



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* spp.  
con actividad biocontroladora sobre el patógeno  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el insecto  
plaga *Trialeurodes vaporariorum* en plantas de tomate**

**Sandra Milena Ramírez Alarcón**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias – Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2019

**Compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* spp. con actividad biocontroladora sobre el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el insecto plaga *Trialeurodes vaporariorum* en plantas de tomate**

**Sandra Milena Ramírez Alarcón**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias, Microbiología**

Director (a):

Ph.D Sandra Milena Aragón Rodríguez

Codirector (a):

Ph.D Diana Cristina Sinuco León

Línea de Investigación:

Microbiología

Grupos de Investigación Colciencias:

Control biológico de plagas agrícolas, Bioprospección de compuestos volátiles

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias – Microbiología

Bogotá, Colombia

2019

*A Marina, Martha y Yolanda por su apoyo  
Incondicional y ser siempre mi soporte.*

*“La inteligencia consiste no solo en el conocimiento,  
sino también en la destreza de aplicar los  
conocimientos en la práctica”*

*Aristóteles*



## **Agradecimientos**

A mi familia por su apoyo incondicional, por darme palabras de ánimo y la alegría en el momento justo.

A Sandra Milena Aragón, mi directora y Diana Cristina Sinuco, mi codirectora de tesis por su apoyo y orientación en el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional de Colombia y al posgrado Inter facultades de Microbiología por estos dos años de formación a Socorro Prieto y Jeisson García por su acompañamiento, apoyo y gestión.

A los investigadores Mauricio Soto Suárez y Andrea Paola Zuluaga por su ayuda, apoyo y orientación.

A todos mis compañeros y amigos: Grupo de tomate de Agrosavia por su colaboración; Tatiana Santos, Christian Vargas y Ginna Cruz por su amistad y su ayuda incondicional cuando tenía que hacer montajes en invernadero y en los análisis estadísticos.

Al personal base del laboratorio de Microbiología agrícola de Agrosavia: Inesita, Stella, Don José, Luzma, David por la preparación de medios, préstamos de insumos, reactivos y por prestarme su colaboración para procesar muestras.

## Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por 15 cepas de *Trichoderma* spp. sobre (1) el crecimiento radial *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, (2) la severidad de la enfermedad *in planta* y (3) la tasa de oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate. En condiciones *in vitro*, se empleó la técnica de doble placa, donde se enfrentó una caja de Petri con *Trichoderma* y otra con *F. oxysporum* desarrollados en medio PDA, permitiendo solo el intercambio de los VOCs durante 10 días a 25°C. Los mayores porcentajes de inhibición observados fueron: Th004 (46.1%), M44 (45,8%), Th035(40,5%), Th019(39,8%), Th007 (39,4%), 3T(39%) y M45 (37.1%). Estas cepas, fueron probadas en condiciones *in planta*, mediante la exposición de las raíces de las plántulas de tomate inoculadas con el patógeno, a los COVs emitidos por *Trichoderma* spp. en un ambiente confinado durante 21 días. Se observó que la cepa Th035, disminuyó la severidad de la enfermedad en un 31%. Finalmente, se calculó el índice de preferencia de oviposición (IPO) de la mosca blanca sobre plantas tratadas con los COVs, observando valores negativos con las cepas Th035 (-27.30), M44 (-21.80), Th007 (-17.17) y M45(-7,46), mientras que las cepas Th004, 3T, y Th019 estimularon una mayor oviposición. Estos resultados demuestran el potencial biocontrolador de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por algunas cepas del hongo *Trichoderma* sobre dos problemas fitosanitarios en tomate y contribuyen al desarrollo de estrategias de control biológico mediante la bioprospección de estos metabolitos.

**Palabras clave:** Inhibición de crecimiento radial, bioprospección, marchitez vascular, índice de preferencia de oviposición, control biológico.

## Abstract

The effect of the volatile organic compounds (VOCs) emitted by 15 strains of *Trichoderma* spp. was evaluated on (1) *in vitro* radial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FoL59), (2) the severity of the disease *in planta* and (3) the oviposition rate of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. For the *in vitro* experiment, we used the double plate technique, where two Petri plates, one with *Trichoderma* spp. and other with *F. oxysporum* grown on PDA were placed one over the other for ten days at 25°C, the inhibition rate was registered. Seven strains showed the best inhibition rates of the pathogen: Th004 (46.1%), M44 (45,8%), Th035(40,5%), Th019(39,8%), Th007 (39,4%), 3T (39%) and M45 (37.1%). These strains were assessed *in planta* by exposing the roots of tomato seedling to the VOCs emitted by *Trichoderma* spp. in a sealed environment for 21 days. The progress and severity of the disease were assessed. Only the strain Th035 showed a significant difference compared to control plants, reducing by 31% the severity of the disease. Finally, the oviposition preference index (OPI) of the whitefly on VOCs treated tomato plants. Negative OPI values were observed with the strains Th035 (-27.30), M44 (-21.80), Th007 (-17.17) and M45(-7,46), while Th004, 3T, and Th019 showed a stimulant effect on the oviposition. These findings demonstrate a biocontrol activity generated by the fungal VOCs of *Trichoderma* spp. against two different tomato plant health problems and contribute to the development of biological control strategies via bioprospection of fungal metabolites.

**Keywords:** Radial growth inhibition, bioprospecting, vascular wilt, oviposition preference index, biological control

## Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>14</b>
<b>Estado del arte.....</b>	<b>19</b>
1.1 Marchitez vascular del tomate: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen .....	19
Interacción planta-patógeno .....	20
Manejo de la enfermedad .....	21
Prácticas culturales .....	21
Uso de cultivares resistentes.....	22
Control químico .....	22
Control biológico.....	23
1.2 Mosca blanca de los invernaderos, <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood).....	23
Daños.....	23
Interacción planta-insecto.....	24
Manejo de la plaga .....	25
1.3 El género <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico.....	26
Competencia .....	26
Micoparasitismo .....	27
Antibiosis.....	27
1.4 Compuestos orgánicos volátiles de microorganismos.....	28
1.5 Compuestos orgánicos volátiles del género <i>Trichoderma</i> .....	30
Bibliografía .....	34
<b>Capítulo 1: Compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre el manejo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder &amp; H.N. Hansen y la promoción de crecimiento en plantas de tomate .....</b>	<b>43</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>43</b>
1.1 Introducción .....	44
1.2 Materiales y métodos.....	47
1.2.1 Material fúngico.....	47
1.2.2 Material vegetal.....	48
1.2.3 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> mediadas por los COVs de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fol59</i>	49

1.2.4 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre el desarrollo de la marchitez vascular <i>in planta</i> .....	51
Progreso de la enfermedad .....	53
1.2.5 Promoción de crecimiento mediada por compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> en tomate .....	55
1.2.6 Análisis estadístico .....	56
1.3 Resultados y discusión .....	58
1.3.1 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> mediadas por los COVs de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fol59</i> 58	
1.3.2 Promoción de crecimiento mediada por compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> en tomate .....	60
1.3.3 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre el desarrollo de la marchitez vascular <i>in planta</i> .....	63
1.4 Conclusiones .....	68
Bibliografía .....	69
<b>Capítulo 2: Efecto de compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la oviposición de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> en tomate .....</b>	<b>74</b>
Resumen .....	74
2.1 Introducción .....	75
2.2 Materiales y métodos .....	76
2.2.1 Material biológico: Plantas, insectos y aislamientos de hongos. ....	76
2.2.2 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre la preferencia de oviposición de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> en tomate.....	78
2.2.3 Identificación de los compuestos orgánicos volátiles de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ..	81
2.2.4 Análisis estadístico .....	82
2.3 Resultados y discusión .....	83
2.3.1 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre la preferencia de oviposición de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> en tomate.....	83
2.3.2 Identificación de COVs .....	86
2.4 Conclusiones .....	90
Bibliografía .....	91
<b>3. Recomendaciones .....</b>	<b>95</b>
3.1 Recomendaciones.....	95

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> A: la inhibición del crecimiento de patógenos se logra mediante la producción de una sustancia antimicrobiana por <i>Trichoderma</i> micelio inoculado como conidios en las raíces. B: competencia donde <i>Trichoderma</i> por espacio y nutrientes para que otros organismos no puedan acercarse. C: micoparasitismo. Este modo de acción se divide en varias etapas sucesivas, 1- el reconocimiento del objetivo, 2- el ataque directo por secreción de las enzimas líticas. D: resistencia sistémica inducida (Tomado de Zaki <i>et al.</i> , 2020).....	28
<b>Figura 1.1.</b> Esquema del sistema de evaluación de doble placa para evaluación de antagonismo de los COVs de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fol59</i> (adaptada de Sinuco <i>et al.</i> , 2020) .....	50
<b>Figura 1.2.</b> Exposición de raíces de plántulas de tomate a compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. ....	51
<b>Figura 1.3</b> Ubicación del material vegetal en el escáner para la medición del área foliar (Leaf area meter CL-202).....	55
<b>Figura 1.4.</b> Actividad antagonista de compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra el fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ( <i>Fol59</i> ). Fotografía tomada el día 10 del experimento. ....	58
<b>Figura 1.5.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno <i>Fol59</i> por compuestos orgánicos volátiles producidos por <i>Trichoderma</i> spp. barras de error indican el error estándar, letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) .....	59
<b>Figura 1.6.</b> Tratamientos de plantas expuestas a los COVs de <i>Trichoderma</i> (a,b,c,d),. Parámetros de promoción de crecimientos para plantas con y sin <i>Fol59</i> , peso fresco (e), peso seco (f), área foliar (g) y crecimiento (h), estos datos se registraron a los 21 días. Barras de error indican el error estándar, letras no comunes indican diferencias significativas según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ).....	62
<b>Figura 1.7.</b> El efecto de los COVs de <i>Trichoderma</i> sobre plantas infectadas con <i>Fol59</i> , los datos se registraron a los 21 días después de infección y de exposición a COVs de <i>Trichoderma</i> , usando dos tipos de escalas una descriptiva (tabla 1.3) (a,b) y la otra destructiva (tabla 1.4) (g,h) porcentaje de severidad e incidencia. Se observan diferencias con respecto al control (c), testigo	

patógeno <i>Fol59</i> <b>(d)</b> , COVs de Th035 redujeron los síntomas de la enfermedad <b>(e)</b> , COVs de 3T no afectan sobre incidencia ni severidad de la enfermedad <b>(f)</b> . Barras representan el error estándar, letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ).....	64
<b>Figura 1.8.</b> Área abajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) incidencia de severidad <i>Fol59</i> . Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según LSD-FISHER con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ).....	65
<b>Figura 2.1. a)</b> Cría masiva de Mosca blanca en plantas de frijol, <b>b)</b> recolección de <i>T. vaporariorum</i> 20 adultos por unidad experimental <b>c)</b> Conservación en frío de los grupos de mosca blanca para su posterior liberación en las jaulas pinza. ....	78
<b>Figura 2.2. a)</b> Distribución de tratamientos en cuarto de bioensayos del laboratorio de microbiología agrícola, <b>b)</b> exposición de raíces de plántulas de tomate a compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. ....	79
<b>Figura 2.3.</b> Esquema de liberación de adultos de mosca blanca el envés de las hojas de tomate. Se liberó un total de 20 adultos de dos días de emergidos en una proporción 1:1 en el envés de las hojas.....	80
<b>Figura 2.4. a)</b> Periodo de interacción entre adultos de mosca blanca y plantas de tomate tratadas con COVs de <i>Trichoderma</i> spp. <b>b)</b> y <b>c)</b> observación y conteo de huevos de mosca blanca en estereoscopio.....	80
<b>Figura 2.5.</b> Índice de preferencia de oviposición de la mosca blanca de los invernaderos sobre plantas de tomate tratadas con COVs de <i>Trichoderma</i> spp. Letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P > 0,05$ ).....	85

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> COVs de diferentes especies de <i>Trichoderma</i> spp. ....	31
<b>Tabla 1.1.</b> Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. evaluados <i>in vitro</i> .....	48
<b>Tabla 1.2.</b> Tratamientos evaluados para promoción de crecimiento y manejo de la marchitez vascular en tomate mediada por COVs de <i>Trichoderma</i> spp. ....	52
<b>Tabla 1.3.</b> Escala descriptiva de marchitez vascular en plantas de tomate (Gomez 2019) .....	53
<b>Tabla 1.4.</b> Escala destructiva de haces vasculares afectados (Simbaqueba 2018) .....	54
<b>Tabla 2.1.</b> Número de huevos por tratamiento ovipositados en plantas de tomate. Letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ) .....	86
<b>Tabla 2.2.</b> COVs de <i>Trichoderma</i> spp. detectado por HS-SPME-GC-MS. ....	87

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
<i>kPa</i>	kilopascal
°C	Grados Celsius
<i>Cm</i>	Centímetros
<i>Ha</i>	Hectáreas
<i>ton</i>	Toneladas
<i>Kg</i>	Kilogramo

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
$\mu\text{L}$	Microlitros

### Superíndices

Superíndice	Término
®	Marca registrada

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas
SPME	Microextracción en fase sólida
Fol59	<i>Fusarium oxysorum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> (Sacc.)W.C.Snyder & H.N. Hansen
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
EAG-GC	Electroantenografo acoplado a Cromatógrafo de Gases

## Introducción

### Problema

La producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia bajo condiciones protegidas representa una contribución económica importante al sector agrícola principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia con un porcentaje de participación del 28, 11.11 y 9.8% respectivamente (Agronet, 2017; Carmona, 2018; Carmona *et al.*, 2020; Gómez, 2019; Jaramillo *et al.*, 2013). La más reciente producción agrícola reportada por la FAO para este cultivo en Colombia es de 527.313 Ton para el año 2018 (FAOSTAT, 2018). Sin embargo, este cultivo también sufre pérdidas económicas importantes en la producción, cercanas al 80% en casos severos debido a diferentes agentes patógenos tales como el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Carmona *et al.*, 2020).

Esta enfermedad genera afecciones de carácter irreversible como la obstrucción de los haces vasculares del xilema impidiendo el ascenso de agua y nutrientes ocasionando un marchitamiento generalizado hasta finalizar en la muerte de la planta (Vásquez & Castaño, 2017), la persistencia de este patógeno en el suelo y su capacidad de establecimiento en células y tejidos vasculares de la planta (endófito), hacen que su manejo mediante aplicaciones de productos de contacto se dificulte, y es controlado principalmente mediante el uso de variedades resistentes al patógeno, la aplicación de fungicidas de origen químico y prácticas culturales como la solarización de los suelos, embolsado de suelo estéril y rotación de cultivos (Vásquez & Castaño, 2017).

Adicionalmente, este cultivo es afectado por la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) especie reconocida por las pérdidas económicas que causa, por daño directo relacionado con el debilitamiento de la planta y por daño indirecto mediante la reducción del área fotosintética de la hoja y transmisión de virus (Rincon *et*

*al.*, 2019) . Tradicionalmente, el manejo de este insecto plaga se ha realizado mediante la aplicación de insecticidas de amplio espectro, que además de afectar la salud humana e impactar negativamente el medio ambiente, también generan una disminución en la fauna benéfica con potencial para el manejo de poblaciones de la mosca blanca como son los parasitoides, así mismo afecta poblaciones de polinizadores (Aragón *et al.*, 2008; Zaki *et al.*, 2020) y ha generado que algunos insectos plaga como la mosca blanca de los invernaderos, presenten resistencia a los ingredientes activos de estos pesticidas a lo cual el agricultor responde incrementando las dosis de aplicación, sin obtener mejores resultados (Pym *et al.*, 2019).

Por lo cual, investigaciones que contribuyan al diseño e implementación de estrategias de manejo de estos dos problemas fitosanitarios *F. oxysporum* y *T. vaporariorum* en plantas de tomate, son indispensables para reducir el uso de insecticidas y fungicidas de origen químico y de esta manera mitigar el impacto de estos productos sobre el medio ambiente y la salud humana.

## Justificación

Recientes estudios demuestran que las plantas se encuentran constantemente expuestas a interacciones con microorganismos patogénicos y no patogénicos que usualmente habitan el mismo suelo donde éstas se desarrollan, y que las plantas son capaces de percibir compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles emitidos por estos microorganismos desde la distancia, lo cual en consecuencia puede afectar su desarrollo de la planta y su resistencia a factores bióticos y abióticos (Cordovez *et al.*, 2017; Moisan *et al.*, 2019), así como sus interacciones ecológicas con organismos de diferentes niveles tróficos como insectos, microorganismos y enemigos naturales (Contreras-Cornejo *et al.*, 2020; Davis *et al.*, 2013; Macías-Rodríguez *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2015).

Esta comunicación entre las plantas y su entorno ha evolucionado en mecanismos específicos que le permiten reconocer elicitores que provienen de patógenos o de insectos herbívoros, conocidos como patrones moleculares asociados a microorganismos o insectos respectivamente, los cuales les permiten activar su sistema de defensas contra este tipo de ataques (Aragón & Beltran, 2018; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018; Moisan *et al.*, 2019). A pesar

de esto, la aplicación de alternativas de manejo de insectos y microorganismos patógenos mediada por estas señales químicas de estas interacciones es escasa y limitada a ensayos de laboratorio.

Aunque son poco comunes, los estudios donde se implementen estrategias biológicas para el manejo simultáneo de insecto y patógeno, Jaber y Ownley (2018) realizaron una recopilación importante de este tipo de estudios donde se usan microorganismos endófitos con el propósito de controlar dos problemas fitosanitarios diferentes. Sin embargo, el empleo de compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas de hongos biocontroladores como *Trichoderma* sp. en el manejo de dual de insecto y patógeno en un sistema productivo de importancia económica para Colombia como lo es el tomate son casi inexistentes y principalmente dirigidos a ensayos *in vitro* que exploran el potencial de estos volátiles sobre cepas del patógeno (Sinuco *et al.*, 2017).

Considerando esta información, las estrategias de manejo tanto del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* como del insecto plaga *Trialeurodes vaporariorum* podrían potencialmente ser optimizadas mediante el diseño e implementación de una estrategia de manejo integrado de estos dos problemas fitosanitarios, que permita de manera sistémica modular la comunicación interespecífica entre la planta, el patógeno y el insecto plaga. La modulación de esta interacción, dirigida hacia la disminución de la preferencia de oviposición de la mosca blanca mediada por los semioquímicos emitidos por las plantas de tomate tratadas con compuestos volátiles del hongo benéfico *Trichoderma* sp. y a la reducción de los síntomas de la enfermedad en respuesta a una activación del sistema de defensa de la planta causada por algunos compuestos volátiles emitidos por el hongo benéfico, los cuales han sido probados como inductores de resistencia sistémica en plantas como *Arabidopsis* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016, 2020).

Por lo anterior, determinar si existe o no un efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas del hongo benéfico *Trichoderma* sp. sobre la oviposición de adultos de mosca blanca y sobre la severidad de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate tratadas con estos metabolitos contribuye al entendimiento de esta interacción y al enfoque de futuras investigaciones con cepas promisorias del biocontrolador seleccionadas en este trabajo. Adicionalmente, los resultados de estos estudios contribuyen al desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades en este sistema agrícola que

---

permitan la reducción de métodos de control que impacten el medio ambiente y la salud humana como lo son los fungicidas e insecticidas.

Esta investigación, permitió realizar una selección de microorganismos promisorios para el control biológico del agente causal de la marchitez vascular *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate. Una investigación sin precedentes en Colombia, donde se exploraron microorganismos de interés de control biológico del banco de Germoplasma de la Nación en custodia de Agrosavia, desde su actividad biocontroladora bajo condiciones *in vitro* y causada exclusivamente por la interacción entre los compuestos orgánicos volátiles emitidos por los microorganismos y la cepa del patógeno.

En esta primera fase de la investigación y durante el desarrollo de los experimentos, no se presentó ningún tipo de contacto físico entre las estructuras de los hongos, ni entre sus medios de cultivo. Por lo cual, se puede atribuir el efecto controlador observado, a la comunicación mediada por los semioquímicos emitidos por el biocontrolador.

Adicionalmente, se incorporaron dos niveles tróficos a esta interacción: la planta y el insecto, una interacción multitrófica que resulta de gran complejidad y busca contribuir con futuras investigaciones que permitan desarrollar mecanismos de control de insectos plaga y microorganismos fitopatógenos, con un mismo método a través del desarrollo de bioproductos a base de metabolitos con actividad biocontroladora y así contribuir a la disminución del uso de pesticidas. Este trabajo es solo el comienzo y naturalmente se continuará con profundizaciones que nos permitan dilucidar el mecanismo.

