R2: crecimiento radial del patógeno en placas de cultivo dual. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según la prueba ANOVA (p < 0.05).

% Inhibition of Mycelial Growth Plant Pathogens						
Isolates	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Mycosphaerella melonis</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
TAE492	74.25 ± 1.11 d	85.25 ± 0.55 a	84.25 ± 1.42 e	80.75 ± 2.27 c	87.25 ± 2.05 ab	63.5 ± 0.55 b
TAE493	76.5 ± 2.40 bcd	84.00 ± 0.55 ab	85.75 ± 0.68cd	81.75 ± 1.42 bc	87.25 ± 2.03 cd	63.75 ± 0.88 ab
TAE880	76.75 ± 1.11 abcd	84.25 ± 1.42 ab	86.00 ± 0.55 bcd	80.50 ± 0.68 c	87.00 ± 1.11 de	55.00 ± 1.25 e
TAE1320	70.25 ± 2.4 e	83.75 ± 1.25 abc	82.00 ± 0.68 f	76.00 ± 1.04 e	85.50 ± 1.42 b	58.5 ± 1.04 c
TAE1409	77.5 ± 3.30 abcd	83.5 ± 1.36 abcd	85.75 ± 1.42 cd	81.50 ± 1.04 bc	87.00 ± 1.11 ab	65.00 ± 0.88 a
TAEB80	78.25 ± 3.81 abc	81.75 ± 3.37 bcd	86.50 ± 0.55 bcd	80.50 ± 0.68 c	86.75 ± 2.59 ab	53.5 ± 0.55 f
TAET1	80.00 ± 1.76 a	84.00 ± 1.62 ab	89.75 ± 2.85 a	82.75 ± 0.55 ab	87.50 ± 0.88 ab	63.00 ± 1.11 b
TAE13	75.00 ± 5.79 cd	83.00 ± 2.27 abcd	87 ± 0.68 bc	76.75 ± 1.42 e	88.25 ± 2.09 a	59 ± 1.04 c
TAET2	75.50 ± 1.11 cd	83.25 ± 3.13 abcd	85.50 ± 0.68 de	78.50 ± 1.36 d	87.25 ± 2.05 ab	54.25 ± 1.42 ef
TAET3	76.75 ± 1.42 abcd	81.00 ± 2.40 cd	87.25 ± 0.55 b	82.25 ± 0.55 ab	87.00 ± 0.68 ab	58 ± 2.27 cd
TAET4	79.00 ± 1.04 ab	82.25 ± 4.27 bcd	89.25 ± 0.68 a	82.25 ± 0.55 ab	88.75 ± 0.88 a	65.00 ± 0.88 a
TAET5	78.00 ± 2.27 abc	80.75 ± 1.89 d	86.5 ± 0.55 bcd	83.25 ± 0.68 a	86.75 ± 0.68 ab	56.75 ± 0.68 d
P	0.0001	0.0818	0.0000	0.0000	0.2860	0.0000

Los valores medios (±desviación estándar) seguidos de letras distintas (línea) indican diferencias significativas (p < 0.05) mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD).

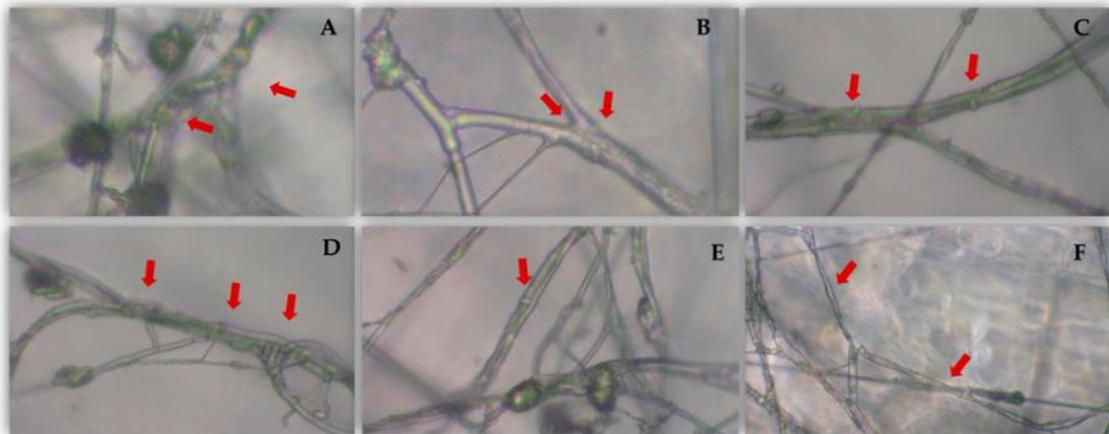


Figura 3. Micoparasitismo por hifas de *Trichoderma* un enrollamiento alrededor de las hifas (A-E). Formación de ganchos (C, E), enrollamiento (B, D) e hifalización (F). Las imágenes se tomaron con un objetivo  $\times 40$ .

Se seleccionó un aislado para las pruebas posteriores, TAET1, porque mostró la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición más altos para algunos fitopatógenos.

#### 4.4. Efecto de los compuestos volátiles sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos

El efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento de los fitopatógenos se muestra en la Tabla 3. No se encontraron porcentajes de inhibición significativos para la mayoría de los hongos, excepto para *F. solani* y *M. melonis*, que mostraron una disminución del crecimiento en los últimos días, con porcentajes de inhibición micelial del 12.85 y 18.60%, respectivamente.

Tabla 3. Crecimiento micelial (cm) de los fitopatógenos en medio PDA por exposición a los volátiles de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* TAET1 frente al control de crecimiento. \* Las medias son significativamente diferentes (LSD) según la prueba T de estudiantes ( $p < 0.05$ ).

Crecimiento del micelio (cm) de los patógenos de las plantas.

Isolates	<i>B. cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>M. melonis</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
Control	4.26 $\pm$ 0.05	4.36 $\pm$ 0.11	4.26 $\pm$ 0.05	4.25 $\pm$ 0.05	4.20 $\pm$ 0.17	4.40 $\pm$ 0.10
TAET1	4.20 $\pm$ 0.17	4.16 $\pm$ 0.23	3.50 $\pm$ 0.40 *	4.10 $\pm$ 0.23	3.66 $\pm$ 0.25 *	4.23 $\pm$ 0.11
<i>p</i>	0.5614	0.2508	0.0303	0.2377	0,0390	0.2901

#### 4.5. Ensayo de hojas desprendidas

La aplicación de esporas de TAET1 en las hojas de pepino, pimiento y tomate previno el conjunto de síntomas causados por *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* y *M. melonis* en el 100, 100 y 93% de las hojas, respectivamente, con la misma eficacia que el fungicida de control. Las hojas no inoculadas con TAET1 mostraron crecimiento micelial y síntomas evidentes de podredumbre en el 100% de las hojas para los tres fitopatógenos probados en este estudio (Figura 4).

