

## EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DUAL DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO DE *Capsicum chinense* Jacq.

### EFFECT OF THE DUAL INTERACTION OF *Trichoderma* SPECIES ON THE GROWTH OF *Capsicum chinense* Jacq.

Jairo **Cristóbal-Alejo**<sup>1</sup>, Felicia Amalia **Moo-Koh**<sup>1,2\*</sup>, José María **Tun-Súarez**<sup>1</sup>, Arturo **Reyes-Ramírez**<sup>1</sup>, Marcela **Gamboa-Angulo**<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/Campus Conkal. Avenida Tecnológico s/n. Conkal, Yucatán. 97345 México. <sup>2</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; Mérida, Yucatán. 97205 México.

\***Autor para correspondencia:** Felicia Amalia Moo Koh (famk22@hotmail.com)

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9346-1783>

#### RESUMEN

La interacción de especies bioestimulantes de *Trichoderma* puede tener beneficios para aumentar la producción de metabolitos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal. La combinación de dos organismos con mayor grado de antagonismo podría potenciar los efectos promotores del crecimiento en plantas. El objetivo del estudio fue seleccionar *in vitro* especies nativas de *Trichoderma* cultivadas de manera dual y evaluar su efecto promotor del crecimiento en *Capsicum chinense*. La selección de aislados *in vitro* se realizó por medio de enfrentamientos duales con las siguientes características: crecimiento proporcional de ambos aislados en la caja Petri, presencia de barrera micelial y coloración del medio de cultivo. Los enfrentamientos seleccionados y sus aislados individuales se evaluaron en plantas de *C. chinense* cv. Mayapan. Además, dos testigos sin inoculación fúngica, uno como testigo al 100% (250N-200P-300K) de la fertilización química recomendada para el cultivo; y el segundo como testigo al 50%, con la mitad de la fertilización indicada. Tres aplicaciones de suspensiones de 10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup> se realizaron en la etapa de almácigo y otras tres durante el crecimiento del cultivo. El efecto de los tratamientos se evaluó a través del crecimiento vegetal y la producción del cultivo a los 145 días después de la siembra. La interacción de *Trichoderma virens* (Th05-02)/*Trichoderma koningiopsis* (Th41-11) fue igual ( $p>0.05$ ) al testigo fertilizado al 100% en las variables evaluadas. Además, se obtuvieron incrementos del 14.53% en altura de la planta, 11.20% en diámetro del tallo, 28.54% en la biomasa seca aérea, 12.97% en biomasa seca de raíz, 33.13% en número de frutos y 25.77% en el peso de frutos, respecto al testigo con 50% de fertilización química. La interacción de las especies *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) ejerció un efecto promotor de crecimiento vegetal con

#### ABSTRACT

The interaction of biostimulant species of *Trichoderma* may have benefits to increase the production of metabolites involved in promoting plant growth; combining two organisms with a higher degree of antagonism could enhance their plant growth promoter effects. The objective of this study was to select *in vitro* native species of *Trichoderma* in a dual cultivation, and to evaluate their growth-promoting effect on *Capsicum chinense*. The selection of isolates *in vitro* was done by dual confrontations with the following characteristics: proportional growth of both isolates in the Petri dish; presence of mycelial barrier; and colour of the culture medium. The selected confrontations and their individual isolates were evaluated in plants of *C. chinense* cv. Mayapan. Also, two controls without fungal inoculation were assessed, one as control with 100% of the chemical fertilization (250N-200P-300K) recommended for the culture; and the second as control at 50%, with half of the indicated fertilization. Three applications of suspensions of 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> were made in the seedbed stage and another three during the growth of the culture. The effect of the treatments was evaluated through plant growth and crop production 145 days after sowing. The interaction of *Trichoderma virens* (Th05-02)/*Trichoderma koningiopsis* (Th41-11) was equal ( $p>0.05$ ) to the 100% fertilized control in the variables evaluated. In addition, increases of 14.53% were recorded in plant height, 11.20% in stem diameter, 28.54% in foliar dry biomass, 12.97% in dry root biomass, 33.13% in a number of fruits, and 25.77% in the weight of fruits, compared to the control with 50% chemical fertilization. The species interaction of *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) exerted a plant growth promoting effect with 50% reduction in the recommended chemical fertilization for habanero pepper cultivation.

Recibido: abril, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 681-693. 2021.

**Key words:** antagonism, *Capsicum chinense*, specific interactions, *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningiopsis*, inoculation.

la reducción del 50% de la fertilización química recomendada en el cultivo de chile habanero.

**Palabras clave:** antagonismo, *Capsicum chinense*, interacciones específicas, *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningiopsis*, inoculación.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de dos o más microorganismos bioestimulantes en cultivos hortícolas, beneficia la producción agrícola, este efecto se atribuye a sus interacciones sinérgicas. En este grupo de microorganismos, se encuentran hongos y bacterias de la rizosfera asociados con el sistema radical. Por ello, la respuesta de la planta a la inoculación combinada con este tipo de microorganismos depende de su capacidad para coexistir (Bansal *et al.*, 2021) en un ambiente donde las interacciones pueden ser de incompatibilidad (antagonismo) o compatibilidad (sinergismo).

Entre los hongos utilizados como bioestimulantes se encuentran especies de *Trichoderma* que en semillero o al momento del trasplante pueden mejorar la capacidad de la raíz para absorber nutrientes y con ello incrementar el crecimiento de las plantas y controlar fitoparásitos (Candelerio *et al.*, 2015).

Aislados nativos de *Trichoderma* spp., en *Capsicum chinense* (Candelerio *et al.*, 2015) y *Solanum lycopersicum* (Moo-Koh *et al.*, 2017) tiene una actividad promotora de crecimiento lo que fortalece la importancia de la aplicación de aislados nativos adaptados a las condiciones climáticas de los suelos de donde se aislaron.

Otros estudios muestran la importancia de inoculaciones duales o en consorcios de *Trichoderma*, capaces de potenciar y promover el crecimiento vegetal en comparación con inoculaciones individuales. En el primer caso se produce un estrés biológico, como consecuencia de la competencia por espacio y nutrientes. Lo anterior conduce a un incremento en la producción de compuestos fúngicos que impiden el crecimiento de otros aislados (antagonismo), hecho que resulta eficiente para la protección contra fitopatógenos, estrés ambiental y promoción en el crecimiento vegetal (Ortuño *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

El crecimiento dual *in vitro* de los aislados *T. harzianum* con *T. asperelloides* y *T. koningiopsis* y este último con *T. asperellum*, promovieron el crecimiento

## INTRODUCTION

The application of two or more bio-stimulant microorganisms in horticultural crops benefits agricultural production; such an effect is attributed to synergistic interactions. In this group of microorganisms, rhizosphere bacteria and fungi were found associated with the root system. Therefore, plant response to combined inoculation with bio-stimulant microorganism depends on their capacities to coexist (Bansal *et al.*, 2021) in an environment where interactions can be due to incompatibility (antagonism) or compatibility (synergism).

