

ORIGINAL

## Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in fungal diseases associated with tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.)

### Potencial biocontrolador de *Trichoderma harzianum* en enfermedades fungosas asociadas al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Maryori C. Pineda Zambrano<sup>1</sup>  , Hebandreyna González García<sup>2</sup>  , Juan C. Escalante<sup>3</sup>  

<sup>1</sup>Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprúm” (UNESUR), Programa académico de Ingeniería de la Producción Agropecuaria, Laboratorio de Fitopatología. Santa Bárbara de Zulía, Venezuela.

<sup>2</sup>Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Centro de Investigaciones Ambientales “José Antonio Cándamo”. Villavicencio, Colombia.

<sup>3</sup>Tecnológico de Antioquia (TdeA), Facultad de Ciencias Administrativas y Económicas, Programa de Administración Financiera. Medellín, Colombia.

**Citar como:** Pineda Zambrano MC, González García H, Escalante JC. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in fungal diseases associated with tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.). *Salud, Ciencia y Tecnología*. 2025; 5:1616. <https://doi.org/10.56294/saludcyt20251616>

Enviado: 14-09-2024

Revisado: 01-01-2025

Aceptado: 27-06-2025

Publicado: 28-06-2025

Editor: Prof. Dr. William Castillo-González 

Autor para la correspondencia: Maryori C. Pineda Zambrano 

#### ABSTRACT

**Introduction:** fungal diseases in tomato cultivation are the main phytosanitary factor that reduces yields. The objective of the investigation was to evaluate the potential biocontroller of *Trichoderma harzianum* in mushrooms associated with cultivation.

**Method:** the samples of leaves, roots and stems of diseased plants were collected and processed by the fungal isolation method in vegetable tissue and papa dextrose agar (PDA), the growths were purified, typified and tested for pathogenicity. The potential biocontroller was evaluated under in vitro conditions with the dual cultivation technique in PDA confronting the antagonist with each pathogen. The study employed an random design, with 7 treatments and 4 repetitions, conformed by: 3 dual cultures, 4 witnesses corresponding to each pathogen and the antagonist. The degree of mycoparasitism, the percentage of inhibition of the radial growth (PCR) of the antagonist and the presence of antibiosis between the antagonist and the pathogens were evaluated every 24 hours for 15 days.

**Results:** the fungi were identified: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Pythium* sp. The tests of confrontation evidenced the presence of the mechanisms of action characteristic of this species of biocontroller, although it varies according to the species. The antagonistic capacity for micoparasitic action was grade 4 with *A. alternata* and *Pythium* and grade 3 with *F. oxysporum*, the strangulation and enzymatic lysis were observable at the microscopic level. The action of antibiosis was present with all pathogens, while the action of competition in growth was significant only with *A. alternata* and *F. oxysporum*. When evaluating the PICR it was found that the antagonist showed high and significant inhibition with *A. alternata* (55,43 %) and *F. oxysporum* (31,01 %), while no inhibition was found with *Pythium*, although when entering contact, the antagonist showed mycopasitic action stopping the growth and invading the pathogen until it sporulates on it.

**Conclusions:** that *T. harzianum* has the potential to be used as a biocontrol agent in fungal diseases associated with tomato cultivation.

**Keywords:** Antagonism; *Alternaria Alternata*; Biological Control; Phytopathogenic Fungi; *Fusarium Oxysporum*; *Pythium* Sp.

**RESUMEN**

**Introducción:** las enfermedades fúngicas en el cultivo tomate son el principal factor fitosanitario que reduce los rendimientos. El objetivo de la investigación fue evaluar el potencial biocontrolador de *Trichoderma harzianum* en hongos asociados al cultivo.

**Método:** las muestras de hojas, raíz y tallo de plantas enfermas fueron colectadas y procesadas por el método de aislamiento de hongos en tejido vegetal en agar papa dextrosa (PDA), los crecimientos fueron purificados, tipificados y comprobados su patogenicidad. El potencial biocontrolador se evaluó bajo condiciones in vitro con la técnica de cultivo dual en PDA confrontando el antagonista con cada patógeno. El estudio empleó un diseño al azar, con 7 tratamientos y 4 repeticiones, conformados por: 3 cultivos duales, 4 testigos correspondientes a cada patógeno y el antagonista. Se evaluó el grado de micoparasitismo, el índice porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PCR) antagonista y la presencia de antibiosis entre el antagonista y los patógenos cada 24 horas por 15 días.

**Resultados:** se obtuvo la identificación de los hongos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium* sp. Las pruebas de confrontamiento evidenciaron la presencia de los mecanismos de acción característicos de esta especie de biocontrolador, aunque varío según la especie. La capacidad antagónica por acción micoparasítica fue en grado 4 con *A. alternata* y *Pythium* y grado 3 con *F. oxysporum*, el estrangulamiento y lisis enzimática fueron observables a nivel de microscopio. Las acciones de antibiosis fueron presentes con todos los patógenos, mientras que la acción de competencia en crecimiento fue significativa solo con *A. alternata* y *F. oxysporum*. Al evaluar el PICR se encontró que el antagonista mostró alta y significativa inhibición con *A. alternata* (55,43 %) y *F. oxysporum* (31,01 %), mientras que con *Pythium* no se encontró alguna inhibición, aunque al entrar en contacto el antagonista mostró acción micoparasítica deteniendo el crecimiento e invadiendo el patógeno hasta esporular sobre él.

**Conclusiones:** el *T. harzianum* tiene el potencial para ser empleado como agente de biocontrol en enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de tomate.

**Palabras clave:** Antagonismo; *Alternaria Alternata*; Control Biológico; Hongos Fitopatógenos; *Fusarium Oxysporum*; *Pythium* Sp.

**INTRODUCCIÓN**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las especies hortícolas más importantes del mundo, alcanzando la producción mundial 180 766 329 toneladas y abarcando un área de 5 030 545 de hectáreas.<sup>(1)</sup> En Venezuela, esta hortaliza representa uno de los rubros de alto valor y demanda por el sector industrial y consumidor, siendo ingrediente sine qua non de la rica gastronomía culinaria nacional, lo que ha motivado el incremento de la superficie sembrada de este cultivo en varias regiones del país<sup>(2)</sup>, su tolerancia a diferentes climas y la inversión técnica agrícola ha permitido el crecimiento de manera heterogénea con el paso de los años, siendo hoy cultivado en varias zonas productivas tanto en campo como bajo cobertura en regiones semiáridas, andinas y centro oriental.<sup>(3)</sup>

Sin embargo, este cultivo es altamente susceptible a gran cantidad de fitopatógenos, de los cuales, los hongos son el principal grupo que destaca, agentes como: *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Llaveilla*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rizoctonia* pueden llegar a mermar 60 % la producción de forma asociada o individual, ocasionando desarrollo de diferentes tipos de lesiones en la planta que desencadenan la reducción de la capacidad fotosintética, deterioro del soporte y anclaje hasta su muerte.<sup>(4)</sup> El efecto y consecuencias de la acción de estos patógenos en el cultivo, deriva principalmente a la susceptibilidad de la especie, el hábitat de suelo de la gran parte de los hongos, las condiciones ambientales favorables predisponentes y de las deficiencias de nutrientes del suelo.