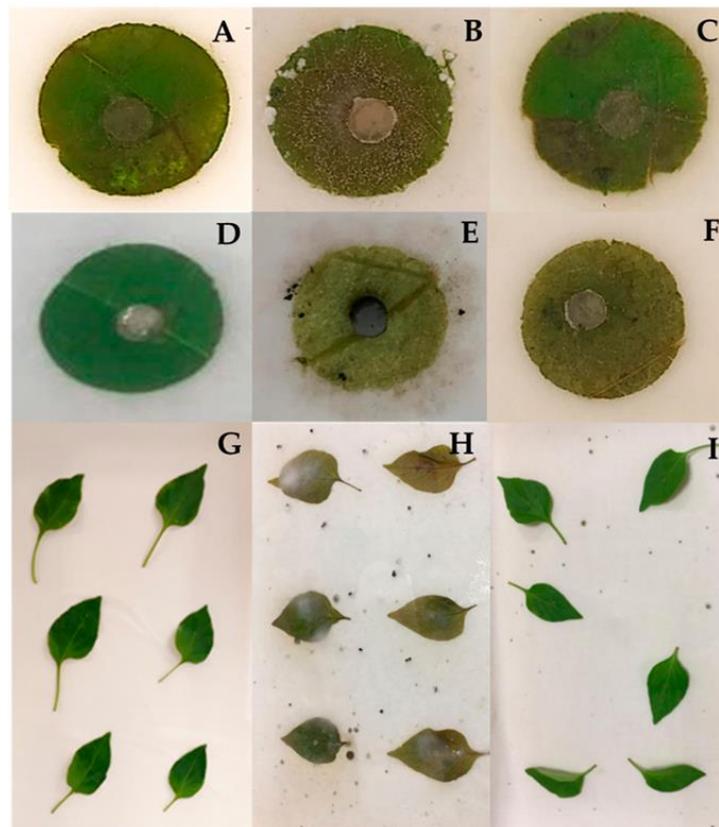


Figura 4. Síntomas de *B. cinerea* (A-C), *M. melonis* (D-F) y *S. sclerotiorum* (G-I), infección en hojas desecadas tratadas con TAET1 (A, D, G), fungicida (C, F, I) o control (B, E, H).

#### 4.6. Degradación de esclerocios de *S. sclerotiorum*

La aplicación de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 produjo una marcada disminución de la viabilidad de los esclerocios (Tabla 4). Los esclerocios tratados con TAET1 no mostraron micelio blanco en su superficie o conidióforos TAET1. Del mismo modo, se detectó la esporulación de TAET1 en la superficie del suelo (Figura 5).

Tabla 4. Efectos de la aplicación de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum*. Número de esclerocios recuperados, porcentaje de germinación de esclerocios y colonización de TAET1 medidos tras 25 días de incubación. \* Los valores representan las medias de cinco réplicas. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student ( $p < 0.05$ ).

	Sclerotia Recovered	Sclerotial Germination (%)	TAET1 Colonization (%)
Control	5	63.2	0
TAET1	2.1 *	0 *	36.8 *



Figura 5. Efecto de TAET1 en la germinación de esclerocios. Control: esclerocios con micelio blanco en su superficie. TAET1: Observación de *Trichoderma* en la superficie del suelo (masa verde).

#### 4.7. Compatibilidad de *T. aggressivum* f. *europaeum* con los fungicidas

Los efectos observados de 19 fungicidas sobre el crecimiento y el desarrollo de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 se presentan en la Tabla 1. Los resultados indicaron que el crecimiento micelial de TAET1 se vio afectado por las diferentes dosis de cada uno de los fungicidas probados in vitro, en comparación con el control. Según la escala OILB [68], la compatibilidad de los 19 fungicidas ensayados utilizando las dosis mínimas (D2) y máximas (D3) recomendadas en cultivos hortícolas fue la siguiente tres eran inofensivos (kresoxim-metilo, pencicurón y cymoxanil; inhibición <30%), cuatro eran ligeramente tóxicos (flutriafol, azoxystrobin, fenhexamid, fosetil-Al; 30-75%), uno era moderadamente tóxico (folpet + metalaxil-M; 75-90%), y cuatro eran tóxicos (tiofanato-metilo, pirimetanil, mancozeb y clorotalonil; >90%). La inhibición total del crecimiento a las dosis D2 y D3 sólo se observó en dos fungicidas (tiofanato-metilo y mancozeb) con efectos fungicidas.

Siete fungicidas mostraron un comportamiento diferente según la escala a dosis máximas y mínimas; cuatro (iprodiona, triadimenol, propamocarb y dimetomorfo + mancozeb) fueron ligeramente tóxicos a las dosis máximas (D3) e ino cuos a las dosis mínimas (D2); dos (miclobutanil y oxiclورو de cobre) fueron moderadamente tóxicos en (D3) y ligeramente tóxicos en (D2); y uno (ciprodinil + fludioxonil) fue tóxico en (D3) y moderadamente tóxico en (D2).

#### 4.8. Biocontrol de *T. aggressivum f. europaeum* contra enfermedades fúngicas

*T. aggressivum f. europaeum* TAET1 disminuyó la gravedad de la enfermedad en todos los sistemas de cultivo estudiados (Figura 6).

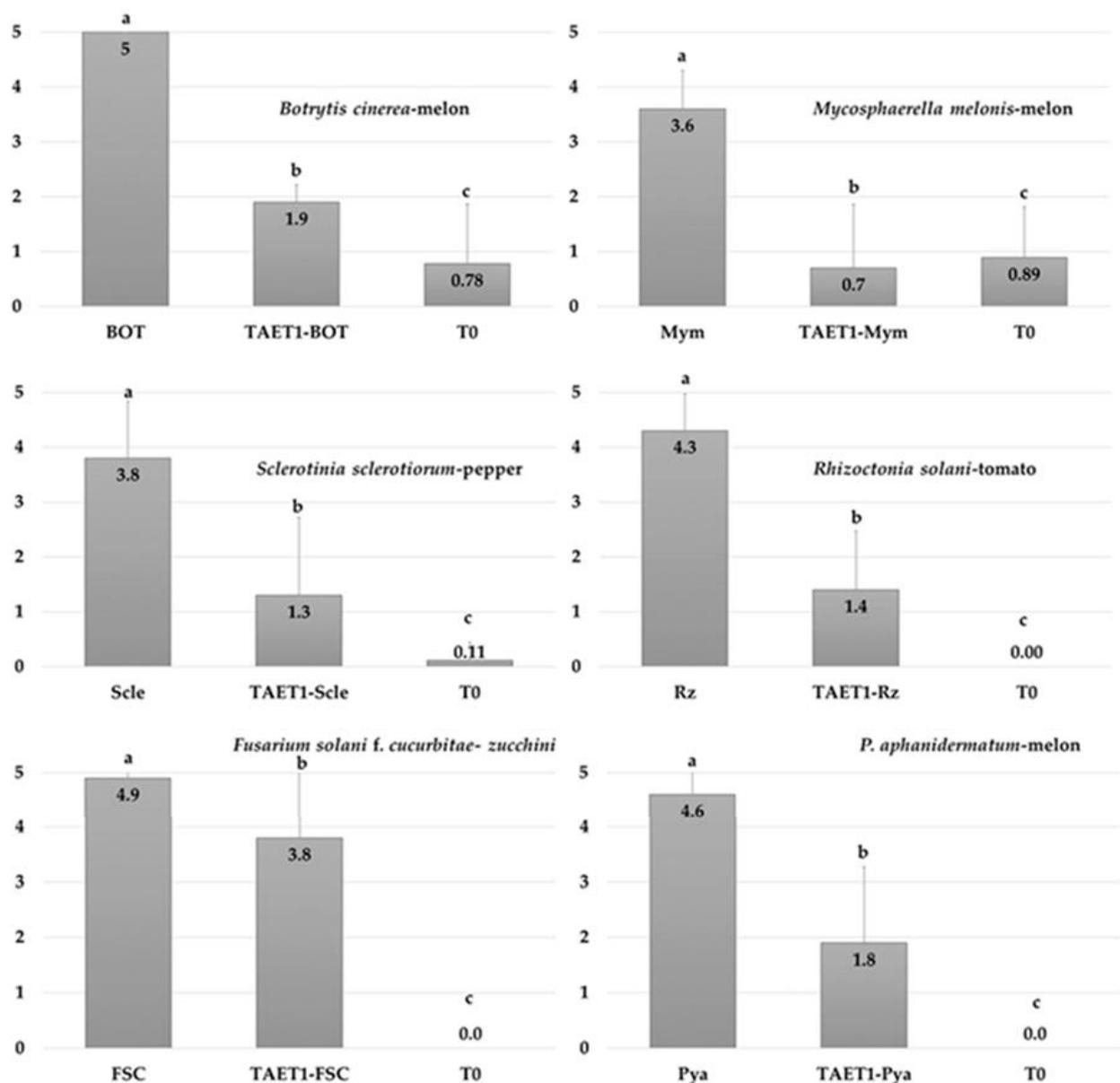


Figura 6. La gravedad de la enfermedad de los fitopatógenos en las plantas se calificó entre 30 y 90 días después de la inoculación en base a una escala de 0 a 5: donde 0 = sin síntomas visibles

de la enfermedad y 5 = planta muerta. T0: control; TAET1: *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1; Bot: *B. cinerea*; Mym: *M. melonis*; Scle: *S. sclerotiorum*; Rz: *R. solani*; FSC: *F. solani* f. *cucurbitae*; Pya: *P. aphanidermatum*. La desviación estándar media se expresa mediante barras de error (24 plantas por repetición). Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (LSD) según el ANOVA ( $p < 0.05$ ).