Among those fungi used as biostimulants there are some species of *Trichoderma*. On the seedbed or at the time of transplantation can improve root capacity to absorb nutrients, thereby increasing plant growth and controlling plant parasites (Candelerio *et al.*, 2015).

Native isolates of *Trichoderma* spp. in *Capsicum chinense* (Candelerio *et al.*, 2015) and *Solanum lycopersicum* (Moo-Koh *et al.*, 2017) are reported with growth promoting activity. This strengthens the importance of the application of native isolates adapted to the climatic conditions of the soils they were isolated from.

Other studies show the importance of dual or in consortium inoculations of *Trichoderma*, capable of enhancing and promoting plant growth compared to individual inoculations. In the first case, a biological stress occurs, as a consequence of competition for space and nutrients. Which leads to an increase in the production of fungal compounds that prevent the growth of other isolates (antagonism); a fact that is efficient for protection against phytopathogens, environmental stress and plant growth promotion (Ortuño *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

The dual *in vitro* growth of *T. harzianum* isolates with *T. asperelloides* and *T. koningiopsis* and the latter with *T. asperellum*, promoted the growth of lettuce and radish, and were associated with a higher production of indole-3-acetic acid (Ortuño *et al.*, 2017). Also, the dual combination of *T. koningiopsis* with *T. virens* improved tomato growth and decreased the damage of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Moo-Koh *et al.*, 2018). Therefore, the combination of two organisms with a higher degree of antagonism would enhance the bio-stimulant effects in plants. Based on the above, the objective of this study was to

de lechuga y rábano, y se asoció con mayor producción de ácido indol-3-acético (Ortuño *et al.*, 2017). También, la combinación dual de *T. koningiopsis* con *T. virens* mejoraron el crecimiento de tomate y disminuyeron el daño del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* (Moo-Koh *et al.*, 2018). Por lo tanto, la combinación de dos organismos con mayor grado de antagonismo podría potenciar los efectos bioestimulantes en las plantas. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue seleccionar *in vitro*, especies nativas de *Trichoderma* cultivadas de manera dual y evaluar su efecto promotor en el crecimiento de *C. chinense*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de *Trichoderma* spp.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, ubicado en el estado de Yucatán, México. Este laboratorio cuenta con una colección fúngica del estado de Yucatán, de la cual se obtuvieron siete aislados de especies de *Trichoderma* a partir de partículas lavadas, secadas y depositadas en cajas de Petri provistas de medio de cultivo; seis aislados se identificaron en otros estudios a nivel especie y un aislado se identificó en esta investigación (Cuadro 1).

Al aislado Th05-02 se le realizó identificación molecular, por medio de extracción de ADN de acuerdo con la metodología establecida en el laboratorio (Moo-Koh *et al.*, 2017). Los hongos se activaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), y se hizo crecer la cepa del hongo durante 3 d. Después, con ayuda de un portaobjeto estéril se obtuvo el micelio de la caja Petri y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL con solución

select *in vitro* native *Trichoderma* species, which were dual cultivated, to evaluate their promoting effect on the growth of *C. chinense*.

## MATERIALS AND METHODS

### Obtention of *Trichoderma* spp.

The study was carried out at the Plant Pathology Laboratory del Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, located in the state of Yucatan, Mexico. This laboratory guards a fungal collection from the state of Yucatan, from which seven isolates of *Trichoderma* species were obtained from particles washed, dried and deposited in Petri dishes provided with culture medium; six isolates were identified in other studies at the species level, and one isolate was identified in this study (Table 1).

Molecular identification was carried out on the Th05-02 isolate by DNA extraction according to the methodology established in the Laboratory (Moo-Koh *et al.*, 2017). Fungi were activated in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, and the fungus strain was grown for 3 d. Then, with the help of a sterile slide, the mycelium was obtained from the Petri dish and placed in a 2 mL microcentrifuge tube with lysis buffer solution of the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research) for DNA extraction.

The standard polymerase chain reaction (PCR) was used for DNA amplification; with the ITS1 and ITS4 primers, the ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified (White *et al.*, 1990). The final amplification products were sent to Macrogen USA for sequencing. The sequences obtained were analysed and compared with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using the Blast algorithm; the sequence of isolate Th05-02 was deposited in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Cuadro 1. Especies de *Trichoderma* aisladas de partículas de suelo en Yucatán, México.**

**Table 1. *Trichoderma* species isolates from soil particles in Yucatan, Mexico.**

Clave	Especie	Número de acceso al GenBank	Origen	Suelo <sup>†</sup>	Referencia
Th26-52	<i>T. ghanense</i>	MF078651	Tahdziú	1	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2017
Th02-01	<i>T. harzianum</i>	MF952887	Tizimín	1	Candellero <i>et al.</i> , 2015 Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th33-59	<i>T. harzianum</i>	MF078648	Ticul	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2017
Th41-11	<i>T. koningiopsis</i>	MF952888	Sanahcat	2	Candellero <i>et al.</i> , 2015
Th09-06	<i>T. simmonsii</i>	MF078647	Dzidzantun	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th27-08	<i>T. virens</i>	MF078646	Chacsinkín	2	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2018
Th05-02	<i>Trichoderma</i> sp.	MF952889	Dzilam González	2	Aislado en estudio

<sup>†</sup>Tipo de suelo 1: suelo agrícola, 2: suelo de selva primaria sin actividad agrícola. ♦ <sup>‡</sup>Soil type 1: agricultural soil, 2: primary forest soil without agricultural activity.

amortiguadora de lisis del Kit ZR Fungal/Bacterial DNA Mini-Prep™ (Zymo Research) para extracción de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional se utilizó para la amplificación del ADN; con los iniciadores ITS1 e ITS4 se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 (White *et al.*, 1990). Los productos finales de la amplificación se enviaron a la empresa Macrogen USA para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo de Blast; la secuencia del aislado Th05-02 se depositó en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Enfrentamiento dual *in vitro* de aislados de especies de *Trichoderma*

Los enfrentamientos duales se realizaron en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA. Un disco de micelio de 5 mm de diámetro, de cada aislado con 8 d de crecimiento se depositó en puntos equidistantes de la caja Petri. Con siete aislados de *Trichoderma* se generaron 21 enfrentamientos duales al azar con cuatro réplicas, con el cuidado de que no se repitan los enfrentamientos. Como testigos se utilizaron los aislados individuales sin enfrentamiento, los cultivos fúngicos se incubaron a 25 °C por 8 d. Para seleccionar los aislados fúngicos duales se consideró el crecimiento proporcional (50:50 en porcentaje) de ambos aislados en la caja Petri; la presencia de una barrera micelial con medida de 0.2 a 0.7 cm; y la coloración que indica maduración de la colonia al esporular en el medio de cultivo (Ortuño *et al.*, 2013).

