



Effect of the hexanic extracts obtained from individual and co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* on the growth of *Colletotrichum acutatum* *in vitro*

Efecto de los extractos hexánicos obtenidos del cultivo individual y co-cultivo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de *Colletotrichum acutatum* *in vitro*

José Luis Ávila-Oviedo^{ID}, Mauricio Nahuam Chávez-Avilés*^{ID}

¹Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, División de Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México/ITS de Ciudad Hidalgo, 61100, Hidalgo, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: nchavez@cdhidalgo.tecnm.mx (M. N. Chávez-Avilés)

Article history:

Received: 21 July 2025 / Received in revised form: 22 August 2025 / Accepted: 28 October 2025 / Published online: 20 November 2025.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2025.10.4.15-43>

ABSTRACT

The resistance of phytopathogenic fungi to chemical compounds has triggered the search for alternatives to their treatment. In this study, the antagonistic potential of hexanic extracts (EH) obtained from the individual cultures and co-cultures (CC) of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* sp. (*T. asperellum* T1 (CC1), T3 (CC3), or *Trichoderma* sp. T2 (CC2)) against *Colletotrichum acutatum* was assessed. Exposure to EH obtained from individual cultures altered mycelial morphology and inhibited the radial growth of *C. acutatum* (15%-17%). In contrast, the HE obtained from CC at 300 µg/mL and 450 µg/mL inhibited the radial growth of *C. acutatum* by 10% and 15%, respectively. Additionally, the EH altered germ tube morphology and reduced conidia germination (66.53%). Finally, the combination of EH obtained from *T. asperellum* T1 at 750 µg/mL and the CC3 at 450 µg/mL increased the radial growth inhibition by 35%. The mixtures altered the polarized hyphal growth, suggesting that the structural integrity of the phytopathogen was affected. These results underscore that the interaction among biological control agents *in vitro* promotes the production of promising

molecules analysis is a promising source of molecules with antagonistic effects against *C. acutatum*.

Keywords: Antagonistic effect, anthracnose, hexanic extract, phytopathogen.

RESUMEN

La resistencia de fitopatógenos a los compuestos químicos ha desencadenado la búsqueda de alternativas para controlarlos. En este estudio, se evaluó el potencial antagónico de los extractos hexánicos (EH) obtenidos de los cultivos individuales (*B. subtilis* (Bs), *T. asperellum* (T1), *Trichoderma* sp. (T2) y *T. asperellum* (T3)) y co-cultivos (CC1 (Bs+T1), CC2 (Bs+T2) y CC3 (Bs+T3)) en caldo Luria-Bertani suplementado con micelio desactivado de *Colletotrichum acutatum* (empleado como inductor) contra *C. acutatum*. La exposición a los EH obtenidos de los cultivos individuales alteró la morfología micelial e inhibió el crecimiento radial del fitopatógeno (15-17%). En contraste, los EH obtenidos de los co-cultivos inhibieron el crecimiento radial de *C. acutatum* del 10-15%. Adicionalmente, los EH alteraron la morfología del tubo germinativo y redujeron la germinación de conidios (66.53%). Finalmente, la combinación de los EH obtenidos de T1 a 750 µg/mL y del CC3 a 450 µg/mL inhibió el 35% del crecimiento radial. Las mezclas de los EH alteraron el crecimiento polarizado de las hifas, lo que sugiere que se afectó la integridad estructural del fitopatógeno. Estos resultados muestran que la interacción entre agentes de control biológico promueve la producción de moléculas prometedoras con efectos antagónicos contra *C. acutatum*.

Palabras clave: Antracnosis, efecto antagonista, extractos hexánicos, fitopatógeno.

1. Introducción

La presencia de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas provoca pérdidas productivas que comprometen la seguridad alimentaria (Savary y Willocquet, 2020). El género *Colletotrichum* alberga más de 600 especies fitopatógenas entre las que destaca *Colletotrichum acutatum* (Silva *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2024). Este fitopatógeno es cosmopolita y hemibiotrófico, ocasiona la enfermedad fúngica conocida como antracnosis, la cual genera pérdidas que van desde el 30% al 100% (Gallardo-Camarena *et al.*, 2025) en cultivos de cítricos, pimiento (Joo *et al.*, 2025), leguminosas (Sousa *et al.*, 2025), fresa (Gama *et al.*, 2025), mango, papaya, aguacate (Zakaria, 2021) y manzana (Trkulja *et al.*, 2024), entre otros.

El ciclo de vida de *C. acutatum* inicia con la formación de estructuras de resistencia (aprosorios o conidios) que se adhieren a la superficie vegetal y comienzan la infección. Posteriormente, se desarrolla la fase necrotrófica, durante la cual el tejido vegetal muere y el hongo forma nuevas estructuras reproductivas que se dispersan para infectar nuevos hospedantes (Liang *et al.*, 2021). Estas estructuras de resistencia pueden entrar en estado de latencia y germinar nuevamente cuando las condiciones bióticas y abióticas sean favorables. Esta característica aumenta la capacidad de supervivencia a largo plazo de *C.*

acutatum, lo que complica su control y erradicación; como consecuencia, se elevan los costos de producción y se comprometen los rendimientos agrícolas (Poling, 2008; Aljawasim *et al.*, 2023).

Una estrategia para mitigar la antracnosis es la aplicación de productos químicos. Sin embargo, su uso excesivo y manejo inapropiado ocasionan daños severos a los ecosistemas, perjuicios a la salud humana y favorecen el desarrollo de resistencia en los fitopatógenos (Juárez-Campusano *et al.*, 2020; Ciofini *et al.*, 2022; Espinoza-Acosta *et al.*, 2023). Uno de los principales desafíos de la agricultura moderna es desarrollar estrategias con un enfoque de sustentabilidad (Ntui *et al.*, 2021). En este sentido, los agentes de control biológico (ACB), como *Trichoderma* (Awad-Allah *et al.*, 2022; Moreno-López *et al.*, 2023) representan una alternativa para el manejo y control de enfermedades de origen fúngico. Los ACB poseen diversos mecanismos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos como la competencia por espacio y nutrientes (Tyśkiewicz *et al.*, 2022), el micoparasitismo (Mukherjee *et al.*, 2022), la antibiosis (Evren *et al.*, 2025) y la respuesta sistémica inducida (Montejano-Ramírez *et al.*, 2024). Sin embargo, aunque la aplicación de *Trichoderma* ha mostrado resultados prometedores (Jin y Alberti, 2025), su uso extendido afronta limitaciones relacionadas con su capacidad de adaptación al nicho ecológico donde se desea implementar, su susceptibilidad a las condiciones ambientales y la posible falta de especificidad hacia el huésped de interés (Vos *et al.*, 2015; Stange *et al.*, 2024; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2025).