El efecto más fuerte se observó en *M. melonis*, con una disminución del 80,55% en la incidencia de la enfermedad. En *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, la disminución de la gravedad de la enfermedad alcanzó el 62 y el 65.78%. También se observó la enfermedad en los controles no inoculados (T0) de algunos de los sistemas de cultivo, debido a la disposición aleatoria de los tratamientos. La gravedad de las enfermedades causadas por *P. aphanidermatum*, *R. solani* y *F. solani* f. *cucurbitae* disminuyó en un 58.69, 67.44 y 22.44%, respectivamente, después de aplicar las esporas TAET1 (Figura 6). Dos semanas después de la última evaluación, no se observaron cambios en el índice de severidad de los diferentes patosistemas, excepto para *F. solani* f. *cucurbitae*, en el que todas las plantas alcanzaron el índice de mortalidad 5. La repetición del ensayo para *F. solani* f. *cucurbitae* con dos concentraciones de inóculo confirmó el retraso en la aparición de la enfermedad, tras la aplicación de TAET1, aunque sin controlar la enfermedad (Figura 7). A pesar de la elevada presión del inóculo, cuando la incidencia de la enfermedad era superior al 75%, la aplicación de TAET1 redujo la gravedad de la enfermedad en un 77 y un 34%, con las dosis de inóculo F1 y F2, respectivamente (Figura 8).



Figura 7. Comparación del estado de las plantas al final del ensayo: sin inóculo FSC (A) y los tratamientos con F1 (B) y con F2 (C), con TAET1. FSC: Control sin *F. solani* f. *cucurbitae* (FSC). F1: 105 UFC·mL<sup>-1</sup>; (F2): 104 UFC·mL<sup>-1</sup>.

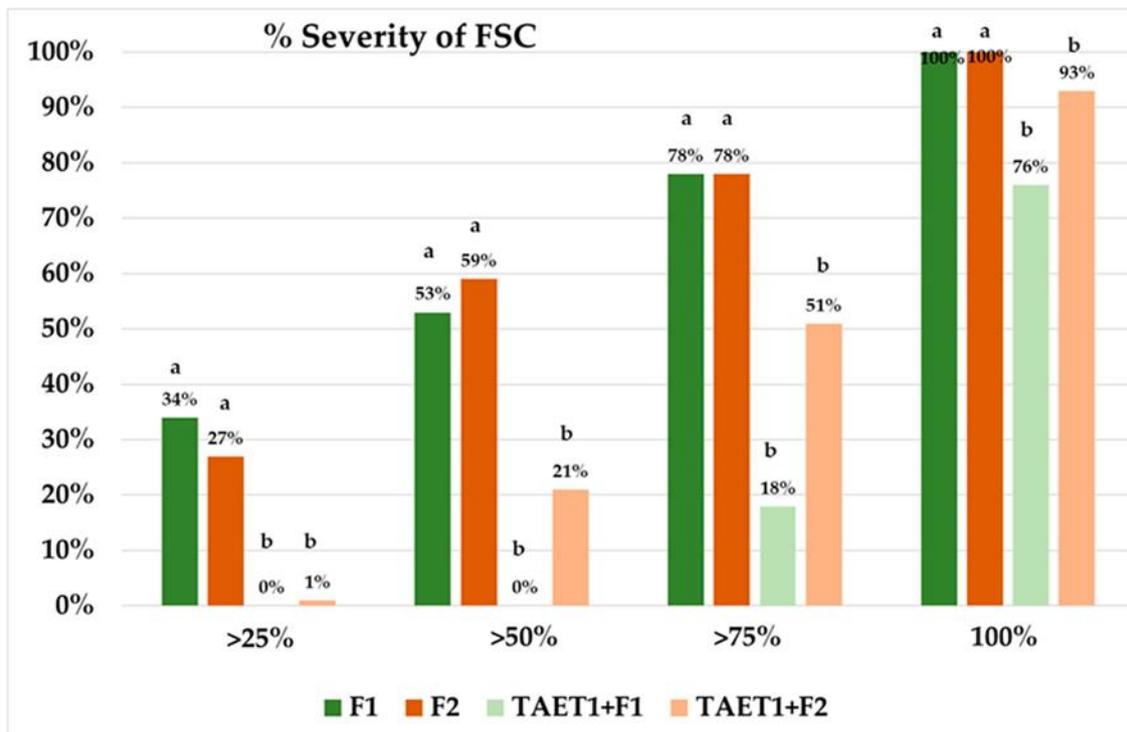


Figura 8. Comparación del efecto de TAET1 en el porcentaje de severidad de la enfermedad tras aplicar dos dosis de FSC (F1: 105 UFC·mL<sup>-1</sup>; F2: 104 UFC·mL<sup>-1</sup>. 25, 50, 75 y 100%: porcentajes de severidad de la enfermedad superiores al 25%, 50%, 75% y 100% para F1 y F2.

A su vez, la aplicación foliar de TAET1 suprimió considerablemente la enfermedad causada por *P. xanthii* (Figura 9), con una reducción del 66.78% en la proporción del área foliar que presentaba síntomas. Asimismo, el número de hojas y pecíolos con oídio se redujo en un 31.42% y un 33.39%, respectivamente.

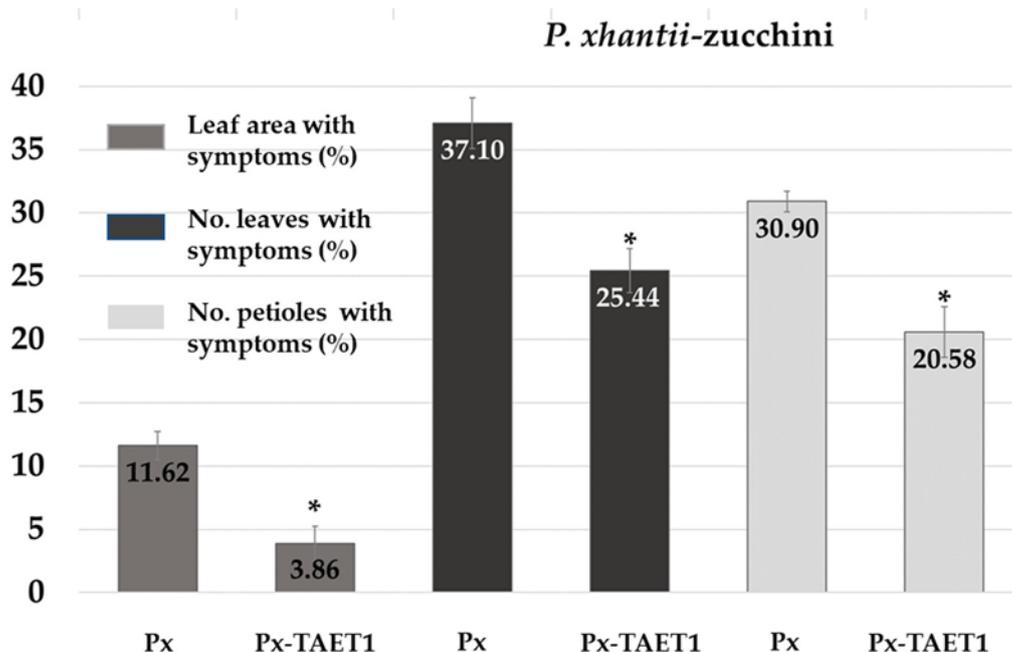


Figura 9. Control de *P. xanthii* mediante la pulverización de plantas de calabacín con TAET1. Proporción media de superficie foliar con síntomas de oídio por planta, porcentaje del número de hojas con síntomas por planta y porcentaje del número de pecíolos con oídio. Px: Aplicación de *P. xanthii*. Px- TAET1: aplicación de TAET1 3 días antes de la aplicación de *P. xanthii*. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student. \* significativo a  $p < 0.05$ .