### Efecto de la interacción dual de especies de *Trichoderma* en *C. chinense*

Los enfrentamientos duales seleccionados y sus aislados individuales se evaluaron en condiciones controladas con plantas de *C. chinense* cv. Mayapan. Primero, se prepararon suspensiones de conidios de cada enfrentamiento y sus aislados individuales a una concentración de  $10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>. Luego, en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato Cosmopeat® mezclado con Agrolita® (1:1, v:v), se inoculó 1 mL de solución con las suspensiones de conidios en cada cavidad. Tres inoculaciones en semillero se realizaron al momento de la siembra, a los 8 y 15 d después de la germinación. Después de 45 d de la siembra se procedió al trasplante, en bolsas negras con capacidad de 5 kg, se llenaron con suelo Luvisol ródico esterilizado por arrastre de vapor de agua durante 4 h. A los 15 y 30 d después del trasplante se hicieron aplicaciones con 50 mL de las suspensiones de conidios por bolsa, con la misma concentración utilizada en semillero.

### *In vitro* dual confrontation of *Trichoderma* species isolates

The dual confrontations were carried out in Petri dishes of 90 mm in diameter with PDA culture medium. A mycelium disc of 5 mm in diameter, of each isolate, with 8 d of growth, was deposited in equidistant points of the Petri dish. With seven isolates of *Trichoderma*, 21 random dual confrontations were generated with four replicates, observing not to repeat the confrontations. The individual isolates without confrontation were used as controls, the fungal cultures were incubated at 25 °C for 8 d. To select the dual fungal isolates, the proportional growth (50:50, %) of both isolates in the Petri dish was considered; as well as the presence of a mycelial barrier measuring 0.2 to 0.7 cm; and the coloration that indicates maturation of the colony when sporulating in the culture medium (Ortuño *et al.*, 2013).

### Effect of the dual interaction of *Trichoderma* species on *C. chinense*

The selected dual confrontations and their individual isolates were evaluated under controlled conditions with plants of *C. chinense* cv. Mayapan. First, suspensions of conidia from each confrontation and their individual isolates were prepared at a concentration of  $10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>.

Then, in 200-cavity polystyrene trays with Cosmopeat® substrate mixed with Agrolita® (1:1, v:v), 1 mL of solution was inoculated with the conidia suspensions in each cavity. Three inoculations in the seedbed were done at the time of sowing, at 8 and 15 d after germination. After 45 d of sowing, seedlings were transplanted in black bags with 5 kg capacity; bags were filled with soil Luvisol rhodic, sterilized by steam dragging for 4 h. At 15 and 30 d after transplantation, applications were made with 50 mL of the conidia suspensions per bag, at the same concentration used in the seedbed.

The treatments used consisted of four selected dual confrontations and their individual isolates. In addition, two controls without fungal inoculation were included, each one represented one treatment, with 20 plants per treatment and four replicates. Each replicate consisted of five plants as an experimental unit. The 100% control treatment was the recommended fertilization for the cultivation of *C. chinense*, corresponding to the formula 250N-200P-300K for a density of 20 000 plants ha<sup>-1</sup> and it was applied distributed in four phenological stages. The second control at 50% contained half of the recommended fertilization doses (125N-100P-150K). The dual confrontations previously selected *in vitro* and their individual isolates were mixed with 50% fertilization. Fertilization was balanced with commercial grade fertilizers: Urea (46-00-00), monoammonium phosphate (MAP, 12-61-00) and potassium nitrate (NKS, 13-2-44).

Los tratamientos utilizados consistieron en cuatro enfrentamientos duales seleccionados y sus aislados individuales. Además, se incluyeron dos testigos sin inoculación fúngica, cada uno representó un tratamiento, con 20 plantas por tratamiento y cuatro repeticiones. Cada repetición consistió en cinco plantas como unidad experimental. El testigo al 100% representó la fertilización recomendada para el cultivo de *C. chinense*, la cual correspondió con la fórmula 250N-200P-300K para una densidad de 20 000 plantas ha<sup>-1</sup> y se distribuyó en cuatro etapas fenológicas. El segundo testigo al 50% (125N-100P-150K) contenía la mitad de la fertilización recomendada. Los enfrentamientos duales seleccionados antes *in vitro* y sus aislados individuales se mezclaron con la fertilización al 50%. La fertilización se balanceó con los fertilizantes grado comercial: Urea (46-00-00), fosfato monoamónico (MAP, 12-61-00) y nitrato de potasio (NKS, 13-2-44).

#### VARIABLES DE CRECIMIENTO

Después de 145 d desde la siembra se midieron las variables de crecimiento: altura de planta (AP) y diámetro del tallo (DT). Para medir las variables biomasa seca aérea (BSA) y biomasa seca de raíz (BSR) se separó el material vegetal en parte aérea y raíz, se depositaron en un horno a 65 °C hasta peso constante. También se registraron variables de producción como número de frutos por planta y peso de frutos por planta. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar; con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y la comparación de medias se estimó por el método de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ) con el programa InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación del aislado nativo de *Trichoderma* (Th05-02)

La identificación morfológica del aislado Th05-02, correspondió al género *Trichoderma* de acuerdo con la observación de conidios en fialides y conidióforos, de color amarillo en medio de cultivo (Barnett y Hunter, 1998). Al analizar y comparar la secuencia obtenida del aislado Th05-02 con las secuencias del GenBank®, ésta correspondió a *T. virens* (número de acceso del GenBank®, MF952889) con un porcentaje de identidad del 100% y cobertura del 99%. Es importante identificar de manera molecular las especies de *Trichoderma* porque la identificación morfológica resulta insuficiente para distinguir entre especies, debido a la biología y a la similitud morfológica entre ellas (Moo-Koh *et al.*, 2017). Además, muchos

