



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**Valoración de metabolitos de *Trichoderma* sp. como agente controlador de la Sigatoka
negra**

Christian Andrés Mosquera Jaraba

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Ingeniero Bioquímico

Asesoras

Carolina Montoya Vallejo, PostDoctor (PostDoc) en Ingeniería Química

Yennifer Adriana Hinstroza Durango, Ingeniera Bioquímica

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Bioquímica
Carepa, Antioquia, Colombia
2025



Cita

Mosquera Jaraba [1]

Referencia

- [1] C. Mosquera Jaraba, “Valoración de metabolitos de *Trichoderma* sp. como agente controlador de Sigatoka negra”, Trabajo de grado profesional, Ingeniería Bioquímica, Universidad de Antioquia, Carepa, Antioquia, Colombia, 2025.

Estilo IEEE (2020)



Grupo de Investigación. Bioprocesos y grupo de investigación de Biomateriales

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).

Biblioteca Sede Estudios Ecológicos y Agroambientales Tulenapa (Carepa)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos

Antes que nada, quiero agradecer al creador por la oportunidad de permitirme llevar a cabo esta linda investigación. A mis padres, por su paciencia y enseñanzas.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la profesora Carolina Montoya, mi asesora interna, por su acompañamiento constante y valiosos aportes durante el desarrollo de este proceso. Su guía académica, profesional y humana fue fundamental para la culminación exitosa de este trabajo.

Agradezco también a mi coasesora, Yennifer Hinestroza, por su compromiso y disposición permanente para brindar sus conocimientos y experiencias, las cuales enriquecieron significativamente el proyecto.

De igual manera, extiendo un especial reconocimiento a la profesora Natalia, por su acompañamiento, sugerencias y aportes académicos que contribuyeron al fortalecimiento de este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a Yorladis, Osiris y Yeina, mujeres valiosas que con su apoyo, participación y confianza hicieron posible el desarrollo de esta iniciativa.

Agradezco especialmente a Urias Montiel, quien con gran disposición permitió la toma de muestras en su finca, de donde se aisló la cepa URI (*Trichoderma harzianum*), aporte fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, expreso mi gratitud a mi alma mater, la Universidad de Antioquia, por brindarme las herramientas académicas y humanas necesarias para mi formación profesional. Gracias por ser el espacio donde se gestaron los aprendizajes y experiencias que hoy se reflejan en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 11 |
| ABSTRACT | 12 |
| I. INTRODUCCIÓN | 13 |
| II. OBJETIVOS | 15 |
| III. MARCO TEÓRICO | 16 |
| 3.1. La subregión de Urabá y sus cultivos característicos..... | 16 |
| 3.2. Sigatoka negra | 16 |
| 3.3. Métodos actuales de control..... | 16 |
| 3.4. Control biológico como alternativa sostenible..... | 17 |
| 3.5. Generalidades de Trichoderma..... | 17 |
| 3.6. Clasificación taxonómica | 18 |
| 3.7. Macro y microscopía | 18 |
| 3.8. Metabolitos secundarios de Trichoderma | 19 |
| 3.9. Activación del metabolismo secundario | 20 |
| 3.10. Compuestos con actividad antifúngica presentes en Trichoderma spp..... | 20 |
| Péptidos no ribosómicos | 20 |
| Peptaibióticos | 20 |
| Epipolítiodioxopiperazinas..... | 20 |
| Sideróforos | 21 |
| Policétidos..... | 21 |
| Terpenoides..... | 21 |
| 3.11 Cultivos de Trichoderma..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.12. Producción de peptaiboles..... | 22 |
| IV. METODOLOGÍA | 23 |
| 4.1. Recolección de muestras | 23 |
| Muestras de suelo..... | 23 |
| Muestras de tejido foliar | 24 |
| 4.2. Aislamiento de Trichoderma..... | 24 |
| 4.3. Identificación macroscópica y microscópica de Trichoderma..... | 25 |
| 4.4. Conservación de las cepas aisladas | 26 |
| 4.5. Cultivo para producción del metabolito..... | 26 |
| 4.6. Técnicas de extracción del metabolito | 28 |
| 4.6.1. Extracción cultivo sólido | 28 |
| 4.6.2. Extracción cultivo líquido..... | 28 |
| 4.7. Evaluación de la actividad inhibitoria in vitro del metabolito | 29 |
| 4.8. Análisis molecular..... | 30 |
| 4.9. Análisis estadístico..... | 30 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 31 |
| 5.1. Bioprospección y aislamiento de cepas autóctonas de Trichoderma sp..... | 31 |
| 5.2. Condiciones de cultivo para la producción de biomasa y metabolitos | 33 |
| 5.4. Caracterización química del metabolito..... | 34 |
| 5.5. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro frente a <i>Pseudocercospora fijiensis</i> | 37 |
| 5.5.1. Actividad inhibitoria de los metabolitos producidos en fermentación líquida | 37 |
| Concentración efectiva media (EC ₅₀) en cultivo líquido..... | 37 |
| 5.5.2. Actividad inhibitoria de los metabolitos en condiciones sólidas | 40 |
| Concentración efectiva media (EC ₅₀) en cultivo sólido | 40 |
| Comparación con cultivo líquido | 41 |

| | |
|--|----|
| 5.6. Análisis estadísticos de los resultados encontrados | 43 |
| 5.6.1. Caso - Extractos obtenidos de la cepa UdeA | 44 |
| 5.6.2. Caso - Extractos obtenidos de la cepa URI..... | 45 |
| VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 49 |
| REFERENCIAS | 51 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA I. CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACIÓN LÍQUIDA..... | 38 |
| TABLA II. CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA | 40 |
| TABLA III. EXTRACTO NECESARIO PARA INHIBICIÓN ABSOLUTA (μ L) | 44 |
| TABLA IV. CUADRO COMPARATIVO TRATAMIENTOS SELECCIONADOS UDEA | 44 |
| TABLA V. CUADRO COMPARATIVO TRATAMIENTOS SELECCIONADOS URI | 46 |
| TABLA VI. ANÁLISIS DE MEDIAS | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig 1. Cultivo en caja Petri de (a) <i>Trichoderma harzianum</i> (b) <i>Trichoderma viride</i> | 19 |
| Fig 2. Toma de muestra de suelo con Barreno..... | 23 |
| Fig 3. Toma de muestra de tejido foliar. | 24 |
| Fig 4. Procesamiento de las muestras de suelo (a) Diluciones seriadas, (b) Siembra en medio PDA y TSM..... | 25 |
| Fig 5. Conservación de <i>Trichoderma</i> sp. en papel Filtro..... | 26 |
| Fig 6. Fermentación en estado líquido (luz y oscuridad) – PDB pH 5,5 | 27 |
| Fig 7. Fermentación en estado sólido – PDA y TSM pH 5,5..... | 27 |
| Fig 8. Procesamiento de la muestra proveniente de la fermentación en estado sólido | 28 |
| Fig 9. Extracción líquido – líquido de los metabolitos | 29 |
| Fig 10. Procesamiento de las muestras se Sigatoka negra. | 29 |
| Fig 11. Crecimiento de las diluciones seriadas (a) Solución madre, (b) 1×10^{-1} (c) 1×10^{-2} , (d) 1×10^{-3} | 31 |
| Fig 12. <i>Trichoderma</i> sp. aislada en UdeA- Carepa (a) Cultivo sólido en TSM (15 días), (b) Vista al microscopio 40 X. | 32 |
| Fig 13. <i>Trichoderma</i> sp. aislada en Finca Uri - Turbo (a) Cultivo sólido en TSM (7 días), (b) Vista al microscopio 40 X. | 32 |
| Fig 14. Extractos purificados (a) Provenientes del cultivo sólido (b) provenientes del cultivo líquido..... | 33 |
| Fig 15. Espectro FTIR del extracto UdeA - Líquido..... | 34 |
| Fig 16. Espectro FTIR del extracto URI - Sólido | 36 |
| Fig 17. % de inhibición de los extractos provenientes del cultivo líquido (UdeA / URI)(Luz/Oscuridad)..... | 39 |
| Fig 18. Esporas de <i>P. fijiensis</i> vistas al microscopio 10 X en las diferentes dosis de extracto evaluado - Extracto Líquido Oscuridad UDEA | 39 |
| Fig 19. % de inhibición de los extractos provenientes del cultivo sólido (UdeA / URI)(Luz/Oscuridad). | 42 |

Fig 20. Esporas de *P. fijiensis* vistas al microscopio 10 X en las diferentes dosis de extracto evaluado - Extracto Líquido Luz URI.....42

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| PDB | Potato Dextrose Broth |
| TSA | Tryptic soy agar |
| TSM | <i>Trichoderma</i> Selective Medium |
| UdeA | <i>Trichoderma</i> aislada en la Universidad de Antioquia – Carepa |
| URI | <i>Trichoderma</i> aislada en la finca URI - Turbo |

RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis*, constituye una de las principales enfermedades que afectan los cultivos de musáceas en la región del Urabá antioqueño, generando pérdidas económicas significativas y dependencia del control químico. En este contexto, el uso de agentes biológicos como *Trichoderma sp.* se presenta como una alternativa sostenible. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por cepas autóctonas de *Trichoderma sp.*, aisladas en suelos agrícolas de la región. La metodología incluyó la bioprospección, aislamiento e identificación microscópica de las cepas, su cultivo en medios sólidos y líquidos bajo diferentes condiciones de luz y oscuridad, la extracción de metabolitos mediante solventes orgánicos y la evaluación in vitro de su efecto inhibitorio sobre el tubo germinativo de *P. fijiensis*. Los resultados mostraron que ambas cepas presentaron una inhibición significativa dependiente de la concentración, alcanzando valores del 100 % en dosis superiores a 600 µL. La cepa aislada en la Universidad de Antioquia (UdeA) (*Trichoderma asperellum*) evidenció mayor estabilidad en sus respuestas bioactivas, especialmente en condiciones de oscuridad, mientras que la cepa URI (*Trichoderma harzianum*) destacó en medio líquido bajo luz. Estos hallazgos confirman el potencial de los metabolitos de *Trichoderma sp.* como agentes de biocontrol frente a la Sigatoka negra y promueven su aplicación en la producción agrícola sostenible.

Palabras clave — *Trichoderma sp.*, metabolitos secundarios, control biológico, *Pseudocercospora fijiensis*, Sigatoka negra.

ABSTRACT

Black Sigatoka, caused by *Pseudocercospora fijiensis*, is one of the most destructive diseases affecting banana and plantain crops in the Urabá region of Antioquia, leading to significant economic losses and excessive dependence on chemical control. In this context, the use of biological agents such as *Trichoderma* sp. represents a sustainable alternative. This study aimed to evaluate the antifungal activity of secondary metabolites produced by native *Trichoderma* sp. strains isolated from agricultural soils in the region. The methodology included bioprospecting, isolation, and microscopic identification of the strains, cultivation under solid and liquid media with light and dark photoperiods, extraction of metabolites using organic solvents, and in vitro evaluation of their inhibitory effect on *P. fijiensis* germ tube development. The results showed that both strains exhibited concentration-dependent inhibition, reaching up to 100 % inhibition at doses above 600 μ L. The strain isolated from the University of Antioquia (UdeA) (*Trichoderma asperellum*) showed greater stability in its bioactive responses, particularly under dark conditions, while the URI (*Trichoderma harzianum*) strain performed better in liquid media under light exposure. These findings confirm the potential of *Trichoderma* sp. metabolites as biological control agents against Black Sigatoka, supporting their application in sustainable agricultural production.

Keywords — *Trichoderma* sp., secondary metabolites, biological control, *Pseudocercospora fijiensis*, Black Sigatoka

I. INTRODUCCIÓN

El uso de agentes biológicos para el control de enfermedades en cultivos agrícolas ha cobrado relevancia en los últimos años como alternativa frente al uso intensivo de plaguicidas químicos, los cuales han demostrado efectos adversos en el medio ambiente, la salud humana y la sostenibilidad de los sistemas productivos. En este contexto, *Trichoderma*, un ascomiceto de la familia Hypocreaceae, ha emergido con un gran interés biotecnológico por su capacidad de producir metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, su competencia por espacio y nutrientes, y su notable capacidad de micoparasitismo [1]-[3].

Trichoderma spp. es un organismo cosmopolita que habita suelos, madera en descomposición y rizósferas de plantas. Presenta una alta plasticidad ecológica y se caracteriza por su rápido crecimiento, su elevada producción de enzimas y su interacción simbiótica con plantas [4][5]. Además, es capaz de sintetizar diversos metabolitos secundarios como péptidos no ribosomales, policétidos y terpenoides, que le confieren una fuerte actividad antimicrobiana y citotóxica frente a hongos fitopatógenos [3][6][7]. La expresión de estos metabolitos depende de múltiples factores como el pH, la luz, las condiciones de cultivo y la interacción con otros organismos [8]-[10].

Uno de los principales retos fitosanitarios en el cultivo de musáceas es la Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, que afecta severamente la producción bananera en regiones tropicales y subtropicales. Su control convencional mediante fungicidas no solo incrementa los costos de producción, sino que también genera impactos negativos sobre el agroecosistema. Frente a esta problemática, el uso de cepas de *Trichoderma spp.* autóctonas, adaptadas a condiciones locales, representa una alternativa prometedora para el desarrollo de bioproductos eficaces, seguros y sostenibles [11].