Algunos enfoques de control optan por el aprovechamiento de los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* (Cortez-Lázaro *et al.*, 2025), los cuales, debido a su diversa naturaleza química, pueden actuar sobre diferentes blancos de acción en el fitopatógeno de interés (Yao *et al.*, 2023; Boukaew *et al.*, 2024). *Trichoderma* produce compuestos orgánicos volátiles (COVs) que tienen propiedades antimicrobianas (Kong *et al.*, 2022; Joo y Hussein, 2022; Rodríguez-González *et al.*, 2025). Sin embargo, dadas las características químicas de dichos compuestos (alta volatilidad), su aplicación en campo abierto o invernadero presenta limitaciones técnicas, por ejemplo, la baja estabilidad en las condiciones ambientales, lo que dificulta mantener concentraciones efectivas *in situ* (Zhao *et al.*, 2022). Otros metabolitos son de naturaleza difusible; estos compuestos causan alteraciones morfológicas en las colonias de los hongos patógenos (hinchamiento, curvatura y acortamiento de las hifas, así como necrosis) (Bae *et al.*, 2016). Los compuestos producidos por *Trichoderma atroviride* y *T. asperellum*, obtenidos mediante extractos de acetato de etilo, generaron efectos citotóxicos contra hongos fitopatógenos y oomicetos (Stracquadanio *et al.*, 2020).

Sin embargo, la producción y la naturaleza química de estas moléculas dependen de la capacidad metabólica del hongo, la fuente de nutrientes y las condiciones de crecimiento, así como de sus interacciones intra o interespecíficas con otros microorganismos (Bautista-Ortega *et al.*, 2022; Ávila-Oviedo *et al.*, 2024). Algunos enfoques buscan optimizar estas variables para inducir la producción de metabolitos secundarios novedosos. Al respecto, la interacción entre *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. puede generar sinergismo metabólico en el que la actividad de uno favorece la expresión de rutas biosintéticas del otro. Por ejemplo, *Bacillus velezensis* y *Trichoderma harzianum* en co-cultivo adaptan su metabolismo, de manera que los exudados fúngicos estimulan el crecimiento bacteriano y, a su vez, modulan

positivamente la expresión de genes que participan en la síntesis de lipopéptidos en *B. velezensis*; lo cual se traduce en un incremento en la producción de estos compuestos y, por lo tanto, en una mayor actividad antifúngica (Fifani *et al.*, 2022).

Adicionalmente, el co-cultivo de *T. atroviride* SG3403 y *Bacillus subtilis* 22 incrementó la producción de metabolitos con actividad antifúngica; el filtrado fermentado del co-cultivo inhibió el crecimiento radial de *Fusarium graminearum* en un 50%, el cual fue mayor en comparación con los cultivos individuales de *B. subtilis* (46%) y *T. atroviride* (0%) (Li *et al.*, 2020). Estos resultados indican que en el co-cultivo se producen compuestos antifúngicos en mayor cantidad o diversidad química. En este sentido, con la finalidad de inducir la producción diferencial de metabolitos secundarios, Emanuel *et al.*, (2020) establecieron un co-cultivo entre *B. subtilis* y cepas de *Trichoderma* sp. donde usaron como inductor micelio desactivado de *C. gloeosporioides*. Los resultados mostraron que en estos co-cultivos se indujo la producción de metabolitos secundarios como el acetato de butilo, butanoato de etilo, acetato de butilo, ácido acético, 2-butoxietanol, 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzaldehído, alcohol 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibencílico, ácido hexadecanoico y ácido octadecanoico. No obstante, la presencia y abundancia relativa de estos metabolitos fueron distintas entre los co-cultivos de cada cepa de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* evaluados. Por ejemplo, aunque el acetato de butilo se detectó en todas las fracciones de extractos hexánicos (EH), su abundancia fue diferencial entre los co-cultivos; además, este compuesto mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *C. gloeosporioides* y generó alteraciones en la morfología de la colonia fitopatógena. Estos resultados resaltan que las interacciones microbianas interespecíficas representan una estrategia novedosa para identificar moléculas con potencial antagónico.

Otra estrategia para inducir la producción de metabolitos con potencial antifúngico implica modificar la composición química del medio de cultivo en el que se cultivan los microorganismos (Chávez-Avilés *et al.*, 2024) o establecer interacciones controladas entre estos bajo condiciones específicas (Li *et al.*, 2020; Chávez-Avilés *et al.*, 2024; López y López *et al.*, 2023). Consecuentemente, en este estudio se evaluó el potencial antifúngico de los EH obtenidos del cultivo individual y co-cultivo de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. acutatum* contra este mismo fitopatógeno.

2. Materiales y métodos

2.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental se desarrolló en el siguiente orden: inicialmente, se establecieron cultivos individuales (*B. subtilis* QST 713 (Bs), *T. asperellum* (T1), *Trichoderma* sp. (T2) y *T. asperellum* (T3)), así como los co-cultivos (CC1 (Bs + T1), CC2 (Bs + T2) y CC3 (Bs + T3)) en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con 1% de micelio desactivado de *C. acutatum* (MDCa, empleado como inductor). Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento de los microorganismos; se monitoreó la producción de azúcares como indicador indirecto para determinar el tiempo de extracción de los metabolitos. Una vez definido el tiempo de extracción, los metabolitos fueron obtenidos mediante una extracción líquido-líquido con hexano, lo que permitió obtener los EH. Se

evaluó el efecto de los EH obtenidos de los cultivos individuales y co-cultivos sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios de *C. acutatum*. Finalmente, con base en los efectos observados, se establecieron combinaciones de los EH y se analizó su efecto sobre el crecimiento de *C. acutatum*.