La activación de mecanismos de defensa en la planta de tomate *Solanum lycopersicon* L. en respuesta a la interacción con los compuestos volátiles emitidos por el hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. es una apuesta novedosa y poco explorada. Que si bien en este proyecto, por limitaciones de tiempo y presupuesto no se extiende hasta la descripción detallada de los mecanismos bioquímicos activados en las diferentes cascadas de defensa en la planta en respuesta a los compuestos orgánicos volátiles, sí nos permite abrir la discusión sobre el tema y plantear un abanico de posibles mecanismos que permitieron el exitoso manejo de la severidad de la enfermedad y la reducción en la tasa de oviposición de la mosca blanca sobre plantas previamente tratadas con los volátiles y plantear futuros experimentos.

## Hipótesis

Los compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas del género *Trichoderma* spp. tienen actividad biocontroladora sobre el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y ejercen control sobre poblaciones de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* en plantas de tomate *Solanum lycopersicum*.

## Objetivo general

Evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp. sobre el control del insecto plaga *Trialeurodes vaporariorum* y el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate.

## Objetivos específicos

- Caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. de acuerdo a su actividad antagónica mediante compuestos orgánicos volátiles sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones *in vitro*.
- Evaluar la actividad biocontroladora de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp. sobre la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, en plantas de tomate.
- Evaluar la actividad biocontroladora de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp. sobre la oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en plantas de tomate.

## Estado del arte

El tomate (*Solanum lycopersicum*), según su clasificación taxonómica, pertenece a la familia *Solanaceae*; clase: *Manoliopsidia*; orden: *Solanales* actualmente se clasifica dentro del género *Solanum* (Peralta, Spooner, & Knapp, 2008), ha sido reportado como una de las hortalizas de mayor consumo en el mundo (Blancard *et al.*, 2011). En los últimos registros, a nivel mundial se tenía un área cosechada 4.762.457 ha con una producción de 182.256.458 ton (FAO, 2018) y en Colombia el área cosechada fue de 11.227 ha con una producción de 527.313 ton, teniendo como principales departamentos productores a norte de Santander, Antioquia, Boyacá, Santander y Cundinamarca (FAO, 2018).

El cultivo de tomate en Colombia es afectado por un complejo de microorganismos habitantes del suelo que causan importantes pérdidas en la producción, principalmente en cultivos protegidos (Carmona *et al.*, 2020; Jaramillo *et al.*, 2013; Vásquez & Castaño, 2017). Uno de los microorganismos que pertenece al complejo de agentes causales de la marchitez vascular es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, esta forma especial se caracteriza por atacar exclusivamente plantas de tomate (Snyder & Hansen 1940)

### **1.1 Marchitez vascular del tomate: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen**

El marchitamiento vascular es causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen es uno de los más graves en todo el mundo, considerado de importancia económica, ya que causa pérdidas en la producción de hasta un 47 % en invernadero y 21 % en cultivos al aire libre, siendo que, en Colombia, aún no se tienen datos de pérdidas por esta enfermedad. (Ramyabharathi *et al.*, 2012). Hasta el momento se han identificado tres razas (1, 2 y 3), estas diferentes razas del hongo portan en varias combinaciones de genes de avirulencia, que activan respuestas de defensa contra el hongo (Simsek *et al.*, 2018; Vásquez & Castaño 2017).

Cuando este patógeno ataca plántulas, ocasiona el llamado “mal del talluelo”, el cual es favorecido por la carencia de lignina en el tallo, que las hace más susceptibles y permite el

ingreso del patógeno y su llegada a los vasos xilemáticos, lo que ocasiona posteriormente el colapso de la planta. En cambio, cuando ataca a plantas en un estado fenológico vegetativo, la enfermedad se conoce como “marchitez vascular”, se empieza a ver amarillamiento en las hojas bajas, la base del tallo torna a un color oscuro y los haces vasculares se tornan pardo oscuro, debido al impedimento de absorción de agua y transporte de nutrientes, ocasionando marchitamiento, colapso de la planta y finalmente la muerte. A temperaturas altas de 25-32°C y un pH bajo del suelo, son condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad (Vásquez & Castaño 2017, González *et al.*, 2012).

Este patógeno produce tres estructuras de diseminación, los microconidios, macroconidios y clamidiosporas, usando como vectores corrientes de agua, el viento, equipos agrícolas, herramientas infectadas con el patógeno, plantas enfermas y el hombre (De Granada 2001), dentro de la planta con la corriente de transpiración se diseminan las microconidias a través de los haces vasculares donde estas pueden volver a germinar (Gordon 2017)

Las clamidiosporas son estructuras de resistencia que le permite sobrevivir por muchos años en el suelo, donde germinan ante la presencia de azúcares y aminoácidos que se encuentran en los exudados de las raíces (FAO 2013).

## Interacción planta-patógeno

Las plantas están expuestas a la presencia de patógenos, cuando están en presencia de uno, estas han desarrollado mecanismos de defensa que pueden ser pasivas (preexistentes) o activas (inducidas). Los primeros (preexistentes) se refiere a la parte estructural de la planta, como el engrosamiento de las paredes celulares, o en la parte bioquímica que es la información genética propia de la variedad o cultivar, estas se producen sin ningún inductor que son compuestos como aceites esenciales, alcaloides, péptidos, proteínas, fenoles o taninos, terpenos e inductores de proteasa son las formas más comunes como se encuentran en la planta y pueden encontrarse en forma inactiva hasta la detección del patógeno (Agrios 2005)

En segundo lugar, están los mecanismos inducidos, el SAR por sus siglas en inglés systemic acquired resistance, es un tipo de resistencia que se caracteriza por la formación de una necrosis localizada causada por el patógeno inductor y depende de la señalización del ácido salicílico y de la expresión sistémica de genes protéicos relacionados con la patogénesis (PR) (Bolton 2009, Nawrocka 2013; Mendoza *et al.*, 2018). Por otro lado, se encuentra la respuesta inmune a partir del reconocimiento de moléculas llamadas MAMPs ó PAMPs (Microbial or Pathogen Associated Molecular Patterns), la resistencia inducida sistémica o ISR (*induced systemic resistance*), se caracteriza por ser inducida por agentes externos, dependiente de la percepción del ácido jasmónico y el etileno y no está asociada con la expresión de los genes PR, y a diferencia de SAR, no está asociada con la formación de lesiones necróticas locales (Leonetti *et al.*, 2017, Shores *et al.*, 2010).

## **Manejo de la enfermedad**

El manejo integrado de la marchitez vascular se compone en la prevención, monitoreo y control de este patógeno, dentro de ellas se manejan varias prácticas, que serán mencionadas a continuación:

### **Prácticas culturales**

Las prácticas culturales, son una serie de prácticas que ayudan a controlar la enfermedad, mediante la generación de ambientes desfavorables para el patógeno, y se usa como práctica preventiva principalmente. Una de éstas es la rotación de cultivos, la cual se debe hacer durante periodos de 5 a 7 años ya que ésta reduce el inóculo inicial y por consiguiente la incidencia de la enfermedad; se debe tener en cuenta de no usar cultivos de la familia *Solanaceae*. La solarización del suelo, que consiste en cubrir el suelo y con el sol alcanzar altas temperaturas para matar los microorganismos. Otra práctica cultural es haciendo arado con el suelo seco periódicamente para disminuir la población del patógeno; subir el pH (6,5 – 7,5) del suelo ya que las condiciones favorables al patógeno son pH bajos y emplear una fuente de nitrógeno y mantener el cultivo limpio, libre de residuos de podas, residuos de cosechas, de frutos enfermos

ya que este sobrevive de forma saprofita en el suelo (Kant *et al.*,2011; Vásquez & Castaño 2017; Ajilogba *et al.*,2013).

## Uso de cultivares resistentes

El uso de cultivares resistentes es uno de los métodos más eficientes y ecológicos para el manejo de marchitez vascular. Estos cultivares desarrollan mecanismos, a su vez el patógeno desarrolla mecanismos de adaptación para vencer la resistencia de la planta. Las variedades de tomate resistentes a las razas 1 y 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* han sido mejoradas, mediante la introgresión de genes de sus parientes silvestres, como *Solanum pennellii* y *S. pimpinellifolium*. Muchas variedades de tomate mejoradas tienen resistencia a las razas 1 o 2; pero pocas poseen resistencia a todas las razas del hongo (Mc Govern & Mc Sorley, R 2012; Vásquez & Castaño 2017).

## Control químico

Se usan diferentes tipos de químicos para manejar y prevenir la enfermedad, dentro de ellos están: (a) desinfectantes, se usan para inactivar al patógeno haciendo ruptura de los ácidos nucleicos como NaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>; otros como sales cuaternarias de amonio y alcoholes, causa la denaturación de proteínas y lisis en membrana celular. (b) fungicidas como bromuconazole y procloraz, cuando se aplican al suelo, son más efectivos en reducir la incidencia de la enfermedad; el inconveniente de usar fungicidas en formas indiscriminadas, es que se pueden estar seleccionando cepas patogénicas resistentes y disminuyendo la población de microorganismos benéficos del suelo, producir toxicidad en plantas, contaminación de fuentes hídricas y problemas de salud en los consumidores (Amini *et al.*,2010; Vásquez & Castaño 2017; Mc Govern & Mc Sorley 2012; Mc Govern 2015 ).

## Control biológico

Debido a que el uso de fungicidas no es amigable con el ambiente, toma fuerza el manejo de la enfermedad mediante el control biológico, dentro de ellos se encuentran bacterias (*Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*) y hongos (*Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*) (Moreno-Velandia *et al.*, 2019; Vásquez & Castaño 2017; Ajilogba *et al.*, 2013). La siembra de semillas de tomate pregerminadas en suspensiones del hongo *Trichoderma koningii*, con aplicaciones posteriores del mismo hongo y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en el suelo de los semilleros, ayudan a obtener un control de *Fusarium oxysporum* (FAO 2019).

### 1.2 Mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)

La mosca blanca del invernadero *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) es una plaga de importancia económica ya que causa daño con una amplia distribución geográfica, y atacando 250 especies de plantas (Ebrahimifar Jamshidnia, & Allahyari, 2017, Toro 2017), de alta importancia agronómica como habichuela, frijol (Mahecha 2016), pepino (Hassanpour *et al.*, 2016), pimentón, papa, algodón y tomate (Nasruddin 2016, Darshanee *et al.*, 2017) entre otros.

## Daños

Los estados de ninfa y adulto se alimentan del floema causando dos tipos de daño. El daño directo corresponde al debilitamiento de la planta (amarillamiento y marchitez de la planta) debido al hábito alimenticio chupador del insecto. El daño indirecto se asocia con reducción del área fotosintética de la hoja debido el establecimiento y desarrollo de un complejo de hongos denominado fumagina, que afecta la fotosíntesis y los frutos. Esto ocurre, porque las ninfas y los adultos excretan una sustancia azucarada sobre las hojas inferiores que acompañada de alta humedad ambiental crea un microclima ideal para que el hongo colonice las hojas. Sin embargo,

el daño indirecto más importante causado por las moscas blancas es su capacidad de transmitir enfermedades virales a las plantas, dentro de ellos se encuentra el virus del enroscamiento y amarillamiento de las hojas en Tomate (ToRYLCV por sus siglas en inglés), y el virus de la clorosis en tomate (ToCV por sus siglas en inglés) (Betancur Pérez *et al.*,2012; FAO 2013).

McKee & Zalom (2009) informó sobre la relación entre la temperatura y el desarrollo fisiológico de los huevos, los estadios de ninfas y la maduración de adultos en *T. vaporariorum* en tomates de invernadero. El rango de temperatura para su desarrollo está entre 16 - 34°C, temperaturas letales se sitúan por debajo de los 9°C y por encima de los 40°C. El umbral de temperatura para la oviposición es de 14°C, y la fecundidad se reduce de manera notable (Aregbesola *et al.*,2019). El ciclo de vida *Trialeurodes vaporariorum* dura aproximadamente 28 días, donde pasa por seis estados de desarrollo: huevo, cuatro estadios ninfales y adulto (Bernal *et al.*,2008).

## Interacción planta-insecto

La defensa de las plantas contra insectos, puede deberse a varias facultades como la exploración de las bases moleculares, bioquímicas como la resistencia inducida, las interacciones multitróficas y los costos fisiológicos y ecológicos del estado inducido (Kessler & Baldwin 2002). A partir de lo mencionado se encuentran defensas directas e indirectas a los herbívoros, las defensas directas son obstrucciones morfológicas como corteza impenetrable, espinas, pelos punzantes y diversos metabolitos primarios y secundarios tóxicos o antinutritivos que se expresan o inducen constitutivamente después de la infesta; las defensas indirectas están relacionadas con los metabolitos secundarios sean volátiles o no volátiles, que emiten las plantas, no producen un solo compuesto, sino una mezcla sinérgica y estas no son fijos, dependen del estado de desarrollo y entre órganos de la planta, es importante para la resistencia a herbívoros donde atrae depredadores al herbívoro (Kessler.& Baldwin 2002, Agrawal 2005; Wink 2018).

En plantas, las respuestas al daño celular están reguladas por una hormona de estructura química muy similar al ácido araquidónico, el ácido jasmónico. Esta hormona vegetal está

relacionada con señales químicas (jasmonatos) que inducen defensas en las plantas como respuesta al ataque de insectos (Zavala 2010).

En la interacción con mosca blanca y su hábito chupador alimentándose de floema, estos causan daños mecánicos lo que indica que las plantas identifican el ataque de insectos a través de sus secreciones bucales, también pueden responder a otro tipo de secreciones de los insectos, como los fluidos relacionados con la oviposición (Zavala 2010), por lo tanto, la respuesta de la planta es similar a la que tiene con los patógenos, que es a través de señalización de fitohormonas, ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (AJ) / vías dependientes de etileno (ET) (Mayer *et al.*, 2002, Inbar, M., & Gerling 2008). Se ha demostrado la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) dependiente de (SA), para suprimir la señalización de (AJ) en plantas, priorizando así la resistencia dependiente de (SA) a los patógenos microbianos sobre la dependencia de (AJ) defensa que en general, es más efectiva contra la herbivoría de insectos (De Vos *et al.*, 2005). Al igual que en interacción planta-patógeno, las plantas acumulan proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), en respuesta al hábito chupador de mosca blanca; en un estudio demostró que plantas de tomate infestadas produjeron niveles altos de proteínas (PR)  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, peroxidasa, tanto local, como sistémicamente (McKenzie *et al.*, 2002).

## Manejo de la plaga

Para el manejo de esta plaga se debe tener en cuenta el ciclo biológico, la dispersión de la población y densidad de la misma (Bernal *et al.*, 2008). Para definir el nivel de daño económico, se basa en el cálculo de una relación cuantitativa entre el daño económico y la lesión ocasionada por el insecto, importante para la toma de decisiones en los programas de Manejo Integrado de Plagas (Rincon *et al.*, 2019).

Para el control de esta plaga, se utiliza principalmente la aplicación de agroquímicos pertenecientes a una amplia gama de piretroides (neonicotinoides, piretroides y cetoenoles). Sin embargo, el uso constante de estos químicos ha provocado el desarrollo de resistencia a los insecticidas por parte de esta plaga (Moreno *et al.*, 2018), y su impacto negativo en los programas

de control integrado ha fomentado el desarrollo de métodos alternativos de manejo de esta plaga (Fargues *et al.*, 2003).

Una alternativa de manejo de esta plaga es el uso de enemigos naturales de esta plaga como avispas parasitoides del género *Encarsia*, *Eretmocerus*. y *Prospaltella* y chinches depredadores como *Orius tristicolor* y *Chrysopa* spp. Por otro lado, el uso de los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* han reportado controles en huevos, ninfas y adultos (Fargues *et al.*, 2003).

### **1.3 El género *Trichoderma* como agente de control biológico**

Los microorganismos usados en el control biológico ayudan a disminuir los daños que causan las plagas y patógenos del suelo. Estos microorganismos benéficos presentan diferentes modos de acción los cuales les permiten ejercer un papel biorregulador. Entre las especies más estudiadas y usadas como agentes de control biológico, se encuentra el género *Trichoderma* ya que tienen capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto de promoción de crecimiento de cultivos e inducción de resistencia sistémica para la defensa de patógenos (Harman ,2000, Monteiro *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2014, Mathys *et al.*, 2012, Vinodkumar *et al.*, 2017).

Dentro de la acción biocontroladora de *Trichoderma* se encuentran diferentes mecanismos de acción (Figura 1).

#### **Competencia**

Este mecanismo de acción se refiere en la interacción entre dos o más organismos, que se encuentran disputando recursos específicos como son el espacio, nutrientes, agua y luz. Por ejemplo, *Trichoderma* spp. podría competir y secuestrar iones de hierro (los iones son esenciales para el patógeno de la planta, mediante la liberación de compuestos conocidos como sideróforos (Vinodkumar *et al.*, 2017). También son capaces de movilizarse y absorber nutrientes de su

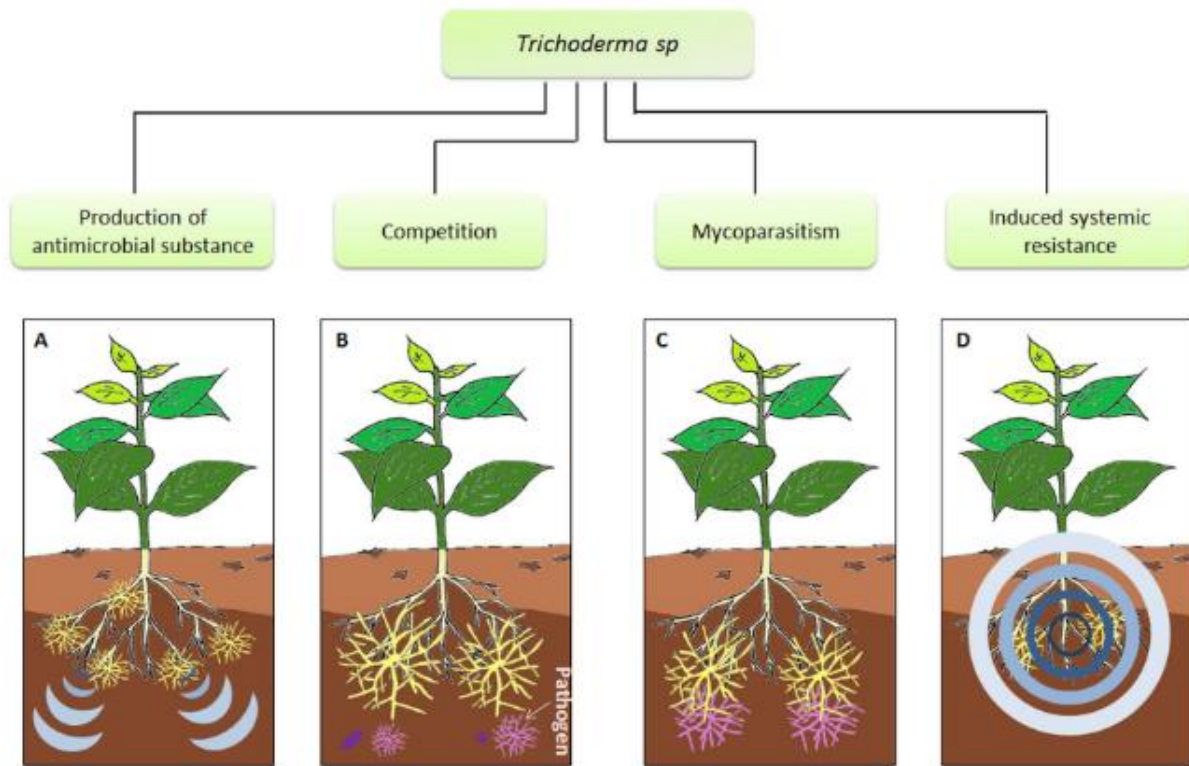
alrededor y usar diferentes fuentes de carbono, por los que se le facilita multiplicarse y colonizar rápidamente la rizosfera (Harman *et al.*,2004).

## **Micoparasitismo**

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que corresponden a la composición y estructura de las paredes celulares de hongos parasitados, el proceso de micoparasitismo involucra cuatro etapas (a) crecimiento quimiotrópico, en el cual un estímulo químico atrae al hongo antagónico; (b) reconocimiento específico, probablemente mediado por lectinas en la superficie celular tanto del patógeno como del antagonista; (c) ataque y enrollamiento de *Trichoderma* alrededor de las hifas del huésped; y (d) secreción de enzimas líticas que degradan la pared de la célula huésped (Vinale *et al.*,2008). En este proceso *Trichoderma* secreta enzimas que degradan la pared celular del hongo patógeno, por lo tanto, la lisis de la pared celular de los fitopatógenos está mediada por glucanasas, quitinasas y proteasas (Dos Reis Almeida *et al.*,2007; Naher *et al.*,2014).