Este trabajo tiene como objetivo principal evaluar la actividad antifúngica de metabolitos secundarios producidos por cepas autóctonas de *Trichoderma sp.*, aisladas de suelos agrícolas de la subregión de Urabá, frente al patógeno *P. fijiensis*. Para ello, se plantea un estudio experimental de tipo cuantitativo que comprende varias etapas:

- (i) Una revisión bibliográfica sobre los mecanismos de acción de *Trichoderma* y sus metabolitos;
- (ii) La bioprospección, aislamiento e identificación morfológica y microscópica de cepas nativas;
- (iii) El cultivo en medios sólidos y líquidos para la producción de biomasa y metabolitos;
- (iv) La extracción y caracterización química de los compuestos bioactivos mediante técnicas cromatográficas como HPLC-MS; y
- (v) La evaluación in vitro de su efecto inhibitorio sobre el desarrollo del tubo germinativo de *P. fijiensis*.

II. OBJETIVOS

A. *Objetivo general*

Evaluar un metabolito secundario de una cepa autóctona de *Trichoderma* sp. aislada en la subregión de Urabá para su potencial uso en el control biológico de *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra en banano y plátano.

B. *Objetivos específicos*

Realizar bioprospección y aislamiento de una cepa autóctona de *Trichoderma* sp. en la subregión de Urabá, con potencial bioactivo para el control de *Pseudocercospora fijiensis*.

Establecer condiciones de cultivo para la cepa de *Trichoderma* sp. en medios sólidos y líquidos para la producción de biomasa y metabolitos secundarios.

Desarrollar una metodología de extracción y caracterización de un metabolito de *Trichoderma* sp. con actividad reportada en el control de *Pseudocercospora fijiensis*.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. La subregión de Urabá y sus cultivos característicos

La subregión de Urabá, ubicada en el departamento de Antioquia, es reconocida por su alto potencial agrícola, en especial por la producción de musáceas (banano y plátano), que constituyen su principal actividad económica y una de las mayores fuentes de exportación del país [12]. Las condiciones agroclimáticas de la región, con temperatura entre 26 – 28 °C, alta humedad relativa y precipitaciones frecuentes, favorecen el desarrollo de los cultivos de musáceas, pero a su vez propician la aparición y propagación de enfermedades como la Sigatoka negra, la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (FOC R4T), la pudrición del racimo causada por *Colletotrichum musae* [13].

3.2. Sigatoka negra

La sigatoka negra es una enfermedad foliar causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, que afecta a las musáceas y se considera una de las más devastadoras en plantaciones de banano y plátano en zonas tropicales [14]. Este patógeno invade el tejido foliar, reduce la capacidad fotosintética de la planta y disminuye la calidad y rendimiento del fruto. La infección progresa desde manchas foliares hasta la necrosis total de las hojas, acelerando la maduración prematura del fruto y afectando su comercialización [15].

3.3. Métodos actuales de control

El manejo convencional de la Sigatoka negra se basa principalmente en el control químico mediante la aplicación frecuente de fungicidas sistémicos y de contacto. En regiones como Urabá, pueden realizarse hasta 50 aplicaciones aéreas anuales para contener la enfermedad[16],[17]. Sin

embargo, el uso intensivo de agroquímicos ha generado preocupaciones ambientales, riesgos para la salud humana, resistencia fúngica y altos costos de producción [18].

Además de los fungicidas se han implementado prácticas culturales como la eliminación de hojas infectadas, mejora de la ventilación en el cultivo y uso de variedades tolerantes, aunque estas estrategias por si solas no resultan suficientes para un control efectivo y sostenible [19].

3.4. Control biológico como alternativa sostenible

El control biológico ha emergido como una estrategia promisorio dentro del marco de la agricultura sostenible y la bioeconomía. Esta práctica consiste en el uso de organismos vivos o sus metabolitos para reducir la incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos [20]. En el caso de enfermedades como la Sigatoka negra, los agentes de biocontrol pueden competir por espacio y nutrientes, parasitar al patógeno, inducir respuestas de defensa en la planta o secretar compuestos antifúngicos.

3.5. Generalidades de *Trichoderma*

El hongo *Trichoderma*, un ascomiceto perteneciente a la familia Hypocreaceae, es un organismo cosmopolita que se encuentra comúnmente en suelos, madera y en hortalizas en descomposición. Se caracteriza por su alta plasticidad ecológica, lo que le permite tener una notable capacidad para interactuar con otros hongos, animales y plantas, y por su habilidad para degradar una amplia gama de sustratos, lo que lo convierte en un excelente candidato para diversas aplicaciones biotecnológicas. Posee una gran capacidad de producción de metabolitos activos que le otorgan propiedades de micoparasitismo, compitiendo eficazmente por espacio y nutrientes, y generando compuestos antimicrobianos que actúan sobre patógenos de plantas. A pesar de que su clasificación taxonómica es compleja y aún incompleta, estudios moleculares han ayudado a mejorar la identificación de especies dentro del género, lo que facilita su uso en biotecnología [1].

3.6. Clasificación taxonómica

El género *Trichoderma* pertenece al filo Ascomycetes, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae [4]. En general, no presenta estado sexual específico y además posee más de 200 especies, de las cuales más de 30 poseen propiedades para el control biológico. La reproducción asexual se da mediante la formación de conidios, los cuales son esporas verdes formadas por conidióforos ramificados y septados. Son conocidos por su rápida tasa de crecimiento y su alta producción de enzimas [2] [5]. Las especies más relevantes de *Trichoderma* para el control biológico incluyen *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. harzianum*, siendo este último recientemente identificado con el estado sexual *Hypocrea lixii*. Estos hongos son aeróbicos facultativos y simbióticos con plantas, sin ser patógenos para ellas. Se encuentran comúnmente en suelos agrícolas y en otros ambientes, particularmente en las raíces de plantas, mostrando una notable capacidad de colonización y adaptación a una variedad de suelos y condiciones ambientales, desde suelos ácidos hasta aquellos con diferentes contenidos de materia orgánica [5].

3.7. Macro y microscopía

La coloración generalmente varía entre blanco algodonoso al principio del cultivo [5] hasta un verde amarillento y verde oscuro [21]. También puede presentar coloración gris verdoso y verde claro [22], con presencia de anillos concéntricos distribuidos en el interior de la caja y micelio aéreo. Produce tres tipos de propágulos: las hifas, los conidios y las clamidosporas; estas últimas son estructuras globosas con pared rugosa y más gruesa que los conidios con capacidad de resistencia a las condiciones desfavorables. Los conidióforos son muy ramificados, hifas tabicadas con más de un núcleo; los conidios son ovoides con un único núcleo y pared normalmente lisa, siendo el verde el color principal [2].

A continuación, se muestran dos especies de *Trichoderma* con coloraciones características diferentes. En la **figura 1** se muestra a *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*.

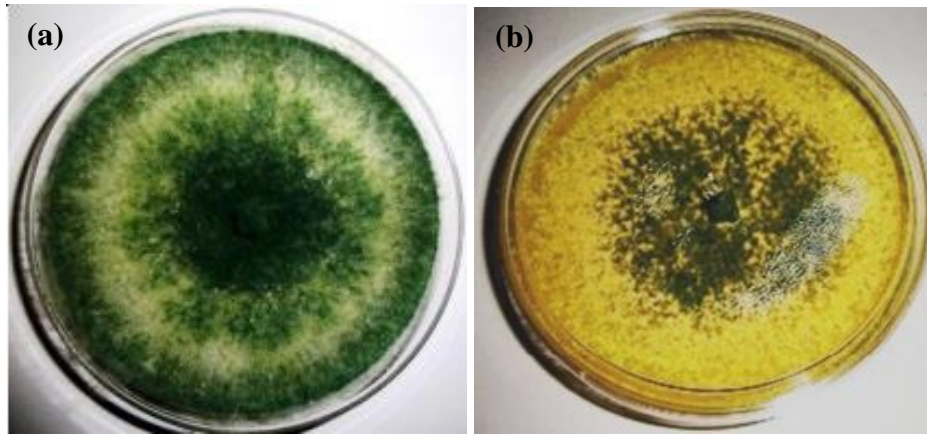


Fig 1. Cultivo en caja Petri de (a) *Trichoderma harzianum* (b) *Trichoderma viride*

Nota fuente: [23].

3.8. Metabolitos secundarios de *Trichoderma*

Diferentes factores como la señalización del pH, las proteínas del complejo velvet y las interacciones con otros organismos son responsables de la expresión de genes relacionados con los metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp.[8].

Los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*, como los péptidos no ribosomales (NRP), los cuales incluyen epipolítidioxopiperazinas (ETP) y sideróforos; los policétidos y terpenoides exhiben una notable actividad antifúngica [3][6]. Los NRP, especialmente los peptaibióticos, actúan formando canales en las membranas y permeabilizándolas, lo que les confiere propiedades antimicrobianas y citotóxicas. Las ETP, como la gliotoxina, son altamente tóxicas y tienen un papel dual como factores de virulencia y agentes antimicrobianos, suprimiendo hongos competidores. Los sideróforos, aunque principalmente quelantes de hierro, limitan la disponibilidad de este recurso para otros microorganismos, lo que indirectamente contribuye a la actividad antifúngica [6].

3.9. Activación del metabolismo secundario

Diversos factores como la luz, el pH, los nutrientes, la inanición o las lesiones mecánicas afectan a este proceso [9]. En *Trichoderma*, la luz influye profundamente en el crecimiento, el desarrollo asexual y sexual, la regulación de las enzimas y el metabolismo secundario [10].

La fermentación se lleva a cabo incubando el cultivo bajo iluminación, agitación y aireación a temperaturas que oscilan entre 25 °C y 30 °C. El pH del medio se mantiene entre aproximadamente 5,8 y 7,0 [9].

3.10. Compuestos con actividad antifúngica presentes en *Trichoderma* spp.

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios con alta capacidad antagonista donde aproximadamente el 80 % pertenecen al grupo de los peptaibióticos [24] de los cuales destacan los peptaiboles [25].

Péptidos no ribosómicos

Peptaibióticos

Son un gran grupo de péptidos lineales o, en algunos casos, cíclicos con una longitud de 4-21 residuos y un peso molecular de 500-2100 Da [6], destacándose a *Trichoderma* como el máximo productor [26]. Poseen actividad formadora de canales iónicos e inhiben las enzimas asociadas a la membrana implicadas en la síntesis de la pared celular [26], [7], [27].

Epipolítiodioxopiperazinas

Son metabolitos altamente reactivos caracterizados por un anillo de dicetopiperazina que se deriva de un péptido cíclico. Su toxicidad se debe a la presencia de un puente disulfuro que inactiva las proteínas uniéndose a grupos tiol y generando especies reactivas de oxígeno mediante ciclos redox, siendo la gliotoxina la mejor estudiada [6] [28].

Sideróforos

Los sideróforos fúngicos son principalmente fusarininas, coprógenos y ferricromos, que pertenecen al grupo de los sideróforos hidroxamato. La deficiencia de hierro en el caldo de cultivo conduce a la expresión de coprógeno, coprógeno B y ferricrocina [6]. Solo se han asociado dos NRPS a la biosíntesis de sideróforos en *Trichoderma*. Uno forma parte del grupo de genes biosintéticos de ferricrocina (BGC) en *T. virens*, *T. atroviride* y *T. reesei*, y el otro es un NRPS del tipo NPS6, que está involucrado en la producción de la mayoría de los sideróforos secretados por *T. virens* [29].

Policétidos

Los policétidos son un grupo de metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos [30]. Se sintetizan a partir de unidades simples como la acetyl-CoA y la malonil-CoA mediante policétidos sintetasas (PKS), que realizan sucesivas reacciones de condensación descarboxilativa. Las PKS son enzimas complejas está compuesta por al menos una cetoacil sintasa, una acil transferasa y un dominio de unión a fosfopanteteína [6]. Estas se expresan en diferentes condiciones y están reguladas por la proteína Vel1. Algunas PKSs en *T. virens* y *T. atroviride* se asocian con la protección contra radiación UV y la interacción con otros organismos, como en el micoparasitismo [30].

Terpenoides

Los terpenoides identificados a partir de *Trichoderma* spp. incluyen terpenos volátiles, el diterpeno tetracíclico harziandiona, sesquiterpenos como los tricotecenos trichodermina y harzianum A, y el triterpeno viridina. Las enzimas clave en la biosíntesis de terpenos son las terpeno sintetasas/terpeno ciclasas. Sin embargo, la diversidad de estructuras de terpenos con frecuencia supera el número de enzimas respectivas codificadas en el fenómeno, ya que las terpeno sintetasas producen una mezcla de compuestos estrechamente relacionados en lugar de un solo terpeno [6].

3.11 Cultivos de *Trichoderma*

Trichoderma es un hongo con gran potencial biotecnológico para el control de enfermedades en diversos cultivos agrícolas debido a su actividad antimicrobiana, principalmente de hongos clave como *Sclerotium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp., entre otros [31], incluyendo a *Mycosphaerella fijiensis* [32]. Actualmente, debido al daño causado por el uso de plaguicidas en la salud de los cultivos, se hace necesario hacer una transición a sistemas o bioproductos basados en *Trichoderma*, los cuales pueden ser sólidos o líquidos.

3.12. Producción de peptaiboles

La producción de peptaiboles y lipopeptaiboles se pueden lograr utilizando diversos medios nutritivos, como el agar de patata dextrosa (PDA), el agar de extracto de malta (MEA), la peptona de levadura glucosada (PYG), el agar de dextrosa caseína (DCA), el medio de agar selectivo para *Trichoderma* (TSM) y el medio Sabouraud (agar Sabouraud Difco); junto con la adición de pequeñas cantidades de sales como $MgSO_4$, $FeCl_2$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, KCl , K_2HPO_4 , KNO_3 , $Ca(H_2PO_4)_2$, $CuSO_4$ y $FeSO_4$ [24] en condiciones de no oscuridad [33].