El manejo empleado con agroquímicos, si bien ejercen una acción de respuesta al problema, a largo plazo representa pérdida de efectividad porque los fitopatógenos generan resistencia a los mismos, riesgos toxicológicos por contaminación de los alimentos y del suelo, reducción de hongos autoreguladores del ecosistema y persistencia en el agua.<sup>(5)</sup> Por lo que, emplear agentes de biocontrol en el manejo de enfermedades representa una alternativa para minimizar los daños causados por los patógenos y reducir el uso de productos químicos. La especie *Trichoderma harzianum* ha sido, hasta el momento, el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas, variando su respuesta según el patógeno con el que se confronte; además de que numerosos biotipos son señalados como tolerantes a fungicidas.<sup>(6)</sup> Con base a lo anterior, en la presente investigación se propone evaluar el potencial biocontrolador de *Trichoderma harzianum* en enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de tomate en condiciones in vitro.

## MÉTODO

### Descripción del área de estudio

La investigación fue realizada en condiciones *in vitro* en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Fitopatología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR) ubicada en el municipio Colón parroquia Santa Bárbara, del estado Zulia, Venezuela. Se empleó un ambiente controlado de temperatura ( $29\pm 1$  °C) y humedad estable (70 %) para el desarrollo de los microorganismos. Se utilizó como antagonista una cepa nativa del Sur del Lago de Maracaibo aislada, caracterizada, e identificada como Th-BST.0108.<sup>(6)</sup> La cepa seleccionada fue previamente activada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). Mientras que, los hongos patógenos fueron aislados a partir de un muestreo preliminar en El Silencio, finca con producción del cultivo de tomate, ubicada a 952 m.s.n.m en el sector El Peñon, parroquia Tovar municipio Tovar del estado Mérida, Venezuela.

### Muestreo de cultivo de tomate afectado

Para la recolección de muestras en campo se realizó un monitoreo permanente de las plantas que tuvieran indicios de la enfermedad causada por el fitopatógeno, las lesiones fueron clasificadas por el tipo de síntomas, el material vegetal fue recolectado en diferentes órganos de las plantas extrayendo secciones de tejido (hoja, tallo); posteriormente, fue resguardado de forma individual en bolsas plásticas ziploc, y trasladado al laboratorio para su respectivo aislamiento e identificación.

### Aislamiento de muestras

El material vegetal recolectado fue aislado de la siguiente manera: se lavó con agua corriente el tejido de interés a procesar; seguidamente, se realizaron cortes a partir del borde de la lesión infectada en los tejidos lesionados de aproximadamente 5 mm, en condiciones totalmente asépticas; y bajo una cámara de flujo laminar se sometieron los cortes a desinfección con solución de hipoclorito durante 1 minuto con agitación permanente, transcurrido el tiempo, el tejido fue lavado tres veces con agua destilada estéril para eliminar los excesos del desinfectante y luego secados con papel toalla estéril.<sup>(7)</sup> Consecutivamente, los cortes fueron ubicados en forma equidistante en los platos de Petri contenidos con medio de Papa Dextrosa Agar PDA, incubándose a temperatura de  $28\pm 1$  °C durante 5 días hasta el desarrollo y posterior purificación de las colonias.

### Identificación del género de hongos aislados

Obtenidas las colonias en el procedimiento anterior, se procedió a la purificación de la muestra con el fin de conseguir un cultivo puro. La tipificación del género aislado se realizó a través de la observación micromorfológica de cada hongo obtenido, realizando montajes de láminas con tinción azul de lactofenol, y con la ayuda de las claves taxonómicas se caracterizó las estructuras de cada aislado en microscopio óptico a 40X y 100X hasta el taxón fúngico de la especie.<sup>(8)</sup>

### Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad fueron evaluadas en umbráculo, el cual consistió en seleccionar por cada grupo de hongo identificado 5 plantas sanas de tomate en etapa de vivero.<sup>(9)</sup> Posteriormente, se realizó la suspensión inoculante por patógeno, agregando 5 ml de ADE sobre una colonia fúngica de 7 días en crecimiento, y con ayuda de un pincel estéril se realizó el barrido de las esporas desarrolladas, resultando una suspensión a la que se cuantificó la cantidad de conidios/mL a través de su conteo en cámara de Neubauer, seguidamente se ajustó el contenido del preparado a aplicar en las plantas ADE hasta obtener la concentración final  $2,5 \times 10^5$  conidios/mL, y adicionalmente se añadió 3 mL de solución Tween 20 para dispersar los agregados de conidios.

Los grupos de plantas sanas fueron inoculadas con suspensiones biológicas y sometidas a cámara húmeda por 3 días para inducir la penetración y establecimiento de los hongos, posteriormente, fueron monitoreadas a diario hasta reconocer los primeros síntomas. Se confirmó el cumplimiento de los postulados de Koch, mediante los reaislamientos e identificación de los patógenos.

### Confrontamiento in vitro

Las pruebas de confrontamiento *in vitro* entre el antagonista y los hongos patógenos identificados, consistió en colocar en el centro del plato Petri una lámina portaobjeto, sobre esta se vertió el medio PDA, bajo condiciones asépticas se colocó un disco de 5 mm de diámetro con el micelio del hongo *T. harzianum* en 7 días de crecimiento activo y en el extremo opuesto del plato Petri el disco de 5 mm con micelio del hongo fitopatógeno a una distancia de 5 cm aproximadamente entre ellos y 2 cm del borde de la cápsula. Se realizaron 5 repeticiones por aislado, las placas así preparadas se incubaron a  $28\pm 1$  °C, midiendo su comportamiento diario por 10 días.<sup>(6)</sup>

El potencial biocontrol del hongo *T. harzianum* en los hongos patógenos asociados al cultivo de tomate se comprobaron al evaluar los 3 mecanismos de acción<sup>(10)</sup> que se le asocian a esta especie: Primero: Midiendo la

acción de antibiosis de *T. harzianum* sobre cada patógeno, la cual se evaluó cualitativamente por el crecimiento de patógeno en el cultivo dual antes del contacto entre ambos hongos (48 h), con respecto a su testigo, tomando en cuenta la capacidad antibiótica del antagonista, para promover la formación de un halo de inhibición durante el crecimiento radial del hongo patógeno, generalmente presenciado a los 10 días de crecimiento.

Segundo: evaluando la competencia por espacio y nutrientes al estimar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en el cultivo dual, y midiendo el radio de crecimiento del patógeno y antagonista con sus respectivos testigos. El PICR se calculó empleando la fórmula  $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$ . Donde R1 es el diámetro del testigo (promedio del crecimiento radial de las repeticiones de cada patógeno) y R2: es el diámetro del organismo patógeno en el cultivo dual con el antagonista.

Tercero: midiendo el grado de micoparasitismo a través de la escala<sup>(10)</sup> (tabla 1); y corroborando estos resultados a través de la interacción directa de las hifas al entrar en contacto entre ambos hongos, para ello se debió extraer la lámina portaobjeto del centro del cultivo dual y realizar su observación en un microscopio óptico con aumento de 40X.

Tabla 1. Escala para la evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma harzianum</i>	
Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Fuente: Ezziyyani et al.<sup>(10)</sup>

### Análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con 7 tratamientos y 4 repeticiones (un testigo de cada tratamiento), donde la unidad experimental fue cada plato Petri, los tratamientos fueron conformados por los cultivos duales entre *T. harzianum* y el respectivo hongo patógeno, mientras que los testigos fueron solo el antagonista y cada hongo patógeno en un plato Petri. El procesamiento estadístico se realizó por la vía paramétrica por medio de un ANOVA. Las comparaciones múltiples de medias se realizaron mediante el uso de las pruebas de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Los datos fueron procesados estadísticamente en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.

## RESULTADOS

### Identificación del patógeno de las muestras colectadas

Al realizar los aislamientos de las muestras de tejido vegetal (tallo, raíz y hojas) con sintomatologías de enfermedad, se obtuvieron la identificación de tres aislados: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium* sp.<sup>(8)</sup> el resultado de las pruebas de patogenicidad comprobó que los hongos presentan actividad patogénica en el cultivo a partir del desarrollo de lesiones en el cultivo de tomate, con características específicas en cada caso diagnosticando las enfermedades de origen fúngico: tizón temprano, pudrición radical y damping off en tomate.

