

COMPATIBILIDAD DE LOS BIOPLAGUICIDAS *CLIBADIUM SYLVESTRE* Y *TRICHODERMA HARZIANUM* COMO ALTERNATIVA EN EL CONTROL ECOLÓGICO DE PLAGAS

José AZABACHE

Centro de Tecnologías Ambientales.

SENATI, Lima, Perú.

josecaaa@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7389-5322>

José IANNAONE

Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

Jose.iannacone@urp.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0003-3699-4732>

RESUMEN

Clibadium sylvestre es una planta que en algunas zonas de la Amazonía es empleada en la pesca artesanal. *Trichoderma harzianum* es un biocontrolador de hongos y de nematodos fitopatógenos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre* sobre el crecimiento de *T. harzianum* para determinar la compatibilidad entre ambos bioplaguicidas. De *C. sylvestre* procedente del departamento de San Martín, Perú se obtuvieron las semillas, fueron secadas a 40°C por 48 h de exposición, pulverizadas, y sometidas a extracción con etanol al 70%, y finalmente el producto obtenido fue decantado y filtrado. Los bioensayos con *T. harzianum* se realizaron en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) con el extracto etanólico de *C. sylvestre* a 125 a 1000 mg·L⁻¹. Se sembró el micelio de *T. harzianum* en la parte central de cada placa de Petri con ASD, se incubó a temperatura ambiente realizando mediciones del diámetro de la colonia cada 12 h. Los parámetros evaluados en *T. harzianum* fueron el diámetro de la colonia (mm) hasta 84 h y la velocidad de crecimiento (mm·h⁻¹) hasta de 100 mm de diámetro. El diámetro de la colonia y la velocidad de crecimiento fueron diferentes al control, lo que indica que el extracto etanólico de *C. sylvestre* actúa como un inhibidor de *T. harzianum*. Se concluye que ambos bioplaguicidas no son compatibles para ser empleados en conjunto en el manejo ecológico de plagas.

PALABRAS CLAVES

Bioplaguicidas, *Clibadium sylvestre*, compatibilidad, extracto etanólico, *Trichoderma harzianum*

COMPATIBILITY OF BIOPLAGUICIDES *CLIBADIUM SYLVESTRE* AND *TRICHODERMA HARZIANUM* AS AN ALTERNATIVE IN ECOLOGICAL CONTROL OF PLAGUE

ABSTRACT

Clibadium sylvestre is a plant that in some areas of the Amazon is used in artisanal fishing. *Trichoderma harzianum* is a biocontroller of fungi and phytopathogenic nematodes. The objective of this research was to evaluate the effect of the ethanolic extract of *C. sylvestre* seeds on the growth of *T. harzianum* to determine the compatibility between both biopesticides. The seeds were obtained from *C. sylvestre* from the department of San Martín, Peru, dried at 40°C for 48 h of exposure, pulverized, and subjected to extraction with 70% ethanol, and finally the product obtained was decanted and filtered. The bioassays with *T. harzianum* were carried out on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) with the ethanolic extract of *C. sylvestre* at 125 to 1000 mg·L⁻¹. *T. harzianum* mycelium was seeded in the central part of each Petri dish with SDA, incubated at room temperature, measuring the diameter of the colony every 12 h. The parameters evaluated in *T. harzianum* were colony diameter (mm) up to 84 h and growth speed (mm·h⁻¹) up to 100 mm in diameter. The colony diameter and growth speed were different from the control, indicating that the ethanolic extract of *C. sylvestre* acts as an inhibitor of *T. harzianum*. It is concluded that both biopesticides are not compatible to be used together in ecological pest management.

KEYWORDS

Biopesticides, *Clibadium sylvestre*, compatibility, ethanolic extract, *Trichoderma harzianum*

Recibido: 10/05/2023

Aprobado: 22/08/2023

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos amazónicos poseen propiedades útiles en el control de organismos plagas de cultivos agrícolas (Gonçalves-Spletzer *et al.*, 2021). La Agri-Food Canadá y la Agencia de Protección Ambiental de los estados Unidos (USEPA) indican que más de doscientos agentes biopesticidas microbianos se venden en los Estados Unidos (Kabulak & Gazdik, 2005). El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza de Costa Rica hace referencia que algunos de estos tipos de bioplaguicidas son derivados de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915, de hongos, y de plantas (CATIE, 2004). En el Perú, se promociona el uso de los bioplaguicidas, y la producción y comercialización de controladores biológicos a base de insectos benéficos, hongos y virus entomopatógenos (SENASA, 2016).

Dentro de los bioplaguicidas se tienen a los extractos de las plantas del género *Clibadium* (Bracho-Pérez *et al.*, 2019). En *Clibadium sylvestre* (Aubl.) Baill se han evaluado las alteraciones bioquímicas provocadas por el extracto hexánico de las hojas de en ratas (Negrão, 2010). De igual forma se ha evaluado la actividad antibactericida y antifúngica de setenta y cinco extractos crudos de partes aéreas de cuatro familias botánicas, y se resalta a *Clibadium funkize* H. Rob. por su actividad antifúngica contra *Fusarium solani* Mart. (Niño *et al.*, 2012). De igual forma se indica que las hojas de *C. sylvestre* es usado como un tóxico contra peces por los nativos sudamericanos (Dos Santos *et al.*, 2016). El extracto acuoso de *Clibadium surinamense* L. ocasiona en peces hiperactividad, nado agitado, aumento de los movimientos operculares, y pérdida de equilibrio (Johnston *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha determinado la bioactividad de los extractos acuosos en diversas plagas agrícolas (Cramer, 2010; Cerda *et al.*, 2019). Pérez (2011) determinó que el extracto etanólico de las semillas de *Clibadium peruvianum* Poepp. ex DC. presentó actividad insecticida sobre *Musca domestica* Linnaeus, 1758.