IV. METODOLOGÍA

Este trabajo fue un estudio cuantitativo de tipo experimental. En una primera etapa se realizó una revisión bibliográfica sobre los métodos convencionales de control de la Sigatoka negra, los metabolitos producidos por *Trichoderma* sp., su modo de acción y su uso en el control biológico sobre *Pseudocercospora fijiensis*. Luego, se llevó a cabo una bioprospección y aislamiento de dos cepas autóctonas de *Trichoderma* sp. en la subregión de Urabá, así como el establecimiento de condiciones de cultivo en medios sólidos y líquidos para la producción de biomasa y metabolitos secundarios. Posteriormente, se llevó a cabo una metodología de extracción y caracterización del metabolito con potencial antifúngico.

4.1. Recolección de muestras

Muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron recolectadas en bolsas de plástico herméticas. Usando un barreno se cavaron huecos cerca de las raíces de las plantas de plátano con una profundidad entre 20 y 30 centímetros [34]. Se recolectaron las muestras de suelo donde se evidenciaron cortes sobre las raíces de la planta a la profundidad establecida (**Fig 2**).



Fig 2. Toma de muestra de suelo con Barreno.

Muestras de tejido foliar

Las muestras de tejido foliar fueron obtenidas realizando cortes sobre hojas de plantas infectadas con Sigatoka negra en estadio 6. Las hojas infectadas fueron cortadas con una podadora y las muestras fueron obtenidas posteriormente recortadas con tijeras previamente desinfectadas. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en bolsas de papel (**Fig 3**).



Fig 3. Toma de muestra de tejido foliar.

4.2. Aislamiento de *Trichoderma*

Las muestras de suelo fueron mezcladas hasta obtener una muestra uniforme. Posteriormente se tomó 1 gramo de esta mezcla y se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-3} [35]. De cada dilución, se tomaron 100 μ L y se sembró por extensión en placas Petri con medio de cultivo TSM (*Trichoderma* Selected Media) (**Fig 4**). Para la preparación de 1 L de medio se usaron 0,2 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,9 g de fosfato dipotásico de hidrógeno (K_2HPO_4), 0,15 g de cloruro de potasio (KCl), 1,0 g de nitrato de amonio (NH_4NO_3), 3,0 g de glucosa, 0,15 g de rosa de Bengala, 20 g de agar-agar y 0,25 g de cloranfenicol [36]. El protocolo de referencia consultado sugería acidificar el medio hasta pH 4,0 [37],[38]; sin embargo, en las pruebas preliminares bajo esas condiciones no se observó crecimiento de los aislamientos locales. Por tal razón, y con base en evidencia que sitúa el óptimo de crecimiento y esporulación de *Trichoderma* entre pH 4,5–5,5 y reportes comparativos donde pH 5,5 maximiza el crecimiento de diversas cepas, se ajustó el pH del TSM a 5,5 [39].

El pH se ajustó antes de la esterilización con HCl o NaOH (soluciones estándar) verificándolo con pH-metro calibrado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante un periodo de 7 días, observando el crecimiento característico de colonias de *Trichoderma* (coloración verde, crecimiento rápido, margen regular) [40].

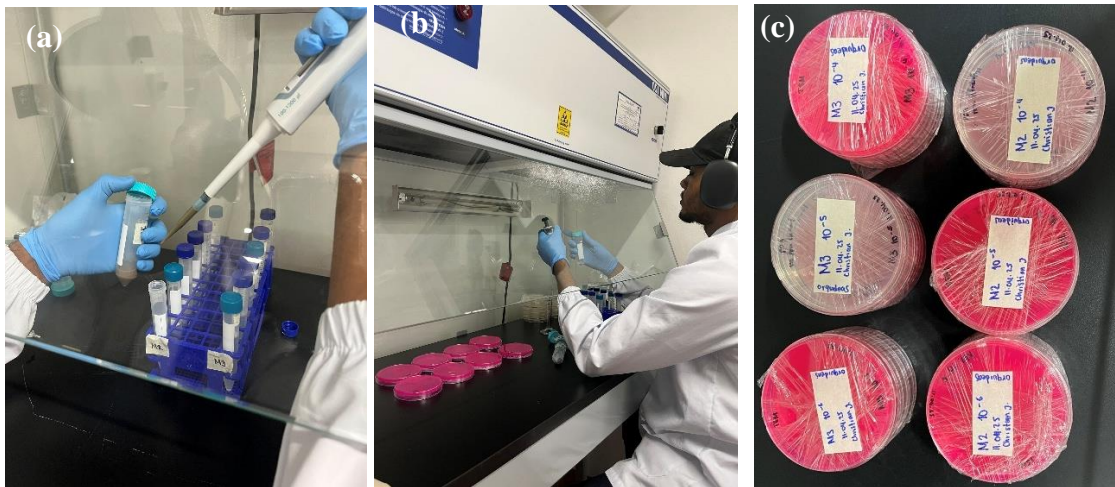


Fig 4. Procesamiento de las muestras de suelo (a) Diluciones seriadas, (b) Siembra en medio PDA y TSM.

4.3. Identificación macroscópica y microscópica de *Trichoderma*

Luego de incubar las cajas Petri con medio TSM, inoculadas con las diluciones seriadas de las muestras de suelo, se procedió a la identificación preliminar de colonias compatibles con *Trichoderma*. Las colonias fueron seleccionadas con base en su rápido crecimiento, micelio inicialmente blanco que adquirió tonalidades verdes y amarillas con el tiempo con textura algodonosa, márgenes definidos y presencia de anillos concéntricos. Las colonias fueron repicadas en placas con medio PDA suplementado con Rosa Bengala y 100 ppm de Cloranfenicol [41] para su purificación.

Una vez obtenidas colonias puras, se procedió con la identificación microscópica utilizando un microscopio óptico compuesto. Se prepararon montajes temporales con azul de lactofenol donde se pudieron observar estructuras típicas del género *Trichoderma*, como conidióforos ramificados, fiálides en disposición verticilada y conidios globosos.

4.4. Conservación de las cepas aisladas

La conservación de las 2 cepas encontradas se desarrolló mediante la técnica de conservación usando papel filtro. En este caso, se recortaron cuadrados de papel filtro de 1cm * 1 cm y fueron dispuestos sobre la superficie del medio PDA, mientras que el hongo fue inoculado en el centro de esta, retirando una porción de medio sólido del centro y disponiendo un inóculo del hongo en la misma posición. Las cajas fueron conservadas a temperatura ambiente para garantizar el crecimiento del hongo alrededor de la placa y cada cuadrado de papel luego puede ser retirado con pinzas estériles e inoculado en otro medio. En la **figura 5** se muestra la descripción de la metodología de conservación.



Fig 5. Conservación de *Trichoderma* sp. en papel Filtro.

4.5. Cultivo para producción del metabolito

La producción del metabolito secundario se llevó a cabo usando los medios en estado sólido: TSM y PDA, y en estado líquido: TSM y PDB. El pH de cada medio fue ajustado a 5.5 y los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones de luz y oscuridad por un tiempo de fermentación de 15 días.

4.5.1. Cultivo en estado líquido

El cultivo en estado líquido se llevó a cabo en Erlenmeyer con capacidad de 100 mL que contenían 40 mL de medio. Los cultivos que se muestran en la **Fig 6**, fueron agitados a 120 rpm [42], usando un agitador orbital (TE-4200).



Fig 6. Fermentación en estado líquido (luz y oscuridad) – PDB pH 5,5

4.5.2. Cultivo en estado sólido

El cultivo en estado sólido se llevó a cabo en placas Petri de 9 cm de diámetro, en la **Fig 7a** se muestran los cultivos de *Trichoderma* UdeA en PDA y TSM y la **Fig 7b** se muestran los cultivos de *Trichoderma* URI.

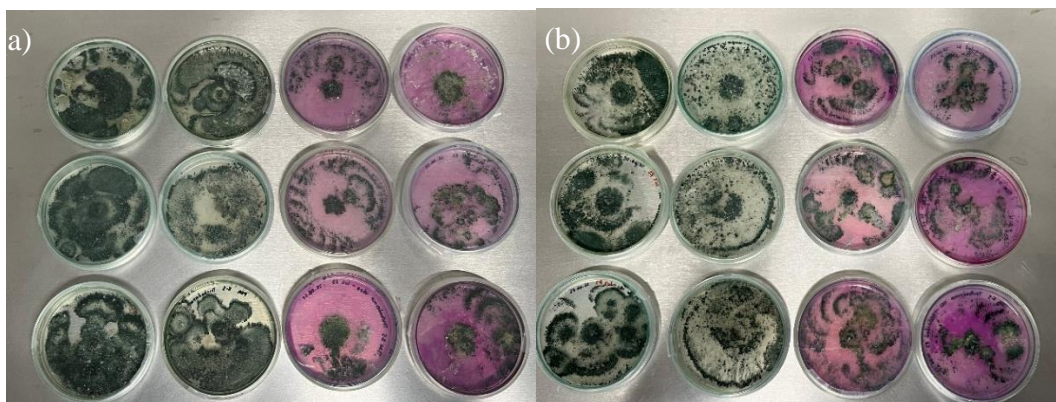


Fig 7. Fermentación en estado sólido – PDA y TSM pH 5,5

4.6. Técnicas de extracción del metabolito

4.6.1. Extracción cultivo sólido

Se raspó y recolectó el micelio de la superficie de los cultivos de las placas **Fig 8**. A continuación, se añadieron 300 mL de solución de cloroformo/metanol 2/1 (v/v) y se llevó a agitación durante 2 h. La fase inferior se recogió y se evaporó. Tras la extracción, el residuo seco se disolvió en MeOH, se centrifugó y, posteriormente se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la caracterización por medio de HPLC-MS [43].

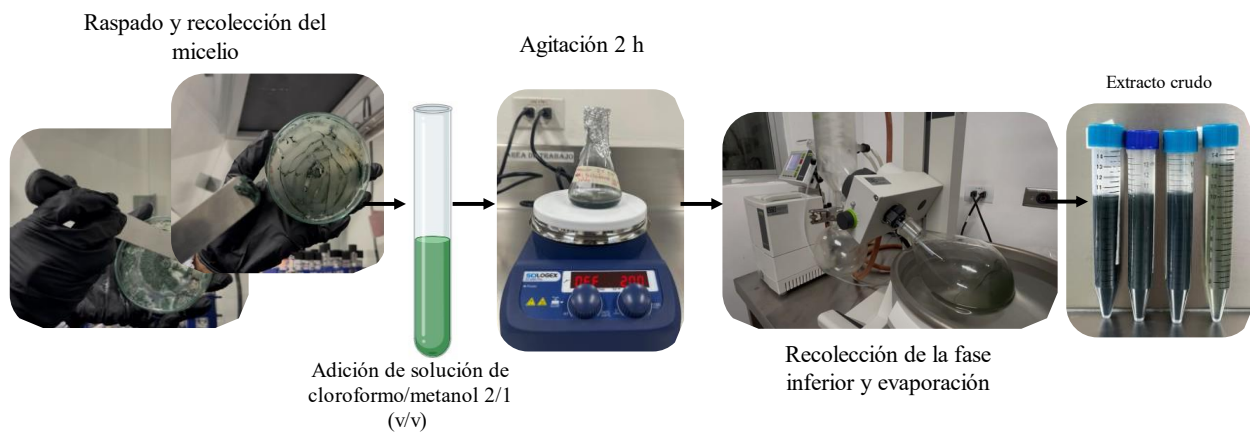


Fig 8. Procesamiento de la muestra proveniente de la fermentación en estado sólido

4.6.2. Extracción cultivo líquido

Al finalizar la fermentación, el caldo de fermentación de cada matrax fue tratado 100 ml de etanol absoluto en agitación durante 2 h a 100 rpm a temperatura ambiente [38]. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se recogió y se rotaevaporó. Posteriormente se obtuvo el extracto crudo **Fig 9**.

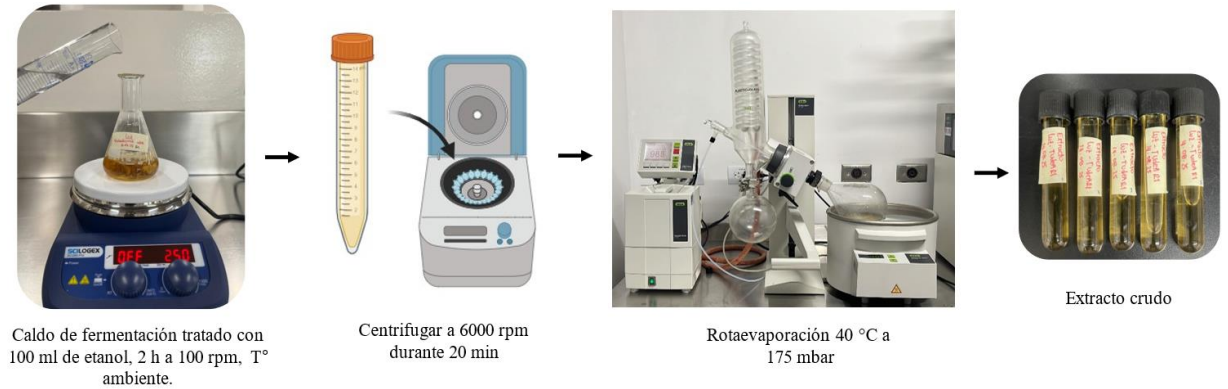


Fig 9. Extracción líquido – líquido de los metabolitos

4.7. Evaluación de la actividad inhibitoria in vitro del metabolito

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Trichoderma* se hizo a través de la técnica de inhibición de ascosporas con algunas modificaciones [39][40].