Las lesiones foliares características de los tejidos donde se obtuvo *Alternaria alternata* presentaron manchas concéntricas, de formas redondas u ovaladas, de color café en hojas, además de un débil halo necrótico de color amarillo alrededor (figura 1a); mientras que en el tallo, pecíolo y pedúnculo se observó la formación necrótica levemente hundida característica de los canchales (figura 1b). Asimismo, a nivel de colonia fúngica de *A. alternata* se encontró un cultivo de crecimiento rápido, de micelios aéreos, textura inicial algodonosa y de coloración de color verde oliva, que pronto se tornó aterciopelada y de color verde oscuro cuando esporula (figura 2a), con presencia de agregados de conidios color blancuzco tipo lana.

Microscópicamente las observaciones de *A. alternata* lo muestran con macroconidias, fusiformes, curvas en los extremos y septadas, los conidióforos cortos erectos, forma cadenas de conidias simples o ramificadas de color oscuro, midiendo 12-20 X 120-296  $\mu\text{m}$  (figura 2b y 2c). Las conidias son grandes, oscuras con apariencia de mazo y presentan septos longitudinales y transversales (figura 2c) se lograron observar a partir de los ocho días. La tipificación de patógeno *Fusarium oxysporum* procedió de tejidos del cultivo que manifestaron presencia unilateral de amarillamiento en las hojas basales que gradualmente se propagaron a las más jóvenes, con marchitamiento de color café en el sistema radicular; la necrosis inicialmente alojada en cuello (figura 3a), y raíz de la planta se extiende progresivamente hacia los tejidos superiores, con aparición de manchas color café en las hojas, extendidas desde tallo hacia el ápice (figura 3b), conforme avanza el marchitamiento generalizado de la planta se conduce a la muerte total de los tejidos (figura 3c).

La colonia purificada de *Fusarium oxysporum* se caracterizó por presentar una topografía inicialmente rala, y posterior a los 7 días semiaérea, con textura filamentosa, micelio de color blanco marfil (figura 4a), con agregados de conidios de color rosado, morado claro que se desarrollan posteriores a los 6 días, al reverso del plato Petri se observa un crecimiento rizoide del micelio levemente morado. Micromorfológicamente se observó hifas sectadas, presencia de conidios grandes, alargados de forma oblonga (banana) con presencia de 3 a 4 septos en su interior, con desarrollo de microconidias levemente ovoides y color hialinas (figura 4b).

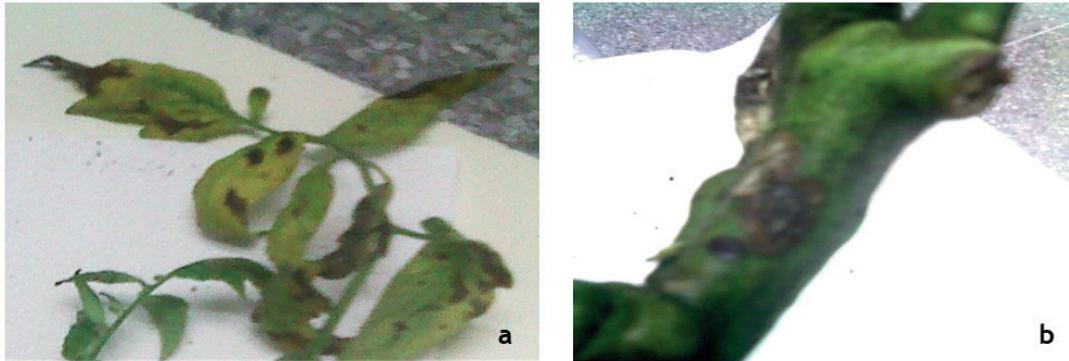


Figura 1. Lesiones necróticas en el cultivo de tomate por *A. alternata*. 1a: Lesiones en hojas, 1b: Lesiones en tallo

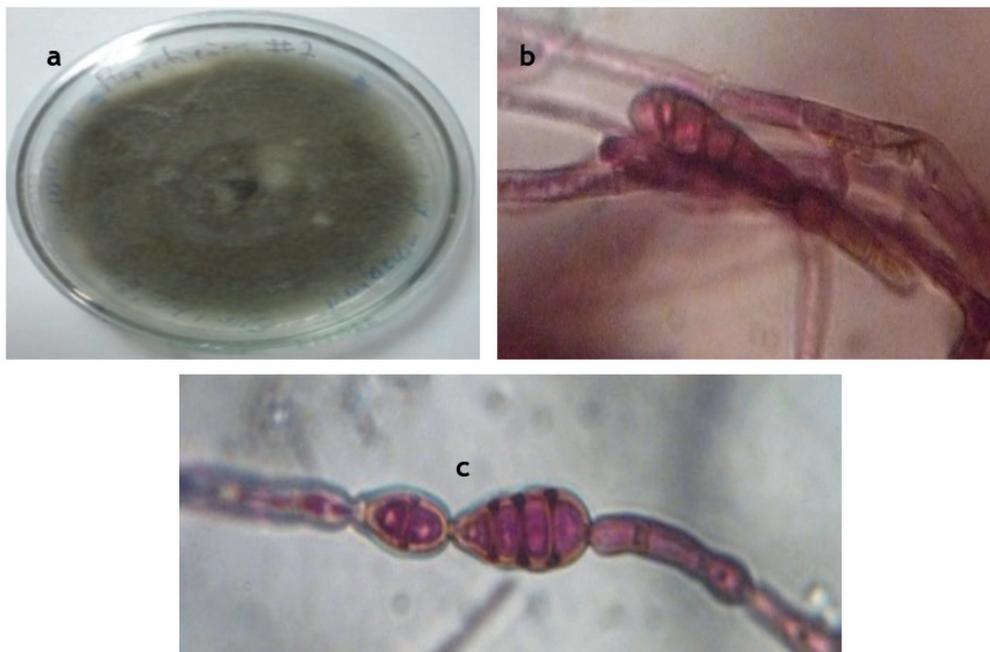


Figura 2. Características culturales y morfológicas de *A. alternata* en plantas de tomate. 2a: Cultivo puro de *A. solani*; 2b y 2c: Conidios del hongo

Finalmente, la presencia del genero *Pythium* sp., fue diagnosticado a partir del síntoma de ahogamiento del cuello de las plantas. Aunque inicialmente la manifestación sintomatológica de marchitamiento y pérdida de la turgencia en los órganos aéreos de las plantas pueden confundirse con déficit de agua, conforme va evolucionando la infección del patógeno en los tejidos se observan pequeñas lesiones en su tallo que se oscurecen lo cual indica la muerte del tejido, impidiendo la movilización de nutrientes en toda la planta. Estas lesiones ocasionan de forma sistémica: amarillamiento, atrofia del crecimiento y marchitamiento en toda la planta (figura 5a).

Los cultivos puros de *Pythium*, lo muestran como un hongo de rápido crecimiento que abarca rápidamente el plato Petri, formado por micelios blanquecinos con topografía aérea, textura algodonosa y mucilaginosa (figura 5b). Microscópicamente presenta hifa cenocítica con ramificaciones de las cuales se forman vesículas circulares denominadas esporangio y oogonio (figura 5c), dentro de las cuales se forman las esporas flageladas conocidas como zoosporas.