Otro agente bioplaguicida son los hongos del género *Trichoderma*, que comprende varias especies con actividad antagónica frente a los hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica (Sudakin, 2003; Siewert, 2021; Shalaby *et al.*, 2022; Zehra *et al.*, 2023). Chakraborty & Chatterjee (2008) confrontaron cinco especies de *Trichoderma* contra el hongo patógeno *F. solani*. *Trichoderma harzianum* Rifai, 1969 ha ocasionado inhibición en el crecimiento de hongos patógenos mediante el micoparasitismo (Guo *et al.*, 2022; Shalaby *et al.*, 2022; Villa-Rodriguez *et al.*, 2022). En adición, se han determinado que *T. harzianum* y *Trichoderma viride* (Pers.) fueron más eficientes en la disminución de la población de hongos patógenos, bajo condiciones de campo (Geng *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2022; Zehra *et al.*, 2023).

Las cepas de *T. harzianum* y *T. viride*, presentan capacidad antagónica por su alta velocidad de crecimiento (Geng *et al.*, 2022; Shalaby *et al.*, 2022; Zehra *et al.*, 2023), e inhiben el crecimiento de hongos como *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *A. flavus* Link, *A. niger* Tieghem, *Mucor petrinsularis* Naumov y *Rhizopus cohnii* Berl. & De Toni, y de bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Borrero & Silva, 2005).

Trichoderma no perjudica a la microflora propia de las raíces vegetales, y por el contrario estimula el incremento de las poblaciones de fijadores del nitrógeno como *Azotobacter* sp., incrementa la masa fresca de la planta, la altura y diámetro del tallo en cultivos de tomate, y maracuyá (González *et al.*, 1999; Cubillos, 2009). Se ha determinado que la aplicación de *T. harzianum* en los primeros estados de los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), pepino (*Cucumis sativus* Mill.) y pimiento (*Capsicum annumm* L.) influye en el aumento del sistema radicular, de la parte aérea y mayor protección frente al estrés del trasplante (Galeano *et al.*, 2002). Finalmente, se ha observado que la aplicación de una cepa de *T. harzianum* ocasiona un incremento en la biomasa en cultivo del arroz (Pérez *et al.*, 2009).

Con respecto a la compatibilidad de los extractos vegetales con *Trichoderma*, y organismos relacionados como los hongos filamentosos, se ha analizado lo señalado por Verástegui (1995), quien analizó el efecto antifúngico de veinte extractos de plantas. Alvarado *et al.* (2011) evaluaron *in vitro* la compatibilidad de los extractos etanólicos del orégano silvestre (*Lippia origanoides* Kunth), neem (*Azadirachta indica* A.Juss.), con el empleo de *T. harzianum*.

En el Perú, existen decenas de especies vegetales con propiedades para el control de plagas de los cultivos agrícolas, y que pueden ser la base para una nueva industria de plaguicidas naturales como el barbasco (*Lonchocarpus nicou* (Aubl.)), muña andina (*Minthostachys mollis* Griseb), molle (*Schinus molle* Linn.), neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), huaca (*Clibadium* sp.), entre otras (Pérez, 2011; Bracho-Pérez *et al.*, 2019).

Considerando que el Perú, cuenta con una importante biodiversidad y un gran potencial en la agricultura orgánica, es necesario disponer de conocimientos acerca de los principios activos que poseen las especies vegetales para aplicarlos en el control biológico de plagas y de esta manera contribuir al desarrollo de la agricultura orgánica (Bracho-Pérez *et al.*, 2019). Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la compatibilidad entre los bioplaguicidas *C. sylvestre*, y *T. harzianum* como alternativas en el control ecológico de plagas agrícolas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las semillas de *C. sylvestre* fueron obtenidas a partir de un espécimen recolectado del distrito de Juanjuí, provincia de Mariscal Cáceres, departamento de San Martín, Perú. Esta área se localiza a orillas del río Huallaga entre los 250 msnm y los 350 msnm (07°11'04" LS; 76°43'40" LO). Posteriormente, el espécimen botánico fue identificado por taxónomos especialistas. El hongo *T. harzianum* fue adquirido de la sub dirección de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria de Perú (SENASA), Lima, Perú.

Clibadium sylvestre

Las semillas del *C. sylvestre* fueron trasladadas al Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú. Con la finalidad de eliminar la humedad de las semillas se secaron en una estufa a 40°C durante 48 h, y luego empleando un mortero fueron pulverizadas. El material pulverizado fue sometido a un proceso de extracción sólido-líquido con etanol al 70% (Pérez, 2011). La solución se almacenó en un lugar fresco y oscuro dejando que se macere por 15 días. Culminado el proceso de maceración, la solución fue decantada para separar la fase líquida sobrenadante, y se refrigeró a una temperatura de 4°C durante 24 h. Los extractos fueron filtrados con papel Whatman® n°1. Se tomaron alícuotas de 10 mL del extracto obtenido, se trasvasó a un vaso de precipitado de 50 mL, y se sometió a calentamiento a una temperatura de 105°C. Posteriormente, se colocaron los residuos sólidos secos en una campana desecadora por 24 h para su enfriamiento y obtener lecturas de masa constante.