#### GROWTH VARIABLES

After 145 d from sowing, growth variables were measured: plant height: (AP) and stem diameter (DT). To measure the foliar dry biomass (BSA) and root dry biomass (BSR) variables, the plant material was separated in foliage and roots; both were placed in an oven at 65 °C until constant weight. Production variables such as number of fruits per plant and weight of fruits per plant were also recorded. Treatments were distributed in a completely randomized experimental design. Data obtained were analysed with ANOVA, and the comparison of means was estimated by the Scott-Knott method ( $p \leq 0.05$ ) with InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification of the native isolate of *Trichoderma* (Th05-02)

The morphological identification of the isolate Th05-02 corresponded to the genus *Trichoderma*, according to the observation of conidia in phialides and conidiophores, yellow in colour in culture medium (Barnett and Hunter, 1998). When analysing the sequence obtained from the Th05-02 isolate and comparing it with the GenBank® sequences, it corresponded to *T. virens* (GenBank® accession number, MF952889) with a 100% identity percentage and 99% coverage. It is important to molecularly identify *Trichoderma* species because morphological identification is insufficient to distinguish between species, due to the biology and morphological similarity between them (Moo-Koh *et al.*, 2017). In addition, many widely used commercial fungus are identified up to their genus branch. Instead, the specific identification of bio-stimulant organisms provides knowledge of the presence of species in tropical areas (Mukherjee *et al.*, 2013).

For *Trichoderma*, 488 species have been registered (<http://www.indexfungorum.org>) of which 14 are reported in Mexico. Previous studies have shown the antagonistic and plant growth promoter potential of this genus. The species of *T. harzianum*, *T. hammatum*, *T. koningiopsi*, and *T. simmonsii* (Moo-Koh *et al.*, 2018) were registered as antagonistic species. While *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. ghanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, and *T. virens* were classified as plant growth promoters (Candelero *et al.*, 2015; Moo-

hongos comerciales de uso extenso se identifican a nivel género. En cambio, la identificación específica de los organismos bioestimulantes proporciona un conocimiento de la presencia de especies en zonas tropicales (Mukherjee *et al.*, 2013).

Para *Trichoderma* se han registrado 488 especies (<http://www.indexfungorum.org>) de las cuales 14 están reportadas en México. Estudios previos han mostrado el potencial antagónico y promotor de crecimiento vegetal de este género. Las especies de *T. harzianum*, *T. hammatum*, *T. koningiopsis*, y *T. simmonsii* (Moo-Koh *et al.*, 2018) se incluyeron como especies antagónicas. *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. ghanense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis* y *T. virens*, se catalogaron como promotoras de crecimiento vegetal (Candelerio *et al.*, 2015; Moo-Koh *et al.*, 2017). *T. crassum*, *T. brevicompactum*, *T. pleuroticola*, *T. reesei* y *T. spirale* se encontraron en el agroecosistema de cacao y banano (Torres *et al.*, 2015). La identificación de especies de *Trichoderma* demuestra la presencia y distribución en zonas distintas con y sin actividad agrícola, y con la obtención de especies nativas se contribuye a la búsqueda de agentes alternativos bioestimulantes nativos.

### Efecto *in vitro* de la interacción dual de especies de *Trichoderma*

En general, se observó mayor antagonismo dual en aquellas especies provenientes de suelos con actividad agrícola que en los aislados de suelos sin actividad agrícola. Los aislados que sobresalieron con interacción dual mayor fueron: *T. ghanense* (Th26-52) proveniente de suelo con actividad agrícola y *T. koningiopsis* (Th41-11) de suelo sin actividad agrícola (Cuadro 2).

Cuando estos aislados se enfrentaron con otros, su coloración micelial cambió a un color de intensidad mayor por la presencia abundante de esporas, estimulada por la competencia de los aislados enfrentados (Figura 1).

En ocho enfrentamientos se observó barrera micelial de 0.2-0.7 cm, con los aislados *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) y *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), los cuales mostraron una barrera de 0.7 cm, así como un cambio de color en el medio de cultivo. Solo la barrera micelial del enfrentamiento de *T. koningiopsis* (Th41-11)/*T. harzianum* (Th33-59) midió 0.2 cm y no presentó

Koh *et al.*, 2017). *T. crassum*, *T. brevicompactum*, *T. pleuroticola*, *T. reesei*, and *T. spirale* were found in the cocoa tree and banana plant agroecosystems (Torres *et al.*, 2015). The identification of *Trichoderma* species shows their presence and distribution in different areas with and without agricultural activity; and obtaining native species contributes to the search for alternative native bio-stimulant agents.

### *In vitro* effect of the dual interaction of *Trichoderma* species

In general, greater dual antagonism was observed in those species from soils with agricultural activity than in isolates from soils without agricultural activity. The isolates with the highest dual interaction were: *T. ghanense* (Th26-52) from soil with agricultural activity, and *T. koningiopsis* (Th41-11) from soil without agricultural activity (Table 2).

When those isolates faced each other, their mycelial coloration changed to a colour of greater intensity due to the abundant presence of spores, stimulated by the competition of the confronting isolates (Figure 1).

In eight confrontations a mycelial barrier of 0.2-0.7 cm was observed, with the isolates *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) and *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), which showed a barrier of 0.7 cm, as well as a colour change in the culture medium. Only the mycelial barrier from the *T. koningiopsis* (Th41-11)/*T. harzianum* (Th33-59) confrontation measured 0.2 cm and did not show a colour change in the culture medium. No dual interaction was observed between isolates of the same species, even when they had different origin.

The *in vitro* study of *Trichoderma* isolates is the basis for their selection and agricultural use because it allows to select confrontations that can be used as biostimulants in agriculture. *In vitro* confrontation studies of *Trichoderma* isolates reported greater antagonism against phytopathogenic fungi, depending on the quantity of metabolites produced and the sensitivity of the microorganisms involved (Leylaie and Zafari, 2018).