Se preparó agar agar añadiendo un volumen de extracto por cada caja (50 - 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 800 – 900 – 1000 μ L). Se tomaron muestras de hojas de plantas infectadas en estadio 6 en la escala de Fouré y se graparon en discos de papel Kraft (**Fig 10**). Los discos fueron humedecidos, guardados e incubados en bolsas plásticas selladas por un período de 2 días. Posteriormente, se realizó la descarga de ascosporas sobre cajas Petri con agar agar durante 1 h. Se incluyó un control, el cual consistió en el medio de cultivo sin extractos de *Trichoderma*. Finalmente, se midió la elongación del tubo germinativo de *Pseudocercospora* crecido sobre medio agar-agar suplementado con extractos de *Trichoderma* y se comparó frente al control sin extractos.



Fig 10. Procesamiento de las muestras se Sigatoka negra.

4.8. Análisis molecular

Para la identificación molecular de los aislamientos, se enviaron las muestras al Laboratorio de Servicios Agrícolas Especializados (SAE) de la Universidad de Antioquia, en convenio con la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). El procedimiento se realizó según el protocolo, empleando el kit Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. 27300) para la extracción de ADN fúngico. Posteriormente, se amplificó la región ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante PCR con cebadores universales, y los fragmentos resultantes fueron secuenciados. Las secuencias forward y reverse fueron editadas y alineadas con el software BioEdit v7.2, obteniéndose secuencias consenso que fueron comparadas con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLASTn.

4.9. Análisis estadístico

Los análisis del diseño completamente al azar (análisis factorial 2x2) fueron llevados a cabo usando el software estadístico R-Studio versión 4.4.1. El objetivo principal fue evaluar la influencia de los factores “TIPOS DE FERMENTACIÓN” y “FOTOPERÍODO” en el porcentaje de inhibición del tubo germinativo de *P. fijiensis*. La fermentación fue evaluada en 2 niveles, sólido y líquido; y el fotoperiodo en los niveles luz y oscuridad. Para los análisis principales se hace uso del análisis de varianza (AOV) y se finaliza con un análisis de comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey. Finalmente, se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuales.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Bioprospección y aislamiento de cepas autóctonas de *Trichoderma* sp.

El aislamiento de *Trichoderma* sp a partir de las muestras de suelo recolectadas en zonas productoras de musáceas en la subregión de Urabá fue exitosa, tras la siembra en el medio TSM en las diluciones (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3}), se observó el crecimiento de colonias con características morfológicas compatibles con *Trichoderma* como lo fue el rápido crecimiento, el color del micelio inicio blanco y cambio a tonalidades más verdes, márgenes regulares y presencia de anillos concéntricos (**Fig 11**).

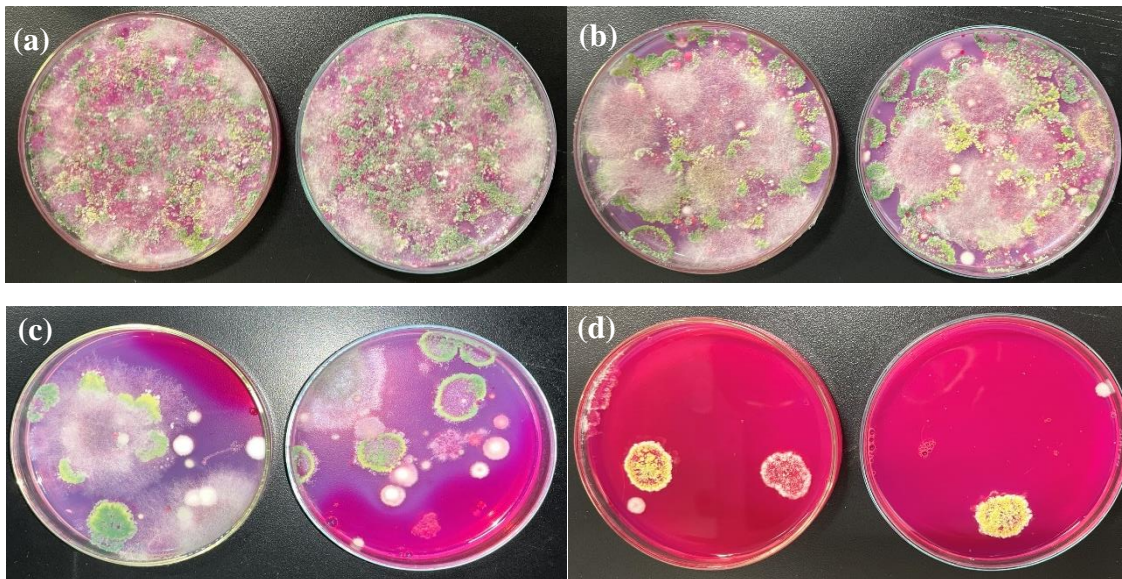


Fig 11. Crecimiento de las diluciones seriadas (a) Solución madre, (b) 1×10^{-1} (c) 1×10^{-2} , (d) 1×10^{-3} .

Luego del proceso de purificación de los cultivos, se identificaron dos cepas autóctonas, una proveniente de las muestras recolectadas en predios de la Universidad de Antioquia en Carepa – Tulenapa y otra de una finca ubicada en Turbo (Uri), ambas cepas se les identificó mediante microscopia y se evidenciaron estructuras típicas del género tales como conidióforos ramificados, fiálides en disposición verticilada y conidios globosos (**Fig. 12** y **Fig. 13**).

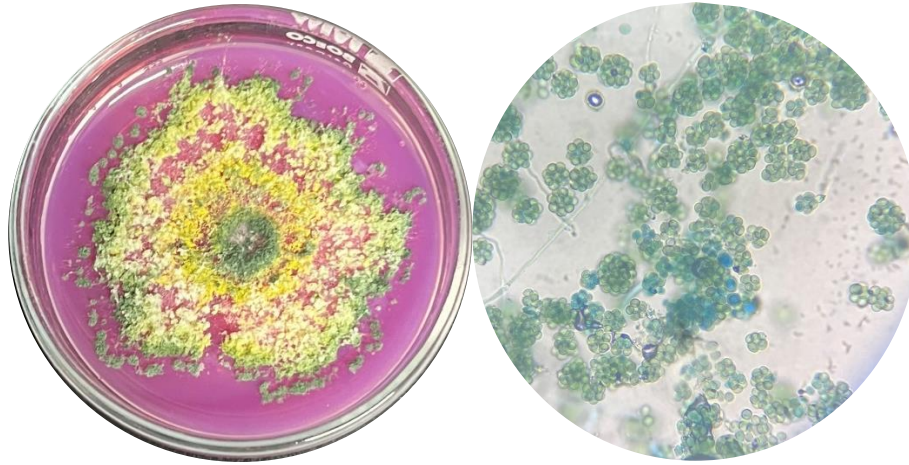


Fig 12. *Trichoderma* sp. aislada en UdeA- Carepa (a) Cultivo sólido en TSM (15 días), (b) Vista al microscopio 40 X.

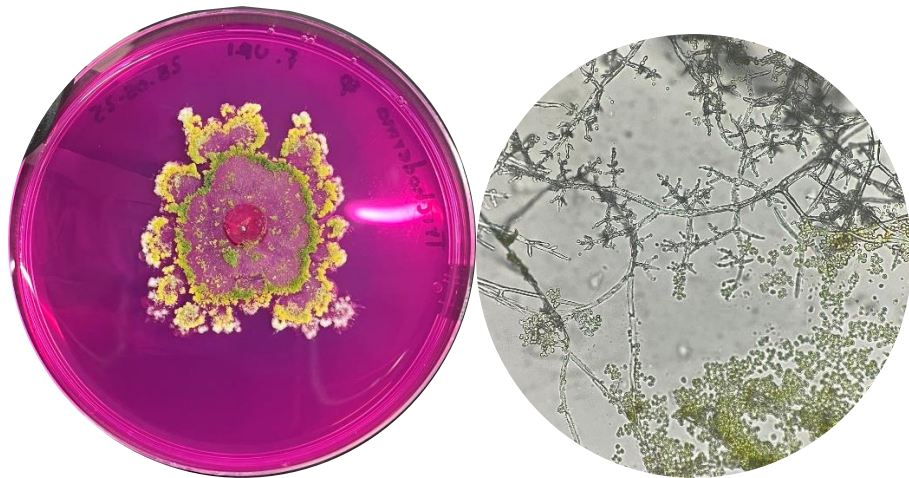


Fig 13. *Trichoderma* sp. aislada en Finca Uri - Turbo (a) Cultivo sólido en TSM (7 días), (b) Vista al microscopio 40 X.

Durante el proceso fermentativo se evidenció un desarrollo diferencial del micelio, en los medios líquidos, especialmente en PDB, se observó una mayor densidad de biomasa en los cultivos incubados bajo condiciones de luz continua, tras 15 días de incubación en 40 mL de medio. En los cultivos sólidos, las colonias presentaron una pigmentación verde oscuro y esta fue más abundante en PDA que en TSM.

5.2. Condiciones de cultivo para la producción de biomasa y metabolitos

Durante el proceso fermentativo se evidenciaron diferencias notables en el crecimiento micelial y la producción de metabolitos entre las dos cepas de *Trichoderma sp.* (UdeA y URI), así como entre los distintos sistemas de cultivo y condiciones de fotoperiodo evaluadas.

En los cultivos líquidos, especialmente en el medio PDB, se observó una mayor densidad de biomasa en las condiciones de oscuridad, caracterizada por un micelio compacto y de coloración blanquecina a verde pálido. Este comportamiento sugiere que la ausencia de luz favorece el metabolismo primario y el crecimiento fúngico, posiblemente por una menor desviación de recursos hacia la síntesis de pigmentos o metabolitos secundarios fotoinducidos [9][10].

Por otro lado, en los cultivos sólidos se evidenció una pigmentación más intensa y una esporulación abundante, particularmente en los medios PDA, bajo condiciones de luz continua. Las colonias adquirieron tonalidades verdes oscuro, indicativas de una activación del metabolismo secundario asociada a la respuesta lumínica. Este resultado concuerda con reportes previos que describen la luz como un factor clave en la regulación de genes vinculados a la biosíntesis de peptaiboles y otros compuestos antifúngicos en *Trichoderma spp* [7], [26]. Comparativamente, la cepa aislada en la Universidad de Antioquia (UdeA) presentó un crecimiento más uniforme y abundante en ambos sistemas de cultivo, lo que sugiere una mayor capacidad adaptativa. En contraste, la cepa URI mostró un desarrollo más variable, con mayor producción de biomasa en medio líquido y pigmentación más pronunciada en medio sólido, lo que refleja diferencias metabólicas entre las cepas (**Fig 14**).

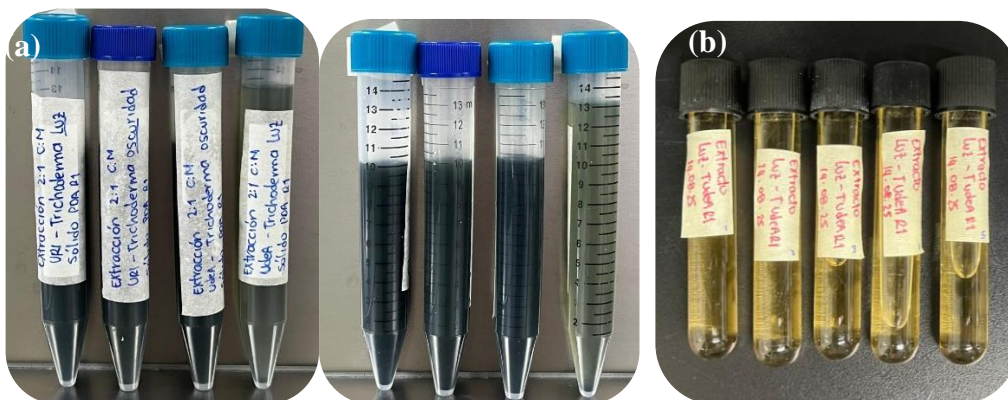


Fig 14. Extractos purificados (a) Provenientes del cultivo sólido (b) provenientes del cultivo líquido.

5.3. Análisis molecular de las cepas

El análisis molecular permitió confirmar la identidad taxonómica de las cepas fúngicas UdeA y URI, previamente clasificadas morfológicamente dentro del género *Trichoderma*. La secuenciación de la región ITS reveló que la cepa **UdeA** correspondió a *Trichoderma asperellum* (96 % de cobertura y 99 % de identidad; acceso GenBank KY318472.1), mientras que la cepa **URI** fue identificada como *Trichoderma harzianum* (98 % de cobertura y 99 % de identidad; acceso GenBank ON319118.1).

5.4. Caracterización química del metabolito

El análisis espectroscópico mediante FTIR permitió identificar los principales grupos funcionales presentes en los extractos líquidos obtenidos del cultivo de *Trichoderma asperellum* (cepa UdeA). El espectro evidenció una banda ancha en el rango de 3200–3450 cm^{-1} , atribuida a los tramos de los enlaces O–H y N–H, característicos de alcoholes, fenoles y amidas, respectivamente. Estas señales son indicativas de la presencia de compuestos polares, como polisacáridos y proteínas derivadas de la matriz fúngica [44], [45].