#### 4.5 Discusión

Las especies del género *Trichoderma* son de gran interés por sus beneficios en la agricultura y en los ecosistemas naturales. Las especies de *Trichoderma* tienen actividad antagónica contra varios patógenos de plantas transmitidos por el suelo y por el aire, principalmente hongos como *Fusarium oxysporum* [31,71- 75], *F. solani* [76-78], *B. cinerea* [79-85], *S. sclerotiorum* [82,86], *S. minor* [87], *Rhizoctonia solani* [72,88-90], *Phytophthora capsici* [91,92], *Phytophthora parasitica* [85], *Chondrostereum purpureum* [93], *Macrophomina phaseolina* [94], *Podosphaera xanthii* [95], *Alternaria alternata*, [96], *Pythium aphanidermatum* [97] y *Pythium ultimum* [24,98], entre muchos otros.

En el presente estudio, el aislado *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 fue seleccionado para controlar diferentes fitopatógenos de interés en cultivos hortícolas, evaluando porcentajes de inhibición del crecimiento micelial y reducción de la severidad de la enfermedad superiores a los encontrados en otras especies de *Trichoderma*. Por ejemplo, Zhang et al. [99] reportaron un 75% y 82% de inhibición del crecimiento micelial in vitro de *B. cinerea* y *R. solani* por *T. longibrachiatum*, respectivamente. Fernandes et al. [100] también encontraron buenos resultados de inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*, *R. solani* y *F. solani* al utilizar diferentes

especies de *Trichoderma*. Los mismos autores informaron de que *T. tomentosum* mostró un antagonismo eficaz contra *S. sclerotiorum* y *R. solani* y un antagonismo moderado contra *F. solani*. Además, Amin et al. [101] informaron de que *T. viride* inhibía en gran medida el crecimiento micelial de *R. solani*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* en comparación con *T. harzianum*. En general, los resultados de la comparación varían con el aislado de *Trichoderma* y con el fitopatógeno. Además, los resultados se ven afectados por el medio de crecimiento, la temperatura y otros factores. Se encontraron resultados similares en las pruebas in vivo y en el control de enfermedades aéreas o del suelo. Rini y Sulochana [102] lograron un control del 25% de la incidencia de la podredumbre de la raíz por *Rhizoctonia* tras aplicar *T. harzianum* o *T. pseudokoningii*. Por su parte, Hafez et al. [103] informaron de un control de aproximadamente el 40% del oídio causado por *P. xanthii* en pepinos al utilizar *T. harzianum* y *T. viride*. Ambos porcentajes de control de la enfermedad son inferiores a los valores alcanzados en este estudio con *T. aggressivum*. Se han realizado muy pocos estudios utilizando *T. aggressivum* f. *europaeum* como agente de control biológico. Sánchez-Montesinos et al. [24] han informado de resultados muy similares a los encontrados en este estudio al analizar *P. ultimum* después de aplicar *T. aggressivum* f. *europaeum*, incluso en condiciones de estrés salino en plantas de melón. En *F. solani* f. *cucurbitae*, aunque la enfermedad no ha sido bien controlada, en contraste con los resultados in vitro, la aparición de la enfermedad se retrasó considerablemente. Khanzada et al. [104] informaron de una inhibición del crecimiento micelial in vitro cercana al 20% en comparación con *T. harzianum*. Este porcentaje fue mayor para otras especies, alcanzando valores cercanos al 70% para *T. pseudokoningii*. Pérez-Hernández et al. [105] reportaron que la aplicación de la cepa T22 de *T. harzianum* no tuvo efecto en el control de la enfermedad, en contraste con Roberti et al. [106], quienes detectaron un control de la pudrición de la corona y del pie de *Fusarium* al aplicar la misma cepa, T22, y otras formulaciones basadas en *Trichoderma*, en un rango inferior al 30%.

Se han detectado interacciones entre las hifas de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 y diferentes patógenos. El hiperparasitismo y la fuerte competencia ejercida por el rápido crecimiento y esporulación han sido los principales mecanismos de inhibición reportados en la literatura [25]. En comparación con los resultados de otros autores, en este estudio se observó una escasa actividad antagonista a causa de los metabolitos volátiles. Recientemente, la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV) del moho verde (*T. aggressivum* f. *europaeum*) en diferentes medios de cultivo ha sido descrita por Radványi et al. [107]. Asimismo, Krupke et al. [108] describieron la producción del metabolito 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina por *T. aggressivum*. Lee et al. [59] establecieron la relación entre la producción de COV por *T. aggressivum* f. *europaeum* y la promoción del crecimiento de *Arabidopsis*. Pandey et al. [109] informaron sobre la producción de enzimas y los efectos de los COV en el crecimiento del micelio

de *Sclerotium rolfsii*, *R. bataticola*, *F. oxysporum*, *F. udum* y *Colletotrichum capsici*, evaluando los porcentajes de inhibición que van del 8 al 55% in vitro. Diferentes estudios sobre *T. harzianum* han demostrado que la producción de metabolitos volátiles dio lugar a porcentajes de inhibición del crecimiento micelial in vitro superiores al 50% para *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* [110]. Resultados similares fueron encontrados por El-Katatny et al. [111] por la sobreproducción de metabolitos volátiles contra *Sclerotium rolfsii*.

Los estudios sobre la sensibilidad de *T. aggressivum* f. *europaeum* a los fungicidas se han centrado generalmente en los fungicidas utilizados para controlar el moho verde en los hongos cultivados, como el pro-cloraz y la metrafenona [112]. A diferencia de algunos resultados de este trabajo, las pruebas realizadas por Kosanovic et al. [42] informaron de que los aislados de *T. aggressivum* f. *europaeum* eran sensibles al clorotalonil y al carbendazim y menos susceptibles a la iprodiona, y algunos aislados eran resistentes al tiofanato-metilo y resistentes a la trifloxistrobina. Williams et al. [51] desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento de *Trichoderma* a partir de compuestos comerciales de *Agaricus bisporus* que contenían propamocarb y descartaban el captan para inhibir la esporulación. Otros estudios han analizado la sensibilidad a las sustancias químicas activas o a los agentes biológicos [49], y *T. aggressivum* f. *europaeum* se ha aplicado como agente de biocontrol sólo de forma esporádica; por lo tanto, no se han realizado estudios de compatibilidad de esta especie con los hongos comúnmente utilizados para controlar las enfermedades en los cultivos hortícolas. Nuestro estudio aporta información sobre la compatibilidad de *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 frente a diferentes dosis de fungicidas in vitro. Sin embargo, deben realizarse nuevos estudios en planta para establecer mejor los límites de cada uno y permitir su uso en la gestión integrada de enfermedades.

No hay consenso sobre el uso de patógenos derivados de hongos cultivados [113,114]. Numerosas formulaciones comerciales de biofungicidas se basan en especies que han sido descritas como agentes causales del moho verde. Del mismo modo, aunque se han descrito diferentes especies de *Trichoderma* como agentes patógenos para algunas especies vegetales, como las plántulas de pino [115], o como patógeno causante de la enfermedad de la podredumbre de la mazorca en el maíz [116], e incluso como causante de enfermedades en humanos tras la ingesta de alimentos contaminados [117,118] o en pacientes inmunodeprimidos [119,120], el uso de *Trichoderma* en la agricultura puede considerarse una de las mejores alternativas al control químico porque sus beneficios superan con creces cualquier desventaja fitosanitaria.