2.2. Obtención de extractos hexánicos

Se establecieron dos tipos de cultivo para obtener los EH, cultivos individuales y co-cultivos. Para los cultivos individuales se inocularon 1×10^8 UFC de Bs o 1×10^8 conidios de T1, T2 o T3 en un matraz con 250 mL de caldo LB. Para el co-cultivo se añadieron 1×10^8 UFC de Bs y 1×10^8 conidios de *Trichoderma* (T1, T2 o T3) designándose como CC1, CC2 y CC3 respectivamente. En todos los casos se utilizó caldo LB suplementado con 10 g de MDCA. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad en agitación constante a 150 rpm a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.3. Determinación de azúcares reductores

Para determinar la producción de azúcares reductores (como una medida indirecta del crecimiento) se implementó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La mezcla de reacción se preparó con 20 μL de las muestras, 180 μL de agua destilada y 300 μL del reactivo DNS. La solución se sometió a un choque térmico a 95°C (5 minutos) y 4°C (2 minutos). La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 530 nm con base en una curva de calibración en la que se empleó glucosa como estándar ($r^2 = 0.98$, datos no mostrados). Las mediciones se realizaron cada 12 horas durante 11 días. Los metabolitos producidos en los cultivos individuales se extrajeron a las 36 horas de incubación (S1) mientras que los metabolitos producidos en los co-cultivos se extrajeron en diferentes periodos de incubación; para el CC2 se extrajeron a las 24 horas, mientras que los de CC1 y CC3 se obtuvieron a las 48 horas (S2).

2.4. Extracción de compuestos orgánicos de los cultivos líquidos

Después de identificar la fase estacionaria (mediante el monitoreo de azúcares reductores) de los cultivos individuales y de los co-cultivos, se extrajeron los compuestos orgánicos con hexano de acuerdo con Emanuel *et al.*, (2020). Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria (S1, S2) se centrifugaron a $5,590 \times g$ durante 5 minutos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con hexano en una proporción 1:1. La mezcla se mantuvo a 25°C con agitación constante a 180 rpm durante 3 días. La fase orgánica se separó y se concentró en un rotavapor a 65°C . El extracto hexánico se almacenó a 4°C hasta su uso.

2.5. Análisis del efecto de los extractos hexánicos obtenidos de los cultivos individuales y de los co-cultivos sobre el crecimiento de *C. acutatum*

Para evaluar el efecto de los EH sobre el crecimiento de *C. acutatum* se empleó la técnica del medio envenenado (Arjona-Girona *et al.*, 2014), para lo cual se suplementó el medio PDA con diferentes concentraciones de los EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$) de cada uno de los cultivos individuales (T1, T2, T3 y Bs) y de los co-cultivos (CC1, CC2 y CC3). Posteriormente, se inoculó un disco de 8 mm de diámetro de medio de cultivo colonizado

con micelio de *C. acutatum* en el centro de la caja Petri. Se midió el crecimiento radial durante 12 días y se analizó el porcentaje de crecimiento micelial usando la siguiente ecuación: Inhibición del crecimiento = $[(\text{Crecimiento del control} - \text{Crecimiento del tratamiento}) / (\text{Crecimiento control})] \times 100$ (Abdelshafy-Mohamad *et al.*, 2020). Al término del experimento se visualizó el micelio con un microscopio metalográfico Meiji Infinit 1 con el objetivo de 40X (Emanuel *et al.*, 2020).

2.6. Efecto de los extractos hexánicos obtenidos del cultivo y co-cultivo sobre la germinación de los conidios de *C. acutatum*

Para evaluar la viabilidad de los conidios producidos por las colonias expuestas a los EH se siguió la metodología propuesta por Barroso-Ake *et al.* (2021) con ligeras modificaciones. Se recolectó el micelio de las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH en un tubo cónico estéril de 15 mL y se re-suspendió con 5 mL de agua destilada estéril. La solución se homogeneizó mediante agitación durante 1 minuto en vórtex, después se filtró con manta de cielo en un tubo cónico nuevo. Se cuantificó la concentración de conidios en una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 1×10^7 conidios/mL. Para evaluar la viabilidad de los conidios, estos se incubaron en caldo papa dextrosa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación constante (180 rpm) bajo condiciones de oscuridad. Los conidios se analizaron en un microscopio metalográfico Meiji Infinit 1 con el objetivo 40X cada 3 horas durante 12 horas y se determinó el porcentaje de germinación. Los tratamientos evaluados fueron: cultivos individuales (T1, T2 y T3 a 700 µg/mL) y co-cultivos CC1 (150, 450 y 750 µg/mL), CC2 (450 y 600 µg/mL) y CC3 (450 y 750 µg/mL).

2.7. Efecto de las mezclas de los extractos hexánicos obtenidos de los cultivos individuales y co-cultivos sobre el crecimiento de *C. acutatum*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la combinación de los EH, se conformaron mezclas de estos, para lo cual se consideraron los efectos causados individualmente por los EH como la inhibición del crecimiento, la germinación de conidios, las alteraciones en la morfología del micelio, el daño a las hifas y la formación de apresorios. Los tratamientos establecidos fueron: M1 (T1-750 µg/mL + CC3-450 µg/mL), M2 (T1-750 µg/mL + CC3-750 µg/mL), M3 (T1-750 µg/mL + CC2-450 µg/mL), M4 (T2-750 µg/mL + CC1-150 µg/mL), M5 (T2-750 µg/mL + CC1-450 µg/mL), M6 (T2-750 µg/mL + CC3-450 µg/mL), M7 (T2-750 µg/mL + CC3-750 µg/mL), M8 (T3-750 µg/mL + CC1-150 µg/mL), M9 (T3-750 µg/mL + CC1-450 µg/mL), M10 (T3-750 µg/mL + CC1-750 µg/mL), M11 (T3-750 µg/mL + CC2-450 µg/mL). Los ensayos de antagonismo se realizaron según lo descrito en la sección 2.5.