Composición química cualitativa del extracto etanólico de semillas de C. sylvestre
Se determinaron los siguientes parámetros fitoquímicos:

Azúcares reductores: mediante el ensayo de Fehling (Pereira *et al.*, 2009).

Compuestos fenólicos: mediante el reactivo Tricloruro Férrico (Fe₃Cl) 1% (Coy *et al.*, 2014).

Alcaloides: mediante el reactivo de Dragendorff (Coy *et al.*, 2014).

Flavonoides: mediante el ensayo de Shinoda (Pereira *et al.*, 2009).

Azúcares totales: mediante reactivo de Molish (Pereira *et al.*, 2009).

Bioensayos con T. harzianum frente el extracto etanólico de semillas de C. sylvestre

Se preparó el Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) al 4% en seis matraces conteniendo 100 mL del medio, se esterilizó en autoclave y se enfrió a 45°C aproximadamente. Luego a cinco matraces se le adicionó residuos sólidos secos (RS) del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre* para obtener una concentración final de 125, 250, 500 y 1.000 mg·L⁻¹. Al matraz restante no se le agregó residuos sólidos secos del extracto a fin de utilizarlo como control (0 mg·L⁻¹), posteriormente el medio de cultivo se homogenizó con los residuos sólidos secos y fue vertido en placas de Petri estériles.

Siembra e incubación de cultivos

A partir del cultivo reactivado de *T. harzianum*, mediante transferencia directa, se sembró una porción de micelio en la parte central de la placa de Petri conteniendo ASD (4%) y sus correspondientes concentraciones de los extractos etanólicos de *C. sylvestre*. Todas las placas fueron incubadas a temperatura ambiental (~23°C) durante 10 días.

Lectura

Se realizó midiendo el diámetro de crecimiento (mm) de *T. harzianum* en diferentes direcciones, cada 12 h, con lo cual se obtuvo un diámetro

promedio de crecimiento de cada una de las concentraciones del extracto evaluado. El crecimiento de la colonia de *T. harzianum* a 0, 125, 250, 500 y 1.000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre* fue comparados a diferentes periodos de exposición. Posteriormente se determinaron los valores de velocidades de crecimiento, hasta que cada que el hongo alcanzó una colonia de un diámetro de 100 mm en cada tratamiento por un periodo de 204 h de exposición.

Análisis de datos

Se llevó a cabo utilizando el programa Minitab® versión 16,00. Los valores de crecimiento de la colonia y de velocidad de crecimiento de los tratamientos y del control fueron evaluados mediante Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA) y su respectivo análisis de comparación múltiple de Tukey. Los valores de velocidad de crecimiento (mm·h⁻¹) alcanzados por *T. harzianum* en cada uno de los tratamientos y en el control hasta que desarrolló una colonia de diámetro de 100 mm, se proyectaron en una gráfica del valor de diámetro (mm) vs tiempo (h) obteniendo una línea de tendencia y su respectiva ecuación de la recta. La velocidad de crecimiento está dada por el valor de la pendiente de la línea de tendencia.

Aspectos éticos: Los autores señalan que cumplieron todos los aspectos éticos nacionales e internacionales.

RESULTADOS

Como parte de la composición química del extracto de *C. sylvestre* se determinó cualitativamente la presencia de azúcares reductores, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y azúcares totales (Tabla 1).

Tabla 1. Composición cualitativa del extracto etanólico del extracto de *Clibadium sylvestre*.

Reacción	Principal metabolito	Resultado
Fehling	Azúcares reductores	Positivo
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	Positivo
Dragendorff	Alcaloides	Positivo
Shinoda	Flavonoides	Positivo
Molish	Azúcares totales	Positivo

En la figura 1, se muestra la gráfica de las curvas de crecimiento (mm) de *T. harzianum* a 0 (control), 125, 250, 500 y 1000 mg·L⁻¹. El comportamiento desarrollado para cada tratamiento y control, consideró dos periodos, uno de 84 h, tiempo en el cual se compararon estadísticamente los diámetros de crecimiento observándose una notoria diferencia entre la curva de crecimiento del control y las curvas de crecimiento desarrolladas en el resto ensayos. En

los casos de 500 y 1.000 mg·L⁻¹ no se evidenció crecimiento (Tablas 2 al 10). En la figura 2, se representa mediante un esquema de barras el porcentaje de crecimiento alcanzado por *T. harzianum* a las 84 h de exposición. Se consideró como referencia de 100% al crecimiento obtenido en el ensayo control (0 mg·L⁻¹), y a los 125 mg·L⁻¹ alcanzó crecimiento de 52,7%, y con 250 mg·L⁻¹ creció un 15,56%.

En la tabla 11 se muestra el tiempo en h requerido por *T. harzianum* para alcanzar una colonia de diámetro de 100 mm, a diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre*. El tratamiento a 500 mg·L⁻¹ requirió de 204 h, para alcanzar el máximo crecimiento micelial. Los valores de velocidad de crecimiento (mm·h⁻¹) indican los tratamientos que son estadísticamente diferentes respecto a la velocidad del control y entre sí (Tabla 12).