#### 4.6 Conclusiones

En consecuencia, basándonos en los resultados de nuestro estudio, consideramos que *T. aggressivum* f. *europaeum* TAET1 debería ser estudiado en invernaderos comerciales para futuros propósitos. Las aplicaciones como prevención y/o control de enfermedades fúngicas de las plantas pueden ser una alternativa viable al uso de compuestos sintéticos convencionales. La alta compatibilidad de este aislado con los fungicidas podría permitir su uso en combinación con diferentes estrategias de control de plagas.

#### 4.7 Bibliografía

1. Arora, N.K.; Tewari, S.; Singh, S.; Lal, N.; Maheshwari, D.K. PGPR for protection of plant health under saline conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*; Maheshwari, D.K. Ed.; Springer: Berlin, Germany, **2012**, 239–258.
2. FAO. *Manual on Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides*; FAO Plant Production and Protection Paper 228; FAO/WHO Joint Work: Rome, Italy, **2016**.
3. Pimentel, D. Pesticides and pest control. In *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*; Rajinder, P., Dhawan, A. Eds.; Springer: Heidelberg, Germany, **2009**, *1*, 83–87.
4. Zhang, W.; Jiang, F.; Ou, J. Global pesticide consumption and pollution: With China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* **2011**, *1*, 125–144.
5. FAO. FAOSTAT 2017 Rome. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/> (accessed on 10 April 2020).
6. Sun, B.; Zhang, L.; Yang, L.; Zhang, F.; Norse, D.; Zhu, Z. Agricultural non-point source pollution in China: Causes and mitigation measures. *Ambio* **2012**, *41*, 370–379.
7. Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 338–343.
8. Weindling, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* **1932**, *22*, 837–845.
9. Sulaiman, M.M.; Yass, S.T.A.; Aish, A.A.; Abdullah, S.J.; Youssef, S.A. Activity of *Trichoderma* spp. against *Erwinia carotovora* causal agent of potato tuber soft rot. *Plant Arch.* **2020**, *20*, 115–118.

10. Belanger, R.; Dufuor, N.; Caron, J.; Benhamou, N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Sci. Technol.* **1995**, *5*, 41–54.
11. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *App. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1061–1070, doi: 10.1128/AEM.65.3.1061–1070.
12. Ahmed, A.S.; Ezziyyani, M.; Sánchez, C.P.; Candela, M. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 633–637, doi:10.1023/A:1024734216814.
13. Fraceto, Le.; Maruyama, C.; Guilger, M.; Mishra, S.; Keswani, C.; Singh, H.; Lima, R. *Trichoderma harzianum* based novel formulations: Potential applications for management of next-gen agricultural challenges. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93*, 2056–2063. doi.org/10.1002/jctb.5613.
14. Tan, J.Y.; Shao, X.H.; Chen, L.H.; Chen, L.N.; Xu, H.L. Effect of formulations of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 on the induction of resistance against Fusarium wilt in cucumber. *J. Food Agric. Environ.* **2012**, *10*, 1205–1209.
15. Azeem, W. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Azadirachta indica* in the management of *Meloidogyne incognita* in Tomato. *Pak. J. Zool.* **2020**, *53*, 119–125.
16. Yan, L.; Khan, R.A.A. Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus. *Trichoderma harzianum*. *Egyptia J. Biol. Pest Control* **2021**, *31*, 5. doi/10.1186/s41938-020-00351-9.
17. de Souza, J.T.; Pomella, A.W.; Bowers, J.H.; Pirovani, C.P.; Loguercio, L.L.; Hebbar, K.P. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology* **2006**, *96*, 61–67, doi:10.1094/PHYTO-96-0061.
18. Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Sahai, V.; Prévost, D.; Valéro, J.R.; Surampalli, R.Y. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, *41*, 764–771. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.013.

19. Sreenivasaprasad, S.; Manibushanrao, K. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. *Int. J. Pest Manag.* **1993**, *39*, 167–171. doi.org/10.1080/09670879309371784.
20. Bansal, R.; Mukherjee, M.; Horwitz, B.A.; Mukherjee, P.K. Regulation of conidiation and antagonistic properties of the soil-borne plant beneficial fungus *Trichoderma virens* by a novel proline-, glycine-, tyrosine-rich protein and a GPI-anchored cell wall protein. *Curr. Genet.* **2019**, *65*, 953–964. doi.org/10.1007/s00294-019-00948-0.
21. Park, Y.H.; Chandra Mishra, R.; Yoon, S.; Kim, H.; Park, C.; Seo, S.T.; Bae, H. Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. *J. Ginseng Res.* **2019**, *43*, 408–420. doi.org/10.1016/j.jgr.2018.03.002.
22. Bunbury-Blanchette, A.L.; Walker, A.K. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against Fusarium basal rot of onion. *Biol. Control* **2018**, *130*, 127–135. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007.
23. Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Marín, F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1934–1944.
24. Sánchez-Montesinos, B.; Diáñez, F.; Moreno-Gavira, A.; Gea, F.J.; Santos, M. Plant growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* by saline tolerant *Trichoderma* isolates under salinity stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2053.
25. Wells, H.D. *Trichoderma* as biocontrol agent. In *Biocontrol of Plant Diseases*; Mukerji, K.G., Garg, K.L., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 1988; pp. 71–82.
26. Lewis, K.; Whipps, J.M.; Cooke, R.C. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. In *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*; Whipps, J.M., Lumsden, R.D., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1989; pp. 191–217.
27. Suwan, S.; Isobe, M.; Kanokmedhakul, S.; Lourit, N.; Kanokmedhakul, K.; Soyotong, K.; Koga, K. Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from

*Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time- of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1438–1451.

28. Monte, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **2001**, *4*, 1–4.

29. Mohiddin, F.A.; Khan, M.R.; Khan, S.M.; Bhat, B.H. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? *Plant Pathol. J.* **2010**, *9*, 92–102.

30. Vinale, F.; Nigro, M.; Sivasithamparam, K.; Flematti, G.; Ghisalberti, E.L.; Ruocco, M.; Varlese, R.; Marra, R.; Lanzuise, S.; Eid, A.; et al. Harzianic acid: A novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microb. Lett.* **2013**, *347*, 123–129.

31. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L.; Lorito, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 1–10.

32. Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56, doi:10.1038/nrmicro797.

33. Harman, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **2006**, *96*, 190–194.

34. Haggag, W.M. Biotechnological aspects of plant resistant for fungal diseases management. *Am. Eur. J. Sustain. Agric.* **2008**, *2*, 1– 18.

35. Bisen, K.; Keswani, C.; Patel, J.S.; Sarma, B.K.; Singh, H.B. *Trichoderma* spp.: Efficient inducers of systemic resistance in plants. In *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*; Choudhary, D., Varma, A., Eds.; Springer: Singapore, Singapore, 2016; pp. 185–195. doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2\_12.

36. Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 249– 60.

37. Keswani, C.; Mishra, S.; Sarma, B.K.; Singh, S.P.; Singh, H.B. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 533–544. doi.org/10.1007/s00253-013-5344-5.

38. Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y.; Valéro, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 1–20.
39. Harman, G.; Kubicek, C. *Trichoderma Gliocladium*; CRC Press: London, UK, 1998; Volume 2.
40. Geremia, R.A.; Goldman, G.H.; Jacobs, D.; Ardiles, W.; Vila, S.B.; Van Montagu, M.; Herrera-Estrella, A. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 603–613. doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01604.x.
41. Hatvani, L.; Antal, Z.; Manczinger, L.; Szekeres, A.; Druzhinina, I.S.; Kubicek, C.P.; Nagy, A.; Nagy, E.; Vágvölgyi, C.; Kredics, L. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* **2007**, *97*, 532–537.
42. Kosanovic, D.; Potočnik, I.; Duduk, B.; Vukojević, J.; Stajić, M.; Rekanović, E.; Milijašević-Marčić, S. *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Ann. Appl. Biol.* **2013**, *163*, 218–230. doi.org/10.1111/aab.12048.
43. Jayalal, R.G.U.; Adikaram, N.K.B. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the Oyster mushroom. *Cey. J. Sci.* **2007**, *36*, 53–60.
44. Kim, C.S.; Park, M.S.; Kim, S.C.; Maekawa, N.; Yu, S.H. Identification of *Trichoderma*, a competitor of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*), and competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* species in Korea. *Plant Pathol. J.* **2012**, *28*, 137–148. doi.org/10.5423/PPJ.2012.28.2.137.
45. Błaszczyk, L.; Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Frużyńska-Józwiak, D. Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in Central Europe. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 325–333.
46. Wang, G.; Cao, X.; Ma, X.; Guo, M.; Liu, C.; Yan, L.; Bian, Y. Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *MicrobiologyOpen* **2016**, *5*, 709–718, doi: 10.1002/mbo3.364.

47. Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **2012**, *158*, 17–25.
48. Park, M.S.; Bae, K.S.; Yu, S.H. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology* **2006**, *34*, 111–113.
49. Gea, F.J.; Navarro, M.J.; Santos, M.; Diáñez, F.; Carrasco, J. Control of fungal diseases in mushroom crops while dealing with fungicide resistance: A review. *Microorganisms* **2021**, *9*, 585.
50. Mamoun, L.M.; Savoie, J.M.; Olivier, J.M. Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia* **2000**, *92*, 233–240.
51. Williams, J.; Clarkson, J.M.; Mills, P.R.; Cooper, R.M. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4190–4191.
52. Mumpuni, A.; Sharma, H.; Brown, A.E. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 5053–5056.
53. Savoie, J.; Iapicco, R.; Largeteau-Mamoun, M. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 1348–1356.
54. Kosanovic, D.; Grogan, H.; Kavanagh, K. Exposure of *Agaricus bisporus* to *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* leads to growth inhibition and induction of an oxidative stress response. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 814–820.
55. O'brien, M.; Grogan, H.; Kavanagh, K. Proteomic response of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* to *Agaricus bisporus* tissue and mushroom compost. *Fungal Biol.* **2014**, *118*, 785–791.
56. Ordaz-Ochoa, J. Control Biológico y Químico de *Armillaria* spp., (Vahl.: Fr.) Karsten. Aisladas de Aguacate (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake). Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Uruapan Michoacan, México, 2017.

57. Rodríguez, M.C.H.; Evans, H.C.; de Abreu, L.M.; de Macedo, D.M.; Ndacnou, M.K.; Bekele, K.B.; Barreto, R.W. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5671.
58. Sánchez-Montesinos, B.; Diáñez F.; Moreno-Gavira, A.; Gea F.J.; Santos M. Role of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as plant- growth promoter in horticulture. *Agronomy* **2020**, *10*, 1004.
59. Lee, S.; Yap, M.; Behringer, G.; Hung, R.; Bennett, J.W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2016**, *3*, 7.
60. Carrasco, J.; Navarro, M.; Santos, M.; Diáñez, F.; Gea, F. Incidence, identification and pathogenicity of *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on *Agaricus bisporus* mushroom crops in Spain. *Ann. Appl. Biol.* **2016**, *168*, 214–224.
61. Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **2000**, *7*, 203– 214.
62. Morgulis, A.; Coulouris, G.; Raytselis, Y.; Madden, T.L.; Agarwala, R.; Schäffer, A.A. Database indexing for production Mega- BLAST searches. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 1757–1764.
63. Santos, M.; Diáñez, F.; del Valle, M.A.; Tello, J. Grape marc compost: microbial studies and suppression of soil-borne mycosis in vegetable seedlings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 1493–1505.
64. Novak, N.G.; Perez, F.G.; Jones, R.W.; Lawrence, S.D. Detached leaf assays to simplify gene expression studies in potato during infestation by chewing insect *Manduca sexta*. *J. Vis. Exp.* **2019**, *147*, e59153.
65. Patial, M.; Kumar, J.; Pal, D. Detached leaf assay for evaluating resistance to leaf rust Pst. 104-2 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J. Exp. Biol.* **2017**, *55*, 789–794.
66. Diáñez, F.; Santos, M.; Blanco, R.; Tello, J.C. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (Southwestern Spain). *Phytoparasitica* **2002**, *30*, 529–534.

67. Nene, Y.L.; Thapliyal, R.N. *Evaluation of Fungicides for Plant Disease Control*, 3rd ed.; IBH Publishing Co.: New Dehli, India, 1993; p. 33.
68. Viñuela, E.; Jacas, J.A.; Marco, V.; Adan, A.; Budia, F. Los efectos de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos en agricultura. Grupo de trabajo de OILB plaguicidas y organismos beneficiosos. I. Insecticidas y acaricidas. *Phytoma* **1993**, *45*, 18–25.
69. Marín, F.; Diáñez, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Gea, F.J.; Castañeda, C.; Navarro, M.J.; Yau, J.A. Control of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper (*Capsicum annuum* L.) with compost teas from different sources and their effects on plant growth promotion. *Phytopathol. Mediterr.* **2014**, *53*, 216–228.
70. Chen, Y.; Wang, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* **2005**, *89*, 1268–1272.
71. Dubey, S.C.; Suresh, M.; Singh, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control* **2007**, *40*, 118–127.
72. Singh, S.; Balodi, R. Bio-management of soil borne pathogens infesting cucumber (*Cucumis sativus* L.) under protected cultivation system. *Biol. Control* **2021**, *157*, 104569.
73. Díaz-Gutiérrez, C.; Arroyave, C.; Llugany, M.; Poschenrieder, C.; Martos, S.; Peláez, C. *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control Fusarium wilt in *Stevia rebaudiana*. *Biol. Control* **2021**, *155*, 104537.
74. Jamil, A.; Musheer, N.; Ashraf, S. Antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* and *Azadirachta indica* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* for the management of chilli wilt. *J. Plant Dis. Prot.* **2021**, *128*, 161–172.
75. El-Komy, M.H.; Saleh, A.A.; Eranthodi, A.; Molan, Y.Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* **2015**, *31*, 50–60.
76. Rojo, F.G.; Reynoso, M.M.; Ferez, M.; Chulze, S.N.; Torres, A.M. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 549–555.

77. Morsy, E.M.; Abdel-Kawi, K.A.; Khalil, M.N.A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. *Egypt. J. Phytopathol.* **2009**, *37*, 47–57.
78. Amira, M.B.; López, D.; Mohamed, A.T.; Khouaja, A.; Chaar, H.; Fumanal, B.; Gousset-Dupont, A.; Bonhomme, L.; Label, P.; Goupil, P. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain *Ths97* in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biol. Control* **2017**, *110*, 70–78.
79. Zimand, G.; Elad, Y.; Chet, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* **1996**, *86*, 1255–1260.
80. Kapat, A.; Zimand, Y.; Elad, Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **1998**, *52*, 127–137.
81. Elad, Y.; Kapat, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1999**, *105*, 177–189.
82. Elad, Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases—control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocont. Sci. Technol.* **2000**, *10*, 499–507.
83. Yang, H.H.; Yang, S.L.; Peng, K.C.; Lo, C.T.; Liu, S.Y. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 924–932.
84. Fedele, G.; Brischetto, C.; Rossi, V. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on Grape Berries as influenced by temperature and humidity. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1232.
85. Choudhary, A.K.; Singh, N.; Singh, D. Evaluation of the bioformulation of potent native strains of *Trichoderma* spp. against the foot rot/gummosis of Kinnow mandarin. *Egyptia J. Biol. Pest Co.* **2021**, *31*, 90.
86. Manganiello, G.; Nicastro, N.; Caputo, M.; Zaccardelli, M.; Cardi, T.; Pane, C. Functional hyperspectral imaging by high-related vegetation indices to track the wide-spectrum *Trichoderma*

biocontrol activity against soil-borne diseases of baby-leaf vegetables. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 630059.