2.8. Análisis estadístico

Para realizar los gráficos se utilizó la paquetería de Microsoft Office software (Excel and Word, 2021). Para los análisis estadísticos, se utilizó Minitab® v.21.3. (2024). <https://www.minitab.com/>. Los datos de los cultivos individuales y co-cultivos, de la combinación de las mezclas y de la germinación de conidios se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar de tres repeticiones. Los datos de inhibición del crecimiento radial se analizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los datos obtenidos de las pruebas de germinación se analizaron mediante

un ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Se realizaron dos réplicas técnicas de cada ensayo.

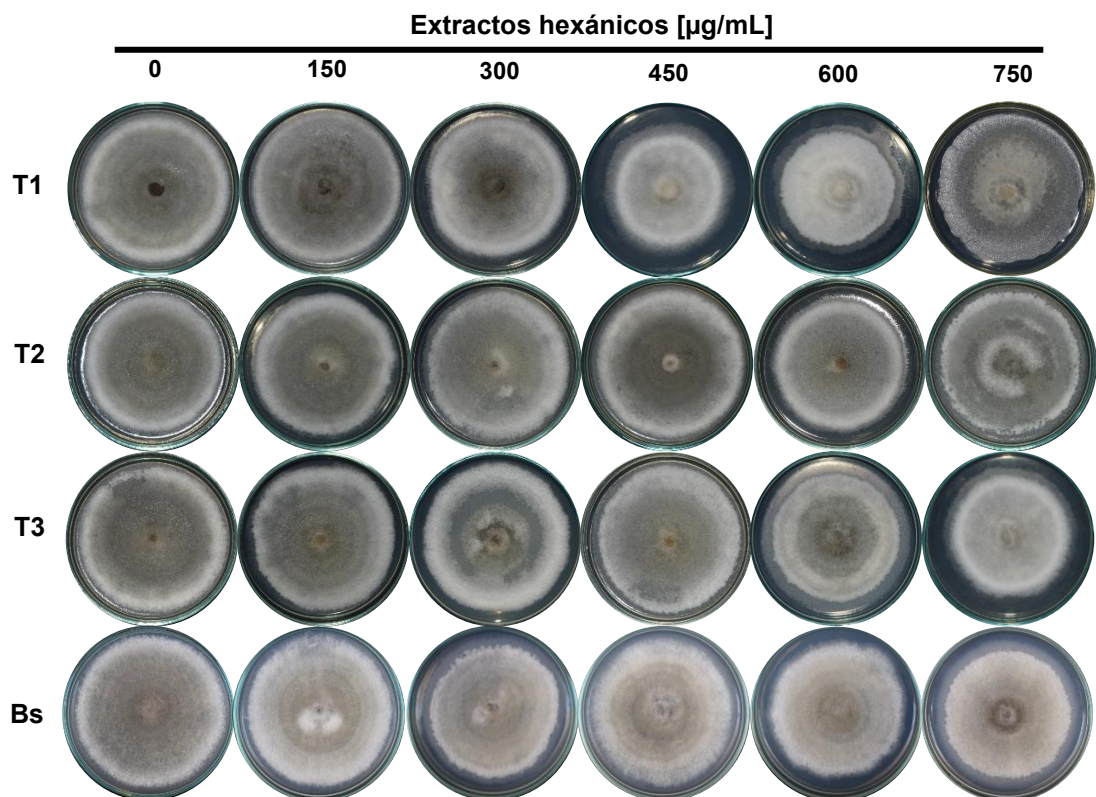
3. Resultados

3.1. Análisis del efecto de los extractos hexánicos obtenidos de los cultivos individuales sobre el crecimiento de *C. acutatum*

Una vez obtenidos los EH de los cultivos individuales, se determinó su efecto sobre el crecimiento de *C. acutatum*. Las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH mostraron alteraciones morfológicas en el micelio, las cuales incluyeron bordes irregulares a partir de 150 $\mu\text{g/mL}$. Estos efectos variaron en función de los EH obtenidos de cada cultivo. Adicionalmente, se visualizaron halos de micelio laxo a 300 $\mu\text{g/mL}$ del EH obtenido del cultivo T3 (Fig. 1a).

En cuanto al crecimiento radial, todos los EH obtenidos de los cultivos individuales evaluados a 300 $\mu\text{g/mL}$ y 450 $\mu\text{g/mL}$ inhibieron el crecimiento radial de *C. acutatum* entre un 5% y 15%. Los efectos más pronunciados se observaron en las colonias expuestas a los EH obtenidos del cultivo T1 a 600 $\mu\text{g/mL}$, así como de T3 y Bs a 750 $\mu\text{g/mL}$, los cuales alcanzaron un 17% de inhibición radial del crecimiento de *C. acutatum* (Fig. 1b). A nivel microscópico, los EH disminuyeron la densidad de hifas de *C. acutatum*, las cuales además eran delgadas; adicionalmente, se observó una modulación diferencial en la producción de conidios (presencia o ausencia) a partir de 300 $\mu\text{g/mL}$ (S3).

a)



b)