## **Antibiosis**

La antibiosis es la acción directa de secreción de compuestos antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por hongos antagonistas que suprimen o matan patógenos del suelo; cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibitoras son consideradas "antifungicos" (Verma *et al.*,2007; Roberto *et al.*,2019).



**Figura 1.** A: la inhibición del crecimiento de patógenos se logra mediante la producción de una sustancia antimicrobiana por *Trichoderma* micelio inoculado como conidios en las raíces. B: competencia donde *Trichoderma* por espacio y nutrientes para que otros organismos no puedan acercarse. C: micoparasitismo. Este modo de acción se divide en varias etapas sucesivas, 1- el reconocimiento del objetivo, 2- el ataque directo por secreción de las enzimas líticas. D: resistencia sistémica inducida (Tomado de Zaki *et al.*, 2020).

## 1.4 Compuestos orgánicos volátiles de microorganismos

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son moléculas de bajo peso molecular (<250 um), a base de carbono, alta presión de vapor (>0,001kPa a 20°C, 760mm Hg) (Pagans *et al.*,2006; Contarino *et al.*,2019). En la literatura se encuentran identificados más 300 COVs de origen fúngico (Hung *et al.*, 2015). Entre los compuestos identificados se encuentran grupos funcionales cetonas, heterocíclicos, aldehídos, fenoles, ácidos, alcoholes, terpenos, tioalcoholes, tioésteres, compuestos aromáticos y ciclohexanos. Estos compuestos son derivados de varias rutas metabólicas se forman principalmente por oxidación de glucosa. Las vías biosintéticas

subyacentes son el metabolismo aeróbico, el carbono heterotrófico, la fermentación, el catabolismo de aminoácidos (alcoholes, aldehídos alcoholes), la biosíntesis terpenoide (isopropeno, monoterpenos y sesquiterpenos), la degradación de ácidos grasos (lactonas, alcanos) y la reducción de azufre (Morath *et al.*, 2012; Lemfack *et al.*, 2013, Schmidt *et al.*, 2015)

Los COVs pueden viajar a largas distancias por los poros del suelo mediando la comunicación entre diferentes microorganismos como bacterias y hongos que están presentes en la rizosfera y en ambientes aéreos con plantas, insectos y otras formas de vida (Effmert *et al.*,2012).

Entre los efectos observados en plantas se encuentran cambios fisiológicos negativos que pueden ser reducción o inhibición de la germinación, retraso del crecimiento, etiolación, clorosis y senescencia o cambios positivos como el aumento del crecimiento, biomasa y aumento de la concentración de clorofila, estos cambios pueden estar relacionados con la hormona (ET) etileno que controla muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Hung *et al.*,2015, Zipfel 2013). A los COVs también se les atribuye la activación de genes relacionados con la defensa en plantas, induciendo la resistencia sistémica (Naznin *et al.*,2014; Lee *et al.*,2019, Schmidt *et al.*, 2015).

En el estudio de COVs se emplean diversas técnicas para su extracción y posterior análisis. Para el aislamiento de los COVs fúngicos se encuentran técnicas como: extracción con sorbente de barra agitada (Sorbitive Bar Solvent Extraction, SBSE por sus siglas en inglés) (Guo *et al.*,2019) y principalmente el uso de técnicas de muestreo del espacio de cabeza (Headspace. HS por sus siglas en inglés) estático, y dinámico, extracción líquido-líquido y microextracción de fase sólida (SPME) (Sinuco *et al.*,2017; Morath *et al.*,2012).

Vale la pena resaltar que los métodos de extracción del headspace de *Trichoderma viride*, pueden representar una manera más cercana al ambiente al cual se encuentran expuestos los hongos fitopatógenos evaluados. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los medios de cultivo producen COVs, que se pueden confundir con aquellos producidos por el hongo. Por esta razón el uso de blancos es requerido en este tipo de estudios (Sinuco *et al.*,2020).

Para la identificación de los COVs, se emplea principalmente, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Hung *et al.*,2015), mediante el uso de criterios cromatográficos (índices de retención) y espectral (espectros de masas) comparados contra sustancias de referencia (Stashenko & Martínez 2010).

## 1.5 Compuestos orgánicos volátiles del género *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas y utilizadas durante décadas como biofertilizantes y agentes de control biológico en la agricultura (Gupta *et al.*, 2014). Dentro de los mecanismos de acción se encuentran el ejercido por COVs de esta especie ya que estos sirven como antibióticos contra patógenos de las plantas como lo muestra el estudio de Chen y colaboradores (2016) donde evaluaron la actividad inhibitoria de COVs producidos por *Trichoderma gamsii* contra diferentes fitopatógenos dentro de ellos *Fusarium flocciferum*, alcanzando 46% de inhibición del crecimiento radial. Dentro de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM por sus siglas en español) encontraron disulfuro de dimetilo, dibenzofurano, metanotiol y cetonas, los cuales pueden servir como inhibidores químicos, de hongos patógenos. De otra parte, se ha evaluado la actividad biológica debida únicamente a COVs liberados por el hongo *T. viride* frente a hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B y se comparan 3 métodos de extracción de COVs liberados por el hongo *T. viride* (Sinuco, *et al.*, 2017).

Otro mecanismo de acción de los hongos del género *Trichoderma* es su capacidad de promover crecimiento a las plantas mediante la emisión de COVs que demostraron influir en el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* las cuales presentaron mayor biomasa y fueron más vigorosas que plantas que no fueron expuestas a los VOCs. El análisis del perfil de compuestos volátiles de *Trichoderma viride* presentó los siguientes compuestos: alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y el 3-metilbutanal, los cuales fueron los posibles responsables de esta actividad (Hung *et al.*, 2013). Mediante Extracción Líquido-Líquido (ELL), los autores identificaron 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoina), que han sido asociados con la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* por COVs de *T. viride* (Hung, *et al.*, 2013, Ryu *et al.*, 2003).

Además de los atributos antimicrobianos de los COVs de *Trichoderma*, también tienen la capacidad de proteger a las plantas frente a los patógenos mediante la inducción de resistencia sistémica a partir del compuesto volátil 6-n-pentil-6H-piran-2-ona (6PP), el cual es producido por *Trichoderma harzianum* y es capaz de inducir mecanismos de defensa contra *Botrytis cinerea* en

plantas de tomate presuntamente mediante este mecanismo (Vinale 2009, Stoppacher *et al.*,2010). A esta lactona insaturada, identificada como componente mayoritario de *T. viride* se le atribuye actividad nematocida (Yang *et al.*, 2012), la bioactividad presentada por *T. harzianum* y *T. koningii*, así como efectos en el crecimiento de tomate (Vinale *et al.*, 2008).

Para el control de insectos recientemente se informó que 1-octen-3-ol y 6-PP, ambos compuestos producidos por *T. atroviride*, redujeron el ataque del gusano ejército de otoño *Spodoptera frugiperda* en las hojas de maíz (Contreras-Cornejo *et al.*,2020). En otro reporte se informó que *T. atroviride* asociado con raíces de maíz e infestado con *Spodoptera.frugiperda* en las hojas, se le atribuye probablemente que liberó algunos COV vegetales o fúngicos que atrajeron avispa hembras de *Campoletis sonorensis*, el enemigo natural de *S. frugiperda*, encontrando un papel clave para el metabolito fúngico 6-PP atrayendo a las avispas *C.sonorensis* y aumentando así el número de larvas parasitadas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2018)

En la (Tabla 1) se presenta una recopilación de los principales COVs identificados en diferentes especies de *Trichoderma* spp.

**Tabla 1.** COVs de diferentes especies de *Trichoderma* spp.

Especie	COV Identificados	Método de extracción
<b><i>Trichoderma atroviride</i> Stoppacher <i>et al.</i>,2010</b>	Alcohol feniletílico, $\alpha$ -felandreno, $\gamma$ -Terpineno, $\alpha$ -Terpineno, 2-Heptanona, 2-Undecanona, $\beta$ -Felandreno, $\alpha$ -Terpinoleno, 3-Octanol, 2-Nonanone, 1-Octen-3-ol, 2-Pentilfurano, 2-n-heptilfurano, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, $\alpha$ -bergamoteno, $\alpha$ -zingibereno, 3-octanona, $\beta$ -bisaboleno, $\alpha$ -curcumeno, 2-p-menten-7-ol, $\alpha$ -farneseno, $\beta$ -farneseno, nerolidol, $\gamma$ -curcumeno, $\beta$ - sesquifelandreno	Microextracción en fase solida (SPME)

<b><i>Trichoderma aureoviride</i> Bruce et al.,2000</b>	Acetaldehído, acetona, alcohol bencílico, cloroformo, isobutano, 2-metil-1-propanol, 2-etil-4-metil-1-pentanol, heptanona, nonano, heptano, decano, 2,4-dimetilheptano, 3-metil-2-hexanol, 7-octen-4-ol, 5-metil-5-hexen-3-ol	Malla Haysep Q 800–1000 y Tenax
<b><i>Trichoderma atroviride</i> Lee et al.,2016</b>	Etanol, Propan-2-one, 2-metilpropanal, propan-2-ol, butanol, butan-2-one, propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, acetato de etilo, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, pentanal, heptadecano, dodecanoato de propilo, aromadendreno	Headspace estático
<b><i>Trichoderma asperellum</i> Lee et al.,2016</b>	Etanol, propan-2-one, 2-metilpropanal, propan-2-ol, acetato de metilo, butan-2,3-dione, butanol, butan-2-one, ácido acético, 2-metil-1-propanol, acetato de etilo, 3-metilbutanal, 2- metilbutanal, pentanol, 3-hidroxibutan-2-one, 3-metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, ácido 2-metilpropanóico, pentan-1-ol, piridina, ácido butanóico, 2-etilhexanal.	Headspace estático
<b><i>Trichoderma viride</i> Hung et al.,2013</b>	Etanol, acetona, 2-metilpropanal, butanal, alcohol isobutílico, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, 1-butanol, 2-pentanona, pentanal, acetoína, 2-metil-1-butanol,	Método de purga y trampa

	alcohol isopentílico, toluene, hexanal, octadieno, 2-heptanona, heptanal, 2-etilhexanal, 6-metil-5-hepten-2-one, 1-deceno, 2-pentilfurano, 2-octanona, octanal, limoneno	
<b><i>Trichoderma harzianum</i> Lee et al.,2016</b>	Propan-2-ona, 2-Metilpropanal, 2,3-Butanediona, 2-Butanona, Ácido acético, acetato de etilo 3-Metilbutanal, 3-penten-2-ol, 3-Metilbutan-1-ol, hepta-1,3,6-triene, pentan-1-ol, Piridina, ácido butanóico, 2-heptilfurano, acetato de butilo, 2-(Metoximetil)furano, octan-3-ona, Octanal, Limoneno, 2-fenilacetaldehyde, Undecane, Nonanal.	Headspace estático
<b><i>Trichoderma koningiopsis</i> Chen et al.,2016</b>	$\beta$ - felandreno, trans-1-butil-2-metilciclopropano, 2-dodeceno, cis-1-Butilo-2- metilciclopropano, 2-tridecenal, ciclohexeno, ciclopropano, fenantreno, antraceno, ciclocta-2,4-dien-1-ol	Microextracción en fase solida (SPME)
<b><i>Trichoderma viride</i> Sinuco et al., 2017</b>	2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 3-hidroxi-2-butanona(acetoina), 1-Hexanol, Benzaldehído, , Alcohol 2-feniletílico, 6-pentil-(2H)-piran-2-ona	Extracción liquido-liquido (ELL)

## Bibliografía

- Agrawal, A. A. (2005). Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 97-105.
- Agrios GN (2005) Plant pathology. Academic press.
- Agronet. (2017). Producción y rendimiento de tomate 2017. [https://www.agronet.gov.co/Documents/9-TOMATE\\_2017.pdf](https://www.agronet.gov.co/Documents/9-TOMATE_2017.pdf)  
<http://www.agronet.gov.co/Documents/TOMATE2016.pdf>
- Ajilogba, C. F., & Babalola, O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol science*, 18(3), 117-127
- Amini, J., & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of plant protection research*, 50(2), 172-178.
- Aragón, S., & Beltran, C. (2018). Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests Contenido. *Control Biológico de Fitopatógenos, Insectos y Ácaros*, October 2018, 854–873.
- Aregbesola, O. Z., Legg, J. P., Sigsgaard, L., Lund, O. S., & Rapisarda, C. (2019). Potential impact of climate change on whiteflies and implications for the spread of vectored viruses. *Journal of Pest Science*, 92(2), 381-392.
- Bernal, L., Pesca, L., Rodríguez, D., Cantor, F., & Cure, J. (2008). Plan de muestreo directo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)(Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos comerciales de tomate. *Agronomía colombiana*, 26(2), 266-276.
- Betancur Pérez, J. F. (2012). Identificación y caracterización molecular de virus transmitidos por mosca blanca *Bemisia tabaci* que infectan tomate en la región andina de Colombia (para optar título de Doctoral, Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira).
- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate: Mundi-Prensa Libros.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular plant-microbe Interactions*, 22(5), 487-497.

- Bruce, A., Wheatley, R. E., Humphris, S. N., Hackett, C. A., & Florence, M. E. (2000). Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung*, 54(5), 481-486.
- Chen, J.-L., Sun, S.-Z., Miao, C.-P., Wu, K., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., Zhao, L.-X. (2016). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(4), 315-324.
- Carmona, S. L. (2018). Sandra Lorena Carmona Gutiérrez. Universidad Nacional de Colombia.
- Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., Simbaqueba, J., & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean Region of Colombia. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010070>
- Cordovez, V., Mommer, L., Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Pierik, R., Mumm, R., Carrion, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Plant Phenotypic and Transcriptional Changes Induced by Volatiles from the Fungal Root Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01262>
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food microbiology*, 82, 70-74.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J (2018) The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. *Appl Soil Ecol* 124:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.004>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2020). Interactions of *Trichoderma* with plants, insects, and plant pathogen microorganisms: chemical and molecular bases. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 263-290.
- Darshanee, H. L., Ren, H., Ahmed, N., Zhang, Z. F., Liu, Y. H., & Liu, T. X. (2017). Volatile-mediated attraction of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to tomato and eggplant. *Frontiers in plant science*, 8, 1285.

- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 840–859. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0306-z>
- De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., & Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-25.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., & Pieterse, C. M. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 923-937
- Dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., & Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 29(8), 1189-1193.
- Ebrahimifar, J., Jamshidnia, A., & Allahyari, H. (2017). Functional response of *Eretmocerus delhiensis* (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) by parasitism and host feeding. *Journal of Insect Science*, 17(2), 56.
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of chemical ecology*, 38(6), 665-703.
- FAO (2013). El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>.
- FAO (2018). FAOSTAT *Crop statistics*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO (2019). Manejo integrado de enfermedades-FAO. [www.fao.org/3/a1374s/a1374s05.pdf](http://www.fao.org/3/a1374s/a1374s05.pdf).
- Fargues, J., Vidal, C., Smits, N., Rougier, M., Boulard, T., Mermier, M., ... & Lagier, J. (2003). Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological Control*, 28(3), 320-331.
- Gómez, M. (2019). Evaluación de sustancias bioactivas como alternativa para el manejo de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/71749/1/1069723022.2019.pdf>
- González, I., Yailén, A., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7

- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annual review of phytopathology*, 55, 23-39.
- Guo, Y., Ghirardo, A., Weber, B., Schnitzler, J. P., Benz, J. P., & Rosenkranz, M. (2019). *Trichoderma* Species Differ in Their Volatile Profiles and in Antagonism Toward *Ectomycorrhiza Laccaria bicolor*. *Frontiers in microbiology*, 10, 891.
- Gupta, V. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (Eds.). (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Newnes
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43.
- Hassanpour, M., Bagheri, M., Golizadeh, A., & Farrokhi, S. (2016). Functional response of *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) to *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae): effect of different host plants. *Biocontrol Science and Technology*, 26(11), 1489-1503.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal ecology*, 6(1), 19-26.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(8), 3395-3405.
- Inbar, M., & Gerling, D. (2008). Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 431-448.
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological control*, 116, 36-45.
- Jaramillo, J., Rodriguez, V., Gil, L., Garcia, M., Climaco, J., Quevedo, D., Sanchez, G., Aguilar, P., Pinzon, L., Zapata, M., Restrepo, J., & Guzman, M. (2013). Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas. In Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-120-2>
- Kant, P.; Reinprecht, Y.; Martin, C.J.; Islam, R.; Pauls, K.P. (2011). Integration of biotechnologies: disease resistance pathology *Fusarium*. In: Moo-Young M. (ed.). *Comprehensive Biotechnology*, second edition, Elsevier, Amsterdam. p.729-743.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology*, 53(1), 299-328.

- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 7.
- Lee, S., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. (2019). Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. *Fungal ecology*, 37, 1-9.
- Leonetti, P., Zonno, M. C., Molinari, S., & Altomare, C. (2017). Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant cell reports*, 36(4), 621-631.
- Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., & Piechulla, B. (2013). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic acids research*, 42(D1), D744-D748.
- Macías-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P., & Contreras-Cornejo, H. A. (2018). *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy137>
- Mahecha, L. M. H., & del Rosario Manzano, M. (2016). Efecto del viento en la dispersión a corta distancia del parasitoide *Amitus fuscipennis* MacGown y *Nebeker* (Hymenoptera: Platygasteridae) en cultivos de frijol y habichuela. *Acta Agronómica*, 65(1), 80-86.
- Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerkhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., & De Coninck, B. (2012). Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in plant science*, 3, 108.
- Mayer, R. T., Inbar, M., McKenzie, C. L., Shatters, R., Borowicz, V., Albrecht, U. & Doostdar, H. (2002). Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 51(4), 151-169.
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 62-85.

- MC Govern, R. J., & MC Sorley, R. (2012). Management of bacterial and fungal plant pathogens by soil solarization. *Soil Solarization: Theory and Practice*. APS Press, Minneapolis, MN, 53-62.
- MC Govern, R.J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 73:78-92.
- McKee, G. J., & Zalom, F. G. (2009). A model of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) population development and management on Camarosa variety strawberry plants. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(3), 117-122.
- McKenzie, C. L., Shatters Jr, R. G., Doostdar, H., Lee, S. D., Inbar, M., & Mayer, R. T. (2002). Effect of geminivirus infection and *Bemisia* infestation on accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 49(4), 203-214.
- Moisan, K., Cordovez, V., van de Zande, E. M., Raaijmakers, J. M., Dicke, M., & Lucas-Barbosa, D. (2019). Volatiles of pathogenic and non-pathogenic soil-borne fungi affect plant development and resistance to insects. *Oecologia*, 190(3), 589–604. <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04433-w>
- Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A. O., ... & Ulhoa, C. J. (2010). New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current microbiology*, 61(4), 298-305.
- Moreno, I., Belando, A., Grávalos, C., & Bielza, P. (2018). Baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) to cyantraniliprole. *Pest management science*, 74(7), 1552-1557.
- Moreno-Velandia, C. A., Izquierdo-García, L. F., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2019). Soil sterilization, pathogen and antagonist concentration affect biological control of *Fusarium* wilt of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. *Plant and Soil*, 435(1-2), 39-55.
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83.
- Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., & Hossain, K. (2014). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak. J. Bot*, 46(4), 1489-1493.

- Nasruddin, A., & Mound, L. A. (2016). First record of *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) severely damaging field grown potato crops in South Sulawesi, Indonesia. *Journal of plant protection research*, 56(2), 199-202.
- Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological control*, 67(2), 149-156.
- Naznin, H. A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., & Hyakumachi, M. (2014). Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 9(1), e86882.
- Pagans, E., Font, X., & Sánchez, A. (2006). Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of hazardous materials*, 131(1-3), 179-186.
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Systematic Botany Monographs*, 84.
- Pineda, A., Zheng, S.-J., Van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, 15, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.007>
- Pym, A., Singh, K. S., Nordgren, Å., Davies, T. E., Zimmer, C. T., Elias, J., ... & Bass, C. (2019). Host plant adaptation in the polyphagous whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, is associated with transcriptional plasticity and altered sensitivity to insecticides. *BMC genomics*, 20(1), 1-19.
- Ramyabharathi, S. A., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *J Today's Biol Sci Res Rev*, 1, 50-60.
- Rincon, D. F., Vasquez, D. F., Rivera-Trujillo, H. F., Beltrán, C., & Borrero-Echeverry, F. (2019). Economic injury levels for the potato yellow vein disease and its vector, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), affecting potato crops in the Andes. *Crop Protection*, 119(January), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.002>
- Roberto N. Silva, Valdirene Neves Monteiro, Andrei Stecca Steindorf, Eriston Viera Gomes, Eliane Ferreira Noronha, Cirano J. Ulhoa, (2019) *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security, *Fungal Biology*.