87. Abdollahzadeh, J.; Goltapeh, E.M.; Rouhani, H. Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma* species in biological control of causal agents of crown and root rot of sunflower (*Sclerotinia minor*) in vitro. *Agric. Sci. Tabriz* **2003**, *13*, 13–23.

88. Pandey, S.; Pundhir V.S. Mycoparasitism of potato black scurf pathogen (*Rhizoctonia solani* Kuhn) by biological control agents to sustain production. *Indian J. Hortic.* **2013**, *70*, 71–75.

89. Lucon, M.C.M.; Koike, C.M.; Ishikawa, I.A.; Patrício, F.R.A.; Harakava, R. Bioprospection of *Trichoderma* spp. isolates to control *Rhizoctonia solani* on cucumber seedling production. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2009**, *44*, 225–232.

90. Zhang, Y.; Zhuang, W.Y. *Trichoderma brevicrassum* strain TC967 with capacities of diminishing cucumber disease caused by *Rhizoctonia solani* and promoting plant growth. *Biol. Control* **2020**, *142*, 104151.

91. Ezziyyani, M.; Requena, M.E.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M.E. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Int. J. Environ. Sci.* **2007**, *155*, 342–349.

92. Roberts, D.P.; Maul, J.E.; McKenna, L.F. Emche, S.E.; Meyer, S.L.F.; Collins, R.T.; Bowers, J.H. Selection of genetically diverse *Trichoderma* spp. isolates for suppression of *Phytophthora capsici* on bell pepper. *Can. J. Microbiol.* **2010**, *56*, 864–873.

93. Schubert, M.; Fink, S.; Schwarze, F.W.M.R. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biol. Control* **2008**, *45*, 111–123.

94. Swehla, A.; Pandey, A.K.; Nair, R.M. Bioactivity of *Trichoderma harzianum* isolates against the fungal root rot pathogens with special reference to *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of mungbean. *Indian Phytopathol.* **2020**, *73*, 787–792.

95. Elad, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.* **2000**, *19*, 709–714.

96. Gveroska, B.; Ziberoski, J. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *ATI Appl. Tech. Innov.* **2012**, *7*, 67–76.
97. Le, H.T.; Black, L.L.; Sikora, R.A. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol of tomato sudden caused by *Pythium aphanidermatum* following flooding in tropical hot season. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2003**, *68*, 463–474.
98. Ramesh, R. Management of damping off in brinjal using biocontrol agents. *J. Mycol. Plant Pathol.* **2004**, *34*, 666–669.
99. Zhang, S.; Xua, B.; Zhanga, J.; Ganc, Y. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pestic. Biochem. Phys.* **2018**, *147*, 59–66.
100. Fernandes, T.; Lopes, A.C.A.; Steindorff, S.A.R.; Jesuino, S.A.R.; Ulhoa, C. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1461–1468.
101. Amin, F.; Razdan, V.K.; Mohiddin, F.A.; Bhat, K.A.; Sheikh, P.A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in-vitro. *J. Phytol.* **2010**, *2*: 34–37.
102. Rini, C.R.; Sulochana, K.K. Management of seedling rot of chilli (*Capsicum annum* L.) using *Trichoderma* spp. and fluorescent pseudomonads (*Pseudomonas fluorescens*). *J. Trop. Agric.*, **2006**, *44*, 79–82.
103. Hafez, Y.M.; El-Nagar, A.S.; Elzaawely, A.A.; Kamel, S.; Maswada, H.F. Biological control of *Podosphaera xanthii* the causal agent of squash powdery mildew disease by up-regulation of defense-related enzymes. *Egyptia J. Biol. Pest Control* **2018**, *28*, 57.
104. Khanzada, M.A.; Tanveer, M.; Maitlo, S.A.; Hajano, J.; Ujjan, A.A.; Syed, R.N.; Lodhi, A.M.; Rajput, A.Q. Comparative efficacy of chemical fungicides, plant extracts and biocontrol agents against *Fusarium solani* under laboratory conditions *Pak. J. Phytopathol.* 2016, *28* 133–139.

105. Pérez-Hernández, A.; Porcel-Rodríguez, E.; Gómez-Vázquez, J. Survival of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and fungicide application, soil solarization and biosolarization for control of crown and foot rot of zucchini squash. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1507–1514.
106. Roberti, R.; Veronesi, A.; Flamigni, F. Evaluation of microbial products for the control of zucchini foot and root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. *Phytopathol. Mediterr.* **2012**, *51*, 317–331.
107. Radványi, D.; Geösel, A.; Jókai, Z.; Fodor, S.P.; Gere, A. Detection and identification of microbial volatile organic compounds of the green mold disease: MVOC profile on different media. *Int. J. Agric. Environ. Inf. Sys.* **2020**, *11*, 14–28.
108. Krupke, O.A.; Castle, A.J.; Rinker, D.L. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **2003**, *107*, 1467–1475.
109. Pandey, V.; Shukla, A.; Kumar, J. Physiological and molecular signalling involved in disease management through *Trichoderma*: An effective biocontrol paradigm. In *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*; Kumar, P., Gupta, V.K., Tiwari, A.K., Kamle, M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; 2016. pp. 317–346.
110. Mahalakshmi, P.; Yesu, R.I. Biocontrol potential of *Trichoderma* species against wilt disease of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi*. *J. Biopest.* **2013**, *6*, 32–36.
111. El-Katatny, M.; Gudelj, M.; Robra, K.H.; Elnaghy, M.; Gübitz, G. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium Rolfsii*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2001**, *56*, 137–143.
112. Luković, J.; Milijašević-Marčić, S.; Hatvani, L.; Kredics, L.; Szűcs, A.; Vágvölgyi, C.; Duduk, N.; Vico, I.; Potočnik, I. Sensitivity of *Trichoderma* strains from edible mushrooms to the fungicides prochloraz and metrafenone. *J. Environ. Sci. Health* **2020**, *56*, 54–63.
113. Komon-Zelazowska, M.; Bissett, J.; Zafari, D.; Hatvani, L.; Manczinger, L.; Woo, S.; Lorito, M.; Kredics, L.; Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Genetically closely related but phenotypically

divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7416–7426.

114. Oskiera, M.; Szczecha, M.; Stępowaska, A.; Smolińska, U.; Bartoszewski, G. Monitoring of *Trichoderma* species in agricultural soil in response to application of biopreparations. *Biol. Control* **2017**, *113*, 65–72.

115. Destri Nicosia, M.G.L.; Mosca, S.; Mercurio, R.; Schena, L. Dieback of *Pinus nigra* seedlings caused by a strain of *Trichoderma viride*. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 44–49.

116. Pfordt, A.; Schiwiek, S.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A. *Trichoderma Afroharzianum* Ear Rot—A new disease on maize in Europe. *Front. Agron.* **2020**, *2*, 547758.

117. Tijerino, A.; Cardoza, R.E.; Moraga, J.; Malmierca, M.G.; Vicente, F.; Aleu, J.; Collado, I.G.; Gutierrez, S.; Monte, E.; Hermosa, R. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 285–296.

118. Yang, Y.; Yu, S.; Tan, Y.; Liu, N.; Wu, A. Individual and combined cytotoxic effects of co-occurring deoxynivalenol family mycotoxins on human gastric epithelial cells. *Toxins* **2017**, *9*, 96.

119. Muñoz, F.M.; Demmler, G.J.; Travis, W.R.; Ogden, A.K.; Rossmann, S.N.; Rinaldi, M.G. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 499–503.

Sautour, M.; Chrétien, M.L.; Valot, S.; Lafon, I.; Basmacıyana, L.; Legouge, C.; Verrier, T.; Gonssaud, B.; Abou-Hanna, H.; Dalle, F.; et al. First case of proven invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a neutropenic patient with acute leukemia. *J. Mycol. Med.* **2018**, *28*, 659–662.