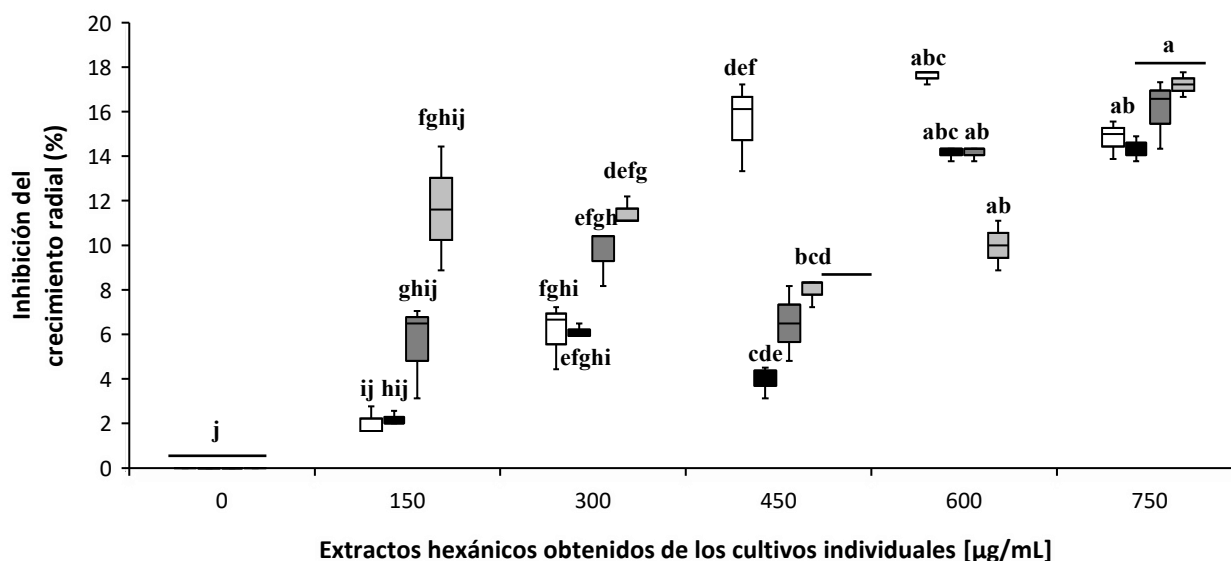


Fig. 1. Efecto de los EH obtenidos de los cultivos individuales (T1, T2, T3 y Bs) sobre el crecimiento de *C. acutatum*. Colonias representativas de *C. acutatum* expuestas a diferentes concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 µg/mL) durante 12 días de incubación (a). Inhibición del crecimiento radial en respuesta a los HE de T1 □, T2 ■, T3 ■ y Bs ■ (b). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas; el experimento se realizó en dos réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según el ANOVA de un factor, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p \leq 0.01$).

Fig. 1. Effect of HE obtained from individual cultures (T1, T2, T3, and Bs) on the growth of *C. acutatum*. Representative colonies of *C. acutatum* exposed to different HE concentrations (0, 150, 300, 450, 600, and 750 µg/mL) after 12 days of incubation (a). Radial growth inhibition in response to HE from T1 □, T2 ■, T3 ■, and Bs ■ (b). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates; the experiment was performed with two independent biological replicates. Different letters indicate statistically significant differences among treatments according to one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p \leq 0.01$).

Una vez obtenidos los EH de los co-cultivos, se evaluó su efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno. La exposición de *C. acutatum* a los EH obtenidos de los co-cultivos evaluados a 300 y 450 µg/mL causó alteraciones morfológicas pronunciadas en las colonias del fitopatógeno (bordes irregulares, micelio laxo y cambios en la pigmentación del micelio, principalmente). Los EH obtenidos del CC1 redujeron la densidad micelial y provocaron un crecimiento irregular del fitopatógeno, mientras que los EH obtenidos de los CC2 y CC3 favorecieron el desarrollo de micelio aéreo (Fig. 2a).

Los datos cuantitativos mostraron dos efectos. Por un lado, los EH evaluados a 150, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$ (en todos los casos) promovieron el crecimiento de *C. acutatum* (5-10%); mientras que los EH obtenidos de todos los co-cultivos evaluados a 450 $\mu\text{g/mL}$ generaron del 11% al 13% de inhibición del crecimiento radial. Los análisis microscópicos revelaron que las colonias expuestas a 150 $\mu\text{g/mL}$ generaron estructuras reproductivas, mientras que en el resto de los tratamientos no se observaron. Adicionalmente, las colonias expuestas a 300, 450, 600 y 700 $\mu\text{g/mL}$ del EH desarrollaron hifas delgadas, bifurcadas y distorsionadas (S4).