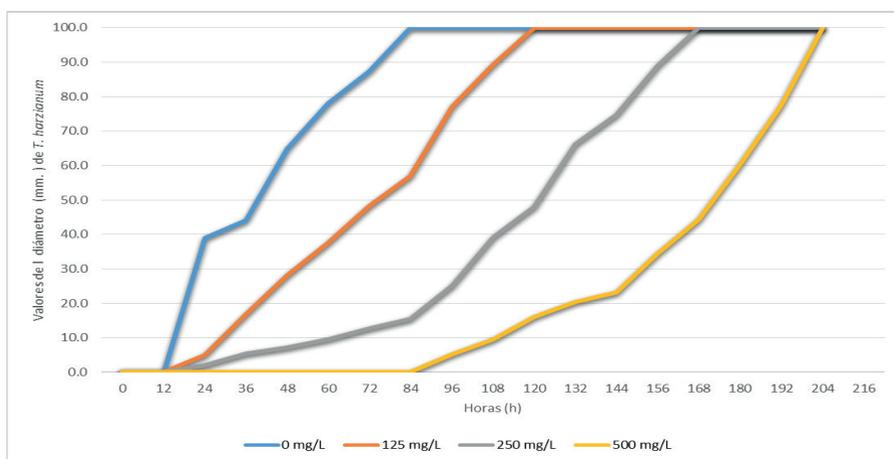


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Trichoderma harzianum* a cuatro diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Clibadium sylvestre*.

Tabla 2. Valores de P del estadístico F del ANOVA a periodos de evaluación de cada 12 h de exposición, en el que se midió el crecimiento de la colonia de *Trichoderma harzianum*. Se muestra información de datos hasta las 204 h de exposición, tiempo en el cual el bioensayo a concentración de 500 mg·L⁻¹ desarrolló una colonia de diámetro de 100 mm. *No determinado, pues los valores de diámetro de colonia de cuatro tratamientos tienen el mismo valor 100 mm.

Tiempo (h)	Valor P
24	0,005
36	0,001
48	0,000
60	0,000
72	0,000

(Continúa Tabla 2)

(Continúa Tabla 2)

84	0,000
96	0,000
108	0,000
120	0,000
132	0,000
144	0,000
156	0,000
168	0,000
180	0,000
192	0,000
204	*

Tabla 3. Estadístico F del ANOVA a periodos de cada 12 h de exposición, tiempo en que se midió el crecimiento de la colonia de *T. harzianum*. Se muestra información hasta las 204 h de exposición, tiempo en el cual el bioensayo a una concentración de 500 mg·L⁻¹ desarrolló una colonia de diámetro de 100 mm. *No determinado pues los valores de diámetro de colonia de cuatro tratamientos tienen el mismo valor 100 mm. Fc = F calculado. Ft= F tabulado.

Tiempo de exposición (h)	Valores	
	Fc*	Ft**
24	7,29	
36	10,99	
48	19,09	
60	36,48	
72	40,73	
84	346,82	
96	169,65	
108	105,61	
120	79,67	3,47
132	71,63	
144	75,36	
156	84,18	
168	113,36	
180	112,06	
192	113,36	
204	***	

Tabla 4. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 24, 36 y 48 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1.000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg·L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)		
	24 h	36 h	48 h
0	38,89a	44,10a	64,78a
125	5,00b	16,87b	28,11b
250	2,11b	5,33c	7,11c
500	0,00b	0,00c	0,00c
1000	0,00b	0,00c	0,00c

Tabla 5. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 60 y 72 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1.000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg·L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)	
	60h	72h
0	78,00a	87,33a
125	37,50b	48,33b
250	9,50c	12,78c
500	0,00c	0,00d
1000	0,00c	0,00d

Tabla 6. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 84 y 96 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1 000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg·L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)	
	84 h	96 h
0	100,00a	100,00a
125	57,00b	77,00b
250	15,56c	25,22c
500	0,00d	5,19d
1000	0,00d	0,00d

Tabla 7. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 108, 120 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1 000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg·L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)	
	108 h	120 h
0	100,00a	100,00a
125	89,22a	100,00a
250	39,11b	48,11b
500	9,57c	16,00c
1000	0,00d	0,00d

Tabla 8. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 132 y 144 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1.000 mg•L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg•L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)	
	132 h	144h
0	100,00a	100,00a
125	100,00a	100,00a
250	66,22b	74,67b
500	20,47c	23,22c
1000	0,00d	0,00d

Tabla 9. Diámetros de las colonias (mm) de *Trichoderma harzianum* a 156, 168, 180, 192 y 204 h de exposición a 0, 125, 250, 500 y 1.000 mg•L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Resultados a base de tres réplicas. Medias que no comparten una letra minúscula en una misma fila son significativamente diferentes según Tukey al 95%.

Concentración del extracto (mg•L ⁻¹)	Diámetro de la colonia (mm)				
	156 h	168 h	180 h	192h	204h
0	100a	100a	100a	100a	100,00a
125	100a	100a	100a	100a	100,00a
250	89a	100a	100a	100a	100,00a
500	34,44b	44,33b	60,57b	77,67b	100,00a
1000	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00b

Tabla 10. Tiempos en horas requerido por *Trichoderma harzianum*, a diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*, para alcanzar una colonia de diámetro de 100 mm. *ND: No determinado, el hongo no desarrolló.