The competition capacity of an antagonist organism for substrate is favoured by antibiosis and the mycoparasitism exerted on other organisms (Mukhopadhyay and Kumar 2020; Sood *et al.*, 2020). This capacity was observed in the dual isolates that had proportional growth, a defence barrier of 0.7 cm,

**Cuadro 2. Enfrentamientos duales con capacidad de competencia *in vitro* de especies de *Trichoderma*.**  
**Table 2. Dual confrontations with *in vitro* competition capacity of *Trichoderma* species.**

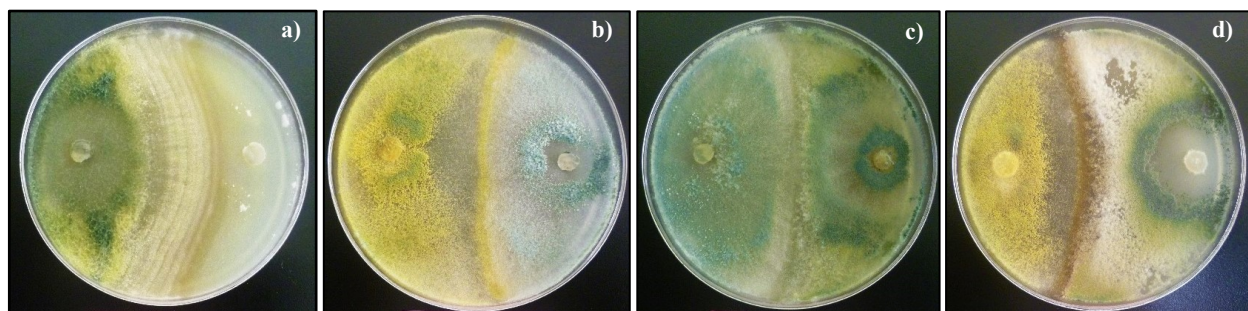
Enfrentamientos	Origen <sup>†</sup>	Barrera micelial (cm)	Coloración en el medio <sup>‡</sup>
<i>T. harzianum</i> / <i>T. ghanense</i> Th02-01/Th26-52	1/1	0.7	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. koningiopsis</i> Th05-02/Th41-11	2/2	0.5	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. ghanense</i> Th05-02/Th26-52	2/1	0.7	Sí
<i>T. virens</i> / <i>T. ghanense</i> Th27-08/Th26-52	2/1	0.2	No
<i>T. simmonsii</i> / <i>T. ghanense</i> Th09-06/Th26-52	2/1	0.3	No
<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. harzianum</i> Th41-11/Th33-59	2/2	0.2	No
<i>T. ghanense</i> / <i>T. harzianum</i> Th26-52/Th33-59	1/2	0.3	No

<sup>†</sup>Tipo de suelo 1: suelo con actividad agrícola, 2: suelo sin actividad agrícola; <sup>‡</sup>Coloración en el medio; Si: con coloración; No: sin coloración. ♦ <sup>†</sup>Type of soil 1: soil with agricultural activity, 2: soil without agricultural activity; <sup>‡</sup>Colouring in the medium; Sí: with colouring; No: with no colouring.

cambio de color en el medio de cultivo. No se observó interacción dual entre aislados de la misma especie, aun cuando provinieron de origen diferente.

El estudio *in vitro* de aislados de *Trichoderma* es la base para su selección y uso agrícola, porque permite seleccionar enfrentamientos con las características para su aprovechamiento como bioestimulantes en la agricultura. Estudios de enfrentamientos *in vitro* de aislados de *Trichoderma* reportaron antagonismo mayor contra hongos fitopatógenos en función de la

and coloration in the culture medium (Bansal *et al.*, 2021; Ortuño *et al.*, 2013). The antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. depends on the isolate and not on the species, since the same species may have a different biocontrol capacity. This was confirmed with the changes in colouring according to the confrontation; for example, *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) isolates from soils without agricultural activity presented a barrier of 0.5 cm and coloration in the culture medium.



**Figura 1. Enfrentamientos *in vitro* de especies de *Trichoderma*, a) *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), b) *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), c) *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) y d) *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52).**

**Figure 1. *In vitro* confrontations of *Trichoderma* species, a) *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), b) *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11), c) *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11), and d) *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52).**

cantidad de metabolitos producidos y de la sensibilidad de los microorganismos involucrados (Leylaie y Zafari, 2018).

La capacidad de competencia de un organismo antagonista por sustrato se favorece por la antibiosis y el micoparasitismo que se ejerce sobre otros organismos (Mukhopadhyay y Kumar 2020; Sood *et al.*, 2020). Esta capacidad se observó en este estudio con los aislados duales que tuvieron crecimiento proporcional, una barrera de defensa de 0.7 cm y con coloración en el medio de cultivo (Bansal *et al.*, 2021; Ortuño *et al.*, 2013). La capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. es dependiente del aislado y no de la especie, ya que de la misma especie pueden poseer capacidad de biocontrol diferente. Lo anterior se confirmó con los cambios en la coloración según el enfrentamiento; por ejemplo, *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) aislados provenientes de suelos sin actividad agrícola, presentaron barrera de 0.5 cm y coloración en el medio de cultivo.

Así mismo, *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11), provenientes de suelos sin actividad agrícola, tuvieron una menor barrera de defensa de 0.4 cm y sin coloración en el medio. A diferencia de *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52) provenientes de suelos con y sin actividad agrícola, los cuales tuvieron una barrera de 0.7 cm y coloración en el medio. Pocos estudios de interacciones duales *in vitro* de aislados de *Trichoderma* existen antes de sus aplicaciones directas en plantas (Ortuño *et al.*, 2017). Por ejemplo, *T. harzianum* y *T. asperellum* *in vitro* presentaron una barrera gruesa de 0.7 cm, e *in vivo* se probaron en *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* (Ortuño *et al.*, 2013). En tanto que *T. atroviride* y *T. citrinoviride* en combinación produjeron ácido indolacético y sideróforos, los cuales fueron bioestimulantes multifuncionales para el crecimiento y desarrollo de *Brassica chinensis* (Chen *et al.*, 2021).

El efecto benéfico de la combinación interespecífica de *Trichoderma* se atribuye a la capacidad de proliferar en el suelo y competir por espacio y nutrientes con otros microorganismos; actividad que se potencializa en presencia de materia orgánica (Ali *et al.*, 2020). Además, el desencadenamiento de una serie de compuestos con efecto en otros organismos antagonistas inclusive de la misma especie y dentro de una población mixta en nichos ambientales, como los sistemas con suelos agrícolas tanto cultivados como los no cultivados. Lo anterior puede sugerir que las especies de *Trichoderma* tienen características

Likewise, *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) from soils without agricultural activity had a smaller defence barrier of 0.4 cm, and without coloration in the medium. In contrary, *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52) from soils with and without agricultural activity, which had a barrier of 0.7 cm and coloration in the medium. There are few studies of dual *in vitro* interactions of *Trichoderma* isolates before their direct applications in plants (Ortuño *et al.*, 2017). For example, *in vitro* *T. harzianum* and *T. asperellum* presented a thick barrier of 0.7 cm, and *in vivo* they were tested on *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus* (Ortuño *et al.*, 2013). Whereas *T. atroviride* and *T. citrinoviride* in combination produced indoleacetic acid and siderophores, which were multifunctional biostimulants for the growth and development of *Brassica chinensis* (Chen *et al.*, 2021).