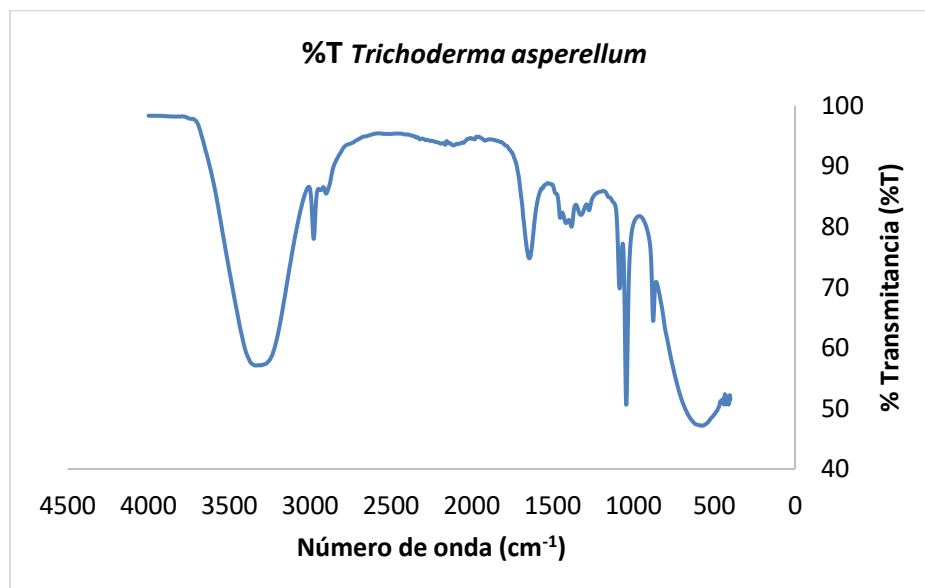


Fig 15. Espectro FTIR del extracto UdeA - Líquido

Asimismo, se observaron bandas en 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} asociadas a los estiramientos C–H de grupos alifáticos (CH_2 y CH_3), que sugieren la existencia de cadenas hidrocarbonadas típicas de lípidos y metabolitos secundarios de tipo terpenoide o policétido [46],[47]. En la región de $1735 - 1710\text{ cm}^{-1}$, se registró una absorción correspondiente al estiramiento C=O de ésteres y ácidos carboxílicos, confirmando la posible presencia de lactonas y compuestos derivados de ácidos grasos [48].

Las señales observadas entre $1655 - 1630\text{ cm}^{-1}$ (Amida I) y $1550 - 1540\text{ cm}^{-1}$ (Amida II) corresponden a los modos vibracionales C=O y N–H propios de las proteínas y péptidos no ribosomales (peptaiboles), ampliamente reportados en metabolitos antifúngicos de *Trichoderma* [49]. Por su parte, la región $1250 - 1020\text{ cm}^{-1}$ mostró bandas intensas asociadas a los enlaces C–O–C y C–O, correspondientes a estructuras polisacáridicas, principalmente β -glucanos, quitina y quitosano [50]. Además, una señal en torno a $900 - 890\text{ cm}^{-1}$ sugiere la presencia de enlaces β -glicosídicos, confirmando la existencia de unidades glicosídicas características de la pared celular fúngica.

En conjunto, el perfil espectral obtenido (**Fig 15**) indica la coexistencia de polisacáridos estructurales, proteínas o péptidos bioactivos, y compuestos lipofílicos compatibles con metabolitos secundarios típicos de *Trichoderma* spp., como peptaiboles, policétidos y terpenoides [28], [30]. Estos resultados confirman la complejidad química del extracto líquido y respaldan su actividad antifúngica observada frente a *Pseudocercospora fijiensis*.

En la **Fig 16**, se muestra el espectro infrarrojo del extracto sólido obtenido a partir del cultivo de *Trichoderma harzianum* (cepa URI) reveló bandas de absorción características de compuestos orgánicos de naturaleza mixta, evidenciando la presencia de proteínas, polisacáridos y metabolitos secundarios de tipo lipídico o terpenoide. La banda ancha registrada alrededor de 3326 cm^{-1} se asocia a los estiramientos O–H y N–H, típicos de alcoholes, fenoles y amidas, indicando la existencia de grupos polares derivados de proteínas y polisacáridos estructurales propios de la pared celular fúngica [46], [51].

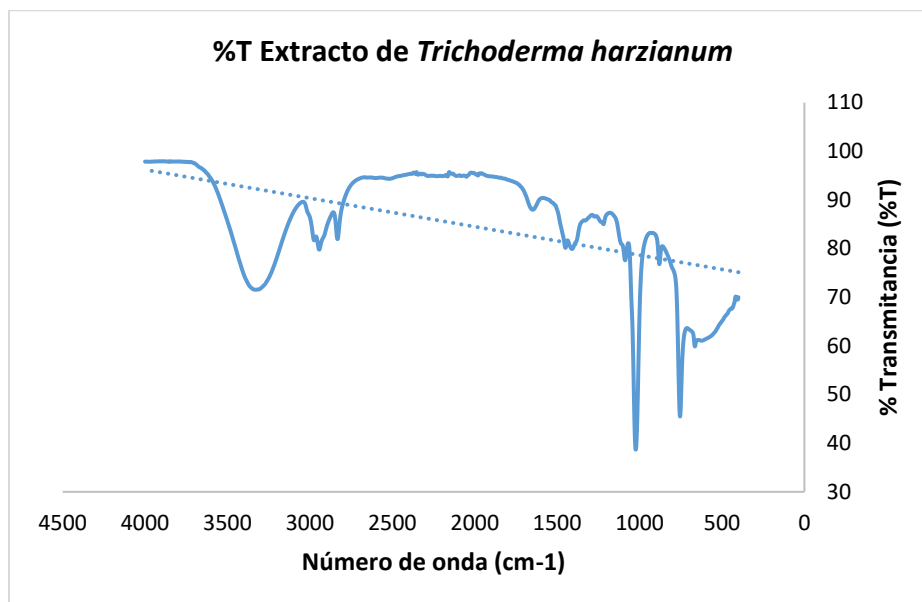


Fig 16. Espectro FTIR del extracto URI - Sólido

En la región de 2 974–2 832 cm^{-1} , se observaron señales correspondientes a los estiramientos C–H alifáticos ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), atribuibles a cadenas hidrocarbonadas presentes en lípidos o metabolitos secundarios de tipo terpenoide o policétido, los cuales son comúnmente reportados en especies de *Trichoderma* con actividad biológica [46].

La banda detectada entre 1735–1710 cm^{-1} se asocia al estiramiento del grupo C=O de ésteres y ácidos carboxílicos, confirmando la presencia de compuestos lipídicos, lactonas o derivados de ácidos grasos, lo cual coincide con reportes de metabolitos secundarios fúngicos con propiedades biosurfactantes o antifúngicas [52]. Este comportamiento espectral sugiere la existencia de estructuras oxigenadas complejas que podrían participar en la actividad antifúngica observada frente a *Pseudocercospora fijiensis*.

La intensidad relativa de las bandas en 1650 –1550 cm^{-1} corresponde a las vibraciones amídicas (Amida I y II), indicativas de enlaces peptídicos en proteínas o péptidos no ribosomales, mientras que la región de 1200 –1020 cm^{-1} muestra señales características de enlaces C–O–C y C–

O, asociados a polisacáridos del tipo β -glucanos y quitina/quitosano [53]. En conjunto, estas absorciones confirman que el extracto sólido de la cepa URI contiene una mezcla de biopolímeros estructurales y metabolitos secundarios de naturaleza lipídica y peptídica, coherente con la composición química reportada para metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp.

5.5. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro frente a *Pseudocercospora fijiensis*

5.5.1. Actividad inhibitoria de los metabolitos producidos en fermentación líquida

Los metabolitos obtenidos a partir de la **fermentación líquida** de las cepas aisladas (UdeA y URI) mostraron una inhibición progresiva del crecimiento de *Pseudocercospora fijiensis* dependiente de la concentración del extracto aplicado (**Figura 17**). En todos los casos, el porcentaje de inhibición se incrementó de forma casi lineal a medida que aumentó el volumen del extracto (50–1000 μ L), alcanzando valores de inhibición cercanos al 100 % en las concentraciones más altas.

En la cepa aislada en la UdeA, los cultivos en condiciones de luz alcanzaron inhibiciones entre 35 % y 55 % a bajas concentraciones (50–100 μ L), con un incremento sostenido hasta alcanzar 100% de inhibición a partir de 900 μ L. En condiciones de oscuridad, la misma cepa mostró una respuesta más marcada, con porcentajes iniciales de 65% a 50 μ L y logrando inhibiciones del 100% desde los 700 μ L de extracto. Por su parte, la cepa aislada en la finca Uri evidenció un comportamiento diferencial. En condiciones de luz, alcanzó inhibiciones iniciales de 69 % a 50 μ L y superó el 90 % a los 500 μ L, llegando al 100 % a partir de los 900 μ L. En condiciones de oscuridad, los extractos mostraron un inicio de inhibición de 55 % a bajas concentraciones, con incrementos graduales hasta alcanzar valores cercanos al 100 % en volúmenes superiores a 900 μ L.

Concentración efectiva media (EC₅₀) en cultivo líquido

El cálculo de la concentración efectiva media (EC₅₀), definida como la concentración necesaria del extracto para inhibir el 50 % del crecimiento del patógeno, permitió cuantificar la

potencia inhibitoria de los metabolitos bajo las diferentes condiciones evaluadas. Los resultados obtenidos para los extractos provenientes del cultivo líquido se muestran en la (TABLA I).

TABLA I.
CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACIÓN LÍQUIDA

| Cepa | Concentración efectiva media | |
|-------------------------|------------------------------|---------------|
| | Luz | Oscuridad |
| <i>Trichoderma</i> UdeA | 138,89 μ L | 38,46 μ L |
| <i>Trichoderma</i> URI | 36,23 μ L | 45,45 μ L |

Estos valores muestran que, para la cepa UdeA, la condición de oscuridad favoreció la producción de metabolitos con mayor actividad antifúngica (menor EC_{50}). En contraste, la cepa URI presentó un comportamiento más estable entre condiciones de luz y oscuridad, con valores de EC_{50} cercanos. Cabe destacar que el extracto de la cepa URI bajo luz presentó la EC_{50} más baja de todas las condiciones evaluadas (36,23 μ L), evidenciando un alto potencial bioactivo.

Al contrastar estos resultados con la información reportada en el Informe anual CENIBANANO 2022 [54], se observa que los programas de control químico para la Sigatoka negra dependen de moléculas como triazoles, estrobilurinas y mezclas sistémicas, con eficacias reportadas en campo que oscilan entre 70 – 90 % según la rotación y las condiciones climáticas. Si bien la acción de los metabolitos de *Trichoderma* fue evaluada en condiciones in vitro, la inhibición alcanzada (≥ 90 % en concentraciones superiores a 500 μ L) y los bajos valores de EC_{50} , especialmente en la cepa URI, sugieren un desempeño comparable con fungicidas de referencia. Estos hallazgos sustentan el potencial de los metabolitos como alternativa biológica de control, reduciendo la dependencia de productos químicos de amplio uso en la región.

En la **figura 17 y 18** se muestran los resultados del ensayo de inhibición del tubo germinativo de *P. fijiensis* en agar-agar suplementado con extracto crudo de *Trichoderma* sp. (cepa UdeA, cultivo líquido–oscuridad y Cepa URI, cultivo líquido-luz). Respecto al testigo, se observa una reducción progresiva del número de esporas germinadas y de la longitud del tubo germinativo conforme aumenta el volumen del extracto (50–1000 μ L), de acuerdo con el protocolo descrito, hasta alcanzar inhibición prácticamente total a altas concentraciones.