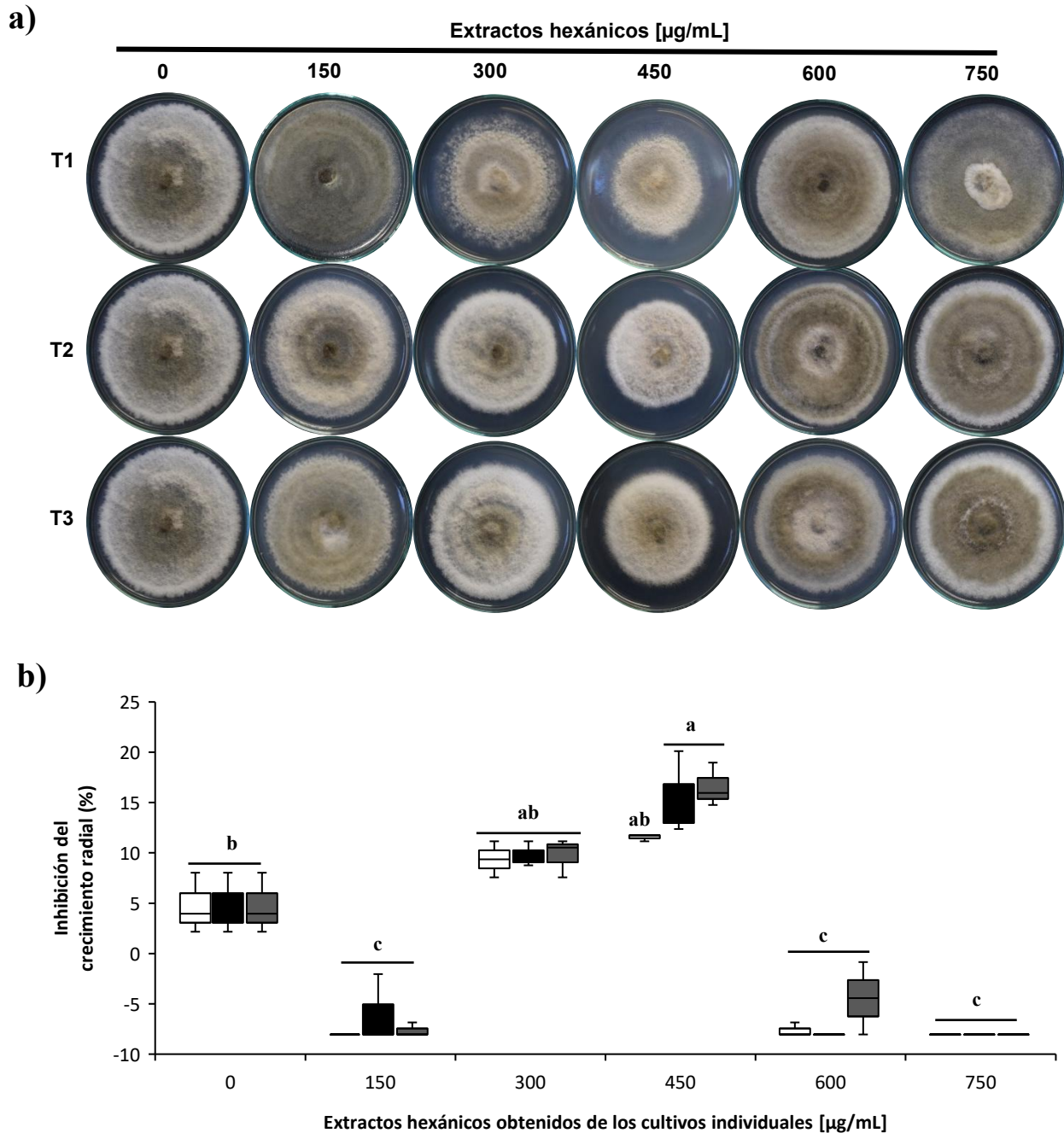


Fig. 2. Efecto de los EH obtenidos de los co-cultivos (CC1, CC2 y CC3) sobre el crecimiento de *C. acutatum*. Colonias representativas de *C. acutatum* expuestas a diferentes concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 días de incubación (a). Inhibición del crecimiento radial en respuesta a los HE de CC1 \square , CC2 \blacksquare y CC3 \blacksquare (b). Las líneas verticales indican la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas; el experimento se realizó en dos réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según el ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p \leq 0.01$).

Fig. 2. Effect of HE obtained from co-cultures (CC1, CC2, and CC3) on the growth of *C. acutatum*. Representative colonies of *C. acutatum* exposed to different HE concentrations (0, 150, 300, 450, 600, and 750 $\mu\text{g/mL}$) after 12 days of incubation (a). Radial growth inhibition in response to HE from CC1 \square , CC2 \blacksquare , and CC3 \blacksquare (b). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates; the experiment was performed with two independent biological replicates. Different letters indicate statistically significant differences among treatments according to one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p \leq 0.01$).

3.2. Efecto de los extractos hexánicos obtenidos de los cultivos individuales y de los co-cultivos sobre la germinación de conidios de *C. acutatum*

Con base en las alteraciones morfológicas observadas en las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH, se evaluó si la exposición a estos afectó la viabilidad de los conidios, por lo que se determinó su germinación. En el tratamiento control, la germinación de los conidios inició a las 9 horas (S5). Sin embargo, en todos los tratamientos los conidios producidos durante la exposición a los EH a 750 $\mu\text{g/mL}$ presentaron un retraso en la elongación del tubo germinativo (S5) y, por lo tanto, en la germinación (Fig. 3). Finalmente, a las 12 horas, la tasa de germinación en el control alcanzó el 80%, mientras que los conidios producidos en las colonias expuestas a los EH en todos los tratamientos germinaron entre un 8% y un 25% (Fig. 3), lo que indica que los EH producidos en los cultivos individuales evaluados a 750 $\mu\text{g/mL}$ contienen compuestos que afectan negativamente el desarrollo de *C. acutatum*.

En los bioensayos de germinación de los conidios obtenidos de las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH obtenidos de los co-cultivos se observaron alteraciones morfológicas, como la inhibición de la elongación del tubo germinativo, encorvamiento y adelgazamiento de este (S5). De manera general, se identificaron dos efectos en la germinación; por un lado, los EH obtenidos de los CC2 y CC3 estimularon la germinación de los conidios (16-58%) a las 9 horas de incubación. De manera similar, el EH obtenido del CC3 generó un efecto positivo en la germinación (17.25%) a las 12 horas de incubación (Fig. 4). En contraste, el EH obtenido del CC1 (150 $\mu\text{g/mL}$) inhibió la germinación (66.53%) a las 12 horas de incubación (Fig. 4). Estos resultados muestran efectos diferenciales en la germinación de conidios producidos durante la exposición a los EH obtenidos de los cultivos individuales y de los co-cultivos, lo que sugiere que la interacción interespecífica entre ACB modula la producción de compuestos con actividad biológica diferencial sobre el desarrollo de *C. acutatum*.