The beneficial effect of the interspecific combination of *Trichoderma* is attributed to the capacity to proliferate in the soil and compete for space and nutrients with other microorganisms; activity that is potentiated in the presence of organic matter (Ali *et al.*, 2020). Also, a series of compounds resulting from *Trichoderma* combinations have an effect on other antagonistic organisms, including those in the same species, and within a mixed population in environmental niches, like systems with either cultivated or non-cultivated agricultural soils. This may suggest that *Trichoderma* species have evolutionary characteristics, selective and protective roles when they interact between species and with plants (Chen *et al.*, 2021).

#### **Biostimulant effect of *Trichoderma* species on *C. chinense* plants**

The analysis of variance between treatments of the growth variables showed differences ( $p \leq 0.05$ ). In the isolates of dual interaction and in the control with 100% chemical fertilization, the highest averages were recorded. The control with 50% fertilization, after the inoculation of the dual confrontations and the individual isolates, caused increases of 0.58-14.53% in plant height, 0.96-11.20% in stem diameter, 2.39-28.54% in foliar dry biomass, 1.22-12.97% in dry root biomass, 3.47-33.13% in number of fruits, and 0.11-25.77% in fruit weight (Table 3).

In particular, the treatment of *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) was equal ( $p \leq 0.05$ ) to

evolutivas, roles selectivos y protectores cuando interaccionan entre especies y con las plantas (Chen *et al.*, 2021).

### Efecto bioestimulante de especies de *Trichoderma* en plantas de *C. chinense*

Los análisis de varianza entre tratamientos de las variables de crecimiento mostraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ). En los aislados de interacción dual y en el testigo con fertilización química al 100% se tuvieron los promedios mayores. El testigo con 50% de fertilización, tras la inoculación de los enfrentamientos duales y los aislados individuales originó incrementos de 0.58-14.53% en altura de la planta, 0.96-11.20% en diámetro del tallo, 2.39-28.54% en biomasa seca aérea, 1.22-12.97% en biomasa seca de raíz, 3.47-33.13% en número de frutos y 0.11-25.77% en el peso de frutos (Cuadro 3).

En particular, el tratamiento de *T. virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) fue igual ( $p \leq 0.05$ ) al testigo con fertilización al 100% en las variables estimadas. Con efecto menor resultaron los tratamientos de *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52), *T.*

the control with 100% fertilization in the estimated variables. The treatments of *T. virens* (Th05-02)/*T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52), and *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11) resulted with a lower effect. With the dual interactions, increases of 7.62-14.53% were obtained in plant height, 7.20-11.20% in stem diameter, 9.53-28.54% in foliar dry biomass, 1.82-12.97% in root dry biomass, 15.26-33.13% in number of fruits, and 19.43-25.77% in fruit weight, with respect to the control with 50% fertilization.

The individual isolates also exerted a promoter effect by obtaining higher averages than the 50% control. With the isolates of *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), and *T. virens* (Th05-02), increases went from 0.58-6.16% in plant height, 0.96-4.62% in stem diameter, 2.39-14.64% in foliar dry biomass, 1.22-3.59% in dry root biomass, 3.47-15.26% in number of fruits per plant, and 0.11-9.88% in the weight of fruits per plant, with respect to the control with fertilization at 50%.

Inoculation studies in *C. chinense* seedlings with individual native isolates of *T. virens* (Th05-02 and Th27-08) showed positive effects of fungi on the

**Cuadro 3. Efecto de la interacción dual de especies de *Trichoderma* en las variables de crecimiento vegetal en plantas de *C. chinense*.**

**Table 3. Effect of the dual interaction of *Trichoderma* species on the variables of plant growth in *C. chinense* plants.**

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	BSA (g)	BSR (g)	No. de frutos	Peso de frutos (g)
<i>T. harzianum</i> Th02-01 + 50% Fert	126.1 d	10.5 c	41.8 d	16.3 b	130 c	454.9 e
<i>T. virens</i> Th05-02 + 50% Fert	123.9 e	10.8 c	47.8 c	16.5 b	131 c	470.5 d
<i>T. virens</i> Th27-08 + 50% Fert	126.6 d	10.4 c	46.0 c	16.6 b	115 e	424.6 f
<i>T. ghanense</i> Th26-52 + 50% Fert	119.5 f	10.6 c	44.4 c	16.6 b	129 c	453.6 e
<i>T. koningiopsis</i> Th41-11 + 50% Fert	121.1 f	10.6 c	45.4 c	16.7 b	121 d	424.5 f
Th05-02/Th26-52+ 50% Fert	135.4 b	11.2 b	56.0 a	17.1 b	152 b	554.3 b
Th27-08/Th41-11 + 50% Fert	128.6 d	11.4 b	45.1 c	16.4 b	131 c	526.3 c
Th02-01/Th26-52 + 50% Fert	132.6 c	11.1 b	53.3 b	17.1 b	136 c	545.9 b
Th05-02/Th41-11 + 50% Fert	139.0 a	11.6 a	57.1 a	18.5 a	166 a	571.2 a
Testigo 100%	140.3 a	11.6 a	58.1 a	18.0 a	172 a	574.6 a
Testigo 50% de Fertilización	118.8 f	10.3 c	40.8 d	16.1 b	111 e	424.0 f
DS	4.95	1.09	5.43	3.32	7.70	37.88

Medias con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística (Scott-Knott,  $p \leq 0.05$ ). AP: altura de planta, DT: diámetro del tallo, BSA: biomasa seca aérea, BSR: biomasa seca de raíz. Testigo al 100%: 250N-200P-300K; Testigo al 50% de fertilización: 125N-100P-150K. DS: desviación estándar. ♦ Means with different letters in each column indicate statistical difference (Scott-Knott,  $p \leq 0.05$ ). AP: plant height, DT: stem diameter, BSA: foliar dry biomass, BSR: root dry biomass. Control at 100% fertilization: 250N-200P-300K; Control at 50% fertilization: 125N-100P-150K. DS: standard deviation.

*harzianum* (Th02-01)/*T. ghanense* (Th26-52) y *T. virens* (Th27-08)/*T. koningiopsis* (Th41-11). Con las interacciones duales se obtuvieron incrementos de 7.62-14.53% en altura de la planta, 7.20-11.20% en diámetro del tallo, 9.53-28.54% en biomasa seca aérea, 1.82-12.97% en biomasa seca de raíz, 15.26-33.13% en número de frutos y 19.43-25.77% en peso de frutos, respecto al testigo con fertilización al 50%.