- Ryu, C. Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Wei, H., Pare, P.W., & Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(8), 4927-4932.
- Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, 9(11), 2329-2335.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48:21–43
- Simsek, D., Pinar, H., & Mutlu, N. (2018). Development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (foI) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (forI) resistant tomato lines with the aid of marker assisted selection. *Current Trends in Natural Sciences Vol*, 7(13), 281-285.
- Singh, B. N., Singh, A., Singh, B. R., & Singh, H. B. (2014). *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. *Journal of applied microbiology*, 116(3), 654-666.
- Sinuco, D. C., Pérez, A. C., & Moreno-Sarmiento, N. (2017). Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 63-70.
- Sinuco León, D., Coconubo Guio, L.C., & Castellanos, L. (2020). Fungicidal activity of volatile organic compounds from *Paenibacillus* bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 20-25.
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The Species Concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27(2), 64–67. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1940.tb14217.x>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2, 29–47.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Toro, V. (2017). Evaluación de método de muestreo y dinámica poblacional de mosca blanca.(Tesis de grado.Ingeniero Agrónomo). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador, Chimborazo. p. 87.
- Vásquez, R. L., & Castaño, Z. J. (2017). manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC Snyder & HN Hansen]: UNA REVISIÓN. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.

- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 48(6), 705-711.
- Vinodkumar, S., Indumathi, T., & Nakkeeran, S. (2017). *Trichoderma asperellum* (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. *Biological Control*, 113, 58-64.
- Wink, M. (2018). Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction?. *Frontiers in physiology*, 9, 364.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei L., Xia., Z., Shao, L., Zhnag, K., & Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15 (4), 647–650.
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., & Jacques, P. (2020). Limiting factors of mycopesticide development. *Biological Control*, 104220.
- Zavala, J. A. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos.
- Zipfel, C. (2013). Combined roles of ethylene and endogenous peptides in regulating plant immunity and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5748-5749.

# Capítulo 1: Compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sobre el manejo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen y la promoción de crecimiento en plantas de tomate

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por diferentes cepas del hongo biocontrolador *Trichoderma* sobre la interacción planta-patógeno como estrategia de control biológico contra *Fo/59* en tomate y la promoción de crecimiento, como un atributo adicional para la bioprospección de estas moléculas con potencial bioactivo. En condiciones *in vitro* se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) de 15 cepas de *Trichoderma* spp. sobre la inhibición de crecimiento radial del patógeno mediante la técnica de doble placa, donde se enfrentan dos cajas de Petri, una con el patógeno *Fo/59* y la otra con el hongo biocontrolador previamente desarrollado en medio PDA, durante 10 días a 25°C y se registró el porcentaje de inhibición del desarrollo radial del patógeno. Las cepas que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron: Th004, M44, Th035, Th019, Th007, 3T y M45 con 46.1%, 45.8%, 40.5%, 39,8%, 39.4%, 39% y 37.1% respectivamente. Las siete cepas fueron seleccionadas para su evaluación bajo condiciones *In planta* donde, en un ambiente confinado se expusieron las raíces de plántulas de tomate de ocho semanas de desarrollo inoculadas con el patógeno a los COVs emitidos por cada cepa del hongo benéfico, durante 21 días donde se registró la incidencia y severidad de la enfermedad. Este tratamiento redujo entre un 10% y 30% la incidencia de la enfermedad. Mientras que la cepa Th035 presentó una reducción de la severidad del 35%. A pesar de los reportes de promoción de crecimiento atribuidos a *Trichoderma* en tomate, en estos experimentos no se evidenció un efecto significativo en la promoción de crecimiento mediada por COVs del microorganismo.

**Palabras clave:** Inhibición de crecimiento radial, bioprospección, índice de severidad de la enfermedad.

## 1.1 Introducción

El hongo benéfico del género *Trichoderma* es uno de los más estudiados y empleados en el manejo de problemas fitosanitarios en tomate, dada su capacidad de proteger a las plantas frente a patógenos del suelo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen mediante la inducción de resistencia sistémica y su ampliamente estudiada estrategia de promoción de crecimiento vegetal que le proporciona una mayor disponibilidad de nutrientes para su desarrollo (Suárez *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos mecanismos antagónicos de *Trichoderma* se encuentran poco estudiados. Es el caso del metabolismo secundario de *Trichoderma* spp., el cual genera señales químicas de tipo volátil con actividad biocontroladora frente a microorganismos fitopatógenos. La caracterización de esta comunicación química permitirá iniciar la bioprospección de estos compuestos para el desarrollo de bioproductos última generación para el manejo de problemas fitosanitarios en el cultivo de tomate.

Este sistema productivo, registró una producción de 182.256.458 ton a nivel mundial en el 2018 y es una de las hortalizas de mayor consumo en el mundo (FAO, 2018). Sin embargo, la marchitez vascular, causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* le ocasiona pérdidas de importancia económica superiores al 70% en casos muy severos de la enfermedad (Ramyaabharathi *et al.*, 2012). Este hongo se presenta principalmente como saprófito y patógeno especializado en forma especial (f. sp) de acuerdo a su planta hospedera (De Granada *et al.*, 2001). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es la forma especial que afecta este cultivo (Snyder 1940; Carmona *et al.*, 2020). En la colección de microorganismos de Agrosavia se encuentra la cepa *Fol59*, un aislamiento que fue identificado y caracterizado por primera vez en Colombia como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 obtenida de cultivos comerciales, que fue identificado a nivel molecular con la presencia de los genes SIX 1, SIX 2, SIX 3 y SIX 5. La patogenicidad fue probada en plantas de tomate susceptibles, alcanzando una incidencia del 100% y una severidad de 94% (Carmona 2019; Carmona *et al.*, 2020).

Este patógeno ingresa a la planta por los vasos del xilema, lo cual obstruye el ascenso del agua y nutrientes, y ocasiona síntomas como amarillamiento en las hojas, marchitamiento y por último ocasiona la muerte. Para el control de este patógeno se usa tradicionalmente el control químico.

Sin embargo, su uso no apropiado genera que cada vez se incremente la cantidad de producto aplicado y a su vez una posible resistencia de estas cepas patogénicas al ingrediente activo, disminuyendo la efectividad de estos productos y generando más impacto al medio ambiente y a la salud alimentaria (Zhao *et al.*,2019). Por lo descrito anteriormente, se necesita encontrar una estrategia que sea amigable con el medio ambiente para el control de esta enfermedad ya que afecta la producción de este cultivo (Ramyabharathi *et al.*,2012).

Por lo tanto, una de las alternativas para el manejo de esta enfermedad es el uso de agentes de control biológico, ya que además de ser eficaz, es amigable con el medio ambiente (Cotes ,2018). Dentro de las estrategias de control biológico más conocidas se encuentra el uso de microorganismos bacterianos como *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* y hongos como *Gliocladium virens*, *Trichoderma* spp., (Moreno-Velandia *et al.*,2019).

Los hongos del género *Trichoderma* son uno de los más estudiados gracias a sus mecanismos de acción directos como el micoparasitismo, la competencia por nutrientes o por espacio, la antibiosis y mecanismos de acción indirectos por medio de la promoción de crecimiento y la inducción de resistencia sistémica (Lee *et al.*,2016; Roberto *et al.*,2019; Zohair *et al.*,2018). Este género ha sido estudiado como agentes de control biológico para el control de marchitez vascular en tomate (Hohmann *et al.*,2011).

Además, *Trichoderma* spp. produce una gran diversidad de metabolitos volátiles conocidos como Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), los cuales son moléculas de bajo peso molecular, alta presión de vapor y bajo punto de ebullición, producto final de varias vías metabólicas, estos compuestos se encuentran clasificados dentro de varias clases como sesquiterpenos, alcoholes, lactonas, cetonas, ésteres y compuestos C8 (Contarino *et al.*,2019; Korpi *et al.*,2009).

Uno de los ejemplos más representativos es el compuesto 6-pentil- 2H -pyran-2-ona (6PP) emitido por diferentes especies de *Trichoderma*, el cual influye negativamente en el crecimiento de fitopatógenos como *Ceratocystis piceae*, *Armillaria*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Stoppacher *et al.*,2010). Además, al ser aplicado directamente en el medio de crecimiento de la planta o en forma de aspersion sobre las hojas promueve el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* mediante la estimulación y formación de raíces laterales. (Lee *et al.*,2016). En otro estudio se demostró que los COVs de *Trichoderma* spp. tienen efecto de promoción de crecimiento en plantas como *Arabidopsis thaliana* donde se analizaron los

COVs de *Trichoderma viride* y se encontraron los siguientes compuestos: alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y el 3-metilbutanal posibles responsables de esta actividad (Hung *et al.*, 2013).

Los COVs, también han sido reportados como inductores de resistencia en la planta, mediante la estimulación de la resistencia basal o barreras preexistentes, que consiste en el reconocimiento de las moléculas MAMPs ó PAMPs (Microbial or Pathogen Associated Molecular Patterns), que son reconocidas por las PRRs (Pattern Recognition Receptors) que se encuentran en las plantas (Bolton 2009, Nawrocka 2013). Así como también inducen la resistencia sistémica a través de las hormonas vegetales, dentro de esta última, se encuentran la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR), las cuales son complejos sistemas bioquímicos antagónicos de señalización que son dependientes de fitohormonas. En primer lugar, se encuentra el ácido salicílico (SA), esta fitohormona rige la SAR y está asociada a la respuesta patógenos biotrófos y hemibiotrófos. En cambio, la acumulación de etileno (ET), ácido jasmónico (JA) rigen la ISR y se asocian a la defensa contra microorganismos necrotrofos y herbívoros (Mathys *et al.*,2012; Thomashow *et al.*,2016, Lee *et al.*,2016). Un ejemplo de inducción de resistencia por medio de los COVs, es el compuesto volátil 6-n-pentil-6H-piran-2-ona, el cual es producido por *Trichoderma harzianum* y es capaz de inducir mecanismos de defensa contra *Botrytis cinerea* en plantas de tomate presuntivamente mediante ISR (Vinale *et al.*,2008a).

En este capítulo se presenta el efecto de los COVs emitidos por diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre la inhibición del crecimiento radial del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol59) en medio de cultivo, bajo condiciones *In vitro*, a partir de este ensayo seleccionar las cepas con mayor inhibición para ser evaluadas sobre la promoción de crecimiento y su manejo de la incidencia y severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal de la marchitez vascular en tomate.

## 1.2 Materiales y métodos

### 1.2.1 Material fúngico

En la Tabla 1.1, se presentan los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en este trabajo, 10 de los aislamientos proceden del Banco de Germoplasma con Interés en Control Biológico de la Nación, en custodia de AGROSAVIA y los cuatro restantes fueron aislamientos endófitos obtenidos de plantas de tomate en cultivos sin síntomas asociados a la marchitez vascular (Carmona 2019), y se usó un producto comercial Tricho D® a base de *Trichoderma harzianum* como control. La cepa patogénica *Fol59*, aislada y caracterizada por Carmona (2019). Los hongos fueron multiplicados en cajas de Petri de vidrio que contenían medio PDA (agar papa dextrosa) y se incubaron a  $25\pm 2$  °C durante 6 días en oscuridad.

Para la preparación del inóculo del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *Fol59*, se empleó la metodología estandarizada por Gomez (2019) donde se tomaron 7 cajas de Petri, con el hongo desarrollado durante 11 días a 25°C, se realizó la cosecha de las microconidias mediante un raspado del micelio con un rastrillo y agua destilada estéril, posteriormente se filtró con papel miracloth® y se ajustó la concentración del inóculo a  $1*10^6$  microconidias/ml mediante la cuantificación en cámara de Neubauer.

**Tabla 1.1.** Aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados *in vitro*

<b>Código Aislamiento</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>
Th035	<i>Trichoderma atroviride</i>	Suelo
Th034	<i>Trichoderma asperellum</i>	Suelo
Th032	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Sin especificar
Th019	<i>Trichoderma asperellum</i>	Sin especificar
Th013	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Planta de lulo
Th007	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Sin especificar
Th004	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Residuos de flora
Th003	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Suelo
Th084	<i>Trichoderma asperellum</i>	Sin especificar
Th051	<i>Hypocrea lixii</i>	Sin especificar
2R *	<i>Trichoderma asperellum</i>	Planta de tomate
3T *	<i>Trichoderma gamsii</i>	Planta de tomate
M44 *	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Planta de tomate
M45 *	<i>Trichoderma ghanense</i>	Planta de tomate
<b>Tricho D</b>	<b><i>Trichoderma harzianum</i></b>	<b>Producto comercial</b>

\*Cepas aisladas por Carmona 2019

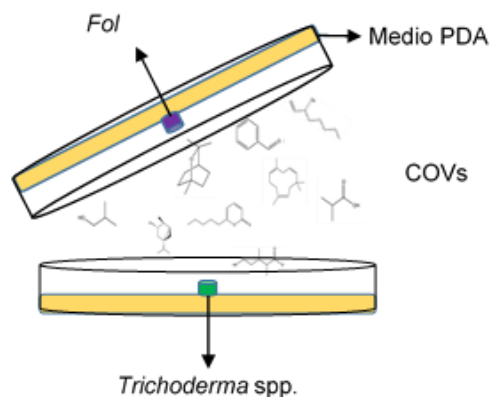
## 1.2.2 Material vegetal

Las plantas de tomate se obtuvieron a partir de semillas seleccionadas de *Solanum lycopersicum*, Mill. (var. Santa Cruz Kada). Las semillas fueron esterilizadas superficialmente antes de su uso. El proceso consistió en lavar el material con agua corriente y hacer un lavado con tween 80 al 0,1% estéril (Merck Millipore) dentro de un tubo falcón agitando vigorosamente para retirar la

mayor cantidad de fungicida y contaminantes superficiales. Luego, se realizaron tres enjuagues con agua corriente para retirar los residuos de jabón filtrando con muselina. En la cámara de flujo laminar previamente esterilizada, se realizaron los siguientes lavados con un volumen aproximado de 200 ml de líquido en cada lavado: 15 minutos en hipoclorito de sodio al 2% seguido de un minuto con etanol al 70% y tres lavados consecutivos con agua estéril. Posteriormente, se sembraron en bandejas de germinación de semillas de 50 alvéolos con turba estéril como sustrato. El material se mantuvo en condiciones controladas con una temperatura de 25°C y humedad del 60% en un cuarto de bioensayos del Laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA hasta la obtención de plántulas con el segundo par de hojas verdaderas (aproximadamente 4 semanas), según la escala de BBCH estadio principal 1, 102 (Agustí *et al.*, 1995).

### **1.2.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* mediadas por los COVs de *Trichoderma* contra *Fol59***

Para la evaluación antagónica *in vitro* de COVs de *Trichoderma* spp. (Tabla 1.1) contra *Fol59*, se adaptó la metodología descrita por Sinuco (2020). Inicialmente se ubicó un disco micelial de 7 mm de diámetro del patógeno de diez días en el centro de una placa de Petri que contenía medio PDA (Agar papa dextrosa), incubado durante dos días a 25°C. Posteriormente, en otra caja de Petri con medio PDA, se inoculó un disco de 7 mm con los diferentes antagonistas. Las placas se enfrentaron dejando en la parte superior a *Fol59*, se sellaron usando Parafilm™ y se incubaron a 25 ° C durante 10 días en la oscuridad (Figura 1.1). Se usó como control, *Fol59* contra una caja de Petri con medio PDA.



**Figura 1.1.** Esquema del sistema de evaluación de doble placa para evaluación de antagonismo de los COVs de *Trichoderma* spp. frente a *Fol59* (adaptada de Sinuco *et al.*, 2020)

Se empleó un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental fue cada uno de los enfrentamientos, el experimento contó con cinco réplicas por tratamiento y tres repeticiones en el tiempo, cada caja enfrentamiento de cajas de Petri se consideró como una unidad experimental. Las placas de Petri se monitorearon fotográficamente durante 10 días, las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ2 (Rueden *et al.*, 2017) y se calculó el tamaño de la colonia de *Fol59*. Teniendo estos datos, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) mediante la fórmula descrita por (Zohair *et al.*, 2018) (Ecuación 1.2).

**Ecuación 1.2**

$$\% \text{ PICR} = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

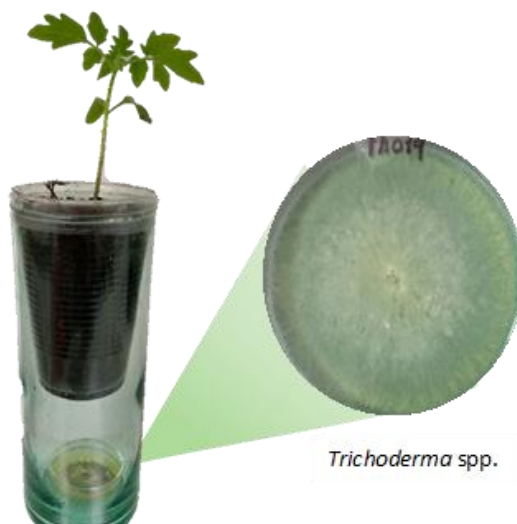
**Donde:**

**R1:** Diámetro del crecimiento del patógeno en control

**R2:** Diámetro del crecimiento del patógeno enfrentado con el antagonista

### 1.2.4 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sobre el desarrollo de la marchitez vascular *in planta*

Para las evaluaciones *in planta*, se seleccionaron las cepas que mostraron desde un 37 hasta un 46% de inhibición de crecimiento radial en el experimento en condiciones *in vitro*. Se adaptó la metodología propuesta por Tahir (2017), donde se realizó un lavado de las raíces de las plántulas de tomate con cuatro semanas, según la escala de BBCH estadio principal 1, 102 (Agustí *et al.*, 1995) de crecimiento aproximadamente (obtención del segundo par de hojas verdaderas) con agua corriente y posteriormente se realizó la infección por inmersión de raíz durante 15 minutos en la suspensión de  $1 \times 10^6$  microconidias/ml del *Fo159* de acuerdo con el protocolo estandarizado por Carmona (2019) (figura 1.3 a). Posteriormente, las plantas fueron trasplantadas en vasos de 12 onzas con una mezcla estéril de suelo y turba en una relación 3:1 (Aragón, 2016). La base de los contenedores se perforó para permitir que los compuestos volátiles permearan a las raíces de cada plántula (figura 1.2).



**Figura 1.2.** Exposición de raíces de plántulas de tomate a compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* spp.

Cada vaso se introdujo en un contenedor cilíndrico de vidrio, en cuya base interna se ubicó una caja de Petri de 5 cm de diámetro con la cepa de *Trichoderma* correspondiente, la boquilla del recipiente de vidrio se selló con Parafilm™ para evitar cualquier escape de volátiles de estas cepas (figura 1.2). Con el fin de facilitar la incubación de la enfermedad, el ensayo se dejó por 7 días en el cuarto de bioensayos del Laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA a una temperatura de 26°C y una humedad de 60%. Después de este periodo, el ensayo se ubicó en invernadero con una temperatura de 25±8 °C. Los tratamientos evaluados se presentan en la tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Tratamientos evaluados para promoción de crecimiento y manejo de la marchitez vascular en tomate mediada por COVs de *Trichoderma* spp.