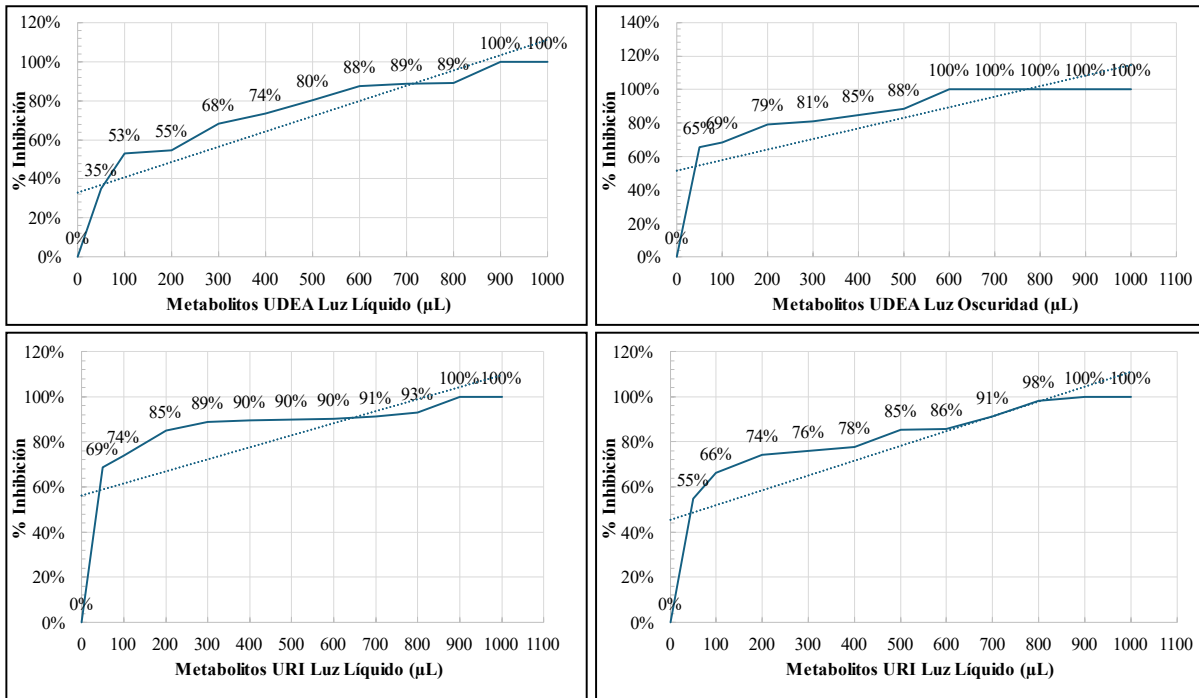


Fig 17. % de inhibición de los extractos provenientes del cultivo líquido (UdeA / URI)(Luz/ Oscuridad)

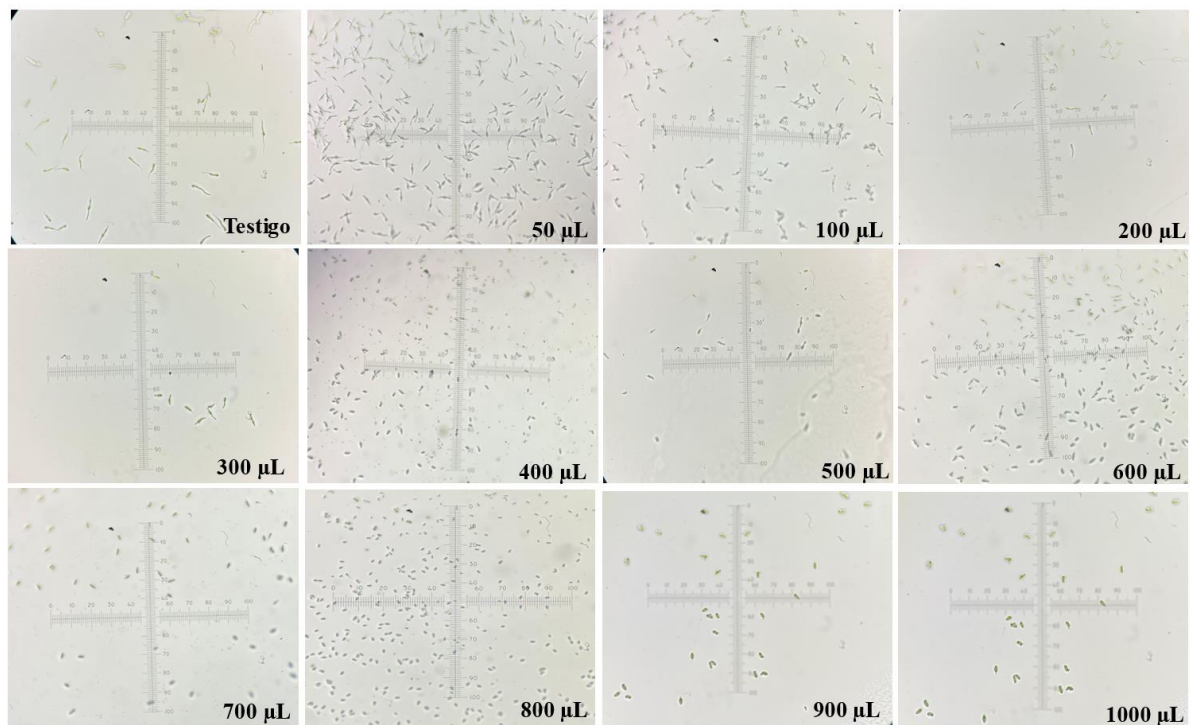


Fig 18. Esporas de *P. fijiensis* vistas al microscopio 10 X en las diferentes dosis de extracto evaluado - Extracto Líquido Oscuridad UDEA

5.5.2. Actividad inhibitoria de los metabolitos en condiciones sólidas

Los extractos obtenidos de los cultivos sólidos de *Trichoderma sp.* (UdeA y URI) también presentaron actividad inhibitoria contra *Pseudocercospora fijiensis*, con una respuesta dependiente de la concentración aplicada (50–1000 μL). En general, se alcanzaron inhibiciones completas (100 %) a volúmenes $\geq 600 \mu\text{L}$ en la mayoría de las condiciones evaluadas (**Figura 19 y Figura 20**).

Para la **cepa UdeA**, los extractos producidos bajo condiciones de luz mostraron porcentajes iniciales de inhibición de 58–59 % a 50 μL , con un incremento progresivo hasta alcanzar 100 % de inhibición desde los 600 μL . En condiciones de oscuridad, la tendencia fue similar, con un inicio de 54 % y una inhibición completa a partir de los 700 μL .

Por otro lado, la **cepa URI** mostró un comportamiento más variable. En condiciones de luz, los niveles de inhibición fueron bajos en las primeras concentraciones (7–19 % a 50 – 200 μL), aumentando hasta 87 % a 500 μL y logrando 100 % en concentraciones $\geq 600 \mu\text{L}$. En oscuridad, los valores iniciales fueron mayores (28–39 % a 50–200 μL) y la inhibición completa se alcanzó igualmente a partir de los 600 μL .

Concentración efectiva media (EC₅₀) en cultivo sólido

El análisis de la concentración efectiva media (EC₅₀) mostró diferencias notables entre las cepas y las condiciones de incubación (**TABLA II**):

TABLA II.
CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA

| Cepa | Concentración efectiva media | |
|-------------------------|------------------------------|----------------------|
| | Luz | Oscuridad |
| <i>Trichoderma</i> UdeA | 43,10 μL | 46,30 μL |
| <i>Trichoderma</i> URI | 116,28 μL | 128,21 μL |

Estos valores indican que los metabolitos de la cepa UdeA presentaron una mayor potencia inhibitoria en estado sólido (menores EC_{50}), siendo consistentes tanto en luz como en oscuridad. En contraste, la cepa URI requirió concentraciones más altas para alcanzar el 50 % de inhibición, lo que refleja una menor eficacia relativa bajo estas condiciones.

Comparación con cultivo líquido

Al comparar con los resultados obtenidos en fermentación líquida, se observa que la cepa URI mostró mejor desempeño en condiciones líquidas (EC_{50} entre 36,23 y 45,45 μL) que en sólidas (>116 μL), lo cual sugiere que el medio líquido favoreció la producción de metabolitos con mayor actividad antifúngica. Por el contrario, la cepa UdeA presentó una eficacia más uniforme entre los dos sistemas, aunque destacó por su alta actividad en cultivo sólido ($EC_{50} \approx 43 \mu\text{L}$).

Estos resultados confirman que el tipo de sustrato (líquido vs. sólido) y el fotoperiodo influyen en la expresión de metabolitos secundarios de *Trichoderma sp.* La cepa UdeA mostró un perfil bioactivo más estable y eficiente en ambas condiciones, mientras que la cepa URI fue altamente dependiente del sistema de cultivo. Este hallazgo es relevante para orientar futuras aplicaciones en formulación de bioproductos, donde la elección del sistema de producción puede determinar la eficacia antifúngica del metabolito obtenido.

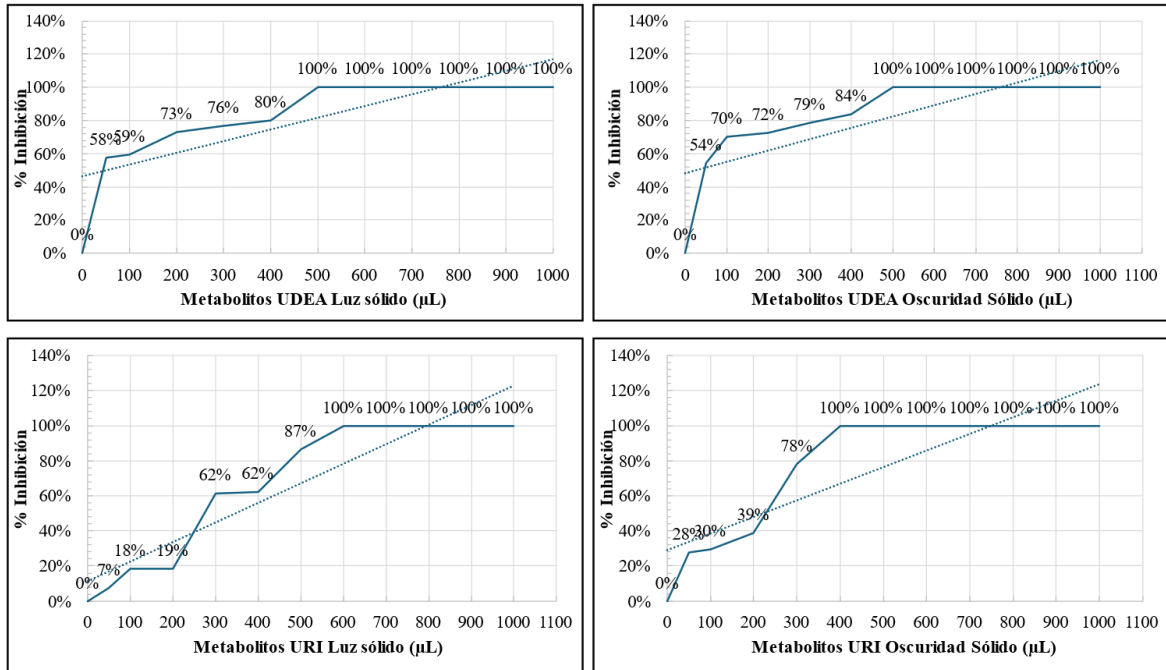


Fig 19. % de inhibición de los extractos provenientes del cultivo sólido (UdeA / URI)(Luz/ Oscuridad).

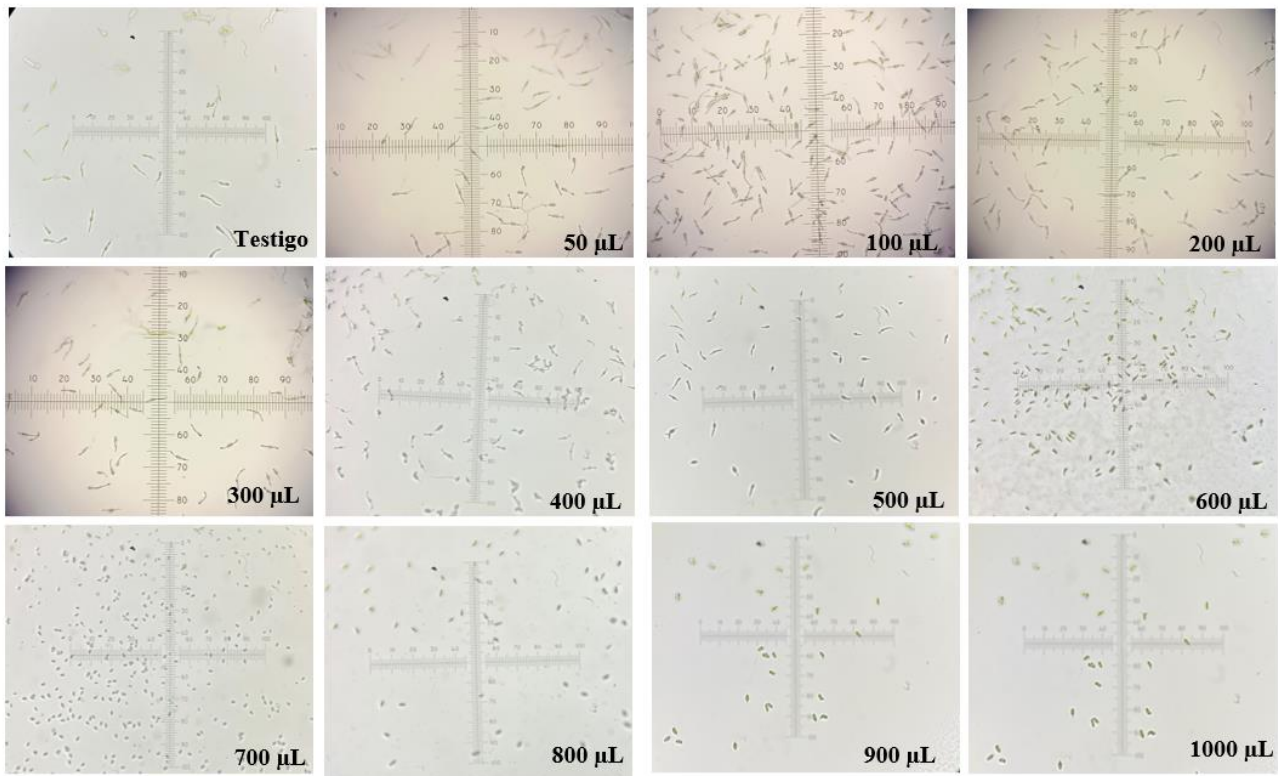


Fig 20. Esporas de *P. fijiensis* vistas al microscopio 10 X en las diferentes dosis de extracto evaluado - Extracto Líquido Luz URI.