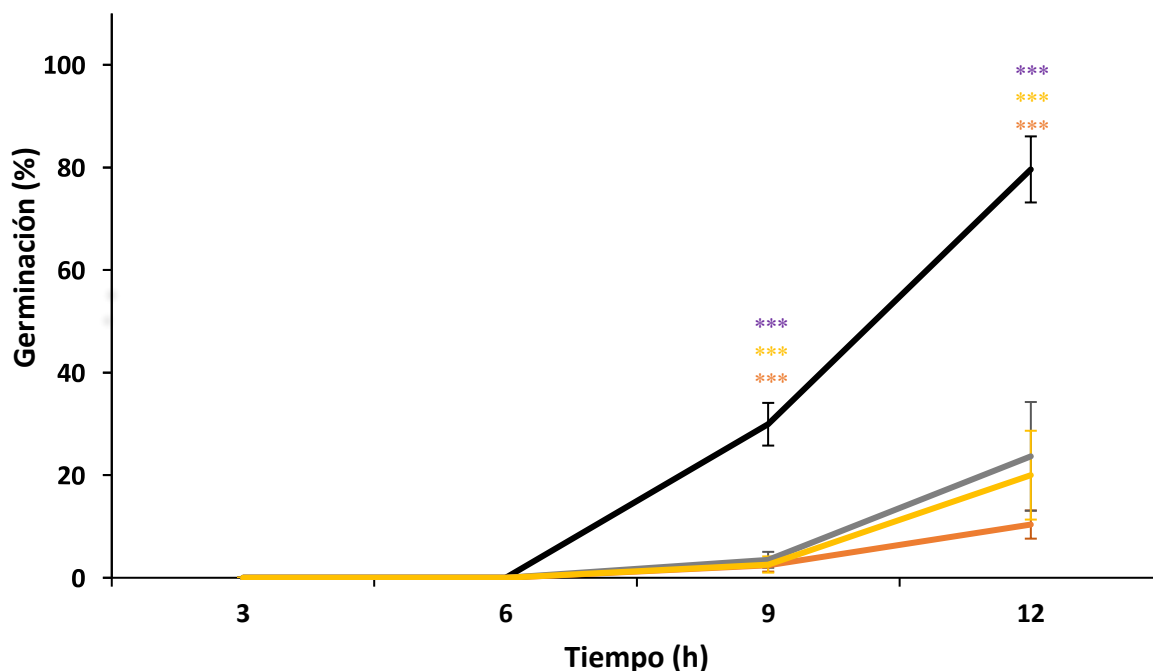


Fig. 3. Germinación de los conidios de *C. acutatum* durante la exposición a los EH obtenidos de cultivos individuales. Control (línea negra), T1-750 µg/mL (línea naranja), T2-750 µg/mL (línea gris), T3-750 µg/mL (línea amarilla). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas en cada uno de dos experimentos independientes. Las diferencias significativas entre tratamientos se detectaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos (***) indican diferencias estadísticamente significativas.

Fig. 3. Germination of *C. acutatum* conidia during exposure to HE obtained from individual cultures. Control (black line), T1-750 µg/mL (orange line), T2-750 µg/mL (gray line), and T3-750 µg/mL (yellow line). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates, each performed in two independent experiments. Significant differences among treatments were detected by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p \leq 0.0001$). Asterisks (***) indicate statistically significant differences.

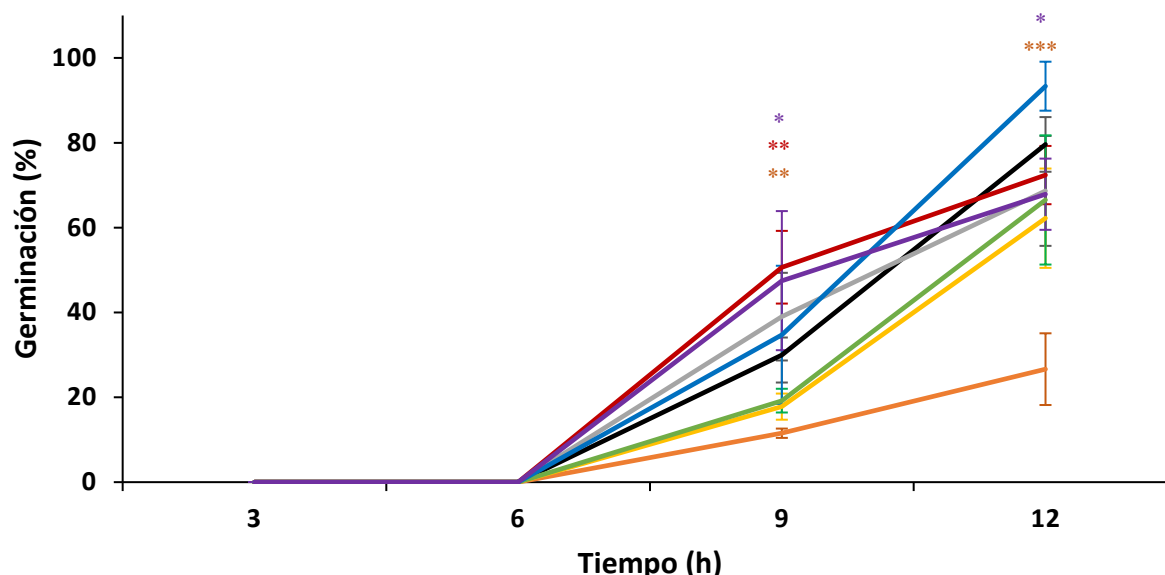


Fig. 4. Germinación de los conidios de *C. acutatum* durante la exposición a los EH obtenidos de los co-cultivos. Control (línea negra), CC1-150 $\mu\text{g/mL}$ (línea naranja), CC1-450 $\mu\text{g/mL}$ (línea gris), CC1-750 $\mu\text{g/mL}$ (línea amarilla), CC2-450 $\mu\text{g/mL}$ (línea roja), CC2-600 $\mu\text{g/mL}$ (línea verde), CC3-450 $\mu\text{g/mL}$ (línea azul) y CC3-750 $\mu\text{g/mL}$ (línea morada). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas en cada uno de dos experimentos independientes. Las diferencias significativas entre tratamientos se detectaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni ($p \leq 0.0001$). Los asteriscos (***) indican diferencias estadísticamente significativas.

Fig. 4. Germination of *C. acutatum* conidia during exposure to HE obtained from co-cultures. Control (black line), CC1-150 $\mu\text{g/mL}$ (orange line), CC1-450 $\mu\text{g/mL}$ (gray line), CC1-750 $\mu\text{g/mL}$ (yellow line), CC2-450 $\mu\text{g/mL}$ (red line), CC2-600 $\mu\text{g/mL}$ (green line), CC3-450 $\mu\text{g/mL}$ (blue line), and CC3-750 $\mu\text{g/mL}$ (purple line). Vertical lines represent the standard deviation of the means from three technical replicates, each performed in two independent experiments. Significant differences among treatments were detected by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p \leq 0.0001$). Asterisks (***) indicate statistically significant differences.