N°	TRATAMIENTOS
1	M44
2	M44 + <i>Fol59</i>
3	Th004
4	Th004 + <i>Fol59</i>
5	M45
6	M45 + <i>Fol59</i>
7	Th019
8	Th019 + <i>Fol59</i>
9	Th035
10	Th035 + <i>Fol59</i>
11	Th007
12	Th007 + <i>Fol59</i>
13	3T
14	3T + <i>Fol59</i>
15	Testigo patógeno <i>Fol59</i>
16	Control

## Progreso de la enfermedad

Para llevar a cabo el seguimiento de la enfermedad se registró la incidencia de la enfermedad (número de plantas enfermas con respecto al total de plantas evaluadas) y el grado de afectación de las plantas se midió por medio de dos escalas de severidad, la primera descrita por Gómez (2019) y la segunda, descrita por Simbaqueba (2018). La primera escala implica una descripción cualitativa de los síntomas de la enfermedad y de acuerdo con esto se asigna un grado (Tabla 1.3), la toma de estos datos, se realizó día de por medio hasta el día 21. Complementario a esta metodología, se empleó el protocolo propuesto por Simbaqueba (2018) donde, al finalizar el ensayo en el día 21 después de inoculación (dpi) se realizó un corte del tallo por encima de los cotiledones y luego un corte longitudinal para observar el número de haces vasculares afectados por el patógeno, los cuales se caracterizan por presentar un color café, la escala se presenta en la (Tabla 1.4). Con estos datos de incidencia (porcentaje de plantas enfermas en relación al total del ensayo) y la primera escala de severidad (frecuencia de cada nivel de la enfermedad), se calculó por separado el índice de severidad con la propuesto por Chiang (2017) y descrito en la ecuación 1.3, luego, se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con la ecuación 1.4 propuesta por (Pedroza & Samaniego 2009) A las plantas control o sin inoculación alguna de *Fo159* se le midieron solamente parámetros de promoción de crecimiento.

**Tabla 1.3.** Escala descriptiva de marchitez vascular en plantas de tomate (Gómez 2019)

Síntoma	Grado
Sin síntomas/ Planta sana	0
Ligero amarillamiento en una o dos hojas	1
Amarillamiento en hojas basales y del tercio medio, con algunas hojas marchitas	2
Amarillamiento severo de hojas; 50% de las hojas marchitas	3
Síntomas generalizados, todas las hojas amarillas, retraso severo en el crecimiento	4
Planta muerta	5

**Tabla 1.4.** Escala destructiva de haces vasculares afectados (Simbaqueba 2018)

Síntoma	Grado
Sin síntomas/ Planta sana	0
Hipocótilo ligeramente hinchado o doblado	1
Uno o dos vasos marrones en hipocótilo	2
Más de dos vasos marrones, distorsión del crecimiento, tallo de flexión fuerte	3
Todos los vasos son marrones, plantas muertas, muy pequeñas y marchitas.	4

**Ecuación 1.3**

$$IS \% = \frac{\Sigma (\text{Frecuencia de cada nivel de enfermedad} * \text{nivel de enfermedad})}{(\# \text{ total de observaciones}) * (\text{Nivel máximo de la enfermedad})} * 100$$

**Ecuación 1.4**

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

**Donde:**

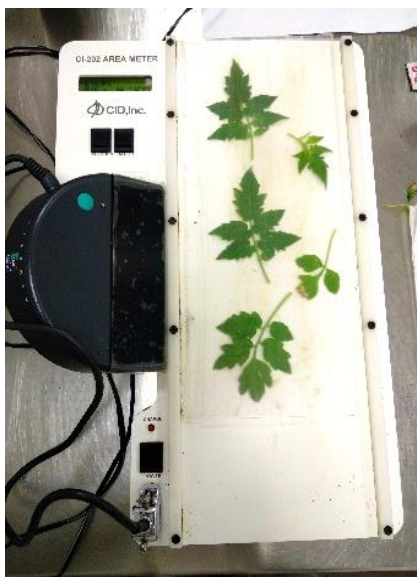
**Y:** Es el % de la enfermedad (severidad)

**t:** Tiempo en días transcurrido

Se empleó un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental fue cada uno de los enfrentamientos, el experimento contó con cinco replicas por tratamiento y tres repeticiones en el tiempo. Los datos de la primera escala de severidad (tabla 1.3) se registraron a los 9, 12, 15, 18, 21 días después de infección (ddi) y con ello se calculó el progreso de la enfermedad. Los datos obtenidos a partir de la segunda escala de severidad (tabla 1.4), se tomaron en un muestreo destructivo a los 21 días ddi; se compararon los resultados obtenidos con las dos escalas.

### 1.2.5 Promoción de crecimiento mediada por compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* en tomate

La promoción de crecimiento mediada por los COVs fue evaluada mediante el registro de las variables desde el inicio hasta 21 días después que finalizó el experimento, se registraron las variables de longitud de tallo, peso fresco y peso seco de la planta. El peso fresco se tomó el día 21 haciendo una remoción del suelo lavado de raíces y secándolas para luego pesarlas en una báscula. El peso seco del material previamente colectado y pesado se empacó en bolsas de papel para su posterior secado en un horno (Novatech) a 69°C por tres días. El área foliar se midió con un medidor láser de área foliar portátil CL-202 (CID- BioScience Inc), donde cada hoja se ubicó sobre el escáner como se muestra en la (Figura 1.3), y por medio de la detección ultrasensible del equipo se generó la información del área foliar en cm<sup>2</sup>



**Figura 1.3** Ubicación del material vegetal en el escáner para la medición del área foliar (Leaf area meter CL-202).

## 1.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se probaron los supuestos de normalidad mediante el estadístico de Shapiro-wilk (Shapiro & Francia, 1972), homogeneidad de varianza usando la prueba de Levene (Montgomery, 1991) e independencia de los errores con la prueba de Durbin Watson (Durbin, 1960). Para las variables % de inhibición e índice de severidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

En cuanto a las variables Crecimiento del tallo, área foliar, Peso fresco, peso seco y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), se analizaron mediante modelos lineales generalizados mixtos, donde el efecto fijo del modelo correspondió al tratamiento y el efecto aleatorio a las repeticiones y las plantas. Rienzo & Casanoves, 2012 describen el modelo mixto de la siguiente manera:

$$\gamma_{ij} = \mu + \tau_i + b_j + \varepsilon_{ij}; i = 1, \dots, T; j = 1, \dots, B$$

Donde  $\gamma_{ij}$  es la respuesta al  $i$ -ésimo tratamiento en el  $j$ -ésimo bloque,  $\mu$  la media general de rendimientos,  $\tau_i$  los efectos fijos de los tratamientos,  $b_j$  el cambio del nivel medio de  $\gamma_{ij}$  asociado al  $j$ -ésimo bloque y  $\varepsilon_{ij}$  el término del error asociado a la observación  $\gamma_{ij}$ .  $T$  y  $B$  son el número de niveles del factor de clasificación correspondiente al efecto fijo *Tratamiento* y al número de repeticiones respectivamente. Los  $b_j$  se consideran, a diferencia de un efecto fijo, como variables aleatorias idénticamente distribuidas  $N(0, \sigma_b^2)$  y cuyas realizaciones se interpretan como los efectos de los distintos grupos o estratos (repeticiones, en este ejemplo). Luego, en estos modelos. Los  $\varepsilon_{ij}$  también se interpretan como variables aleatorias idénticamente distribuidas  $N(0, \sigma_\varepsilon^2)$  y describen a los errores aleatorios asociados a cada observación. Se supone, además, que las variables aleatorias  $b_j$  y  $\varepsilon_{ij}$  son independientes.

Para algunas de las variables con problemas de homocedasticidad fueron (peso fresco, peso seco, área foliar y crecimiento del tallo), fue necesario incluir modelos de varianza

heterocedástica. De acuerdo con Rienzo & Casanoves, 2012, el modelo para las varianzas de los errores se puede especificar de la siguiente manera:

$$\text{var}(\varepsilon_i) = \sigma^2 g^2(\mu_i, \mathbf{z}_i, \boldsymbol{\delta})$$

donde  $g(\cdot)$  se conoce como la función de varianza. Esta función puede depender de la esperanza ( $\mu_i$ ) de (la variable de respuesta), de un conjunto de covariables ( $\mathbf{z}_i$ ) de un vector de parámetros ( $\boldsymbol{\delta}$ ).

La selección del modelo se realizó utilizando los criterios de información Akaike (AIC), Bayesiano (BIC), y el valor de máxima verosimilitud (logLik), estos criterios pueden ser interpretados como una medida de bondad de ajuste, el mejor modelo de varianza es aquel con menor valor en cada uno de los criterios (Hern & Su, 2019).

Para los datos de severidad obtenidos mediante las dos escalas, se implementó una prueba de correlación de Kendall, ya que los datos no son normales, son valores nominales o escalas.

Finalmente, la variable incidencia, se analizó por el método de modelos lineales generalizados mixtos con distribución binomial y función de enlace logit, dado a que la variable de respuesta es el número de plantas enfermas en cada tratamiento. Cada tratamiento tiene 10 plantas, por lo que el número de plantas enfermas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* puede variar entre 0 y 10, además la probabilidad de infección se mantiene constante durante todo el experimento, por lo cual la variable incidencia sigue una distribución binomial

Para todas las variables evaluadas se usó la prueba de comparación de medias LSD Fisher ( $p < 0,05$ ), con corrección de Bonferroni. Los datos se analizaron usando el software estadístico R, versión 3.6.0 (Team 2019), Infostat (InfoStat 2018) y el software SAS v 9.4 (SAS Institute Inc 2019).

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Pruebas de antagonismo *in vitro* mediadas por los COVs de *Trichoderma* contra *Fol59*

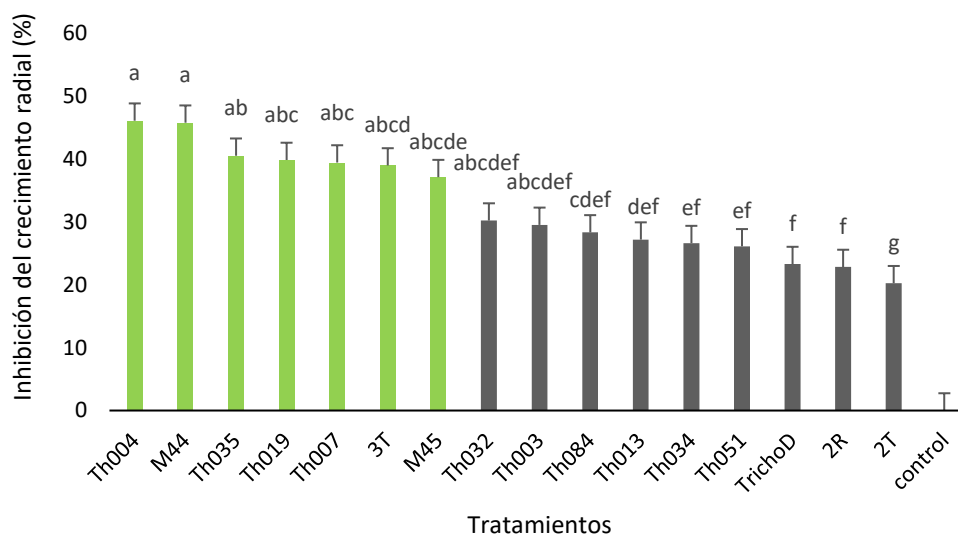
En la evaluación de la actividad antagonista mediada por los COVs emitidos por diferentes cepas de *Trichoderma* spp. frente al patógeno, se observó que después de diez días de interacción, todas las cepas de *Trichoderma* presentaron inhibición del crecimiento micelial del hongo patógeno *F. oxysporum*, mostrando diámetros de desarrollo inferiores que los observados para el control (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Actividad antagonista de compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las cepas de *Trichoderma* spp. contra el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol59*). Fotografía tomada el día 10 del experimento.

En la (Figura 1.5) se presentan los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del fitopatógeno *Fol59*, luego del contacto con COVs emitidos por las cepas de *Trichoderma* evaluadas. Los porcentajes de inhibición se encuentran en un rango entre 20% y 46% donde las

cepas que presentaron el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial del *Fol59* fueron Th004, M44 y Th035. Mientras que los aislamientos con menor inhibición fueron aquellos que crecieron en presencia de los COVs emitidos por 2T, 2R y el producto comercial Tricho D®.



**Figura 1.5.** Porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno *Fol59* por compuestos orgánicos volátiles producidos por *Trichoderma* spp. barras de error indican el error estándar, letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $P > 0,05$ )

Nuestros resultados coinciden con los hallados en otros trabajos en los que se evalúa la capacidad de los COVs liberados por cepas de *Trichoderma gamsii* para inhibir el crecimiento radial fitopatógenos dentro de ellos *Epicocum nigrum*, *Scytalidium lignícola*, *Phoma. herbarum* y *Fusarium flocciferum* patógenos asociados a enfermedades de raíz (Chen *et al.*, 2016a); la capacidad biocontroladora mediante COVs de *Trichoderma harzianum* frente al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerino* (Zhang *et al.*, 2014) y la actividad de *Trichoderma koningiopsis* contra *Fusarium flocciferum* (Chen *et al.*, 2016b).

### 1.3.2 Promoción de crecimiento mediada por compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* en tomate

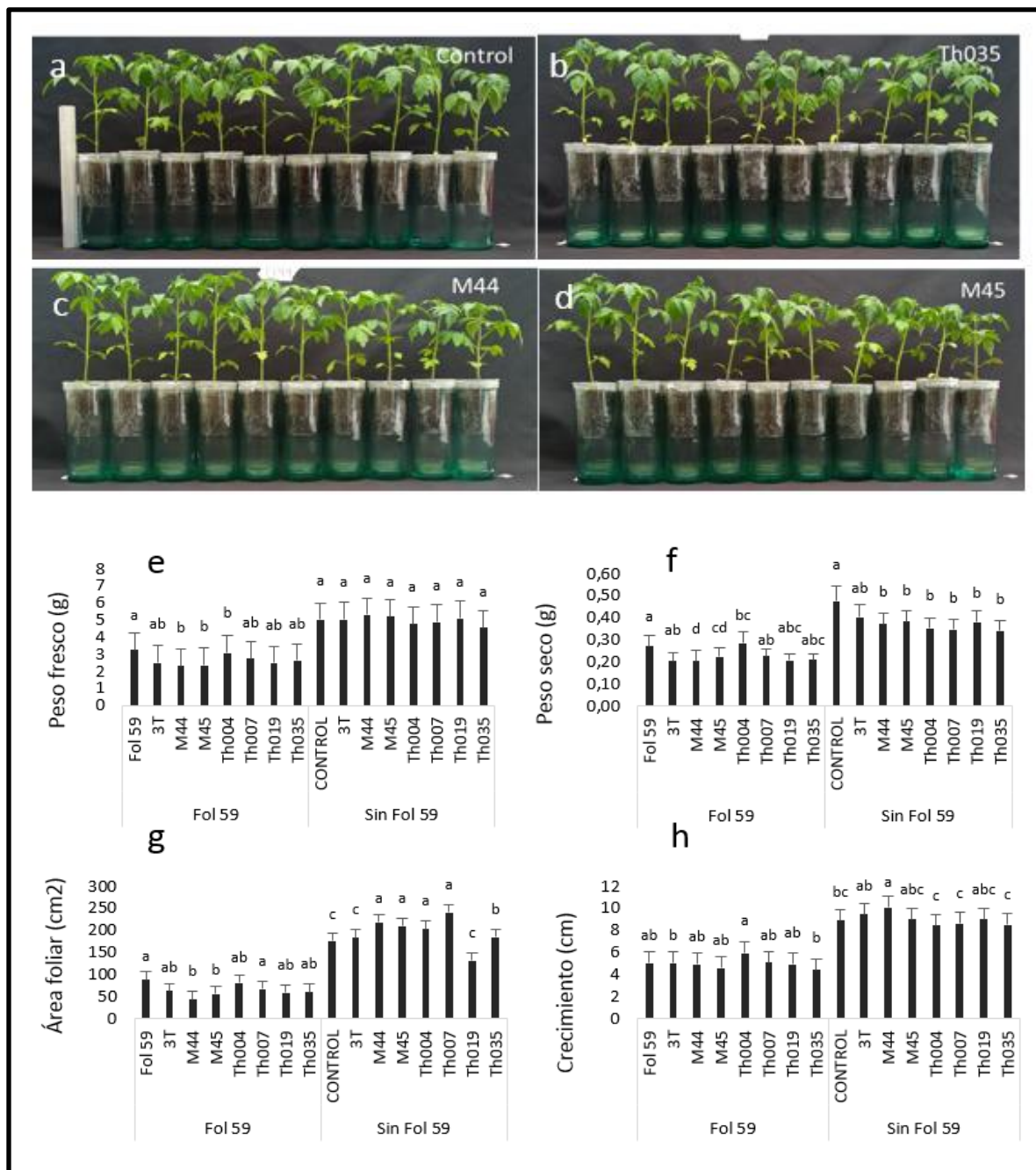
No se presentaron diferencias significativas en el desarrollo de biomasa de plantas tratadas con los VOCs de *Trichoderma* en comparación con plantas sin tratar. En la (Figura 1.6 a-d) se presentan los resultados obtenidos para las variables medidas, mostrando que el parámetro de peso fresco no fue afectado por los volátiles ( $P = 0,2290$ ) (Figura 1.6 e). En cambio, la variable de peso seco fue el control quien presentó diferencias significativas respecto a los demás tratamientos ( $P < 0,0001$ ) (Figura 1.6 f). En relación con el área foliar, el tratamiento control presentó el menor valor con  $123,8 \text{ cm}^2$ , mientras que las cepas M45, Th007, M44 y Th004 estimularon el crecimiento de la hoja ( $P < 0,0001$ ), registrando en promedio valores de  $244.25 \text{ cm}^2$  (figura 1.6 g). y finalmente con respecto al crecimiento del tallo, no se observó un efecto significativo respecto al tratamiento control ( $P = 0,0289$ ) (figura 1.6 h).

Estos resultados indican que los compuestos emitidos por las cepas evaluadas no se encuentran dentro del grupo de los potenciales promotores de crecimiento, y que por el contrario, los VOCs emitidos por las cepas M44, M45, Th035, Th007, Th019 y Th004 pueden probablemente inhibir el desarrollo de biomasa, como lo reporta Lee y colaboradores (2019), quienes concluyeron que compuestos como butanal, 1-butanol, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2-pentanona, 1-octeno, 3-octanona, 1-octanol, 6-amil- $\alpha$ -pirona,  $\beta$ -cariofileno, farnesene no tienen efectos sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* e incluso compuestos como 1-pentanol, 1-octen-3-one, 2-octenal, 1-octen-3-ol, nonanal,  $\beta$ -ocimeno, logran inhibir el crecimiento vegetal.

Para el grupo de plantas infectadas con *Fol59* (figura 1.6 e-h) se observó que los parámetros peso fresco ( $P = 0,0005$ ), peso seco ( $P < 0,0001$ ), área foliar ( $P = 0,0001$ ) y el crecimiento del tallo ( $P = 0,0125$ ), no presentaron diferencias significativas. Se observa que el desarrollo de la planta se ve inhibido por la presencia del patógeno y los COVs de *Trichoderma* no pueden contrarrestar este efecto, además que al día 21 ya muchas de estas plantas estaban muertas. Lo cual nos permite descartar un efecto de promoción de crecimiento relacionado con los compuestos orgánicos volátiles evaluados en esta interacción y bajo las condiciones descritas.

Sin embargo, futuras investigaciones en busca de este atributo de los VOCs, se podría plantear teniendo en cuenta otros factores que favorezcan la emisión de compuestos volátiles promisorios para la estimulación del desarrollo de biomasa en la planta, por ejemplo, las condiciones de desarrollo y el medio de cultivo.