5.6. Análisis estadísticos de los resultados encontrados

Los resultados encontrados fueron significativos. Como se estableció al principio de este trabajo, el objetivo era evaluar los extractos de *Trichoderma sp* sobre el crecimiento *Pseudocercospora fijiensis*, bajo el supuesto de que estos metabolitos secundarios presentes en el extracto, de acuerdo con la información consultada, podrían inhibir el crecimiento de este. El crecimiento de *P. fijiensis* fue distinta a diferentes dosis de tratamiento (50 - 1000 μ L). Se encontró que los extractos provenientes de la cepa aislada de UdeA presentaron mayores cuadros de inhibición, en contraste con la evaluación de los extractos de la cepa aislada en Turbo. Por otra parte, también se encontraron que las condiciones o los factores evaluados como el tipo de fermentación (sólida/líquida) y el fotoperiodo (luz/oscuridad) conducen a conclusiones diferentes en función de cuál sea la cepa analizada. En el caso de la cepa UdeA, el porcentaje de inhibición mínimo promedio encontrado fue del 35 %, de extractos provenientes bajo condiciones de cultivo LÍQUIDO-LUZ a la dosis mínima (50 μ L); A esa misma dosis, se encontró que el porcentaje de inhibición máximo promedio fue del 65 % bajo condiciones de cultivo LÍQUIDO-OSCURIDAD. En el caso de la cepa URI, se encontró que, a la dosis mínima, el porcentaje de inhibición mínimo promedio fue del 10 % a través de condiciones SÓLIDO-LUZ; por otra parte, el porcentaje de inhibición máximo promedio fue de 60 % bajo condiciones SÓLIDO-OSCURIDAD.

Las muestras analizadas UdeA Sólido - Luz presentaron cuadros de inhibición del 100 % cuando se aplicaron concentraciones desde los 400 μ L. Por otra parte, el tratamiento sólido-oscuridad presentó cuadros de inhibición del 100% cuando se aplicaron concentraciones desde los 500 μ L. El tratamiento Líquido-Luz presentó cuadros de inhibición del 100 % bajo concentraciones desde los 900 μ L. Por su parte, este mismo sistema, pero en oscuridad condujo a cuadros de inhibición del 100% bajo concentraciones desde los 600 μ L.

Las muestras analizadas Uri Líquido - Luz presentaron cuadros de inhibición del 100 % cuando se aplicaron concentraciones desde los 900 μ L. Esto mismo se presentó en el tratamiento líquido-oscuridad. Por otra parte, el tratamiento sólido-Luz presentó cuadros de inhibición del 100 % bajo concentraciones desde los 600 μ L. Por su parte, este mismo sistema, pero en oscuridad condujo a cuadros de inhibición del 100 % bajo concentraciones desde los 400 μ L (**TABLA III**).

TABLA III.
EXTRACTO NECESARIO PARA INHIBICIÓN ABSOLUTA (μL)

| Condición | Volumen de extracto (μL) | |
|-------------------|---------------------------------------|-----|
| | UDEA | URI |
| SÓLIDO-LUZ | 400 | 600 |
| SÓLIDO-OSCURIDAD | 500 | 400 |
| LÍQUIDO-LUZ | 900 | 900 |
| LÍQUIDO-OSCURIDAD | 600 | 900 |

5.6.1. Caso - Extractos obtenidos de la cepa UdeA

El análisis factorial se llevó a cabo para cada uno de los niveles de concentración usados. Los resultados del tratamiento óptimo variaron según el nivel que se estuvo analizando. Como se mencionó anteriormente, a ciertas dosis el porcentaje de inhibición de *P.fijiensis* fue del 100 %. Por tanto, se consideró como altas dosis todas aquellas que condujeron al resultado anterior. La importancia de haber evaluado este rango de concentraciones es evidenciar qué tratamientos son más efectivos a pequeñas dosis. De esta manera, se encontró que el tratamiento líquido-oscuridad fue el predominante en las concentraciones menores que 400 μL . A continuación, se presenta un cuadro comparativo donde se evidencia para cada dosis evaluada cuál fue el tratamiento escogido y su porcentaje de inhibición promedio (TABLA IV). Además, se presenta el porcentaje de inhibición mínimo bajo esa dosis y el tratamiento que conduce a dicho resultado.

TABLA IV.
CUADRO COMPARATIVO TRATAMIENTOS SELECCIONADOS UDEA

| Volumen de extracto (μL) | Tratamiento elegido | % Inhibición máximo | % Inhibición mínimo |
|---------------------------------------|--|---------------------|----------------------|
| 50 | LÍQUIDO-OSCURIDAD | 65% | LÍQUIDO-LUZ (35%) |
| 100 | LÍQUIDO OSCURIDAD/ SÓLIDO-OSCURIDAD | 70% | LÍQUIDO-LUZ (53%) |
| 200 | LÍQUIDO-OSCURIDAD | 80% | LÍQUIDO-LUZ (55%) |

| | | | |
|-------------|--|------|----------------------|
| 300 | LÍQUIDO-OSCURIDAD | 82% | LÍQUIDO-LUZ (68%) |
| 400 | SÓLIDO-LUZ / SÓLIDO-OSCURIDAD | 100% | LÍQUIDO-LUZ (74%) |
| 500 | SÓLIDO-LUZ/ SÓLIDO OSCURIDAD | 100% | LÍQUIDO-LUZ (80%) |
| 600 | SÓLIDO-OSCURIDAD/SÓLIDO-LUZ/ LÍQUIDO-OSCURIDAD | 100% | LÍQUIDO-LUZ (88%) |
| 700 | LÍQUIDO-OSCURIDAD/SÓLIDO- OSCURIDAD/SÓLIDO- LUZ | 100% | LÍQUIDO-LUZ (90%) |
| 800 | LÍQUIDO-OSCURIDAD/SÓLIDO OSCURIDAD/SÓLIDO LUZ | 100% | LÍQUIDO-LUZ (90%) |
| 900 | CUALQUIERA | 100% | CUALQUIERA |
| 1000 | CUALQUIERA | 100% | CUALQUIERA |

5.6.2. Caso - Extractos obtenidos de la cepa URI

El análisis factorial se llevó a cabo para cada uno de los niveles de concentración usados. Los resultados del tratamiento óptimo al igual que en el caso UdeA, variaron según el nivel que se estuvo analizando. Como se mencionó anteriormente, a ciertas dosis el porcentaje de inhibición de *P.fijiensis* fue del 100 %. Por tanto, se consideró como altas dosis todas aquellas que condujeron al resultado anterior. La importancia de haber evaluado este rango de concentraciones es evidenciar qué tratamientos son más efectivos a pequeñas dosis. De esta manera, se encontró que el tratamiento líquido-luz fue el predominante en las concentraciones menores que 500 μ L. A continuación, se presenta un cuadro comparativo donde se evidencia para cada dosis evaluada cuál fue el tratamiento escogido y su porcentaje de inhibición promedio (**TABLA V**). Además, se presenta el porcentaje de inhibición mínimo bajo esa dosis y el tratamiento que conduce a dicho resultado.

TABLA V.
CUADRO COMPARATIVO TRATAMIENTOS SELECCIONADOS URI

| Volumen de extracto (µL) | Tratamiento elegido | % Inhibición máximo | % Inhibición mínimo |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------|--|
| 50 | LÍQUIDO-LUZ | 69% | SÓLIDO-LUZ (10%) |
| 100 | LÍQUIDO-LUZ | 74% | SÓLIDO-LUZ (19%) |
| 200 | LÍQUIDO-LUZ | 85% | SÓLIDO-LUZ (19%) |
| 300 | LÍQUIDO-LUZ | 89% | SÓLIDO-LUZ (62%) |
| 400 | LÍQUIDO-LUZ | 90% | SÓLIDO-LUZ (62%) |
| 500 | SÓLIDO-OSCURIDAD | 100% | LÍQUIDO-OSCURIDAD (85%) |
| 600 | SÓLIDO-LUZ/ SÓLIDO OSCURIDAD | 100% | LÍQUIDO-OSCURIDAD (86%) |
| 700 | SÓLIDO-LUZ/ SÓLIDO OSCURIDAD | 100% | LIQUIDO-LUZ/LÍQUIDO OSCURIDAD (91%) |
| 800 | SÓLIDO-LUZ/ SÓLIDO OSCURIDAD | 100% | LIQUIDO-LUZ (93%) |
| 900 | CUALQUIERA | 100% | CUALQUIERA |
| 1000 | CUALQUIERA | 100% | CUALQUIERA |

Cepa Vs tratamiento

Con el objetivo de tener una descripción más precisa de la relación entre los tratamientos y las cepas, se llevó a cabo un análisis de medias para muestras con varianza igual o diferente según el caso. Las comparaciones se hicieron para cada uno de los tratamientos considerando los porcentajes de inhibición encontrados. Cada una de estas comparaciones, además, fue desarrollada para cada una de las dosis para evitar la interferencia del efecto de la concentración y obtener conclusiones más acertadas. A continuación se presenta qué cepa conduce a mayor porcentaje de inhibición promedio cuando éstas son cultivadas (**TABLA VI**). Por ejemplo, cuando las cepas fueron cultivadas bajo el tratamiento líquido-luz, se encontró que la cepa más adecuada a usar fue

URI, dado que fue la que condujo a mayores porcentajes de inhibición para cada una de las dosis, hasta que el efecto de la concentración se hizo presente en dosis desde los 700 μ L donde ambas cepas conducían a los mismos porcentajes de inhibición.

TABLA VI.
ANÁLISIS DE MEDIAS

| Volumen de extracto (μ L) | Líquido-Luz | Líquido-Oscuridad | Sólido-Luz | Sólido-Oscuridad |
|--------------------------------|--------------|-------------------|--------------|------------------|
| 50 | URI | UdeA | UdeA | UdeA |
| 100 | URI | AMBOS | UdeA | UdeA |
| 200 | URI | UdeA | UdeA | UdeA |
| 300 | URI | UdeA | UdeA | AMBOS |
| 400 | URI | UdeA | UdeA (100%) | URI (100%) |
| 500 | URI | UdeA | UdeA (100%) | AMBOS (100%) |
| 600 | URI | UdeA(100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) |
| 700 | AMBOS (100%) | UdeA(100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) |
| 800 | AMBOS (100%) | UdeA(100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) |
| 900 | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) |
| 1000 | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) | AMBOS (100%) |

De manera general, el análisis de medias (**TABLA VI**) permitió identificar que la cepa UdeA exhibe una mayor consistencia en su respuesta inhibitoria frente a los distintos tratamientos, especialmente bajo condiciones de oscuridad y en medios sólidos, donde alcanza niveles de inhibición del 100 % con menores volúmenes de extracto. Esto sugiere que la cepa UdeA posee una maquinaria metabólica más eficiente en la síntesis de metabolitos antifúngicos cuando las condiciones de cultivo estimulan la producción de compuestos secundarios fotoindependientes.

En contraste, la cepa URI manifestó una respuesta más marcada bajo condiciones de luz y en medio líquido, lo que podría relacionarse con la activación de rutas metabólicas fotoinducidas y una mayor adaptación a condiciones aeróbicas de fermentación. A bajas concentraciones (50–400 μ L) las diferencias entre cepas fueron evidentes, pero a partir de los 700 μ L el efecto de la

concentración homogenizó los resultados, reflejando que ambas cepas son igualmente efectivas cuando los metabolitos se encuentran en niveles suficientes para saturar la acción antifúngica. En conjunto, estos resultados evidencian un comportamiento diferencial asociado tanto al origen geográfico de las cepas como al sistema de cultivo empleado, destacando la importancia de optimizar el tipo de fermentación y el fotoperiodo según la cepa seleccionada para maximizar la producción de metabolitos bioactivos frente a *Pseudocercospora fijiensis*.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Fue posible aislar con éxito dos cepas pertenecientes al género *Trichoderma* provenientes de la región del Urabá Antioqueño, a partir de la metodología propuesta. Las cepas fueron recolectadas en los municipios de Carepa y Turbo. Ambas mostraron capacidad de colonización y selectividad en las pruebas de aislamiento en medio TSM, evidenciando un desarrollo vigoroso sobre el sustrato.

Los resultados del análisis molecular, realizado por la Universidad de Antioquia en convenio con la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), confirmaron que las cepas correspondían a *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma asperellum*, con valores de identidad de 99 % y coberturas superiores al 95 %. Esta caracterización permitió precisar su posición taxonómica dentro del género *Trichoderma* y validar su potencial biotecnológico previamente observado en las pruebas in vitro.

Además, se verificó la capacidad de ambas cepas para la producción de metabolitos secundarios, utilizando la elongación del tubo germinativo de *P. fijiensis* como medida indirecta de la actividad antifúngica. Las metodologías de extracción aplicadas tanto en cultivos sólidos como en cultivos líquidos fueron exitosas, confirmando la presencia de compuestos bioactivos asociados al metabolismo secundario de estas especies.

Como se evidenció anteriormente, tanto la cepa Uri como la cepa UdeA presentan altos cuadros de inhibición sobre *P. fijiensis*. Los resultados obtenidos evidencian la selectividad de las cepas en la producción de metabolitos secundarios, pues cada una de éstas presentó mayores cuadros de inhibición al cultivarse bajo distintas condiciones. En el caso de la cepa UdeA, el tratamiento líquido-oscuridad resultó ser el óptimo, pues es el que conduce a mayores cuadros de inhibición (entre el 65 y el 82 % para las dosis entre 50 y 300 μ L) antes de que el efecto de la concentración se presente, como sucede para las dosis por encima de los 400 μ L, donde ocurre inhibición absoluta. Por otra parte, el tratamiento que condujo a los menores porcentajes de

inhibición fue el tratamiento líquido-luz, el cual condujo a cuadros de inhibición entre el 35 y el 68 % considerando las dosis de 50 a 300 μ L.