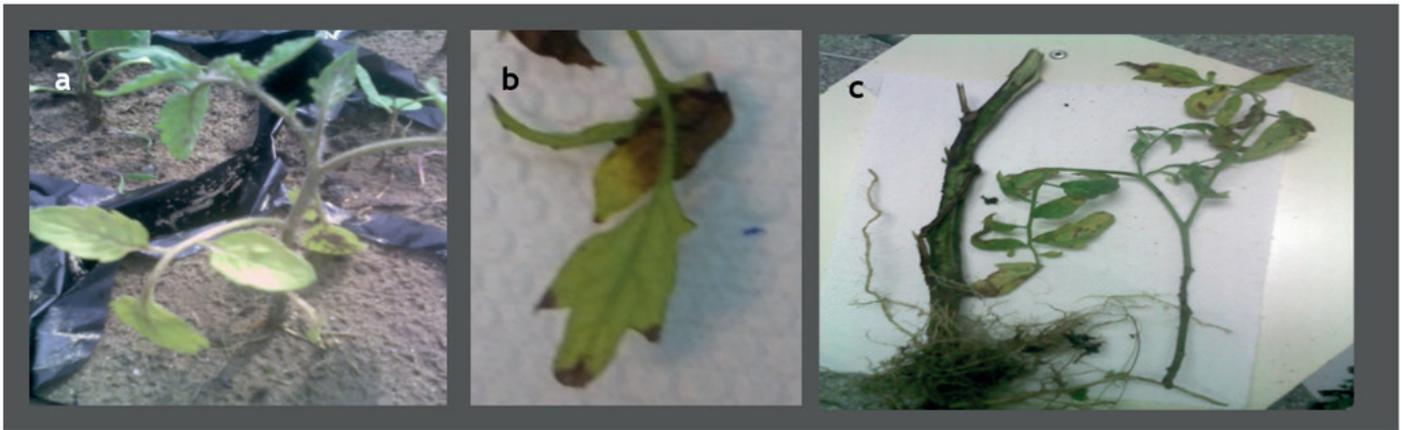


Figura 3. Lesiones necróticas en el cultivo de tomate por a *Fusarium oxysporum*. 3a: Síntomas en tallo; 3b: Manchas marronas y amarillamiento en hojas; 3c: Sección completa de la planta

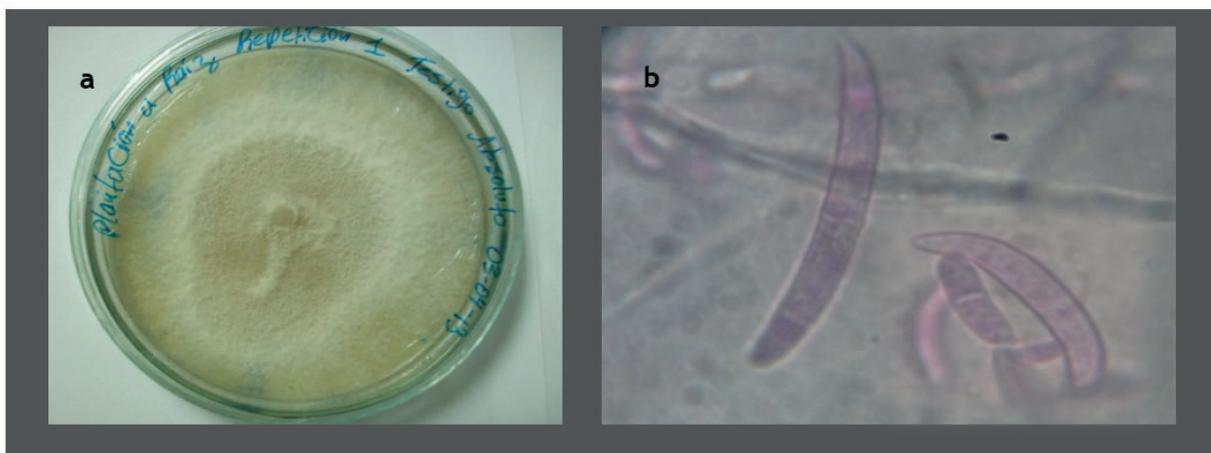


Figura 4. Características culturales y morfológicas de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. 4a: Cultivo puro; 4b: Conidios del hongo

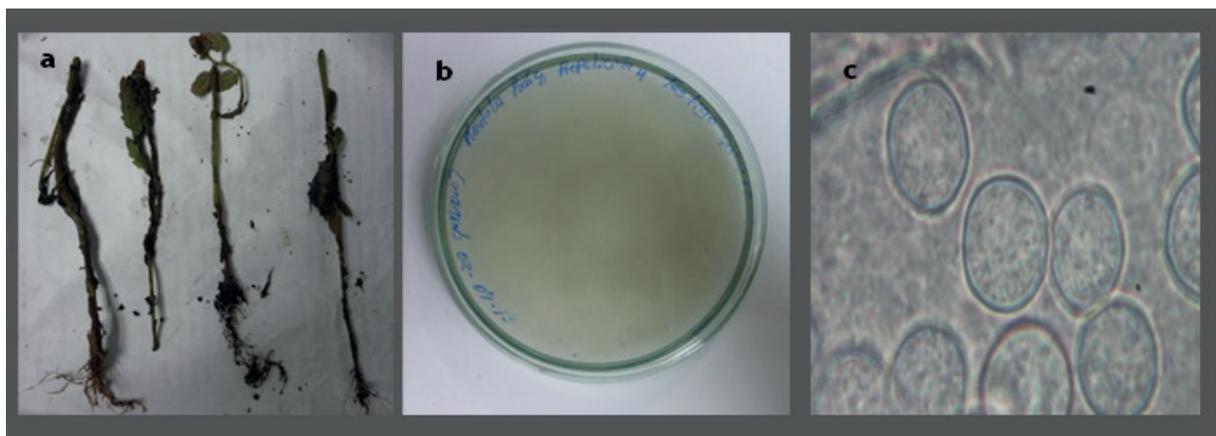


Figura 5. Sintomatología y características culturales y morfológicas de *Pythium* sp. 5a: Lesiones en plantas de tomate asociadas a las infecciones por *Pythium* sp; 5b: Cultivo puro de *Pythium*. 5c: Oogonios de *Pythium*

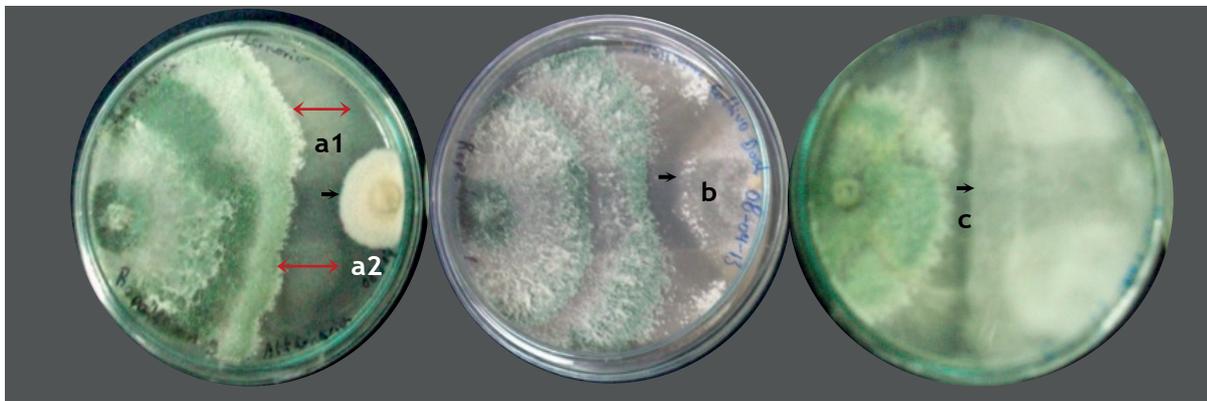
### Evaluación del potencial biocontrolador in vitro de *Trichoderma harzianum* los hongos asociados a enfermedades en el cultivo de tomate

El potencial de biocontrol se encuentra asociado a la capacidad y agresividad de la cepa del antagonista que se emplea. En el estudio, se evaluaron los mecanismos de acción de *T. harzianum* sobre *A. alternata*, *F. oxysporum* y *Pythium* asociados a enfermedades en el cultivo de tomate. Encontrándose que la agresividad de la acción empleada por *T. harzianum* responde según el patógeno que se confronte. Mientras que, los mecanismos que le asocian a la especie actúan sinérgicamente entre ellos como respuesta de la evolución antagónica de *T. harzianum*.