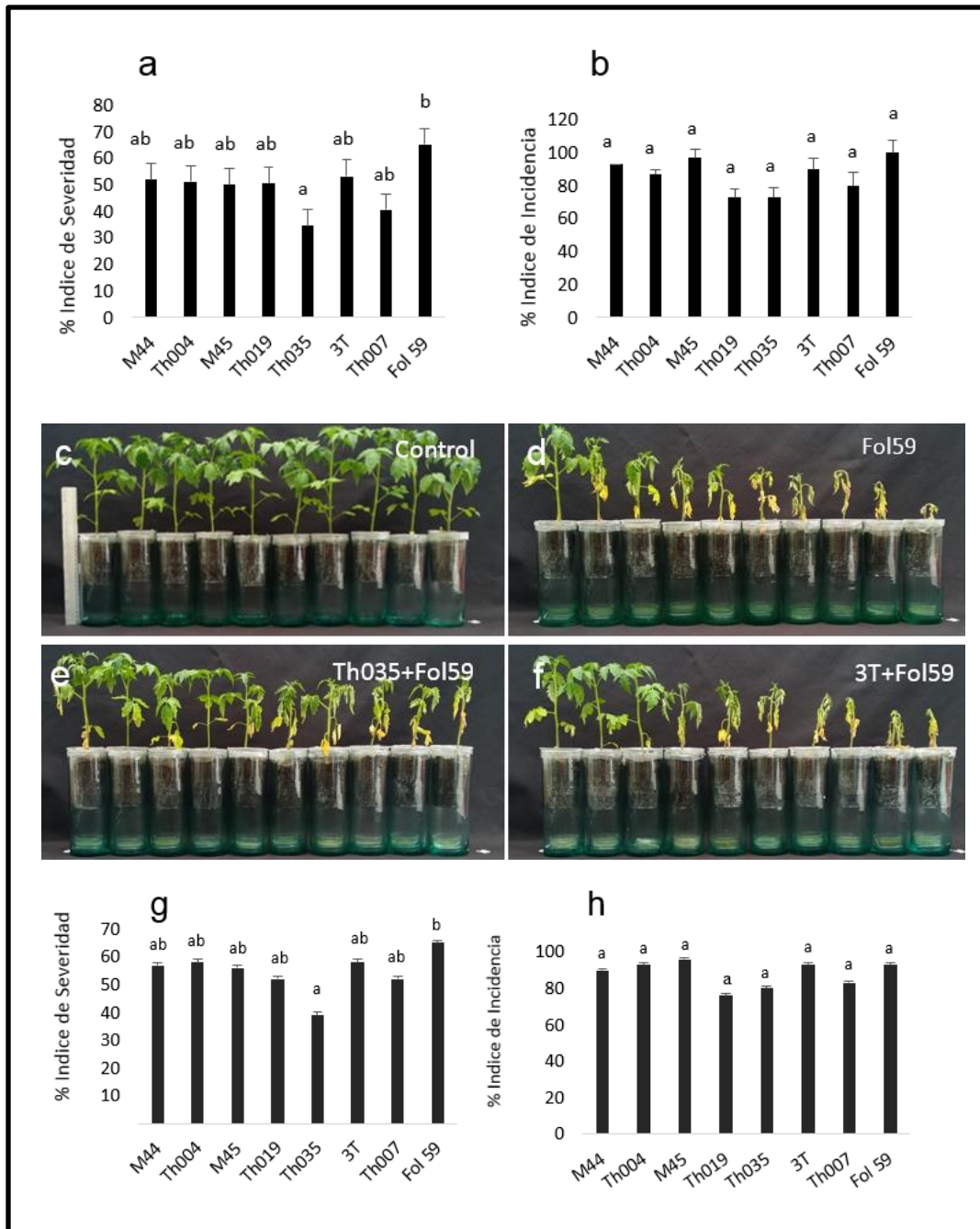
La producción de compuestos orgánicos volátiles de microorganismos puede variar según el medio de cultivo en el que se desarrolla, como lo demuestra un estudio realizado en el 2018 donde evaluaron la promoción de crecimiento de *Arabidopsis* mediada por los COVs producidos por cepas de *Trichoderma*, cultivadas en dos diferentes medios en, donde mostró una diferencia en el efecto de crecimiento en las plantas (González-Pérez *et al.*,2018). Por lo mencionado la cantidad y composición de los volátiles producidos por microorganismos puede variar según las condiciones de cultivo (Schmidt *et al.*, 2015) esto podría ser otra razón para explicar los efectos de crecimiento en plantas de tomate.



**Figura 1.6.** Tratamientos de plantas expuestas a los COVs de *Trichoderma* (a,b,c,d),. Parámetros de promoción de crecimientos para plantas con y sin *Fol59*, peso fresco (e), peso seco (f), área foliar (g) y crecimiento (h), estos datos se registraron a los 21 días. Barras de error indican el error estándar, letras no comunes indican diferencias significativas según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ).

### **1.3.3 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sobre el desarrollo de la marchitez vascular *in planta***

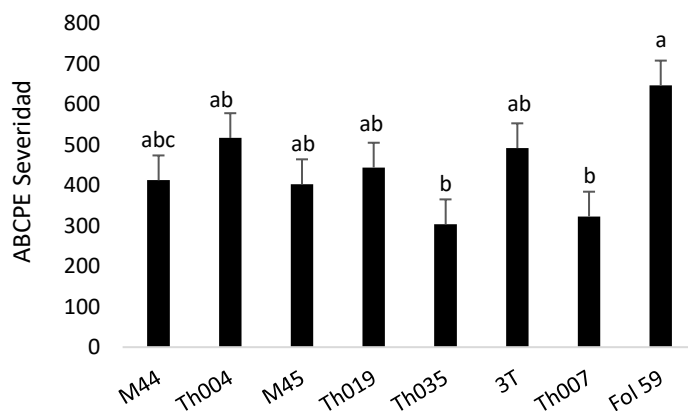
En la figura 1.7 se presentan los resultados del índice de severidad de la marchitez vascular en plantas tratadas con los VOCs de *Trichoderma* , empleando una escala descriptiva basada en la sintomatología y una escala destructiva basada en los daños ocasionados en los haces xilemáticos.



**Figura 1.7.** El efecto de los COVs de *Trichoderma* sobre plantas infectadas con *Fol59*, los datos se registraron a los 21 días después de infección y de exposición a COVs de *Trichoderma*, usando dos tipos de escalas una descriptiva (tabla 1.3) (**a,b**) y la otra destructiva (tabla 1.4) (**g,h**) porcentaje de severidad e incidencia. Se observan diferencias con respecto al control (**c**), testigo patógeno *Fol59* (**d**), COVs de Th035 redujeron los síntomas de la enfermedad (**e**), COVs de 3T no afectan sobre incidencia ni severidad de la enfermedad (**f**). Barras representan el error

estándar, letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ).

Así, se puede observar que los daños ocasionados en los haces vasculares pueden traducirse en la sintomatología de la enfermedad con un coeficiente de correlación de 0,80 ( $P = 2,2 \times 10^{-16}$ ) (Figura 1.7 a,b,g,h). Estos resultados muestran que los COVs producidos por *Trichoderma* causaron una reducción significativa del índice de severidad ( $P = 0,0330$ ), donde se podría creer que hay inducción de resistencia sistémica en las plantas contra *FoI59*. Más concretamente, el tratamiento con la cepa Th035 redujo significativamente la enfermedad mostrando índices de severidad de 35% en comparación con el control *FoI59* que no fue expuesto a COVs con un 65 %; mientras que las cepas Th007, M44, Th004, M45, Th019 y 3T no presentaron diferencias significativas (Figura 1.7 a,g). Respecto al porcentaje de incidencia, ningún tratamiento mostró diferencias significativas ( $P = 0,9999$ ) (Figura 1.7 b,h).



**Figura 1.8.** Área abajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) incidencia de severidad *FoI59*. Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según LSD-FISHER con corrección de Bonferroni ( $P > 0,05$ ).

Con los resultados observados en la figura 1.8, que hace referencia al área bajo la curva del progreso de la enfermedad, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0.0005$ ), donde las cepas Th035 y Th007 presentaron los menores grados de acumulación de la enfermedad con 304 y 323 respectivamente, en comparación con el testigo *FoI59* con 647. Por otro lado, los demás tratamientos presentaron valores promedio de 453.7.

En este estudio dio como resultado que la cepa Th035 mostro una reducción de la severidad de la enfermedad en un 31%, esto puede deberse a que los COVs de la cepa en mención, pueden estar actuando como inductores de resistencia, con patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), así activando genes de defensa como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) o también activando las vías hormonales como lo es el (ISR) (Park & Wu 2016, Vinale et al., 2008b, Wonglom et al., 2019). Un metabolito estudiado en la literatura el 6- n -pentil- 6H -piran-2-ona (6PP) presente en cepas del género *Trichoderma*, están involucrados en la inducción de la resistencia sistémica de la planta, ya que causan una reducción de los síntomas de la enfermedad y sobreexpresión de genes de defensa. (Pascale et al., 2017, Vinale et al., 2008b).

En comparación con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, se evidenció que únicamente dos cepas de *Trichoderma* presentaron efectos significativos sobre la expresión de la enfermedad. Estos resultados indican que, de las 15 cepas evaluadas, 7 produjeron COVs con actividad inhibitoria directa sobre el hongo y solo una (Th035) posee la capacidad para reducir síntomas de la enfermedad de marchitez vascular *in planta*. El efecto observado con esta cepa es indirecto, es decir, que probablemente la cepa Th035 emite compuestos capaces de inducir una resistencia sistémica en la planta de tomate (Vinale et al., 2008b). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que permitan comprobar esta observación.

Por otro lado, es importante mencionar la disminución del número de potenciales agentes biocontroladores a medida que se van incrementando factores al experimento, puesto que cuanto mayor cantidad de variables, la variación de los resultados también aumenta; y en estos experimentos en particular, la transición de la interacción *patógeno - COVs a planta – patógeno – COVs* implica la adición de un nivel trófico que es la planta, la cual aumentará la complejidad de interacciones en función de su metabolismo y compatibilidad genética.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran el potencial uso de los COVs como una alternativa no invasiva para el control de patógenos de importancia económica y permita la reducción de la aplicación de pesticidas. Sin embargo, es indispensable caracterizar los compuestos producidos por las cepas de mayor bioactividad, de tal modo que permitan su integración en estrategias de manejo de la enfermedad y su aplicación, con métodos como la

micofumigación, la cual consiste en usar mezclas de compuestos orgánicos volátiles previamente identificados, para el control de patógenos y se ha demostrado que tienen un efecto inhibitorio sobre ellos (Macías *et al.*, 2018).

La bioprospección de estas moléculas provenientes de hongos benéficos nativos está ganando importancia en Colombia debido a la biodiversidad tan grande con la que se cuenta en los bancos de germoplasma, así como el desarrollo de bioproductos de última generación que se caractericen por presentar atributos multi objetivo, como el manejo de patógenos y promoción de crecimiento en un solo producto (García *et al.*, 2018). Estudios como es que aquí se desarrolló contribuyen a la caracterización de estos microorganismos y al futuro desarrollo biotecnológico mencionado. Por lo cual, la continuidad de este trabajo incluye la identificación de los compuestos volátiles orgánicos emitidos por las cepas promisorias y sus posibles efectos sobre el manejo de otros problemas fitosanitarios en el cultivo de tomate. A partir de los resultados y observaciones realizadas en estos experimentos, se evidencia la importancia de describir el efecto que estos compuestos están generando en el metabolismo de la planta que ha permitido el manejo de la severidad de la enfermedad *in planta*.

## 1.4 Conclusiones

- El experimento bajo condiciones *in vitro* permitió determinar que los compuestos orgánicos volátiles emitidos por algunas cepas de *Trichoderma* spp. sí presentan un efecto biocontrolador del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fo159).
- Las cepas que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron: M45, 3T, Th007, Th019, Th035, M44 y Th004. Estas cepas fueron seleccionadas para la evaluación *in planta*.
- La cepa Th035 es potencial candidata para la reducción de la enfermedad de marchitez vascular, ya que además de producir COVs con actividad antifúngica directa con el patógeno, al parecer también producen compuestos donde se podría atribuir la inducción de resistencia sistémica en la planta.
- No se evidenció un efecto de promoción de crecimiento mediado por los COVs de *Trichoderma* evaluados en este experimento.

## Bibliografía

- Agustí, M., Zaragoza, S., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Klose, R., & Staub, R. (1995). Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus). *Levante Agrícola*, 332, 189-199.
- Aragón, R. S. M. (2016). How entomopathogenic endophytic fungi modulate plant-insect interactions (Doctoral dissertation, Georg-August-Universität Göttingen).
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular plant-microbe Interactions*, 22(5), 487-497.
- Carmona Gutiérrez, S. L. (2019) Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos (Master dissertation, Universidad Nacional-Sede Bogotá).
- Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., Simbaqueba, J., & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean Region of Colombia. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010070>
- Chen, J.-L., Sun, S.-Z., Miao, C.-P., Wu, K., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., Zhao, L.-X. (2016a). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(4), 315-324.
- Chen, J. L., Liu, K., Miao, C. P., Sun, S. Z., Chen, Y. W., Xu, L. H., & Zhao, L. X. (2016b). Salt tolerance of endophytic *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002 and its volatile organic compounds (VOCs) allelopathic activity against phytopathogens associated with *Panax notoginseng*. *Annals of microbiology*, 66(3), 981-990.
- Chiang, K. S., Liu, H. I., Tsai, J. W., Tsai, J. R., & Bock, C. H. (2017). A discussion on disease severity index values. Part II: using the disease severity index for null hypothesis testing. *Annals of Applied Biology*, 171(3), 490–505. <http://doi.org/10.1111/aab.12396>.
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food microbiology*, 82, 70-74.

- Cotes AM (2018) Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico. V. 1 vol 1. *Agrosavia, Bogota Colombia*
- De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G.R.B., & Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta por conocer. *Acta biológica Colombiana*,6(1),7-25.
- Durbin, J. (1960). Estimation of Parameters in Time-Series Regression Models. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 22: 139-153.
- FAO (2018). FAOSTAT. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> fecha de consulta 13 Abril 2020.
- García, A. D., Álvarez, M. I. G., Bernal, E. P. G., Diaz, A. M. S., Barrera, F. M. C., Moreno, D. M. L., ... & Cotes, A. M. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. *Corporacion Colombiana de investigación agropecuaria*. 12, 632-682
- Gómez Marroquín, M. R (2019). Evaluación de sustancias bioactivas como alternativa para el manejo de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Doctoral dissertation, *Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá*).
- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- Hern, E., & Su, M. (2019). Selección del mejor conjunto de Regresión. Recuperado de [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/15751/Seleccion del mejor conjunto de Regresion..pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/15751/Seleccion%20del%20mejor%20conjunto%20de%20Regresion..pdf?sequence=1)
- Hohmann P., Jones E.E., Hill R.A., Stewart A. (2011) Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially seedlings. *Fungal Biol UK*. ;115:759–767.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal ecology*, 6(1), 19-26.
- InfoStat (2018). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA
- Korpi, A., Järnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical reviews in toxicology*, 39(2), 139-193.

- 
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 7.
- Lee, S., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. (2019). Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. *Fungal ecology*, 37, 1-9.
- Macías-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P., & Contreras-Cornejo, H. A. (2018). *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS microbiology ecology*, 94(9), fiy137.
- Macías-Rubalcava, M. L., Sánchez-Fernández, R. E., Roque-Flores, G., Lappe-Oliveras, P., & Medina-Romero, Y. M. (2018). Volatile organic compounds from *Hypoxyton anthochroum* endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food microbiology*, 76, 363-373.
- Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerkhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M. & De Coninck, B. (2012). Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in plant science*, 3, 108.
- Montgomery, D.C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica.
- Moreno-Velandia, C. A., Izquierdo-García, L. F., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2019). Soil sterilization, pathogen and antagonist concentration affect biological control of *Fusarium* wilt of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. *Plant and Soil*, 435(1-2), 39-55.
- Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological control*, 67(2), 149-156.
- Park, Y., & Wu, H. (2016). Differential methylation analysis for BS-seq data under general experimental design. *Bioinformatics*, 32(10), 1446-1453.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop protection*, 92, 176-181.

- Pedroza, A., & Samaniego, J. (2009). Análisis del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en patosistemas agrícolas. In Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad (pp. 6–16). <http://doi.org/10.13140/2.1.4475.7767>.
- Ramyabharathi, S. A., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *J Today's Biol Sci Res Rev*, 1, 50-60.
- Rienzo, J. A. Di, & Casanoves, F. (2012). *Modelos Lineales Mixtos InfoStat*.
- Roberto N. Silva, Valdirene Neves Monteiro, Andrei Stecca Steindorf, Eriston Viera Gomes, Eliane Ferreira Noronha, Cirano J. Ulhoa, (2019) *Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security, Fungal Biology*.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- SAS Institute Inc (2019). SAS/ACCESS® 9.4 Interface to ADABAS: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *ISME Journal*, 9(11), 2329–2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>
- Sinuco León, D., Coconubo Guio, L.C., & Castellanos, L. (2020). Fungicidal activity of volatile organic compounds from *Paenibacillus* bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 20-25.
- Shapiro, S.S.; Francia, R.S. (1972). An approximate analysis of variance test for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 67: 215-216.
- Simbaqueba, J., Catanzariti, A. M., González, C., & Jones, D. A. (2018). Evidence for horizontal gene transfer and separation of effector recognition from effector function revealed by analysis of effector genes shared between cape gooseberry-and tomato-infecting formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 19(10), 2302-2318.
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The Species Concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27(2), 64–67. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1940.tb14217.x>

- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Suárez, Y. Y. J., Velandia, C. A. M., & Prado, A. M. C. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta biológica colombiana*, 14(3), 111-120.
- Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in microbiology*, 8, 171.
- Team, R. C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Thomashow, L. S. (2016). Induced systemic resistance: a delicate balance. *Environ Microbiol Rep*, 8(5), 560-563.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008a). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H. & Lorito, M. (2008b). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 72(1-3), 80-86.
- Wonglom, P., Daengsuwan, W., Ito, S. I., & Sunpapao, A. (2019). Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107, 1-7.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K., & Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of asia-pacific entomology*, 15(4), 647-650.
- Zhao, F., Zhang, Y., Dong, W., Zhang, Y., Zhang, G., Sun, Z., & Yang, L. (2019). Vermicompost can suppress *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* via generation of beneficial bacteria in a long-term tomato monoculture soil. *Plant and Soil*, 1-15.
- Zhang, F., Yang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS microbiology letters*, 359(1), 116-123.
- Zohair, M. M., Ahmed, A., Sadik, M. W., Hamed, E. R., & Sedik, M. Z. (2018). Promising biocontrol agents isolated from medicinal plants rhizosphere against root-rot fungi. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 11-18.

## Capítulo 2: Efecto de compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* spp. sobre la oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate

### Resumen

Como estrategia de control biológico contra la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en tomate, se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por diferentes cepas del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. En experimentos previos se evaluó la efectividad del tratamiento con VOCs a plantas de tomate en el manejo de la marchitez vascular causada por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol59). Las mismas siete cepas evaluadas contra el patógeno fueron evaluadas para el control de la mosca blanca. Se demostró que los COVs emitidos por las cepas Th007, Th035, M44 y M45 afectan el índice de preferencia de oviposición de manera negativa lo cual indica que plantas tratadas con estos compuestos no son preferidas por los adultos de mosca blanca para depositar sus huevos, siendo la cepa M45 la que tuvo diferencias significativas con 343 huevos con respecto al control con 544 huevos. En contraste, las plantas que fueron tratadas con los COVs de Th004, Th019 y 3T, el efecto fue estimulante de la oviposición comparado con el control, donde la cepa Th004 con 652 huevos ovipositados. Los resultados de este experimento nos permitieron determinar que la cepa M45 emite compuestos volátiles orgánicos que fueron capaces de afectar la bioquímica de la planta de tomate disminuyendo la probabilidad que plantas tratadas con estos compuestos sean escogidas por adultos de mosca blanca para ovipositar. Se realizó un análisis no dirigido del perfil de compuestos orgánicos volátiles emitidos por cuatro de las cepas más promisorias en el control de los dos problemas fitosanitarios, con el fin de identificar los COVs posibles responsables de esta actividad biocontroladora. Los avances logrados en este proyecto aportan a la comprensión de la interacción planta-insecto mediada por los COVs de *Trichoderma* spp. que no requieren contacto físico entre el microorganismo y el insecto. Entre los compuestos encontrados en la cepa M5 se encontraron alcoholes y esterés.

**Palabras clave:** Índice de preferencia de oviposición, Inducción de resistencia sistémica, GC-MS, SPME.

## 2.1 Introducción

*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) conocida como la mosca blanca de los invernaderos, es una plaga de importancia económica que afecta a más de 250 especies de plantas (Ebrahimifar, Jamshidnia, & Allahyari, 2017). Esta tiene hábito chupador alimentándose de floema de las plantas y generando daños directos como la reducción del área fotosintética al secretar una sustancia azucarada conocida como mielecilla que es sustrato para un complejo de hongos llamado fumagina y daños indirectos mediante la transmisión de virus (Nasruddin et al.,2016). El tomate es una de las plantas huésped preferidas por *T. vaporariorum*, lo cual implica que potencialmente puede transmitir un gran número de virus de importancia económica como Rugose Yellow Leaf Curl Virus (ToRYLCV) (Wang et al.,2018), Tomato Chlorosis Virus (ToCV) (Wei et al.,2019), Potato Yellow Vein Virus (PYVV), (Cuadros et al.,2017), Potato Yellow Mosaic Panama Virus (PYMPV) (Davino et al.,2018); por lo mencionado, es imprescindible tomar medidas de manejo para el control de esta plaga.