Por otra parte, en el caso de la cepa URI, el tratamiento líquido-luz resultó ser el óptimo, pues es el conduce a mayores cuadros de inhibición (entre el 69 y el 90 % para las dosis entre 50 y 400 μ L) antes de que el efecto de la concentración se presente, como sucede para las dosis por encima de los 500 μ L, donde ocurre inhibición absoluta. Además, el tratamiento que condujo a los menores porcentajes de inhibición fue el tratamiento sólido-luz, el cual condujo a cuadros de inhibición entre el 10 y el 62 % considerando las dosis de 50 a 400 μ L.

Aunque ambas cepas presentaron altos cuadros de inhibición como se evidenció, la cepa UdeA presentó una mayor ventaja competitiva dado que los cuadros de inhibición mínimos para las dosis mínimas son siempre mayores, al igual que la cantidad de tratamientos a seleccionar con el aumento de la concentración.

Los factores analizados en este estudio fueron el “TIPO DE FERMENTACIÓN” y el “FOTOPERÍODO” y su influencia sobre la producción de metabolitos secundarios fue diferente para cada cepa analizada, lo que evidencia que cepas del mismo género de *Trichoderma sp* poseen maquinaria molecular diversa. En el caso de la cepa UdeA el tipo de fermentación adecuado fue en líquido bajo el nivel de fotoperiodo oscuridad. Sin embargo, en el caso de la cepa Uri el tipo de fermentación adecuado fue líquido bajo condiciones de luz. En tal caso, se evidencia la influencia del fotoperiodo, la cual es diferente en ambos casos y aun así los porcentajes de inhibición promedio son aproximados.

REFERENCIAS

- [1] A. M. Mesa Vanegas, D. A. Marín Pavas, and J. Calle Osorno, “Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas,” *Actual. Biológicas*, vol. 41, no. 111, pp. 1–13, 2020, doi: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02.
- [2] Y. González León, J. Ortega Bernal, M. A. Anducho Reyes, and Y. Mercado Flores, “*Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura,” *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 25, pp. 1–14, 2022, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2022.520.
- [3] Y. P. Song and N. Y. Ji, *Chemistry and biology of marine-derived Trichoderma metabolites*, vol. 14, no. 1. Springer Nature Singapore, 2024. doi: 10.1007/s13659-024-00433-3.
- [4] L. Błaszczyk, M. Siwulski, K. Sobieralski, J. Lisiecka, and M. Jędryczka, “*Trichoderma* spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry,” *J. Plant Prot. Res.*, vol. 54, no. 4, pp. 309–317, 2014, doi: 10.2478/jppr-2014-0047.
- [5] G. Basso Valeria, D. B. Gabriela, and R. Gustavo, “*Trichoderma* spp.: characteristics and applications,” *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, vol. 11, no. 1, pp. 18–22, 2024, doi: 10.15406/jabb.2024.11.00354.
- [6] S. Zeilinger, S. Gruber, R. Bansal, and P. K. Mukherjee, “Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics,” *Fungal Biol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 74–90, 2016, doi: 10.1016/j.fbr.2016.05.001.
- [7] A. Wiest *et al.*, “Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 23, pp. 20862–20868, 2002, doi: 10.1074/jbc.M201654200.
- [8] R. Khan, S. Najeeb, S. Hussain, B. Xie, and Y. Li, “Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. Against phytopathogenic fungi,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 6, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8060817.
- [9] M. Schmoll and A. Schuster, “Biology and biotechnology of *Trichoderma*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 3, pp. 787–799, 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.
- [10] M. Schalamun *et al.*, “MAPkinases regulate secondary metabolism, sexual development and

- light dependent cellulase regulation in *Trichoderma reesei*,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–17, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-28938-w.
- [11] A. Setargie, C. Wang, L. Zhang, and Y. Xu, “Chromatographic and Mass Spectroscopic Guided Discovery of *Trichoderma* Peptaibiotics and their Bioactivity,” *Eng. Microbiol.*, vol. 4, no. 2, p. 100135, 2024, doi: 10.1016/j.engmic.2023.100135.
- [12] ICA and AUGURA, “El ICA y Augura fortalecen la producción de banano en el Urabá,” 2018. <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-augura-produccion-banano-uraba> (accessed May 17, 2025).
- [13] G. A. Mejia Mesa, “Buenas prácticas agrícolas para el manejo integrado de la sigatoka negra en el banano Cavendish colombiano.,” 2011. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/19192> (accessed Jul. 20, 2025).
- [14] A. C. L. Churchill, “*Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 12, no. 4, pp. 307–328, 2011, doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x.
- [15] G. Manzo-Sánchez *et al.*, “Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico,” *Plant Pathol.*, vol. 68, no. 3, pp. 513–522, 2019, doi: 10.1111/ppa.12965.
- [16] AUGURA, “Sala de Prensa – Augura,” 2024. <https://augura.com.co/sala-de-prensa/> (accessed Jun. 18, 2025).
- [17] D. Marin and R. Romero, “El combate de la Sigatoka negra en banano.” p. 22.
- [18] V. Rey and Mira Jhon, “La sigatoka negra y aspectos para su manejo cultural en el cultivo del banano en Colombia.,” 2020. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1864> (accessed Jul. 21, 2025).
- [19] M. Orozco Santos *et al.*, “Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos,” *Trop. Plant Pathol.*, vol. 189, no. 3, pp. 189–196, 1992, Accessed: Aug. 11, 2025. [Online]. Available: www.sbfito.com.br
- [20] L. A. Lacey, D. Grzywacz, D. I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge, and M. S. Goettel, “Insect pathogens as biological control agents: Back to the future,” *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 132, pp. 1–41, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.JIP.2015.07.009.
- [21] P. Jaiswal, R. B. Khadka, A. Hussain Bhat, S. Baidya, and A. K. Keshari, “Morphological

- and Molecular Characterization of *Trichoderma* Isolates from Vegetable Crop Rhizospheres in Nepal,” *F1000Research* 2025 131088, vol. 13, p. 1088, Mar. 2025, doi: 10.12688/f1000research.153701.3.
- [22] A. D. Sanabria Velázquez *et al.*, “Characterization of *Trichoderma* species from agricultural soils of Paraguay,” *Agron. Colomb.*, vol. 41, no. 3, pp. 1–20, 2023, doi: 10.15446/agron.colomb.v41n3.111299.
- [23] J. Vásquez Cárdenas, “Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal,” *Intern. Med. J.*, vol. 40, no. 10, pp. 704–709, 2010, doi: 10.1111/j.1445-5994.2009.02101.x.
- [24] D. Balázs, T. Marik, A. Szekeres, C. Vágvölgyi, L. Kredics, and C. Tyagi, “Structure-activity correlations for peptaibols obtained from clade Longibrachiatum of *Trichoderma*: A combined experimental and computational approach,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 21, pp. 1860–1873, 2023, doi: 10.1016/j.csbj.2023.02.046.
- [25] R. Tyśkiewicz, A. Nowak, E. Ozimek, and J. Jaroszuć-ściseł, “*Trichoderma*: estado actual de su aplicación en la agricultura para el biocontrol de hongos fitopatógenos y la estimulación del crecimiento vegetal,” *Rev. Int. Ciencias Mol.*, vol. 23, no. 4, p. 2329, 2022.
- [26] X. Hou *et al.*, “Peptaibols: Diversity, bioactivity, and biosynthesis,” *Eng. Microbiol.*, vol. 2, no. 3, p. 100026, 2022, doi: 10.1016/j.engmic.2022.100026.
- [27] S. A. Asad, “Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review,” *Ecol. Complex.*, vol. 49, no. December 2021, p. 100978, 2022, doi: 10.1016/j.ecocom.2021.100978.
- [28] I. Vicente, R. Baroncelli, R. Hermosa, E. Monte, G. Vannacci, and S. Sarrocco, “Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma ecophysiology*,” *Fungal Biol. Rev.*, vol. 39, pp. 83–99, 2022, doi: 10.1016/j.fbr.2021.12.004.
- [29] H. F. Christoffersen *et al.*, “The natural, peptaibolic peptide SPF-5506-A4 adopts a β -bend spiral structure, shows low hemolytic activity and targets membranes through formation of large pores,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 8, pp. 882–889, 2015, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.03.003.
- [30] P. K. Mukherjee, B. A. Horwitz, and C. M. Kenerley, “Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective,” *Microbiology*, vol. 158, no. 1, pp. 35–45, 2012, doi: 10.1099/mic.0.053629-0.

- [31] S. Farmer, K. Alibek, and S. Mazumder, “Large scale production of liquid and solid trichoderma products.” pp. 1–32, 2019.
- [32] J. Arzate, A. Michel, V. Domínguez, and O. Santos, “Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero,” *Rev. Mex. Fitopatol.*, vol. 24, no. 2, pp. 98–104, 2006.
- [33] M. Schmoll, E. U. Esquivel-Naranjo, and A. Herrera-Estrella, “*Trichoderma* in the light of day - Physiology and development,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 47, no. 11, pp. 909–916, 2010, doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.010.
- [34] P. Okoth, Sheila Okoth and E. Muya, “Influence of soil chemical physical properties on occurrence of *Trichoderma* spp. in Embu, Kenya,” vol. 11, pp. 303–312, 2009.
- [35] K. Kumar, N. Amaresan, S. Bhagat, K. Madhuri, and R. C. Srivastava, “Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens,” *Indian J. Microbiol.*, vol. 52, no. 2, pp. 137–144, 2012, doi: 10.1007/s12088-011-0205-3.
- [36] Y. Elad, I. Chet, and Y. Henis, “A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil,” *Phytoparasitica*, vol. 9, no. 1, pp. 59–67, Feb. 1981, doi: 10.1007/BF03158330/METRICS.
- [37] V. Kumar, B. Koul, P. Taak, D. Yadav, and M. Song, “Journey of *Trichoderma* from Pilot Scale to Mass Production: A Review,” *Agric.*, vol. 13, no. 10, pp. 1–37, 2023, doi: 10.3390/agriculture13102022.
- [38] A. S. Alwadai, K. Perveen, and M. Alwahaibi, “The Isolation and Characterization of Antagonist *Trichoderma* spp. from the Soil of Abha, Saudi Arabia,” *Molecules*, vol. 27, no. 8, 2022, doi: 10.3390/molecules27082525.
- [39] M. A. Moreno Mateos, J. Delgado Jarana, A. C. Codón, and T. Benítez, “pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 44, no. 12, pp. 1355–1367, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.FGB.2007.07.012.
- [40] F. Covacevich and V. F. Consolo, *Manual de protocolos asistenciales Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrícicos Arbusculares y Trichoderma*. 2014.
- [41] K. A. M. Abo Elyousr, S. I. I. Abdel Hafez, and I. R. Abdel Rahim, “Isolation of *Trichoderma* and Evaluation of their Antagonistic Potential against *Alternaria porri*,” *J. Phytopathol.*, vol. 162, no. 9, pp. 567–574, 2014, doi: 10.1111/jph.12228.

-
- [42] J. P. C. Brito, M. H. S. Ramada, M. T. Q. de Magalhães, L. P. Silva, and C. J. Ulhoa, “Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil,” *J. Korean Phys. Soc.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1186/2193-1801-3-600.
- [43] T. Marik *et al.*, “New 19-residue peptaibols from trichoderma clade viride,” *Microorganisms*, vol. 6, no. 3, pp. 1–16, 2018, doi: 10.3390/microorganisms6030085.
- [44] L. H. Fantin *et al.*, “Characterisation of *Trichoderma* strains using FTIR-ATR spectroscopy and molecular analysis,” *Eur. J. Plant Pathol. 2021 1624*, vol. 162, no. 4, pp. 945–956, Jan. 2022, doi: 10.1007/S10658-021-02449-8.
- [45] K. Saravanakumar *et al.*, “Isolation of polysaccharides from trichoderma harzianum with antioxidant, anticancer, and enzyme inhibition properties,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 9, p. 1372, Sep. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10091372/S1.
- [46] C. P. Li, Z. Z. Shi, S. T. Fang, Y. P. Song, and N. Y. Ji, “Lipids and Terpenoids from the Deep-Sea Fungus *Trichoderma lixii* R22 and Their Antagonism against Two Wheat Pathogens,” *Molecules*, vol. 28, no. 17, p. 6220, Sep. 2023, doi: 10.3390/MOLECULES28176220/S1.
- [47] R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, “Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes,” pp. 207–226, 2007, doi: 10.1007/978-1-59745-519-0_14.
- [48] B. C. Smith, “The C=O Bond, Part VI: Esters and the Rule of Three | Spectroscopy Online,” 2018. https://www.spectroscopyonline.com/view/co-bond-part-vi-esters-and-rule-three?utm_source=chatgpt.com (accessed Nov. 06, 2025).
- [49] A. Wiest *et al.*, “Identification of Peptaibols from *Trichoderma virens* and Cloning of a Peptaibol Synthetase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 23, pp. 20862–20868, Jun. 2002, doi: 10.1074/JBC.M201654200.
- [50] E. Wiercigroch *et al.*, “Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 185, pp. 317–335, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.SAA.2017.05.045.
- [51] R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, “Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes: practical considerations,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 400, pp. 207–226, 2007, doi: 10.1007/978-1-59745-519-0_14.

-
- [52] C. Montoya Vallejo, M. A. Flórez Restrepo, F. L. Guzmán Duque, and J. C. Quintero Díaz, “Production, characterization and kinetic model of biosurfactant produced by lactic acid bacteria,” *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 53, pp. 14–22, 2021, doi: 10.1016/j.ejbt.2021.06.001.
- [53] S. Zeilinger, S. Gruber, R. Bansal, and P. K. Mukherjee, “Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics,” *Fungal Biol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 74–90, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.FBR.2016.05.001.
- [54] Cenibanano, “Informe anual,” 2022. [Online]. Available: <https://augura.com.co/wp-content/>