### Acción de antibiosis

Como resultado de las observaciones de los cultivos duales se encontró que *T. harzianum* pudo generar una respuesta positiva a la acción de antibiosis con los patógenos estudiados, a partir de la secreción de forma directa (no volátil) y volátil de compuestos orgánicos. Se observaron dos comportamientos repetitivos en cada hongo descrito. En el primer caso, se encontró: la formación de una banda limítrofe sin coloración del medio, en la zona borde entre el crecimiento horizontal de las hifas del antagonista y las de los tres patógenos en estudio. Esta formación visualmente apreciable se manifestó a las 98 horas, lo que indica el resultado positivo para la acción de antibiosis de *T. harzianum* frente a *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium*. La difusión por el antagonista de posibles compuestos orgánicos no volátiles en el medio en dirección hacia los patógenos, dio como resultado el efecto fungistático, inhibiendo el crecimiento y deformando la característica de la colonia al adquirir los micelios un patrón curvo o recto según la dirección de *T. harzianum* (figura 6a1, 6b y 6c).

La respuesta química directa de *T. harzianum* es compleja. En los cultivos duales el antagonista muestra el desarrollo de estructuras somáticas modificadas, lo que le permitió alcanzar las zonas adyacentes con el patógeno para limitar su expansión; formando la banda limítrofe descrita. Estas observaciones fueron particularmente vistas en todos los aislados con *A. alternata*, donde la tasa de crecimiento del antagonista fue inicialmente constante, hasta llegar a la zona limítrofe, donde el micelio mostró incremento de su velocidad de crecimiento, cambios de color del soma formado (de verde a blanco claro), textura (de algodonosa aérea a rara) y reducción del grosor de la hifa, permitiéndose alcanzar al patógeno (figura 6a2).



**Figura 6.** Acción de antibiosis de *T. harzianum* en cultivos duales. Flecha negra: Posible fungistasis. Flecha roja: Células somáticas modificadas para la acción de antibiosis

En el segundo caso, la respuesta de antibiosis de *T. harzianum* por posible producción de sustancias volátiles, se ve estimulada particularmente por el tipo de hongo con el que se confronte, para lo cual, el fenómeno se muestra al reducir a distancia el radio de crecimiento de los patógenos, observándose solo con *A. alternata* y *F. oxysporum*, es decir, impide el crecimiento del hongo contrario a pesar de que el microorganismo aún no está en el punto de confrontamiento.

Es posible, suponer la presencia de compuestos volátiles debido al efecto fungistático que limitó el desarrollo normal de los patógenos en los cultivos duales, permitiéndole a *T. harzianum* hasta las 196 horas desarrollar mayor radio de crecimiento hasta alcanzar el punto de crecimiento de la colonia de *Alternaria* y *Fusarium*. Con *Pythium* este fenómeno no fue observado, el patógeno en el cultivo dual (4,93) incrementó su tasa de crecimiento (4,25 cm) (figura 7) hasta el punto de confrontamiento, para luego manifestar la acción fungistática descrita en el primer caso (figura 6c).

Al comparar los radios de crecimiento de los tres patógenos en el cultivo dual se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la inhibición entre ellos, siendo *A. alternata* (1,24 cm) y *F. oxysporum* (2,04 cm) los que mostraron respuesta fungistática a distancia al presentar reducción desde el inicio de la evaluación; mientras que en sus testigos el crecimiento fue de 3,21 cm y 3,25 cm, respectivamente. El mecanismo de antibiosis mostrado fue estadísticamente significativo  $p < 0,05$ . Aunque resultó ser positivo en la cepa de *T. harzianum* empleada esta acción no se mantienen en el tiempo, debido a que el antagonista, gana área de ocupación en el medio, la competitividad por espacio se manifiesta sobre esta en el transcurso de las horas, la banda limítrofe de antibiosis se desvanece como consecuencia de la expansión del antagonista hacia esa dirección.

Columnas acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes radios de crecimiento de los patógenos en cultivos duales y el lote testigo. Cada barra representa la media del radio de crecimiento micelial obtenido por cada patógeno en los cultivos dual y el grupo testigo.

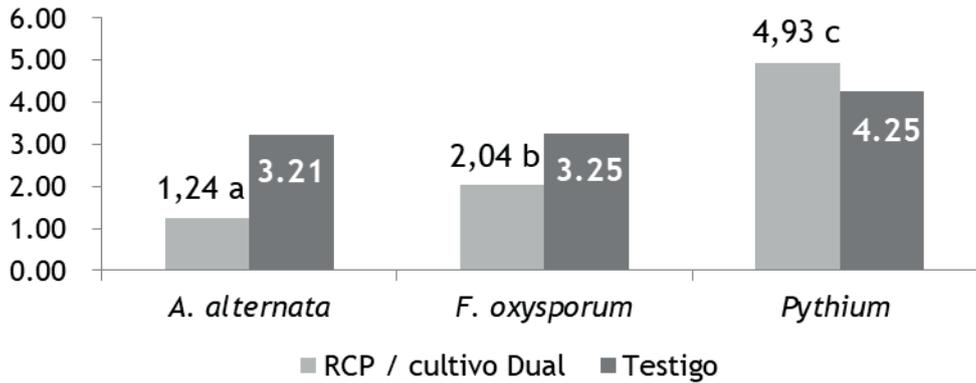


Figura 7. Comparación del radio de crecimiento de los hongos patógenos asociados al cultivo de tomate

### Acción de competencia

Evaluar el radio de crecimiento del antagonista en los cultivos duales, pone en evidencia la habilidad de competir en un hábitat limitado por espacio, nutrientes y agua. Aunque esta acción evolutiva es diferente a la antibiosis, muestra una relación de apoyo entre ambos mecanismos. Debido a que, el efecto de inhibición del crecimiento del patógeno por acción química, le permite a *T. harzianum* tener mayor área para la ocupación micelial, disponiendo de más cantidad de los nutrientes disponibles en comparación al hongo contrastado o debilitando al patógeno para que el antagonista incluso avance hasta crecer encima de él. Al comparar el radio de crecimiento del antagonista en las placas testigo y en los del confrontamiento con todos los patógenos estudiados, se encontró, que hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) siendo mayor en los cultivos duales que en el testigo, por lo que es posible que este mecanismo se active ante la respuesta química de reconcomiendo quimiotrófico en el medio.

Aunque no se encontró diferencia significativa del crecimiento de *T. harzianum* por tipo patógeno, se observó, una tendencia de incremento del radio de crecimiento en *A. alternata* (6,42 cm) y *Pythium* (6,39 cm), la agresividad con que el antagonista expresa su acción le permitió invadir el espacio inicialmente ocupado por el patógeno.

Columnas acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes radios de crecimiento del antagonista en cultivos dual y el lote testigo. Cada barra representa la media del radio de crecimiento micelial obtenido por *Trichoderma harzianum* en los cultivos duales y el grupo testigo.