Los aislados individuales también ejercieron un efecto promotor al obtener mayores promedios que el testigo 50%. Con los aislados de *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01) y *T. virens* (Th05-02) se incrementaron, del 0.58-6.16% en altura de la planta, 0.96-4.62% en diámetro de tallo, 2.39-14.64% en biomasa seca aérea, 1.22-3.59% en biomasa seca de raíz, 3.47-15.26% en número de frutos por planta y 0.11-9.88% en el peso de frutos por planta, respecto al testigo con fertilización al 50%.

Estudios de inoculaciones en plántulas de *C. chinense* con aislados nativos individuales de *T. virens* (Th05-02 y Th27-08) mostraron efectos positivos de los hongos en la variable altura de plántula con incrementos del 55.57 y 47.62% (Candelero *et al.*, 2015). También, en este estudio se observó un incremento con la aplicación de estos aislados en altura de planta, del 4.11% con Th05-02, y del 6.16% con Th27-08. En cambio, en combinación con otros aislados el incremento fue del 12.25-14.53% en esta variable respecto al testigo sin inoculantes. Así, el uso de combinaciones intra e interespecíficas de microorganismo es común para mejorar el potencial de productos bioestimulantes en plantas.

En este estudio las combinaciones para evaluar la interacción dual sobre *C. chinense* se realizaron de manera interespecífica entre: *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), *T. koningiopsis* (Th41-11) y *T. virens* (Th05-02, Th27-08). Otros estudios hallaron evidencias de combinaciones interespecíficas sobre *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*; con la inoculación de aislados duales de *T. harzianum* y *T. asperellum* mejoró el crecimiento hasta un 80% en el primer caso y hasta un 82% en el segundo caso en relación con aislados individuales (Ortuño *et al.*, 2017). También en *Nicotiana tabacum*, la mezcla de aislados nativos de *Trichoderma* (T1024 y T0912) mejoró el rendimiento respecto a aislados individuales, con porcentajes del 18.73% para T1024 y 11.30% para T0912 (Zapata *et al.*, 2012).

seedling height variable, with increases of 55.57 and 47.62% (Candelero *et al.*, 2015). Also, in this study we observed an increase with the application of these isolates in plant height, of 4.11% with Th05-02, and 6.16% with Th27-08. In contrast, in combination with other isolates the increase was 12.25-14.53% in this variable compared to the control without inoculants. Thus, the use of intra- and interspecific combinations of microorganisms usually improves the potential of biostimulant products in plants.

In this study, the combinations to evaluate dual interaction on *C. chinense* were done interspecifically between: *T. ghanense* (Th26-52), *T. harzianum* (Th02-01), *T. koningiopsis* (Th41-11), and *T. virens* (Th05-02, Th27-08). Other studies reported interspecific combinations results on *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus*; with the inoculation of dual isolates of *T. harzianum* and *T. asperellum*, growth increased up to 80% in the first case, and up to 82% in the second case in relation to individual isolates (Ortuño *et al.*, 2017). Also, in *Nicotiana tabacum*, the mixture of native *Trichoderma* isolates (T1024 and T0912) improved the yield compared to individual isolates, with percentages of 18.73% for T1024 and 11.30% for T0912 (Zapata *et al.*, 2012).

In *C. annuum*, the combination of *Trichoderma* spp. with *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices*) increased shoot dry weight by 115% and root dry weight 133% compared to individual inoculations with *G. intraradices* or *T. atroviride*. Such increases in shoot dry weight and root dry weight were associated with a higher level of nutrient absorption. The former shows a better effect when consortia of microorganisms are used, since there is greater competition, which often results in benefits on the growth and health of the plants (Colla *et al.*, 2015). Different isolates of *Trichoderma* produce and release growth-promoting compounds in interaction with other organisms, for example, in *S. lycopersicum*, harzianolide, and 6-pentyl pyrone (6-PP) had an effect on plant height and dry biomass (Vinale *et al.*, 2008). Also, *Trichoderma* species produce 3-indole acetic acid (AIA) and siderophores that act as iron chelating compounds, which is why they are important for the absorption of this element (Zeilinger *et al.*, 2016).

The inoculations of microorganisms are a factor to consider at the time of sowing, because when the roots are transplanted, they are already colonized by them;

En *C. annuum* la combinación de *Trichoderma* spp. con *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices*) aumentaron 115% el peso seco de brotes y 133% el peso seco de raíz en comparación con inoculaciones individuales con *G. intraradices* o *T. atroviride*. Este aumento en el peso seco de brotes y raíz se asoció con un nivel mayor de absorción de nutrientes. Lo anterior demuestra mejor efecto cuando se utilizan consorcios de microorganismos, ya que se tiene competencia mayor, lo cual con frecuencia resulta en beneficios sobre el crecimiento y la sanidad de las plantas (Colla *et al.*, 2015). Diferentes aislamientos de *Trichoderma* producen y liberan compuestos promotores de crecimiento en interacción con otros organismos, por ejemplo, en *S. lycopersicum* la harzianolida y el 6-pentil pirona (6-PP) tuvieron un efecto en la altura de planta y biomasa seca (Vinale *et al.*, 2008). También especies de *Trichoderma* producen ácido 3-indol acético (AIA) y sideróforos que actúan como compuestos quelantes de hierro, por lo cual son importantes para la absorción de este elemento (Zeilinger *et al.*, 2016).

Las inoculaciones de microorganismos son un factor por considerar al momento de la siembra, debido a que cuando se trasplanta las raíces ya se encuentran colonizadas por ellos; esto resulta en un sistema de raíces mejor, mayor vigor y crecimiento de la planta (Candelerio *et al.*, 2015). Para asegurar la persistencia y colonización es importante hacer más aplicaciones durante el desarrollo del cultivo; porque la colonización implica capacidad de reconocimiento o adherencia en raíces, seguida de una penetración en la planta para resistir metabolitos tóxicos producidos por la misma, en respuesta a una invasión desde las primeras etapas de desarrollo vegetal, por lo que, la dosis de conidios no depende del tamaño de la semilla, sino de la especificidad del efecto de germinación y, por lo tanto, es un área que se debe explorar con mayor profundidad.

Con el propósito de estimar la cantidad necesaria de inoculante para promover el crecimiento de la planta, es importante evaluar el inóculo adecuado de esporas para cada cultivo (Mukherjee *et al.*, 2013). Por último, la inoculación de combinaciones duales o consorcios de microorganismos favorece el crecimiento vegetal, ya que se involucra la naturaleza y la relación de los microorganismos con las plantas. Por lo tanto, comprender cuáles factores ambientales

this results in a better root system, as well as greater vigour and plant growth (Candelerio *et al.*, 2015). In order to ensure persistence and colonization, it is important to make more applications during the development of the crop; because colonization implies the ability to recognize or adhere to roots, followed by penetration into the plant to resist toxic metabolites produced by it. This occurs in response to an invasion since early stages of plant growth; therefore, the dose of conidia does not depend on the size of the seed, but on the specificity of the germination effect and, therefore, it is an area that it should be explored in depth.