Concentración del extracto (mg•L ⁻¹)	Tiempo(h)
0	84
125	120
250	168
500	204
1.000	ND*

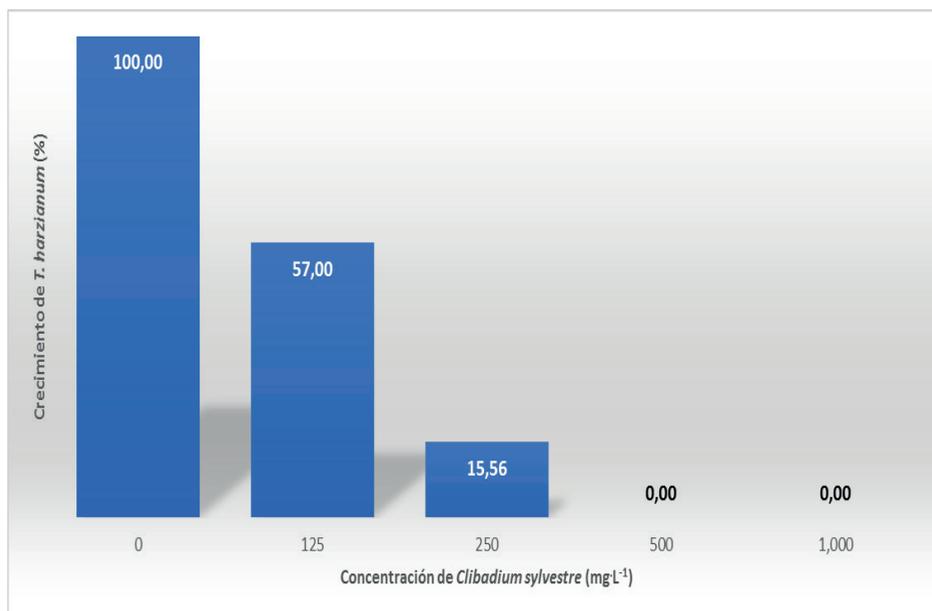


Figura 2. Comparación en porcentaje (%) del crecimiento de la colonia de *Trichoderma harzianum* desarrollado a 0 (control), 125, 250, 500, 1.000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre* a 84 h de exposición.

Tabla 11. Velocidad de crecimiento (mm·h⁻¹) de *Trichoderma harzianum* a 0 (control), 125, 250, 500, 1.000 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *Clibadium sylvestre*. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Tukey al 95%

Concentración del extracto (mg·L ⁻¹)	Velocidad media (mm·h ⁻¹)
0	1,26a
125	0,88b
250	0,60c
500	0,40d
1 000	0,00e

DISCUSIÓN

Bajo condiciones de laboratorio y en un tiempo de 84 h de exposición, el extracto etanólico de *C. sylvestre* a una concentración de 125 mg·L⁻¹ inhibe el crecimiento de *T. harzianum* en un 43%, razón por la cual se sugiere que el empleo de ambos bioplaguicidas de forma simultánea no es compatible.

La marcha fitoquímica del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre* identificó sustancias con propiedades biocidas como compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, y azúcares reductores. El contenido de flavonoides

y derivados forman parte del perfil fitoquímico de especies del género *Clibadium* sp. (Arriagada, 1993). En el análisis fitoquímico de plantas medicinales peruanas se ha obtenido que los alcaloides y flavonoides están presentes en la composición del extracto de *C. sylvestre* (Bussmann *et al.*, 2009).

Se ha identificado como parte del extracto acuoso de las hojas de *C. surinamense* a alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides y saponinas; además de aceites esenciales-grasas, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, aminas y aminoácidos y glicósidos cardiotónicos (Rodríguez & Ríos, 2013). A partir de extractos de *Clibadium* sp. se ha determinado los perfiles cromatográficos y espectrofotométricos ultravioleta-visible, encontrando el compuesto fenólico fluoroglucinol, el flavonoide quercetina y el alcaloide harmalina (Fuertes *et al.*, 2010). Mediante el análisis de cromatografía Gas-Espectrometría de Masas (CG-EM) del extracto etanólico de semillas de *C. peruvianum* se ha descrito la presencia de compuestos fenólicos y derivados tales como ésteres y ácidos grasos (Pérez, 2011).

En la marcha fitoquímica de hojas y frutos de *C. sylvestre* existen azúcares reductores, flavonoides, alcaloides, y compuestos fenólicos como las lactonas (Cramer, 2010). Estos resultados encontrados en la literatura coinciden con la marcha fitoquímica cualitativa realizada al extracto etanólico de las semillas de *C. sylvestre*, el cual a concentraciones de 125 a 1.000 mg·L⁻¹, ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *T. harzianum*, tal como se evidencia en el crecimiento de la colonia (mm) y en la velocidad de crecimiento (mm·h⁻¹) del hongo. En cada uno de los tratamientos con los extractos etanólicos de las semillas de *C. sylvestre* a concentraciones crecientes, *T. harzianum* desarrolló una curva de crecimiento en particular. Para el control (0 mg·L⁻¹), a 84 h de exposición, completó una colonia con un diámetro de 100 mm.

Según Panikov (1995) un microorganismo como *Trichoderma* sp. alcanza una tasa de extensión lineal de la colonia de 0,5 a 2 mm por hora. Domínguez (2012) en su caracterización y evaluación de aislados de *Trichoderma* spp., encontró que uno de sus aislados alcanzó un crecimiento de 75,7 mm en 168 h, este último valor es menor al encontrado en el presente estudio, y esta diferencia se explicaría porque el hongo *T. harzianum* empleado proviene de un producto constituido por un cultivo puro en el que se ha seleccionado y priorizado la presencia de una cepa con determinadas características entre ellas el rápido crecimiento, que le permite competir por espacio y nutrientes, toda vez que el producto está destinado para el control de hongos fitopatógenos.

La relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre* y el diámetro de la colonia de *T. harzianum* se explica debido a que los extractos de vegetales están conformados por diferentes componentes bioactivos que en muchas ocasiones los efectos de estos componentes son el resultado de la sinergia entre dos o más de estas sustancias (Bergeron *et al.*, 1996).

En los compuestos fenólicos se conocen que existen de dos tipos, solubles y no solubles, dentro de los fenoles no solubles se incluyen a taninos, ligninas, ácido fenil propanoico, y como parte de los fenoles solubles tenemos ácidos fenólicos, flavonoides, quininas (Rispaill *et al.*, 2005). Los ácidos fenólicos están relacionados con la defensa de plantas deterioradas contra los patógenos; y otros como los flavonoides, glicósidos, cumarinas así como antroquinonas poseen propiedades antifúngicas. Así mismo indica que los metabolitos secundarios de las plantas como los alcaloides, compuestos fenólicos (flavonoides, isoflavonoides, antrocianinas) y terpenoides pueden interferir con el sistema de transportadores ABC en bacterias y hongos. Los compuestos fenólicos polares como ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas, xantonas, estilbenos, antrocianinas, taninos, antroquinonas y naftoquinonas evidencian inhibición de proteínas formando enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos que ocasionan una alteración en la estructura 3D de las proteínas transportadoras (Olusegun & Oluyemisi, 2013).

indican que el aceite esencial de la hoja de *Clibadium leiocarpum* Steetz presenta una ligera actividad citotóxica *in vitro* contra células MDA-MB-231 y contra *Bacillus cereus* Frankland & Frankland 1887, pudiendo esta actividad biológica atribuirse al principal componente de su aceite esencial (Washington *et al.*, 2013).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la fracción insoluble del extracto de *C. surinamense* a 72 h de exposición para *Trichophyton rubrum* Malmsten, 1845, obtuvo un valor de 0,25 mg·mL⁻¹ y la CMI para *T. mentagrophytes* fue de 0,5 mg·mL⁻¹ (Rodríguez & Ríos, 2013). Los resultados sugieren que las concentraciones de 250 y 500 mg·L⁻¹ de los extractos etanólicos de *C. sylvestre* evaluados consideran que los dermatofitos al igual que *T. harzianum* son hongos filamentosos.

Respecto a los flavonoides, se relacionan como agentes antimicrobianos y citotóxicos (Wink & El-Readi, 2012). La capacidad antioxidante de los flavonoides podría ejercer actividades moduladoras en las células actuando principalmente en proteínas quininas estas interacciones podrían desencadenar resultados impredecibles, dependiendo del tipo de célula, ciclo celular, y el tipo de estímulo aplicado (Kyselova, 2011). El amplio rango de bioactividades de los flavonoides es atribuida a su capacidad para ejercer efectos como antioxidantes, degradador de radicales libres, y quelante de cationes divalentes. Los flavonoides presentan capacidad para inhibir una variedad de enzimas similares a las hidrolasas, hialuronidasas, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa, fosfodiesterasa cAMP, lipasa, alfa-glucosidasa, y quinasa (Sandhar *et al.*, 2011). Cowan (1999) menciona que los taninos presentes en las células de las plantas son potentes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas y enzimas pectolíticas usadas por los patógenos de plantas.

En cuanto a los alcaloides, compuestos nitrogenados heterocíclicos, actúan protegiendo a la planta contra microorganismos además de ocasionando intercalación de los constituyentes de la pared celular y/o constituyente del ADN (Bergeron *et al.*, 1996).

A concentraciones de 125, 250 y 500 mg·L⁻¹ del extracto etanólico de semillas de *C. sylvestre*, se evidenció que *T. harzianum* es capaz de crecer y alcanzar una colonia de 100 mm de diámetro, pero en 120, 168, 204 h, respectivamente. Se ha identificado que los valores de velocidades de crecimiento de *T. harzianum* también son diferentes estadísticamente, los valores de velocidad de crecimiento de *T. harzianum* se relacionan con su capacidad de sintetizar gran cantidad de enzimas inducibles, tolerar condiciones ambientales extremas y sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos (Guilcapi, 2009).

El valor de la velocidad de crecimiento del control (0 mg·L⁻¹) concuerda con los señalado por Deacon (1990) para *T. viride* que presenta tasa de crecimiento 25 mm/ 24 h en medio con agar; además de tolerar productos metabólicos secundarios de otros microorganismos.

El crecimiento micelio de *T. harzianum* alcanzó su máxima inhibición con *Allium sativum* L. a 27,18 % y con *Melia azedarach* L. a 30 %, concentraciones equivalentes a las empleadas en la presente investigación; así mismo refiere que pocas plantas son compatibles con el crecimiento de *T. harzianum* (Sharma & Chandel, 2016).

Trichoderma spp. es uno de los microorganismos que obtuvo mayor resistencia a herbicidas, fungicidas, pesticidas, y metales pesados tóxicos a Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) de 125–850 mg·L⁻¹. Esta tolerancia está mediada por la cantidad de enzimas degradadoras de polímeros tales como la quitina o los glucanos, entre otras (Baytak *et al.*, 2005).