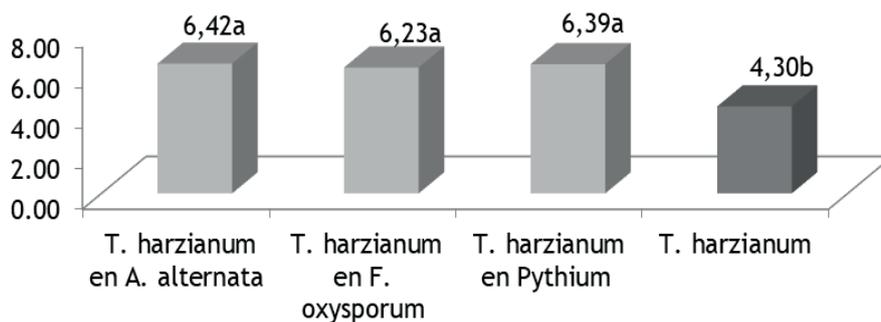


Figura 8. Radio de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en los cultivos dual con los hongos patógenos asociados al cultivo de tomate y el grupo testigo

La acción de competencia del antagonista, expresada por el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en los cultivos duales, muestran que, *Trichoderma harzianum* ejerció un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en los hongos estudiados. El PICR en *Alternaria alternata* (56,64 %) y *Fusarium oxysporum* (31,78 %) indican la capacidad competitiva del antagonista comparado con estos dos géneros de patógenos; mientras que con *Pythium*, no presentaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de inhibición, el PICR fue negativo (-12,14 %) lo que señala que el patógeno presentó mayor radio de crecimiento en el cultivo dual que en las placas testigo.

Columnas acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los porcentajes de inhibición del crecimiento radial PICR en los cultivos duales. Cada barra representa la media del PICR obtenido por los hongos patógenos en los cultivos duales.

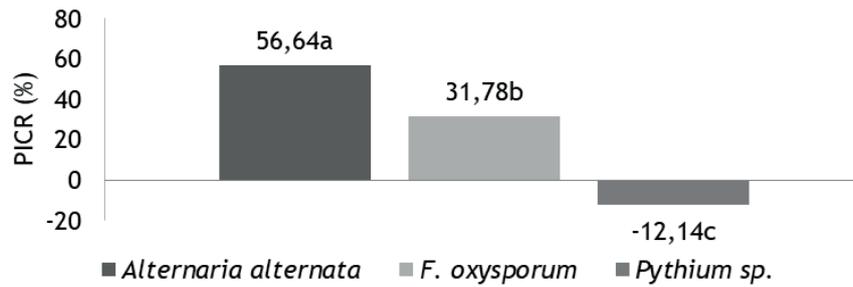


Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial en cultivos duales de *T. harzianum* con *A. alternata*, *F. oxysporum* y *Pythium*

Acción micoparasítica

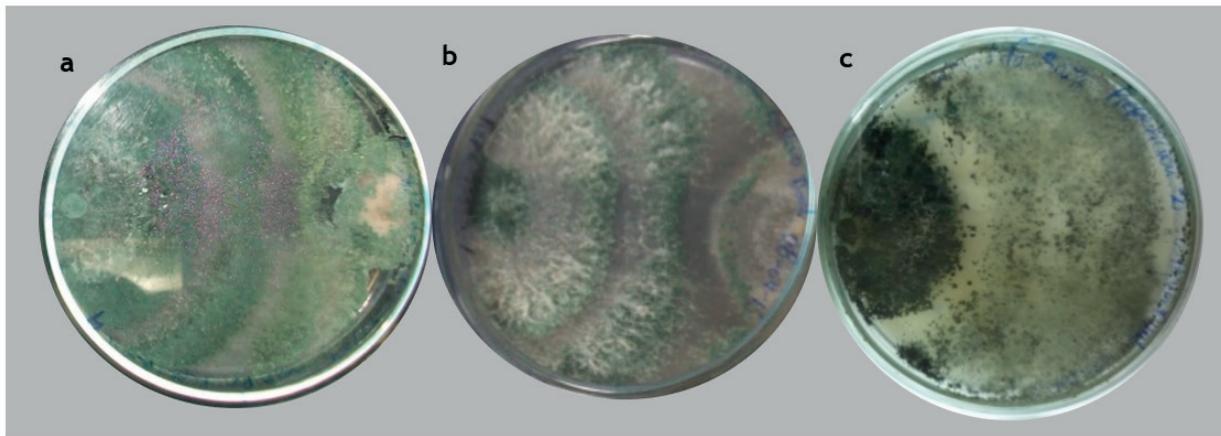


Figura 10. Acción de micoparasitismo de *T. harzianum* en los hongos asociados a enfermedades en el cultivo de tomate. Letras distintas señalan los cultivos duales con los patógenos a: *A. alternata*. b: *F. oxysporum* c: *Pythium*

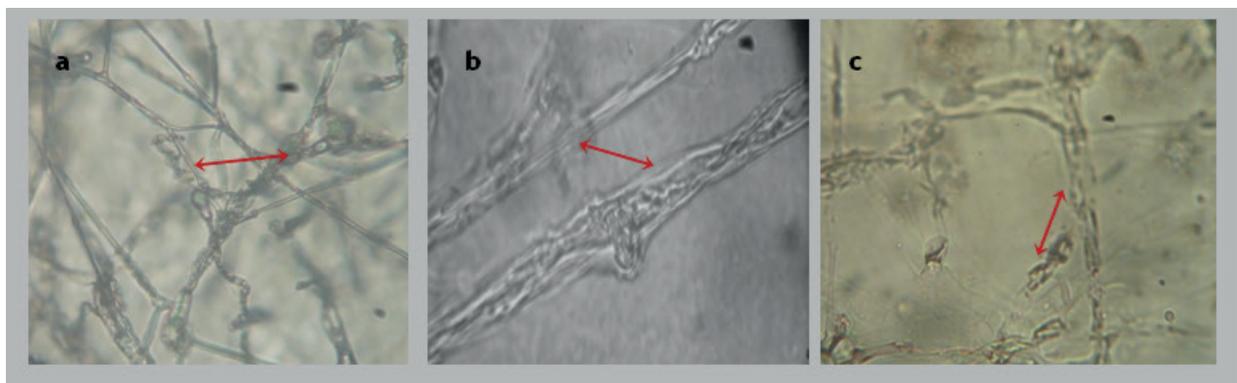


Figura 11. Observaciones microscópicas de la acción de micoparasitismo de *T. harzianum* en los hongos asociados a enfermedades en el cultivo de tomate. a: Enrollamiento de hifas en *A. alternata*. b: Lisis de hifas en *F. oxysporum*. c: Lisis de hifas en *Pythium*

El confrontamiento *in vitro* en el cultivo dual mostró la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* para parasitar los patógenos en estudio. En este caso, se comprobó su capacidad de parasitar la biomasa de los patógenos, presentando esporulaciones de color verde intenso sobre estos. Es decir, que la acción micoparasítica en *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium* fue de grado 4 según la escala propuesta<sup>(10)</sup>, lo que permitió una invasión total de la superficie del patógeno y esporulación sobre este (figura 10).