Hay dos formas de protección por parte de la planta contra los herbívoros, directas e indirectas, las defensas directas son obstrucciones morfológicas y diversos metabolitos primarios y secundarios tóxicos o antinutritivos que se expresan o inducen constitutivamente después de la infesta; las defensas indirectas están relacionadas con los volátiles que emite la planta, comúnmente llamados “volátiles de hojas verdes” como alcoholes, aldehídos, acetatos, sesquiterpenos, compuestos aromáticos entre otros, los cuales son emitidos generalmente en bajas concentraciones y son inducidos según el daño causado por el herbívoro, atrayendo depredadores naturales (Kessler, A.& Baldwin 2002, Agrawal 2005, Rodriguez-Saona et al.,2012, Aljbory et al.,2018 )

Sin embargo, los procesos de adaptabilidad genética de la mosca blanca (Wainaina et al.,2018), le han permitido en muchos casos evitar los sistemas de defensa de la planta, por lo cual se hace necesario el uso de medidas extremas para mitigar el problema (Cotes et al.,2018). Las estrategias de manejo son variadas, sin embargo, predomina el control químico mediante

insecticidas de síntesis química y amplio espectro, los cuales se han demostrado su efecto adverso sobre la salud humana, enemigos naturales y polinizadores, así como también son inviables económicamente debido a alta tasa de resistencia que adquiere *T. vaporariorum* a estos compuestos (Kapantaidaki *et al.*,2018; Esmaeily *et al.*, 2019).

Una de las alternativas para mitigar el uso de los insecticidas de síntesis químico es mediante estrategias de control biológico, usando microorganismos benéficos o sus subproductos, los cuales pueden tener acción directa sobre el insecto o pueden estimular e inducir a la planta para protegerse contra el insecto (Aragón *et al.*,2018). Insectos de habito chupador de floema como las moscas blancas se ven afectados por las defensas mediadas por el ácido jásmónico (JA). Sin embargo, los insectos que se alimentan de floema parecen activar la vía de señalización del ácido salicílico (SA) que contrarresta las defensas dependientes de JA a través de la diafonía (crosstalk). Debido a que la hormona vegetal (AJ) es de importancia central en ISR y en las defensas de la planta contra los insectos herbívoros, se espera que los microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo afecten las interacciones planta-insecto (Ozawa *et al.*,2000; Pineda *et al.*, 2010).

El presente estudio permitió evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por siete diferentes cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas en el capítulo uno por su actividad biocontroladora de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, sobre la preferencia de oviposición de *T. vaporariorum* en plantas de tomate.

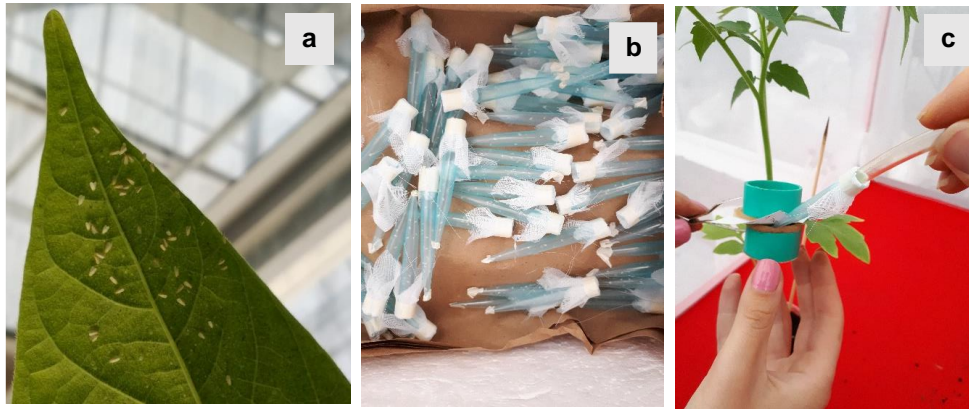
## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Material biológico: Plantas, insectos y aislamientos de hongos.**

Las semillas de tomate *Solanum lycopersicon* var. Santa Cruz Kada (Impulse semillas SAS) fueron esterilizadas superficialmente antes de su uso mediante un lavado inicial con agua corriente seguido de un lavado con tween 80 estéril al 0,1% (Merck Millipore) dentro de un tubo falcón agitando vigorosamente para retirar la mayor cantidad de fungicida y contaminantes

superficiales. Se realizaron tres enjuagues con agua corriente para retirar y se filtraron con muselina. En una cabina de flujo laminar, se realizaron los siguientes lavados con un volumen aproximado de 200 ml de líquido en cada lavado: 15 minutos en hipoclorito de sodio al 2%, seguido de un minuto con etanol al 70% y tres lavados consecutivos con agua estéril. Posteriormente, se sembraron en bandejas de germinación de semillas de 50 alvéolos con turba estéril como sustrato. El material se mantuvo bajo condiciones controladas de temperatura de 25°C y de humedad del 60% en un cuarto de bioensayos del Laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA hasta la obtención de plántulas con el segundo par de hojas verdaderas (aproximadamente 4 semanas) Momento en el que se realizó el trasplante a vasos de plástico de 16 onzas que contenían una mezcla de suelo y vermiculita estéril en una proporción 3:1. La fertilización se realizó con 3 gramos de fertilizante 15-15-15 N-P-K por kilogramo de mezcla. Se realizaron cinco perforaciones en la base de los vasos para permitir el ingreso de los volátiles del hongo y su contacto con el sistema radicular de la planta. En los experimentos se emplearon plantas de ocho semanas contadas desde la germinación de las semillas.

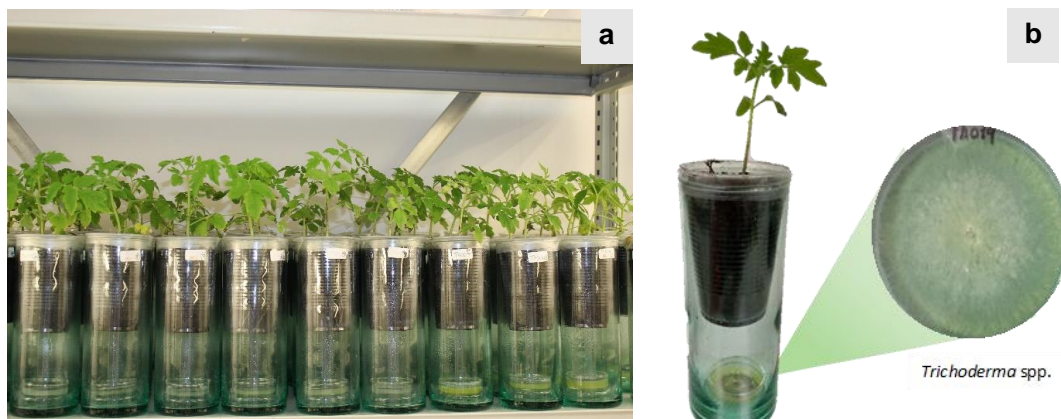
La cría masiva de *Trialeurodes vaporariorum* fue establecida en plantas de frijol el 1 de abril de 2019 en condiciones de invernadero (Figura 2.1a) y está ubicada en centro de investigación Agrosavia - Tibaitatá, para disponer de material biológico utilizado en la realización de los bioensayos. Los adultos de mosca blanca fueron colectados durante la madrugada, donde la actividad del insecto es reducida, para evitar su escape debido a la reacción activa con la luz solar. Se colectaron 20 adultos en una proporción 1:1 (hembra:macho) con ayuda de un aspirador bucal y fueron mantenidos en una nevera de poliestireno expandido (icopor) con balas de hielo (Figura 2.1b) hasta su liberación en las jaulas pinza (Figura 2.1c) .



**Figura 2.1.** a) Cría masiva de Mosca blanca en plantas de frijol, b) recolección de *T. vaporariorum* 20 adultos por unidad experimental c) Conservación en frío de los grupos de mosca blanca para su posterior liberación en las jaulas pinza.

### 2.2.2 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sobre la preferencia de oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate

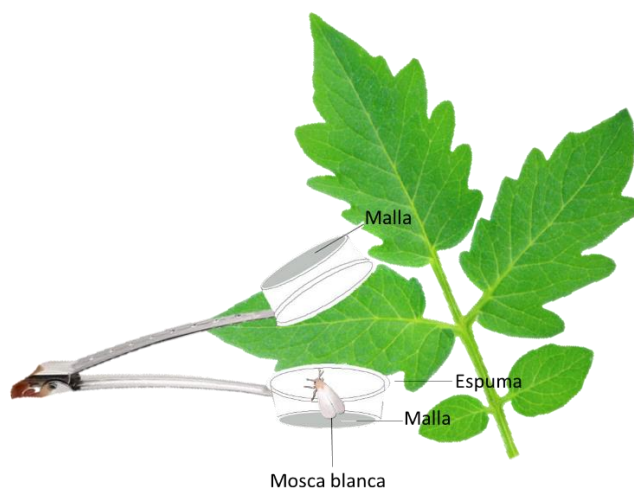
Para evaluar el efecto de los COVs de los agentes biocontroladores (*Trichoderma* spp.) sobre la preferencia de oviposición de la mosca blanca de los invernaderos, se emplearon plantas de tomate variedad Santa cruz Kada, con una edad de ocho semanas (Figura 2.2a). Las plantas fueron ubicadas dentro de un vaso de vidrio que contenía una caja de Petri con una de las cepas de *Trichoderma* spp. a evaluar, con un desarrollo de cuatro días (figura 2.2b). Se permitió una interacción de 48 horas entre los COVs y las raíces de las plantas en condiciones de laboratorio.



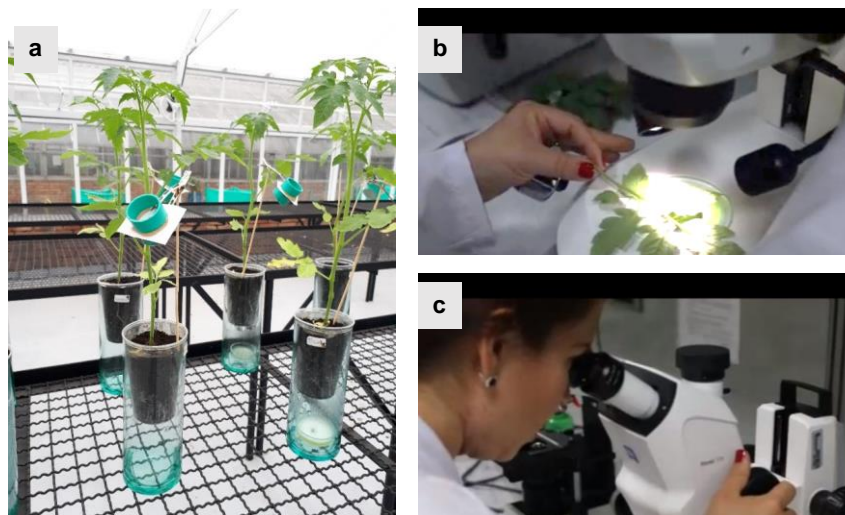
**Figura 2.2. a)** Distribución de tratamientos en cuarto de bioensayos del laboratorio de microbiología agrícola, **b)** exposición de raíces de plántulas de tomate a compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* spp.

Posteriormente, las plantas se trasladaron al invernadero donde se realizó la liberación de los 20 insectos (10 hembras: 10 machos) dentro de cada jaula pinza de 3 cm de diámetro como se muestra en la figura (Figura 2.3). Esta interacción se prolongó por 48 horas y se retiraron las jaulas pinza. Las plantas se dejaron en reposo durante 96 horas después de la oviposición para permitir el desarrollo de los huevos y una detección más acertada dado su proceso de pigmentación (Figura 2.4a). Se colectaron las hojas tratadas, y se llevaron al laboratorio para el conteo de los huevos con la ayuda de un estereoscopio Stemi marca Zeiss® (Figura 2.4a y b).

Se empleó un diseño completamente al azar, con diez replicas por tratamiento y dos repeticiones en el tiempo.



**Figura 2.3.** Esquema de liberación de adultos de mosca blanca el envés de las hojas de tomate. Se liberó un total de 20 adultos de dos días de emergidos en una proporción 1:1 en el envés de las hojas.



**Figura 2.4.** a) Periodo de interacción entre adultos de mosca blanca y plantas de tomate tratadas con COVs de *Trichoderma* spp. b) y c) observación y conteo de huevos de mosca blanca en estereoscopio.

Con los datos de oviposición, se calculó el índice de preferencia de oviposición (IPO) de acuerdo con la ecuación propuesta por (Fenemore, 1980):

**Ecuación 3.1:** 
$$IPO = \left( \frac{T-P}{T+P} \right) * 100$$

**Donde:**

T: Números de huevos por tratamiento

P: Número de huevos del control

### **2.2.3 Identificación de los compuestos orgánicos volátiles de cepas de *Trichoderma* spp.**

El perfil de compuestos volátiles emitidos por cada una de las siete cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en los experimentos in planta, se evaluó mediante la extracción estática del espacio de cabeza (static headspace) por microextracción en fase sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS).

Al séptimo día de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. se realizó, un corte de 35mm de diámetro del cultivo de cada cepa de *Trichoderma*, se depositó en un vial herméticamente sellado durante 10 minutos a 60°C. Luego, una fibra de PDMS/DVB (Supelco) se expuso en el espacio de cabeza (HS) por 30 minutos. Como estándar interno (ISTD) se empleó una disolución de n-tetradecano (1mg; Part. N° 172456, Sigma-Aldrich). Finalmente, la fibra se desorbió en el puerto de inyección (splitless 1min) de un cromatógrafo de gases (GC AT 6890 Series Plus, Agilent technologies, Palo Alto California, EE.UU) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD 5973). Los espectros de masas se adquirieron por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70eV, en un rango de masas de 35 a 250m/z, en modo scan.

La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) (5%-fenil-poli(metililoxano), 60m x 0.25mm x 0.25µm, a un flujo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del horno inició en 45°C y luego calentamiento hasta 150°C a una velocidad de 4°C min<sup>-1</sup>, luego calentamiento hasta 250°C a una velocidad de 5°C min<sup>-1</sup> que se mantuvo por 5 minutos. Finalmente, calentamiento hasta 300°C, a una velocidad de 10°C min<sup>-1</sup>.

Para la identificación de los compuestos orgánicos volátiles se empleó el criterio cromatográfico (índices de retención) calculados por comparación con una mezcla de hidrocarburos lineales C6-

C26 (Sigma-Aldrich) y el criterio espectral por comparación con los espectros de masas de las bases de datos disponibles (Adams y NIST v.2012), empleando el software MSD Chemstation.

## 2.2.4 Análisis estadístico

Para el análisis de las variables Número de huevos e índice de preferencia de oviposición (IPO) se probaron los supuestos de normalidad con los residuos empleando la prueba de Shapiro-Wilks (Shapiro & Francia, 1972), homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene (Montgomery, 1991) e independencia de los errores mediante la prueba de Durbin Watson (Durbin, 1960). Para la variable Número de huevos fue necesario transformar a logaritmo natural (Li; Webster; Shi, 2015) para cumplir el supuesto de normalidad. Los datos se analizaron mediante modelos lineales generales mixtos, donde la parte fija del modelo correspondió a los Tratamientos (cepas) y la parte aleatoria a las repeticiones. Para determinar diferencias de medias se realizó la prueba LSD Fisher ( $p < 0,05$ ), con corrección de Bonferroni

Con el propósito de estructurar el comportamiento de los COVs, y realizar una aproximación asociativa a las características de control del patógeno, la oviposición de mosca blanca y las diferencias entre cada una de las cepas. Los compuestos descritos en la tabla 2.1 fueron sometidos a un análisis de modelos lineales generales mixtos y una comparación de medias prueba LSD Fisher ( $p < 0,05$ ), con corrección de Bonferroni.

Los datos se analizaron usando el software estadístico R, versión 3.6.0 (Team 2019), Infostat (InfoStat 2018) y el software SAS v 9.4 (SAS Institute Inc 2019).

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sobre la preferencia de oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate.

En la figura 2.5 se presentan los índices de preferencia de oviposición de la mosca blanca de los invernaderos sobre plantas tratadas con las diferentes cepas de *Trichoderma*. Se observó que en las plantas expuestas a los COVs de las cepas M44, Th035, Th007 y M45 se disminuyó significativamente la oviposición. Sin embargo, solo el tratamiento M45 presentó una reducción estadísticamente significativa ( $P = 0,0026$ ) de la oviposición comparado con el control. Por otro lado, se evidenció que la oviposición de la mosca blanca sobre plantas previamente expuestas a los COVs de las cepas 3T, Th019 y Th004 fue mayor que en las plantas control, siendo Th004 diferente estadísticamente ( $P = 0,0039$ ) con respecto al control. La información detallada del número de huevos por tratamiento se presenta en la tabla 2.1.

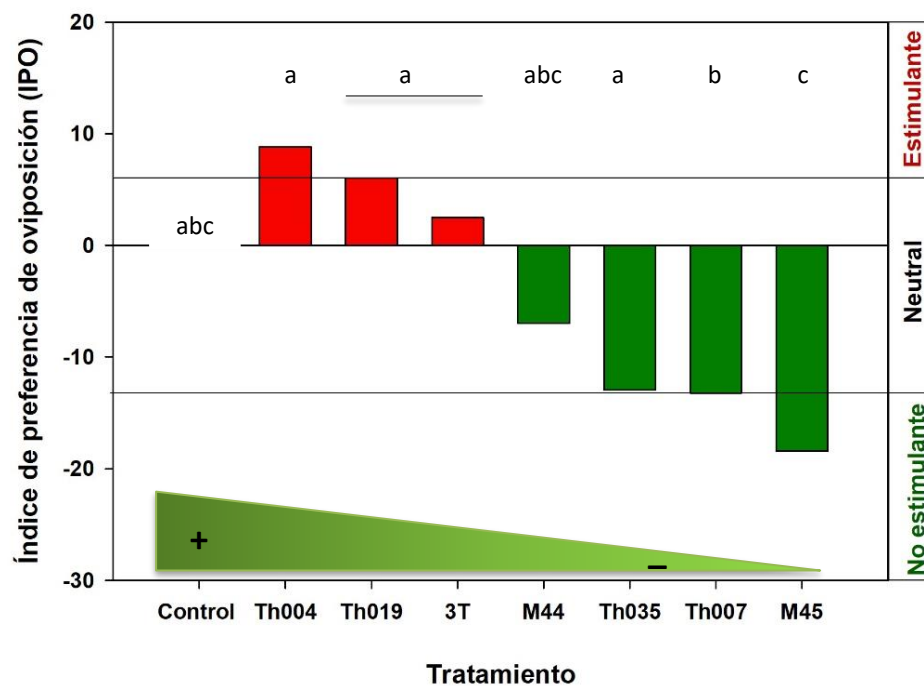
En la literatura, se encuentra ampliamente descrito que las interacciones planta insecto, principalmente la selección de la planta hospedera está basada en la hipótesis de preferencia (“Preference performance hypothesis”), también conocida como “*mamá conoce lo que es mejor*” (“Mother knows best”), la cual establece que los adultos seleccionan la planta donde depositarán sus huevos, teniendo en cuenta la que ofrezca mejores condiciones para el desarrollo de su descendencia y le permita maximizar el crecimiento, desarrollo y reproducción de los nuevos individuos (Awmack & Leather 2002).

Para el caso de la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), esta selección de la planta hospedera para depositar sus huevos, está mediada por las señales químicas volátiles que emiten las plantas, las cuales actúan como semioquímicos, que le permiten reconocer las condiciones de la planta que mejor se acondiciona a las necesidades de su progenie (Bleeker *et al.*, 2009; Esmaeily *et al.*, 2019). En esta investigación observamos que las diferencias en la preferencia de oviposición de la mosca blanca, fueron muy sutiles, pero para el caso de las plantas tratadas con M45 sí se presentaron diferencias significativas reflejadas en una menor selección de estas plantas comparado con el

control. Teniendo en cuenta estos resultados, se reitera la importancia de realizar experimentos adicionales que nos permitan determinar el efecto de los volátiles emitidos por esta cepa sobre el metabolismo de la planta y de esta manera poder determinar las características de los semioquímicos que pueden estar regulando esta interacción. El alcance de este experimento, contribuye a la selección de cepas promisorias para el control de la oviposición de este insecto plaga en el cultivo de tomate y es un primer paso de caracterización de estos microorganismos.