In order to estimate the necessary amount of inoculant to promote plant growth, it is important to evaluate the appropriate spore inoculum for each crop (Mukherjee *et al.*, 2013). Finally, the inoculation of dual combinations or consortiums of microorganisms favours plant growth, since the nature and relationship of microorganisms with plants are involved. Therefore, knowing which environmental factors limit the performance of these inoculants will be very useful to improve their efficiency as biostimulants (Xiang *et al.*, 2012). This is the first report of dual applications of *Trichoderma* species isolates in the state of Yucatan, with a growth-promoting effect on *C. chinense*.

## CONCLUSIONS

The dual *in vitro* interactions of *Trichoderma virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) made it possible to select organisms with biostimulant capacity. These *in vivo* combinations promoted plant growth and increased the production of *Capsicum chinense*. The use of this interspecific combination reduced the recommended synthetic fertilization to 50%.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the Tecnológico Nacional de Mexico for funding this research through Project No. 10759.21 P, "Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* y detección de genes Epl1 y Sm1 involucrados en la resistencia sistémica inducida" (Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* and detection of Epl1 and Sm1 genes involved in induced systemic resistance").

limitan el rendimiento de estos inoculantes será muy útil para mejorar su eficiencia como bioestimulantes (Xiang *et al.*, 2012). Este reporte es el primero de aplicaciones duales de especies *Trichoderma* aisladas en el estado de Yucatán con efecto promotor de crecimiento en *C. chinense*.

## CONCLUSIONES

Las interacciones duales *in vitro* de *Trichoderma virens* (Th05-02)/*T. koningiopsis* (Th41-11) permitieron seleccionar organismos con capacidad bioestimulante. Estos, en combinaciones *in vivo* promovieron el crecimiento vegetal y aumentaron la producción de *Capsicum chinense*. El uso de esta combinación interespecífica redujo al 50% la fertilización sintética recomendada.

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México, por el financiamiento de este estudio a través del Proyecto No. 10759.21P, "Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* y detección de genes *Epl1* y *Sm1* involucrados en la Resistencia sistémica inducida".

## LITERATURA CITADA

- Ali, A., A. Javaid, A. Shoaib, and I. H. Khan. 2020. Effect of soil amendment with *Chenopodium album* dry biomass and two *Trichoderma* species on growth of chickpea var. Noor 2009 in *Sclerotium rolfii* contaminated soil. The Egyptian Journal of Biological Pest Control 30: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00305-1>
- Bansal, R., S. Pachauri, D. Gururajiah, P. D. Sherkhane, Z. Khan, S. Gupta, B. Kaushik, A. Kumar, and P. K. Mukherjee. 2021. Dual role of a dedicated GAPDH in the biosynthesis of volatile and non-volatile metabolites-novel insights into the regulation of secondary metabolism in *Trichoderma virens*. Microbiological Research 253: 126862. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126862>
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA 218 p.
- Candelero, D. J., J. Cristóbal A., A. Reyes R., J. M. Tun S., M. M. Gamboa A., y E. Ruíz S. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Phytion 84: 113-119.
- Chen, D., Q. Hou, L. Jia, and K. Sun. 2021. Combined use of two *Trichoderma* strains to promote growth of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). Agronomy 11: 726. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040726>
- Colla, G., R. Youssef, E. Di Mattia, C. El-Nakhel, and M. Cardarelli. 2015. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. Journal of the Science of Food and Agriculture 95: 1706-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M. Balzarini G., L. Gonzalez, M. Tablada, y C. Robledo W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (Consulta: octubre 2021).
- Leylaie, S., and D. Zafari. 2018. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. Frontiers in Microbiology 9: 1484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01484>
- Moo-Koh, F. A., J. Cristóbal-Alejo, A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun Suárez, y M. Gamboa-Angulo. 2017. Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp. y su actividad promotora en *Solanum lycopersicum* L. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 71: 5-11. <https://doi.org/10.33064/iycuaa201771335>
- Moo-Koh, F. A., J. Cristóbal A., A. Reyes A., J. M. Tun S., M. Gamboa A., y I. R. Islas F. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum* L. Scientia Fungorum 47: 37-45. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.47.1191>
- Mukherjee, K. P., B. A. Horwitz, U. S. Singh, M. Mukherjee, and M. Schmoll. 2013. *Trichoderma* Biology and Applications. British Library. London, UK. 327 p.
- Mukhopadhyay, R., and Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. The Egyptian Journal of Biological Pest Control 30: 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Ortuño, N., C. Miranda, y M. Claros. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Journal of the Selva Andina Biosphere 1: 16-24. <https://doi.org/10.36610/j.sab.2013.010100016>
- Ortuño, N., J. A. Castillo, C. Miranda, M. Claros, and X. Soto. 2017. The use of secondary metabolites extracted from *Trichoderma* for plant growth promotion in the Andean highlands. Renewable Agriculture and Food Systems 32: 366-375. <https://doi.org/10.1017/S1742170516000302>
- Sood, M., D. Kapoor, V. Kumar, M. S. Sheteiwy, M. Ramakrishnan, M. Landi, F. Araniti, and A. Sharma. 2020. *Trichoderma*: the "secrets" of a multitalented biocontrol agent. Plants 9: 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Torres, C., M., C. F. Ortiz G., C. Bautista M., J. A. Ramírez P., N. Ávalos C., S. Cappello G., y A. De la Cruz P. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86: 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, H. M. J. Barbetti, H. Li, and M. Lorito. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 72: 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2008.05.005>

- White, T., J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp: 315-322.
- Xiang, W., L. Zhao, X. Xu, Y. Qin, and G. Yu. 2012. Mutual information flow between beneficial microorganisms and the roots of host plants determined the bio-functions of bio-fertilizers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 115-1120. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.38134>.
- Zapata, R., M. Quiroga, B. Murillo, D. Agüero, B. Lisi, y P. Mena. 2012. *Trichoderma* spp. biocontrolador y promotor de crecimiento: una alternativa al uso de agroquímicos en cultivos intensivos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 16: 47-55.
- Zeilinger, S., S. Gruber, R. Bansal, and P. K. Mukherjee. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30: 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