El efecto de micoparasitismo se evidenció en las observaciones microscópicas, donde se encontró que el antagonista logró penetrar las hifas de los patógenos, ejerciendo enrollamiento, estrangulamiento y penetración (figura 11a), lisis enzimáticas con distorsión (figura 11b), degradado de las hifas del patógeno (figura 11c) y deformación de los esporangios *Pythium*.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el diagnóstico de *Alternaria* y *Fusarium* en el cultivo de tomate con la

sintomatología descrita coinciden con quienes señalan que estos dos géneros son patógenos asociados a plantaciones comerciales de tomate y sus lesiones y daños son cuantiosos por lo que los autores evalúan mecanismos biotecnológicos para combatirlos.<sup>(11)</sup>

Por su parte, <sup>(12,13)</sup> describen que el género *Fusarium* provocan pudrición del tallo y raíces, dado a que su mecanismo de acción es colonizar las raíces de manera patógena, ya que dificulta la absorción de agua y nutrientes, alterando el metabolismo de la planta. Los autores describen que el fitohongo secuestra las vías metabólicas secundarias del huésped, para un mejor establecimiento, mediante la producción de toxinas como las fusarinas, ácido fusárico, y moniliformina que son propias de *F. oxysporum*, las cuales pueden causar efectos nocivos al ser humano y animales cuando aumentan los niveles de toxicidad.

Mientras que <sup>(14)</sup> señalan que luego de que este patógeno se disemina a través del sistema vascular para habitar en los vasos del xilema de la planta causa marchitez y muerte rápida de las plantas, lo que normalmente se conoce como marchitez vascular, que sucede cuando las plantas muestran amarillamiento, y comienza por las hojas más próximas al suelo, además, la base del tallo adquiere un color oscuro y los haces vasculares se tornan de color pardo oscuro, estas sintomatologías descritas por los autores concuerdan con la patogenia observada en los tejidos del cultivo.

Al evaluar el potencial de biocontrol de *Trichoderma* se encontró que este agente de control responde por diferentes vías según el patógeno fúngico a confrontar, mientras que la agresividad del mecanismo empleado se ve asociada por la susceptibilidad de patógeno. Las observaciones de acción de antibiosis y competencia, indican la capacidad de respuesta química y biológica del antagonista. La acción fungistática de forma directa a partir de la formación de una banda de antibiosis que limita el crecimiento del agente patógeno expuesto, señalan la producción de sustancias orgánicas producidas por esta cepa, comportamiento similar reportaron<sup>(15)</sup> en estudios de *T. harzianum* donde los autores señalaron la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos porque produce numerosos antibióticos como tricodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, penicilina, tricotecenos, tricolorzianinas, entre otros.

Al respecto, indicaron la presencia de ácido tetrámico en cepas de *Trichoderma harzianum*, demostrando propiedades biológicas notables, incluida la promoción del crecimiento de las plantas, actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos como *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*, además de la capacidad de quelar el hierro del suelo ( $Fe^{3+}$ ), facilitando así su absorción por parte de la planta.<sup>(16)</sup> Quizás este tipo de compuesto pudo estar presente durante el confrontamiento con el patógeno *Pythium* lo que resultó en fungiestasis del crecimiento del hongo al encontrar la banda de antibiosis desarrollada por *Trichoderma harzianum*.

Los dos tipos de reconocimiento fitoquímico de *Trichoderma* observado sobre las especies patógenas en el medio, le brindó la capacidad de producir sustancias volátiles para ejercer una acción a distancia, lo que limitó y deformó el desarrollo de las estructuras somáticas del patógeno. Los autores <sup>(17)</sup> describieron que los metabolitos secundarios volátiles secretados por *T. viride* pueden hacer que el micelio de *Phytophthora nicotianae* crezca de manera irregular, se rompa o incluso se disuelva; evidenciando la capacidad de producir metabolitos secundarios que le otorga a *Trichoderma* ventajas selectivas en procesos como competencia, simbiosis, transporte de metales, señalización y actividad micoparasítica. De la misma forma, señalaron la capacidad de algunas especies de *Trichoderma* para producir metabolitos volátiles que generan fungistasis,<sup>(18)</sup> es decir, inhiben la germinación de esporas de sus competidores, lo que le otorga ventaja al competir por espacio y nutrientes.

*Trichoderma* tiene una fuerte adaptabilidad al medio ambiente.<sup>(19)</sup> Al crecer rápidamente en los cultivos duales el antagonista puso en evidencia la capacidad competitiva por nichos y nutrientes. Al medir las tasas de crecimiento se encontró la rápida colonización del medio por el antagonista frente a *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. En sus estudios <sup>(20)</sup> explicaron este eficaz fenómeno de incremento de la tasa de crecimiento mayor por *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Sin embargo, en la investigación se encontró que al confrontar el antagonista con *Pythium* el patógeno desarrollo inicialmente mayor radio de crecimiento micelial comparado con *Trichoderma*, sobre esta ocurrencia ya habían manifestado que la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato, y al terminar los días de evaluación este efecto fue observado.<sup>(21)</sup>

En este sentido, <sup>(22)</sup> expresan que varias especies de *Trichoderma* tiene estrategias efectivas de colonización de plantas para ser abundante en un nicho donde ocurre la competencia con otros hongos considerándole competidores agresivos; por lo que, este comportamiento le da ventaja biológica en el medio cuando se comparte con hongos de menores tasas de crecimiento diario. Por otra parte, <sup>(23)</sup> explican que la especie *T. harzianum* colonizan rápidamente varios sustratos y eliminan patógenos de crecimiento más lento. La competitividad de la especie *T. harzianum* expresa en el estudio puede ser el resultado de la agresividad del mecanismo de competencia de la cepa empleada, sumado a la alta disponibilidad de dextrosa que está presente en el medio sintético. Así, <sup>(24)</sup> asociaron el crecimiento del hongo *Trichoderma* en diferentes medios, encontrando tasas de crecimiento particularmente altas bajo la presencia de glucosa y dextrosa.

El comportamiento de inhibición del crecimiento radial PICR ha sido señalado en varias especies de *Trichoderma*, destacándolo como un efectivo agente de biocontrol de varios patógenos de cultivos. Al respecto, <sup>(25)</sup> reportaron 53 % de PICR de *T. harzianum* con *Fusarium solani* y 55 % con del mismo patógeno frente *T. koningiopsis*. Aunque los resultados fueron significativos y efectivos, los estudios realizados con 13 especies de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum* presentaron mayor inhibición del patógeno, con un PICR de 84,4 a 90,5 %, destacando la especie *T. erinaceum*.<sup>(26)</sup>

El micoparasitismo es uno de los mecanismos importantes en el control biológico de *Trichoderma*, en el estudio este indicador estuvo presente en grado 4 con todos los patógenos, con acción de estrangulamiento y lisis de las hifas de los patógenos por la especie *T. harzianum* a nivel microscópico, lo que indican la agresividad de la cepa hacia el biocontrol de los hongos evaluados, coincidiendo con los resultados descritos por <sup>(25,27)</sup> donde al comparar el efecto de especies como *T. harzianum* y *T. koningiopsis* en *Fusarium solani* obtuvieron respuesta y cambios solo con la especie *T. harzianum* debido a la producción de quitinasas que permite disolver la pared celular de las hifas de los patógenos.

La actividad enzimática del micoparasitismo apreciadas en las observaciones microscópicas señalan que en el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma secreta enzimas*<sup>(28)</sup> que hidrolizan la pared celular de los hongos que parasita, siendo las más conocidas: las proteasas, quitinasas y glucanasas; lo que provoca la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma. En tal sentido, <sup>(29)</sup> indican que esta acción por parte de *Trichoderma* inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo de los patógenos, a partir de la degradación de sus enzimas, que le permiten al antagonista alimentarse de ellos.

## CONCLUSIONES

Se identificaron a los microorganismos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium sp.*, como los agentes causales de las enfermedades fúngicas en las lesiones de las plantas de tomate muestreadas.