Trichoderma tiene la capacidad de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina, celulosa entre otros y emplearlos para su crecimiento gracias a su gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasa, quitinasas entre otras) así mismo menciona que, este hongo asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfito de amonio (Guo *et al.*, 2022; Zehra *et al.*, 2023).

Considerando esta capacidad enzimática, las especies de *Trichoderma* pueden potencialmente contribuir en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes depositados en el suelo. Varias especies del género *Trichoderma* son capaces de degradar plaguicidas, y estas sustancias pueden estimular o inhibir el crecimiento de especies de *Trichoderma* (Das *et al.*, 2003).

Más aún, *T. viride* contribuye en la degradación del herbicida triflurina (concentración inicial: 1 mg·L⁻¹) en más del 90 % en aproximadamente 10 días (Argumendo *et al.*, 2009). Estos autores indican que el herbicida arvadex (concentración inicial: 2,5 mg·L⁻¹) es degradado por *T. harzianum*. La mayoría de los plaguicidas organoclorados como el DDT, el dieldrin y el endosulfán, son persistentes en la naturaleza y presentan alta toxicidad. No obstante, se ha documentado que *Trichoderma* es capaz de degradar estos tres plaguicidas (Snedeker, 2001).

Los resultados nos permiten enunciar que las concentraciones de los extractos etanólico de semillas de *C. sylvestre* no son compatibles con el crecimiento micelial de *T. harzianum*; sin embargo, considerando un tiempo de 84 h, podemos sugerir que las concentraciones de 125 y 250 mg·L⁻¹ inhiben parcialmente el crecimiento del hongo en un 43% y 84,44%, respectivamente mientras que a las concentraciones de 500 y 1 000 mg·L⁻¹, la inhibición es total.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, S., Ulacio, D., Sanabria, M., & Jiménez, M. (2011). Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Sclerotium cepivorum* Berk. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 45, 217-343.
- Argumendo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). Revisión del género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25, 257-269.
- Arriagada, J. (1993). Notas sobre las relaciones genéricas de *Clibadium* L. (Compositae, Heliantheae) *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 18, 465-468.
- Baytak, S., Turker, A.R., & Cevrimli, B.S. 2005. Application of silica gel 60 loaded with *Aspergillus niger* as a solid phase extractor for the separation/preconcentration of chromium(III), copper(II), zinc(II), and cadmium(II). *Journal of Separation Science*, 28, 2482–2488.
- Bergeron, C., Marston, A., Gauthier, R., & Hostettmann, K. (1996). Screening of plants used by North American Indians for antifungal, bactericidal, larvicidal and molluscicidal activities. *International Journal of Pharmacognosy*, 34, 233–242.
- Borrero, C., & Silva, H. (2005). Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del piedemonte llanero. *Orinoquia*, 9, 6-14.
- Bracho-Pérez, J., Tacza-Valverde, I., & Vásquez-Castro, J. (2019). Biopesticidas botánicos de origen peruano para el desarrollo sostenible y la protección del ambiente. *Peruvian Journal of Agronomy*, 3, 126–133.
- Bussmann, R., Glen, A., Meyer, K., Rothrock, A., & Townesmith, A. (2009). Phyto-Chemical analysis of peruvian medicinal plants. *Arnaldoa*, 16, 105–110.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). (2004). *International Symposium on Biopesticides for Developing Countries*. Turrialba.

- Cerda, H., Carpio, C., A. Ledezma-Carrizalez, C., Sánchez, J., Ramos, L., Muñoz-Shugulí, C., Andino, M., & Chiurato, M. (2019). Effects of aqueous extracts from amazon plants on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae) in laboratory, semifield, and field trials. *Journal of Insect Science*, 19, 1–9.
- Coy, C., Parra, J., & Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (ruteaceae). *Revista Elementos*, 4, 31-39.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*, 12, 564–582.
- Cubillos, J. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía colombiana*, 27, 81-86.
- Cramer, C. (2010). *Bioatividade de extratos aquosos das espécies Clibadium sylvestre (Aubl.) Baill e Derris amazônica Killip sobre o pulgão Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)*. (Tesis de maestría. Universidade Federal Rural Da Amazônia).
- Chakraborty, M.R., & Chatterjee, N.C. (2008). Control of *Fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biologia Plantarum*, 52, 582-586.
- Das, A.C., Chakravarty, A., Sukul, P., & Mukherjee, D. (2003). Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere*, 53, 1033-1037.
- Deacon, J. (1990). *Introducción a la micología moderna*. Ed. Limusa.
- Domínguez, C. (2012). *Caracterización y Evaluación de asilados de Trichoderma spp. para el control de la pudrición basal de la lechuga causada por Rhizoctonia spp. en la zona agrícola de Timotes, estado Mérida*. (Tesis para optar el grado de Magister Scientiarum en Agronomía, orientación Protección Vegetal. Universidad Central de Venezuela).
- Dos Santos, V., Santos, P., Malcher, C., Louenço, C., Trindade, G., & Souza, R. (2016). Anesthetic induction of the aqueous extract of cunambí, "*Clibadium Surinamense*" linn to perform biometrics in tambaquis, "*Colossoma macropomum*". *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 17, 291-298.
- Fuertes, C., Juradol, B., Gloria, C., Negrón, L., Nuñez, E., Esteban, M., & Távara, A. (2010). Estudio integral de plantas biocidas del algodónero. *Ciencia e Investigación*, 13, 34-41.
- Galeano, M., Méndez, F., & Urbaneja, A. (2002). Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. *Agrícola Vergel*, 251, 628-632.