Se ha reportado que plantas de la familia de las solanáceas, como el tomate, usan volátiles como los terpenos para la defensa contra los herbívoros (Kennedy 2003) y se ha demostrado que algunos terpenos exhiben propiedades repelentes a los insectos (Birkett *et al.*, 2004). Sería interesante, determinar si la exposición de las plantas a los COVs de la cepa M45, contribuyen al incremento de estos compuestos en el perfil volátil de la planta, lo cual está relacionado con la preferencia de oviposición observada. Cabe anotar que han sido muy poco los estudios donde evalúan a fondo este tipo de interacciones, hasta el momento se encuentra en la literatura, trabajos donde evalúan entomopatógenos como endófitos en plantas de *Arabidopsis thaliana* en el control de la población del pulgón *Myzus persicae* y el crecimiento de las orugas *Plutella xylostella* donde no produjeron ningún efecto biocontrolador hacia los herbívoros (Raad *et al.*, 2019). Otros trabajos, enfocan sus observaciones hacia el cambio en la composición química volátil, emitida por (*Solanum lycopersicum* L.) antes y después de una infesta por mosca blanca, (Lopez *et al.*, 2012; Darshanee *et al.* (2017). Lo cual demuestra lo emergente que es este tema en la investigación de las interacciones multitróficas.

En la literatura no se han reportado trabajos donde evalúen el efecto de los COVs de *Trichoderma* en la interacción con la planta para el manejo de la oviposición de insectos para el cultivo de tomate. Por lo cual esta contribución a la comprensión de este tipo de interacciones resulta de interés para el desarrollo de estrategias de control de la plaga novedosas, donde se aplique este control indirecto similar al observado contra mosca blanca en tomate, mediada por semioquímicos de hongos, modulando compuestos relacionados con repelencia o atracción del insecto (López *et al.*, 2012).



**Figura 2.5.** Índice de preferencia de oviposición de la mosca blanca de los invernaderos sobre plantas de tomate tratadas con COVs de *Trichoderma* spp. Letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 2.31.** Número de huevos por tratamiento ovipositados en plantas de tomate. Letras no comunes indican diferencias significativas, según la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con corrección de Bonferroni ( $P > 0,05$ )

Tratamientos	Huevos
CONTROL	544 ± 288,86 abc
3T	582 ± 291,50 abc
M44	457 ± 291,50 abc
M45	343 ± 291,50 c
TH004	652 ± 291,50 a
TH007	406 ± 291,50 bc
TH019	665 ± 291,50 ab
TH035	589 ± 291,01 abc

Estos resultados representan un importante indicio sobre la capacidad de los COVs de *Trichoderma* spp para estimular comportamiento en insectos y mediante estudios más profundos de caracterización química, podría abrir una oportunidad para que estos compuestos sean implementados en estrategias de manejo integrado de insectos.

### 2.3.2 Identificación de COVs

En la Tabla 2.2 se presentan los COVs identificados en cada una de las cepas evaluadas. Se presenta el porcentaje de área relativa de cada compuesto. Los COVs fueron identificados por comparación de los espectros de masas contra una base de datos con un porcentaje de similitud no menor al 90% y comparación de los índices de retención presentes en literatura con una desviación estándar menor al 2% de acuerdo a la metodología propuesta por (Stashenko & Martínez 2010).

**Tabla 2.32.** COVs de *Trichoderma* spp. detectado por HS-SPME-GC-MS.

N°	Compuesto	IRL*		% Area relativa ± SD						
		Exp	Lit	3T	Th004	M45	M44	Th035	Th007	Th019
1	Metil-butanol	738	736		54,9 ± 2,6a	6,5 ± 3,3cd	9,3 ± 2,6cd	5,1 ± 2,6d	29,5 ± 3,3b	18,6 ± 2,6bc
2	Acetato de isobutilo	775	771				9,6 ± 2,1			
3	Hexanol	869	868					3 ± 2,7		
4	Acetato de 2-metil-1-butilo	879	880				54,1 ± 5,2			
5	2-Heptanona	890	891					1,3 ± 0,8		
6	1-Octen-3-ol	979	980			11,9 ± 3,8				
7	3-Octanona	985	986	3,9 ± 3,1bc	7,2 ± 3,1bc	40,2 ± 3,1a	7,6 ± 3,1bc	0,2 ± 2,7c	48,6 ± 3,1a	13,4 ± 2,5b
8	Pentil-furano	989	993	2,2 ± 0,7b				0,9 ± 0,6b		7,3 ± 0,6a
9	1-Octanol	996	994			37,8 ± 2,2a			1,4 ± 1,4b	
10	Alcohol feniletílico	1113	1116		18,3 ± 1,9a	2,9 ± 1,9c	9,3 ± 1,9bc	1,8 ± 2,3c	13,7 ± 2,1ab	3,7 ± 2,1c
11	Acetato de octanilo	1117	1123			2,1 ± 0,7a	2,7 ± 0,5a		4,6 ± 0,7a	
12	5-Etil-2,4-dimetil-4-hepten-3-ona	1157	1149		4,2 ± 3,3					
13	2,4-Nonadienal	1216	1213					0,5 ± 0,3		
14	6-Pentil-2H-piran-2-ona	1461	1453	87,6 ± 3,1a				82,2 ± 2,8a		54,6 ± 2,8b
15	α-Guaieno	1425	1439		1,6 ± 0,3a		1,1 ± 0,3a			
16	α-Cedreno	1428	1411		1,2 ± 0,2a		0,6 ± 0,2a			
17	β-Cedreno	1431	1421		2,7 ± 0,6a		1,5 ± 0,6a			
18	Dihidrocurcumeno	1435	1448				1,5 ± 0,8			
19	β-Copaeno	1438	1432		4,6 ± 0,8a		2,4 ± 0,8a			
20	trans-α-Bergamoteno	1438	1435	2,4 ± 0,6a				3,0 ± 0,6a		1,7 ± 0,6a
21	β-Calareno	1441	1432		2,6 ± 0,4a		1,6 ± 0,4a			
22	9-epi-trans-Cariofileno	1469	1466				0,5 ± 0,2			
23	4-epi-α-Acoradieno	1485	1475		3,1 ± 0,7a		1,1 ± 0,6a			
24	γ-Curcumeno	1495	1480					0,5 ± 0,6b		0,9 ± 0,5a
25	β-Bisaboleno	1511	1509		1,1 ± 0,7					
26	β-Sesquifelandreno	1528	1524	1,0 ± 0,6						

\*IRL: Índice de retención lineal, Exp: Experimental, Lit: Literatura

De acuerdo con los criterios empleados, se identificaron 26 compuestos del espacio de cabeza de las cepas de *Trichoderma*. Los COVs identificados corresponden principalmente a alcoholes, cetonas, esterres, furanos, aldehídos, lactonas y sesquiterpenos. Se evidencia que a pesar de tratarse de microorganismos que comparten el mismo género, la composición de su volatiloma presenta algunas diferencias, que permiten dirigir nuestra atención hacia los efectos causados diferencialmente de acuerdo a la cepa, estas diferencias entre los compuestos de cada cepa, pueden influir diferencialmente en la composición química de la planta en el momento de la interacción, por lo cual estudios adicionales dirigidos a estos efectos sobre la planta que permitan complementar esta información deben realizarse.

En el análisis de los COVs, se observa que siete compuestos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre cepas; de acuerdo a lo anterior y en relación con la comparación de medias LSD-Fisher, se observa un mayor porcentaje de área relativa para las siguientes cepas: M45 con 37,8% 1-Octanol ( $P = 0,0014$ ), Th004 con 18,3% Alcohol\_fenilético ( $P < 0,0001$ ), M45 con 40,2% 3-Octanona ( $P < 0,0001$ ), las cepas 3T y Th035 con 87,6 y 82,2 % 6-Pentil-2H-piran-2-ona ( $P = 0,0002$ ), Th004 con 54,9% Metil butanol ( $P < 0,0001$ ), Th019 con 7,3% Pentil-furano ( $P = 0,0004$ ) y Th019 con 0,9 %  $\gamma$ -Curcumen ( $P = 0,0005$ ). Para los compuestos Acetato de isobutilo, Hexanol, Acetato de 2-metil-1-butilo, 2-Heptanona, 1-Octen-3-ol, 5-Etil-2,4-dimetil-4-hepten-3-ona, 2,4-Nonadienal, 9-epi-trans-Cariofileno,  $\beta$ -Bisaboleno y  $\beta$ -Sesquifelandreno no fue posible realizar un análisis estadístico ya que dichos compuestos se presentaron en solo una cepa.

La interacción multitrófica hongo-planta-insecto evaluada en este trabajo, pionera en este campo, permitió establecer que los COVs emitidos por la cepa M45 donde mostró una emisión de alcoholes y esterres tiene actividad controladora de la oviposición de mosca blanca.

De otra parte, al contrastar la información de la composición de volátiles de las cepas *Trichoderma* spp. con el efecto de promoción de crecimiento, no se observó grandes diferencias en las variables evaluadas (Peso fresco, peso seco, área foliar y el crecimiento). Dentro de los compuestos encontrados en el análisis GC/MS, está 6-pentil-2H-piran-2-ona que se encuentra presente en las cepas 3T, Th035 y Th019 con porcentajes 87,6%, 82,2% y 54,6% ( $P = 0,0002$ ), donde han reportado que este compuesto tiene efectos nulos en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2019) y concentraciones altas puede inhibir el crecimiento de la raíz principal

(Garnica-Vergara *et al.*, 2016). El Metil-butanol se encontró en las cepas Th004, M45, M44, Th035, Th007 y Th019 encontrando diferencias entre ellas ( $P < 0,0001$ ) que es un compuesto con efectos nulos en crecimiento en *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2019). También se encontraron el 1-Octen-3-ol en la cepa M45 y 3-Octanona presente en las siete cepas con diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) estos compuestos han sido reportados como inhibidores en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2019, Splivallo *et al.*, 2007). Estos dos últimos compuestos fueron evaluados de forma individual en *Arabidopsis thaliana* y varios fueron tóxicos en altas concentraciones (Cordovez *et al.*, 2017), para la estimulación de crecimiento aéreo de la planta, en las cepas M44, M45, Th004 y Th007 se presentó un aumento en el área foliar, se puede atribuir a que estas cepas no emitieron el compuesto 6PP, en cambio las cepas 3T, Th035 y Th019 que si presentó este compuesto, se comportó igual que el control, ya que en altas cantidades de este compuesto no tiene efecto positivo en el crecimiento de las plantas (Macías *et al.*, 2018)

Con respecto, a la interacción planta-patógeno se observa que las cepas Th035, Th019 y 3T se identificó 6-pentil-2H-piran-2-ona, con un porcentaje de área relativa 82,2% 54,6% y 87,6% respectivamente ( $P = 0,0002$ ), una lactona insaturada que ha sido estudiada en la inducción de resistencia en plantas (Yang *et al.*, 2012, Vinale *et al.*, 2008), aunque la cepa Th035 muestra la mayor abundancia de este compuesto, algo que puede explicar porque las cepas 3T y Th019, no redujeron la incidencia de la severidad de la enfermedad, aun teniendo este compuesto, un estudio reciente comprobó que el efecto que tiene un solo compuesto es menor con respecto a la mezcla compleja de varios compuestos que es emitido por el microorganismo, donde estos pueden funcionar de manera más efectiva para inhibir el crecimiento de patógenos e inducir respuesta de defensa en las plantas (Wonglom *et al.*, 2020).

## 2.4 Conclusiones

- El estudio de la interacción multitrófica hongo-planta-insecto y hongo-planta-patógeno evaluada en este trabajo es pionera en este campo para el sistema tomate-mosca blanca-marchitez vascular en Colombia. Este estudio, permitió establecer el potencial de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por algunas cepas de *Trichoderma* para el manejo de estos dos problemas fitosanitarios, la cepa M45 tiene actividad controladora de la oviposición de mosca blanca, mientras que los COVs de la cepa Th035 controlan la severidad de la marchitez vascular en tomate, así mismo, estos estudios permitieron descartar su actividad como promotores de crecimiento en este sistema y bajo las condiciones aquí evaluadas.
- Se pudo establecer que los COVs emitidos por las siete cepas de *Trichoderma* presentan diferencias significativas entre sí. Las cepas Th004 y M45 se caracterizaron por la producción de sesquiterpenos. Las cepas 3T, Th035 y Th019 son las únicas que emiten 6-PP y es el componente mayoritario. El único compuesto común emitido por todas las cepas es 3-octanona, siendo el componente mayoritario en la cepa M45. Así mismo, la cepa M45 es la única que produce 1-octen-3-ol y que sus componentes mayoritarios son C8 (1-octanol y 3-octanona).
- A partir de estos resultados, proponemos los compuestos compuestos C8: 1-octen-3-ol, 1-octanol y 3-octanona como candidatos para futuras investigaciones que permitan comprobar la actividad controladora de la oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate y al compuesto 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) para la inhibición del desarrollo de la marchitez vascular *in planta*.

## Bibliografía

- Agrawal, A. A. (2005). Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 97-105.
- Aljbory, Z., & Chen, M. S. (2018). Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science*, 25(1), 2-23.
- Aragón Rodríguez, Sandra, Beltran Acosta Camilo Ruben. (2018). "Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga" Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: Aplicaciones y perspectivas . En: Colombia ISBN: 978-958-740-254-4 ed: Agrosavia , v. , p.852 - 877 2.
- Awmack, C. S., & Leather, S. R. (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual review of entomology*, 47(1), 817-844.
- Birkett, M. A., Agelopoulos, N., Jensen, K. M., Jespersen, J. B., Pickett, J. A., Pries, H. J., ... & Woodcock, C. M. (2004). The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and veterinary entomology*, 18(4), 313-322.
- Bleeker, P. M., Diergaarde, P. J., Ament, K., Guerra, J., Weidner, M., Schütz, S., & Schuurink, R. C. (2009). The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiology*, 151(2), 925-935.
- Cordovez, V., Mommer, L., Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Pierik, R., Mumm, R., ... & Raaijmakers, J. M. (2017). Plant phenotypic and transcriptional changes induced by volatiles from the fungal root pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in plant science*, 8, 1262.
- Cuadros, D. F., Hernandez, A., Torres, M. F., Torres, D. M., Branscum, A. J., & Rincon, D. F. (2017). Vector Transmission Alone Fails to Explain the Potato Yellow Vein Virus Epidemic among Potato Crops in Colombia. *Frontiers in plant science*, 8, 1654.
- Cordovez, V., Mommer, L., Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Pierik, R., Mumm, R., Carrion, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Plant Phenotypic and Transcriptional Changes Induced by Volatiles from the Fungal Root Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01262>
- Cotes AM (2018) Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico. V. 1 vol 1. *Agrosavia, Bogota Colombia*

- Darshanee, H. L., Ren, H., Ahmed, N., Zhang, Z. F., Liu, Y. H., & Liu, T. X. (2017). Volatile-mediated attraction of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to tomato and eggplant. *Frontiers in plant science*, 8, 1285.
- Davino, S., Panno, S., Caruso, A. G., Davino, M., & Vasquez, J. A. H. (2018). High genetic stability of potato yellow mosaic Panama virus infecting tomato in Panama. *Journal of plant pathology*, 100(1), 59-65.
- Durbin, J. (1960). Estimation of Parameters in Time-Series Regression Models. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 22: 139-153.
- Ebrahimifar, J., Jamshidnia, A., & Allahyari, H. (2017). Functional response of *Eretmocerus delhiensis* (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) by parasitism and host feeding. *Journal of Insect Science*, 17(2), 56.
- Esmaeily, S., Samih, M. A., & Izadi, H. (2019). Induced resistance by jasmonic and abscisic acids and *Nesidiocoris tenuis* feeding on *Solanum lycopersicum* against *Trialeurodes vaporariorum*. *International Journal of Pest Management*, 1-12.
- Fenemore, P. G. (1980). Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae); identification of host-plant factors influencing oviposition response. *New Zealand Journal of Zoology*, 7(3), 435-439.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2016). 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 Phytologist*, 209(4), 1496-1512.
- InfoStat (2018). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA
- Kapantaidaki, D. E., Sadikoglou, E., Tsakireli, D., Kampanis, V., Stavrakaki, M., Schorn, C., & Skavdis, G. (2018). Insecticide resistance in *Trialeurodes vaporariorum* populations and novel diagnostics for kdr mutations. *Pest management science*, 74(1), 59-69.
- Kennedy, G. G. (2003). Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual review of entomology*, 48(1), 51-72.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology*, 53(1), 299-328.

- Lee, S., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. (2019). Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. *Fungal ecology*, 37, 1-9.
- López, Y. I. Á., Martínez-Gallardo, N. A., Ramírez-Romero, R., López, M. G., Sánchez-Hernández, C., & Délano-Frier, J. P. (2012). Cross-kingdom effects of plant-plant signaling via volatile organic compounds emitted by tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infested by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Journal of chemical ecology*, 38(11), 1376-1386.
- Nasruddin, A., & Mound, L. A. (2016). First record of *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) severely damaging field grown potato crops in South Sulawesi, Indonesia. *Journal of plant protection research*, 56(2), 199-202.
- Ozawa, R., Arimura, G. I., Takabayashi, J., Shimoda, T., & Nishioka, T. (2000). Involvement of jasmonate-and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(4), 391-398.
- Pineda, A., Zheng, S. J., Van Loon, J. J., Pieterse, C. M., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in plant science*, 15(9), 507-514.
- Raad, M., Glare, T. R., Brochero, H. L., Müller, C., & Rostás, M. (2019). Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects. *Frontiers in microbiology*, 10, 615.
- Rodríguez-Saona, C. (2012). La ecología química de interacciones tri-tróficas. Temas selectos en Ecología química de insectos. *El colegio de la Frontera Sur, Tapachula*, 315-341.
- SAS Institute Inc (2019). SAS/ACCESS® 9.4 Interface to ADABAS: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Shapiro, S.S.; Francia, R.S. (1972). An approximate analysis of variance test for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 67: 215-216.
- Splivallo, R., Novero, M., Berteà, C. M., Bossi, S., & Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175(3), 417-424.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2, 29-47.

- Team, R. C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S., & Schnitzler, J. P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The plant journal*, 45(4), 540-560.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- Wainaina, J. M., De Barro, P., Kubatko, L., Kehoe, M. A., Harvey, J., Karanja, D., & Boykin, L. M. (2018). Global phylogenetic relationships, population structure and gene flow estimation of *Trialeurodes vaporariorum* (Greenhouse whitefly). *Bulletin of entomological research*, 108(1), 5-13.
- Wang, R., Li, Y., Dong, J. L., & Ding, W. L. (2018). First report of tomato yellow Leaf curl virus and cucumber mosaic virus infecting Huoxiang (*Agastache rugosa*) in CHINA. *Journal of Plant Pathology*, 100(3), 581-581.
- Wei, K. K., Jie, L. I., Ding, T. B., Llu, T. X., & Dong, C. H. U. (2019). Transmission characteristics of Tomato chlorosis virus (ToCV) by *Bemisia tabaci* MED and its effects on host preference of vector whitefly. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 2107-2114.
- Wonglom, P., Ito, S. I., & Sunpapao, A. (2020). Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*).

## 3. Recomendaciones

### 3.1 Recomendaciones

Caracterizar a nivel molecular la expresión de genes marcadores asociados a vías de resistencia de la planta, con el fin de profundizar sobre los mecanismos de acción de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Tanto en el modelo planta-patógeno-COVs y planta-insecto-COVs. De igual manera, también evaluando el modelo planta-patógeno-insecto-COVs.

Evaluar individualmente dosis y frecuencias de aplicación de los compuestos asociados presuntivamente al control de la enfermedad y del insecto.

Confirmar la identificación de los compuestos volátiles emitidos por las cepas con potencial para el control biológico de la mosca blanca de los invernaderos, por medio de la comparación de los espectros de masas de los compuestos colectados y su estándar comercial.

Conocer el perfil de COVs emitidos por la planta antes y después de ser tratadas con los COVs de *Trichoderma* spp. para poder determinar la actividad de estos compuestos en el cambio de emisión de volátiles de la planta y entender el comportamiento de oviposición de la mosca blanca.

Una vez confirmados los compuestos, se recomienda realizar la evaluación del potencial biocontrolador de estos compuestos solos y en combinación. Identificando inicialmente los compuestos que son detectados por el insecto mediante su respuesta antenal en electro-antenógrafo acoplado a cromatografía gases (EAG-GC), los compuestos allí seleccionados pasan a evaluación de concentración y proporciones bajo condiciones controladas de túnel de viento.

Preparar y evaluar una mezcla de compuestos C8 para su evaluación como controladores de la oviposición de *Trialeurodes vaporariorum* en tomate.