## Conclusiones Generales

### Capítulo 1.

1. En el análisis bibliométrico realizado, sobre la tendencia de investigación a nivel mundial sobre el género *Trichoderma*, se obtuvo información relevante sobre las directrices de exploración, relacionadas con las principales aplicaciones de este hongo, siendo las de mayor importancia la producción y aplicación de enzimas en diferentes ámbitos industriales.

2. Se expuso la predisposición de investigación de los científicos a lo largo de seis décadas, en la evaluación de las diferentes cepas de *Trichoderma*, para la aplicación de en la agricultura por su capacidad de promoción de crecimiento vegetal y como agente de control biológico.

3. No obstante, son pocas las cepas de las que se ha obtenido más información en concreto cuatro, derivada de la investigación en su producción y aplicación enzimática como (PGPM y MBCA); además de ser un pequeño número los países e instituciones con el mayor porcentaje de la publicación científica (India, Estados Unidos y China con un 37.8%, con 8 de las 16 instituciones).

### Capítulo 2.

1. La evaluación de la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol, por varias cepas de *Trichoderma*, en diferentes condiciones de temperatura y salinidad, permitió demostrar que todos los aislados analizados eran capaces de realizar ambas acciones.

2. La evaluación de la tolerancia estrés salino, informaba las mejores condiciones de crecimiento micelial a diferentes temperaturas y concentraciones salinas, así como el potencial antagónico de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con porcentaje de inhibición de 55% contra *Pythium ultimum*. Se obtuvo una reducción en la enfermedad a las diferentes concentraciones salinas evaluadas, con un mayor porcentaje de 62.96% a 0 g·L<sup>-1</sup> de NaCl.

3. Se describió por primera vez en este capítulo a *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* como ACB y promotor del crecimiento, contrario a lo descrito en la bibliografía, que se tenía reportada como un patógeno para cultivos de champiñón.

### Capítulo 3.

1. Al comparar la promoción del crecimiento vegetal en tomate y pimiento, dos de los cultivos más importantes en la zona del estudio en condiciones similares de producción de plántula y siembra a las realizadas por los agricultores, se logró demostrar la capacidad bioestimulante de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en condiciones de semillero e invernadero comerciales, así como la producción de metabolitos de importancia agrícola.

2. Los tratamientos de dosis de esporas aplicados tras el trasplante de las plántulas, generaron una buena relación en el desarrollo de los brotes y las raíces, promoviendo una mejor calidad en las plantas de tomate; se observó en el caso de los brotes para las dosis (TA D1 y TA D2) un aumento de 43.20%, 22.84% respectivamente, para el peso seco de las raíces un aumento de 29.94% con (TA D1) y 39.32% para (TA D2)

3. El análisis de los sustratos para la producción masiva de esporas fue mayor en las combinaciones de 80% trigo sarraceno + 20 % de arroz y en la proporción 70% trigo sarraceno y 30% avena, a fin de obtener el costo más bajo de producción.

### Capítulo 4.

1. El ensayo de antagonismo in vitro de las principales enfermedades de interés, en los cultivos hortícolas por *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, permitió apreciar altos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial cerca del 90% para *Fusarium solani* y *Mycosphaella melonis*. Para los demás patógenos evaluados se obtuvo entre un 70 y 90%.

2. Para la evaluación de la reducción de la severidad de los daños causados por la enfermedad en aplicación preventiva en el ensayo de hojas desprendidas en las hojas de pepino, pimiento y tomate se previnieron los síntomas en un 100% para *Botrytis cinerea*, 100% *Sclerotinia sclerotiorum* y 93% para *Mycosphaella melonis*.

3. La incidencia de la enfermedad fue reducida en mayor porcentaje en el caso de *Mycosphaella melonis* con un 80.55%, 62% *Botrytis cinerea* y 65.78% *Sclerotinia sclerotiorum*. La gravedad de la enfermedad fue reducida con un 67.44% para el patógeno *Rhizoctonia solani*, 58.69% *Pythium aphanidermatum* y 22.44% *Fusarium solani* f. *cucurbitae*. Se redujo en 66.78% la gravedad de la enfermedad causada por *P. xhantii*.

4. Se obtuvieron datos de la alta compatibilidad con fungicidas químicos, en diferentes dosis. Sin embargo, hace falta realizar más estudios con plantas para establecer las mejores dosis para su uso en el manejo integrado de plagas.

5. Los resultados obtenidos permiten concluir como positiva la caracterización de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, como promotor del crecimiento vegetal y agente de control biológico, recomendando continuar con la investigación de las mejores condiciones de aplicación de este hongo en producciones comerciales.

## General conclusions

### Chapter 1.

1. In the bibliometric analysis carried out on the global research trend on the *Trichoderma* genus, relevant information was obtained on the exploration guidelines related to the main applications of this fungus, with the most important being the production and application of enzymes in different industrial fields.

2. The research predisposition of scientists over six decades in the evaluation of the different strains of *Trichoderma* for application in agriculture for their capacity to promote plant growth and as a biological control agent was presented.

3. However, there are few strains for which more information has been obtained, specifically four, derived from research on their production and enzymatic application (PGPM and MBCA); in addition to being a small number of countries and institutions with the highest percentage of scientific publication (India, United States and China with 37.8%, with 8 of the 16 institutions).

### Chapter 2.

1. Evaluation of plant growth promotion and biocontrol by various *Trichoderma* strains under different temperature and salinity conditions showed that all isolates tested were able to perform both actions.

2. The evaluation of salt stress tolerance reported the best mycelial growth conditions at different temperatures and salt concentrations, as well as the antagonistic potential of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* with an inhibition percentage of 55% against *Pythium ultimum*. A reduction in the disease was obtained at the different salt concentrations evaluated, with a higher percentage of 62.96% at 0 g-L<sup>-1</sup> NaCl.

3. *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* was described for the first time in this chapter as a CBA and growth promoter, contrary to what was described in the literature, which had been reported as a pathogen for mushroom crops.

### Chapter 3.

1. By comparing plant growth promotion in tomato and pepper, two of the most important crops in the study area under similar seedling and sowing conditions to those of farmers, the biostimulant capacity of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* was demonstrated under commercial seedbed and greenhouse conditions, as well as the production of agriculturally important metabolites.

2. The spore dose treatments applied after transplanting the seedlings, generated a good relationship in the development of shoots and roots, promoting a better quality in tomato plants; it was observed in the case of the shoots for the doses (TA D1 and TA D2) an increase of 43.20%, 22.84% respectively, for the dry weight of the roots an increase of 29.94% with (TA D1) and 39.32% for (TA D2).

3. The analysis of substrates for mass spore production was higher in the combinations of 80% buckwheat + 20% rice and in the ratio 70% buckwheat and 30% oats, in order to obtain the lowest cost of production.

### Chapter 4.

1. The in vitro antagonism test of the main diseases of interest in horticultural crops by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* showed high percentages of inhibition of mycelial growth of around 90% for *Fusarium solani* and *Mycosphaella melonis*. For the other pathogens evaluated, between 70 and 90% were obtained.

2. For the evaluation of the reduction of the severity of disease damage caused by preventive application in the test of detached leaves on cucumber, pepper and tomato leaves, symptoms were prevented by 100% for *Botrytis cinerea*, 100% for *Sclerotinia sclerotiorum* and 93% for *Mycosphaella melonis*.

3. Disease incidence was reduced in higher percentage for *Mycosphaella melonis* with 80.55%, 62% *Botrytis cinerea* and 65.78% *Sclerotinia sclerotiorum*. Disease severity was reduced by 67.44% for the pathogen *Rhizoctonia solani*, 58.69% *Pythium aphanidermatum* and 22.44% *Fusarium solani* f. *cucurbitae*. Disease severity caused by *P. xhantii* was reduced by 66.78%.

4. Data were obtained on high compatibility with chemical fungicides, at different doses. However, further studies with plants are needed to establish the best doses for use in integrated pest management.

5. The results obtained allow us to conclude that the characterisation of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as a plant growth promoter and biological control agent is positive, recommending further research into the best conditions for the application of this fungus in commercial production.