- Geng, L., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Zhang, M., Song, Z., Guo, N., Chen, S., Chen, J., Bai, B., Liu, A., Ahammed, G.J. (2022). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Biological Control*, 174, 105019.
- Gonçalves-Spletozer, A., Rosa dos Santos, C. Araujo-Sanches, L., & Garlet, J. (2021). Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies Amazónicas. *Ciencia Forestal*, 31, 974-997.
- González, C., Puertas, A., Fonseca, M., Suárez, E., & Blaya, R. (1999). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. Aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16, 167-173.
- Guilcapi, E. (2009). *Efecto de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride, en la producción de plantas de café (Coffea arábica) variedad caturra a nivel de vivero*. (Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., & Peng, X. (2022). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, 20, 701.
- Johnston, G., Hanrahan, J., Chebib, M., Duke, R., & Mewett, K. (2006). Modulation of Ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Advances in Pharmacology*, 54, 303-304.
- Kabulak, T., & Gazdik, K. (2005). *Directory of microbial pesticides for agricultural crops in OECD countries*. Agriculture and Agri-food Canadá.
- Kyselova, Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdisciplinary Toxicology*, 4, 173-183.
- Negrão, R. (2010). *Estudio fitoquímico y evaluación de las alteraciones bioquímicas provocadas por convulsión inducida por el extracto hexánico de las hojas de Clibadium sylvestre en ratas (Wistar)*. (Tesis para optar el grado de Maestro en Química. Instituto de Ciencias Exactas). Universidad Federal del Pará.
- Niño, J., Mosquera, O.M., & Correa, Y. (2012). Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. *Revista de Biología Tropical*, 60, 1535-1542.
- Olusegun, V., & Oluyemisi, A. (2013). Antifungal property of selected nigerian medicinal plants. In Razzaghi M. & Mahendra A. (Eds). *Antifungal Metabolites from Plants*. (pp. 59-78). Springer Verland.
- Panikov, N. (1995). *Microbial growth kinetics*. Chapman & Hall.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., & Morales, C. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Revista Química Viva*, 3, 192-199.

- Pérez, G. (2011). *Estudio de las propiedades insecticidas de la planta "Huaca" (Clibadium peruvianum Poepp. Ex. DC) para el control de la mosca común (Musca domestica L.)*. (Tesis para optar grado de Ingeniero Ambiental. Facultad de Ciencias). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Pérez, E., Milanés, P., Rodríguez, N., García, G., Torres, O., Martínez, H., Viamontes, R., Tamayo, Y., Pérez, E., & Prada, J. (2009). Acción de *Trichoderma harzianum* Rifai en el incremento de biomasa en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Producción Animal*, 21, 127-130.
- Rispail, N., Morris, P., & Webb, K.J. (2005). *Phenolic compounds: extraction and analysis*. In: Marquez, A.J. (ed) Lotus Japonicus Handbook. (pp. 349-355).
- Rodríguez, C., & Ríos, M. (2013). *Actividad antimicótica in vitro del extracto acuoso liofilizado de las hojas de Clibadium surinamense L. (huaca)*. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Sandhar, H., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Sciences*, 1, 25-37.
- Shalaby, T.A., Taha, N., El-Beltagi, H.S. & El-Ramady, H. (2022). Combined Application of *Trichoderma harzianum* and Paclbutrazol to control root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* of tomato seedlings. *Agronomy*, 12, 3186.
- Sharma, M., & Chandel, S. (2016). In vitro evaluation of compatibility of indigenous *Trichoderma harzianum* with botanicals. *International Journal of Sciences, Environment and Technology*, 5, 1131-1136.
- SENASA. (2016). *Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú. Precios de Productos y Servicios*. www.senasa.gob.pe/senasa/precios-de-productos-y-de-servicios/
- Siewert, B. (2021). Does the chemistry of fungal pigments demand the existence of photoactivated defense strategies in basidiomycetes?. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 20, 475-488.
- Snedeker, S.M. (2001). Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environmental Health Perspectives*, 109, 35-47.
- Sudakin, D. L. (2003). Biopesticides. *Toxicological Reviews*, 22, 83-90.
- Verástegui, M. (1995). *Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas*. Tesis de grado de maestro en Ciencias. Facultad de Ciencias. División de Estudios de Postgrado. Universidad de Nuevo León.
- Villa-Rodríguez, E., Lugo-Enríquez, C., Ferguson, S., Parra-Cota, F.I., Cira-Chávez, L.A., & de los Santos-Villalobos, S. (2022). *Trichoderma harzianum* sensu lato TSM39: A wheat microbiome fungus that mitigates spot

- blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Biological Control*, 175, 105055.
- Washington, V., Agius, B., Palazzo, M., Haber, W., & Setzer, W. (2013). Chemical composition of the leaf essential oil of *Clibadium leiocarpum* from Monteverde, Costa Rica. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1, 43-45.
- Wink, A., & El-Readi, M. (2012). Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–15.
- Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M.K., Ansari, W.A., Meena, M., Swapnil, P., Upadhyay, R.S., Ali, M.A., Al-Ghamdi, A.A., & Lee, J. (2023). Enhanced protection of tomato against *Fusarium* wilt through biopriming with *Trichoderma harzianum*. *Journal of King Saud University – Science*, 35, 102466.