Al ser positiva las respuestas de acción *in vitro* del antagonista en los fitohongos estudiados, se concluye que el hongo *Trichoderma harzianum* presenta el potencial para ser un biocontrol efectivo en las enfermedades fúngicas asociadas al cultivo de tomate, ya que el hongo responde a la presencia de patógenos en su habitat compartido, activando de forma conjunta los mecanismos que se le atribuyen: colonización, antibiosis y micoparasitismo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. «Food Agricultural Organization of the United Nations», 2019. <https://www.fao.org/statistics/es>.
2. Doaz, R. «Situación actual y potencial de las principales hortalizas que se siembran en Venezuela». Revista FONIAP Divulga, 1993.
3. Marín, D. «Rendimiento y Producción agrícola vegetal: Un análisis del entorno mundial (1997-1999) y de Venezuela (1988 - 2001).» Revista Agroalimentaria, 2002.
4. Salas, A., Osorio, E., Espinoza, C., Rodríguez, R., Segura, M., Ramírez, E., y Estrada, B. «Principales enfermedades del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de campo.» Revista Científica Multidisciplinar, 2022.
5. Sánchez, F. «La resistencia de las plagas y enfermedades ante el control convencional y la búsqueda de alternativas de biocontrol.» Tierra Infinita, 2019.
6. Pineda, Z, M., Pineda, R, D., Labarca, M, J., y González, G. H. «Caracterización y comportamiento biológico de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* del sur del lago de Maracaibo - Venezuela». Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria 5, no 1 (2020): 9-15.
7. Agrios, G. Plant Pathology. 5ta ed. London, UK: Editorial Elsevier Academic Press, 2005.
8. Pitt, J., y Hocking, A. Fungi and Food Spoilage. 1era ed. London.: Blackie Academic & Professional., 1997.
9. Pineda, Z, M., y González, G, H. «Bioactividad fungistática del extracto acuoso artesanal de *Azadirachta indica* en hongos fitopatógenos asociados al cultivo de guanábana». Revista Ambiental Aire y Agua 13, no 2 (2022): 65-77.
10. Ezziyani, M., Pérez, C., Sid, A., Requena, M., y Candela, M. «*Trichoderma harzianum* como biofungicida

para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.).» *Revista Anuales de Biología* 26 (2004): 35-45.

11. Martínez, F., Andrade, G., Aispuro, E., Hernández-Montiel, L., Holguin, R., y Rueda-Puente, E. «Antisuero vs hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate en Sonora, México». *Revista Mexicana de Ciencia Agrícolas* 10, no 4 (2020): 873-84. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1706>.

12. Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., y Blanco-Meneses, M. «Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica.» *Agronomía Costarricense* 42, no 1 (2018): 115-26. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>.

13. Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., y Stępień, L. «*Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions». *Toxins* 11 (2019): 1-22. <https://doi.org/10.3390/toxins11110664>.

14. Albarracín, L., Hortua, S., y Acero, J. «Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Lippia graveolens* sobre *Fusarium oxysporum* en la familia Solanaceae. Una revisión». *Revista Tecnología en Marcha* 36, no 1 (2023): 54-65. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v36i1.5877>.

15. Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N y Barrales-Cureño, H. «Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile.» *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 10, no 6 (2020): 1259-72. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>.

16. Vinale, F., Sivasithamparan, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M., y Li, H. «A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants.» *Physiology and Molecular Plant Pathology* 72, no 1-3 (2008): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.

17. Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, MR., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Napolitano, M., Lombardi, N., Lorito, M., y Woo, SL. «Modulation of tomato responses to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid». *Frontiers in Microbiology* 9 (2018): 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966>.

18. El-Sharkawy, H., Rashad, Y., y Ibrahim, S. «Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp.» *Physiological and Molecular Plant Pathology* 103 (2018): 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.002>.

19. Köhl, J., Kolnaar, R., y Ravensberg, W. «Modo de acción de los agentes de control biológico microbiano contra las enfermedades de las plantas: relevancia más allá de la eficacia.» *Frontiers in Plant Science* 10 (2019): 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.

20. Mohiddin, F., Padder, S., Bhat, A., Ahanger, M., Shikari, A., y Wani, S. «Filogenia y optimización de *Trichoderma harzianum* para la producción de quitinaasa: evaluación de su comportamiento antifúngico frente a los prominentes fitopatógenos transmitidos por el suelo de la India templada». *Microorganismos* 9, no 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/microorganismos9091962>.

21. Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. «Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos.» *Revista Protección Vegetal*, 2009.

22. Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., y Kariman, K. «Mecanismos subyacentes a los efectos protectores de los hongos beneficiosos contra las enfermedades de las plantas». *Control biológico* 117 (2018): 147-57. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>.

23. Oszust, K., Cybulska, J., y Frac, M. «How Do *Trichoderma* Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentiates». *International Journal of Molecular Sciences* 21, no 12 (2020): 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21124235>.

24. Jaroszuk-Scise, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyskiewicz, K., Pawlik, A., y Janusz, G. «Fitohormonas (auxina, giberelina) y ACC desaminasa sintetizadas in vitro por la cepa micoparásita *Trichoderma DEMTkZ3A0* y cambios en el nivel de Marcadores de auxinas y resistencia de plantas en plántulas de trigo inoculadas con conidios de esta cepa.» *International Journal of Molecular Sciences* 20, no 19 (2019): 1-35. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>.

25. Ferrer, M., Romero, L., Andrade, O., Sánchez, P., Rivera, JA., y Hernández, S. «Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco.» *Revista Mexicana de fitopatología* 39, no 2 (2021): 228-47. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2101-5>.

26. Martínez, O., Cristóbal, J., Tun, J., y Reyes, A. «Detección de genes Epl1 y Sm1 en *Trichoderma* spp. antagonistas contra hongos fitopatógenos.» *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 8, n.o 2 (2021): 1-8. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2791>.

27. Tian, Y., Tan, Y., Yan, Z., Liao, Y., Chen, J., y De Boevre M. «Antagonistic and Detoxification Potentials of *Trichoderma* Isolates for Control of Zearalenone (ZEN) Producing *Fusarium graminearum*». *Frontiers Microbiology* 8 (2018): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02710>.

28. García, C., Mamani, M., Chávez, G., y Álvarez, M. «Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador». *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7, no 1 (2016): 20-32.

29. Romero, T., López, P., Ramírez, M., y Cuervo, J. «Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*).» *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 32, no 1 (2016): 32-45. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>.

#### FINANCIACIÓN

Los autores agradecen a la empresa INBIA MP 2023 C. A, por el apoyo logístico, que permitió la realización y culminación de esta investigación que contribuye al fortalecimiento de la línea de investigación en el estudio biotecnológico y producción de insumos sostenibles para la agricultura.

#### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

#### CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

*Conceptualización:* Maryori Carolina Pineda Zambrano.

*Curación de datos:* Maryori Carolina Pineda Zambrano.

*Análisis formal:* Maryori Carolina Pineda Zambrano, Hebandreyna González García.

*Investigación:* Maryori Carolina Pineda Zambrano, Hebandreyna González García.

*Metodología:* Maryori Carolina Pineda Zambrano, Hebandreyna González García.

*Administración del proyecto:* Juan Carlos Escalante.

*Recursos:* Maryori Carolina Pineda Zambrano.

*Software:* Juan Carlos Escalante.

*Supervisión:* Hebandreyna González García.

*Validación:* Maryori Carolina Pineda Zambrano.

*Visualización:* Maryori Carolina Pineda Zambrano, Hebandreyna González García, Juan Carlos Escalante.

*Redacción - borrador original:* Maryori Carolina Pineda Zambrano.

*Redacción - revisión y edición:* Hebandreyna González García.