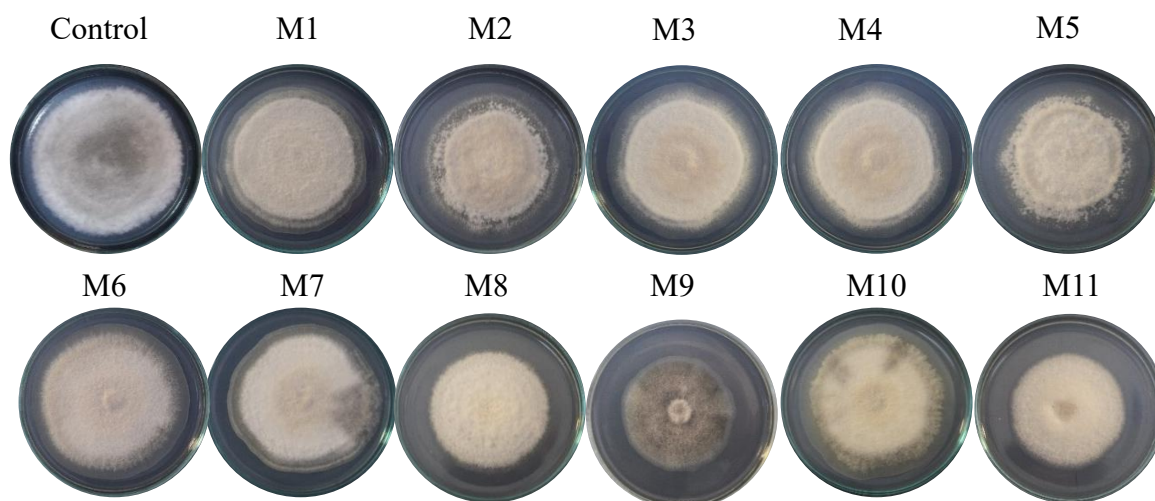
3.3. Efecto de las mezclas de los extractos hexánicos obtenidos de los cultivos individuales y los co-cultivos sobre el crecimiento de *C. acutatum*

Tras analizar las afectaciones generadas por los EH obtenidos de los cultivos individuales y los co-cultivos sobre el crecimiento, el desarrollo y la germinación de *C. acutatum*, se mezclaron los EH con base en la complementariedad de las alteraciones generadas en *C. acutatum*. Las mezclas M2 y M4 estimularon la formación de micelio laxo en las colonias de *C. acutatum*, mientras que la exposición a la mezcla M9 estimuló la pigmentación de la colonia de *C. acutatum* con respecto al control (Fig. 5a).

Algunas de las mezclas exhibieron un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento radial de *C. acutatum* respecto a los tratamientos individuales, donde el máximo efecto alcanzado fue del 17% de inhibición del crecimiento radial. Por ejemplo, la mezcla M8 generó el 19.59% de inhibición, el cual corresponde a 1.15 veces más de inhibición con respecto al porcentaje máximo generado por los EH de forma independiente. De manera notable, las mezclas M11 y M9 generaron los mayores valores de inhibición, al alcanzar el 29% y 35%, respectivamente, lo que equivale a incrementos de 1.71 y 2.06 veces más con respecto al mejor resultado obtenido por los EH evaluados individualmente (Fig. 5b), lo que sugiere un efecto inhibitorio complementario entre los EH evaluados.

Adicionalmente, las observaciones microscópicas revelaron alteraciones de las hifas de *C. acutatum* que no fueron generadas por la exposición a los EH obtenidos de los cultivos individuales o de los co-cultivos, individualmente. Por ejemplo, se observó la producción de estructuras de resistencia (apresorios) en la mezcla M6. Otra alteración observada fue el enrollamiento de las hifas generado por la exposición a las mezclas M2, M3, M5, M10 y M11. Además, se observó la despolimerización de hifas expuestas a la mezcla M1, lo que podría indicar alteraciones en el crecimiento polarizado. Estas alteraciones sugieren que la combinación de los EH induce alteraciones más pronunciadas en el crecimiento y desarrollo de *C. acutatum* que las generadas individualmente, lo cual indica que los compuestos actúan de manera complementaria (S6).

a)



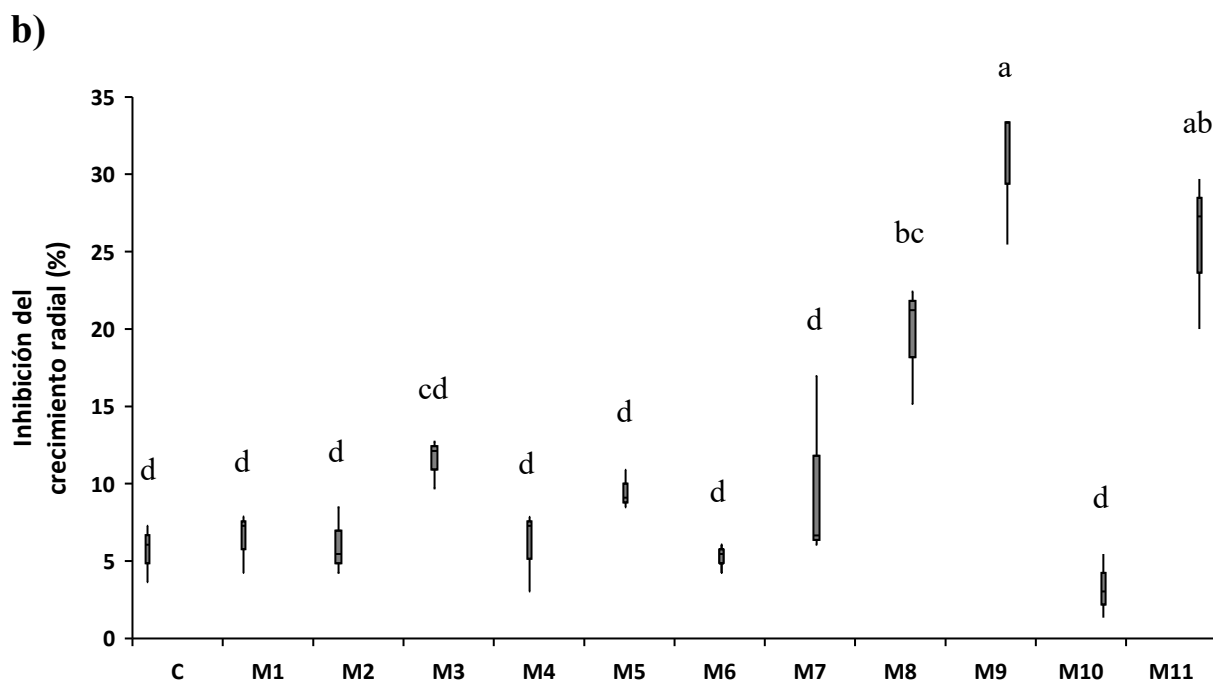


Fig. 5. Efecto de las mezclas de los EH obtenidos de los cultivos individuales y co-cultivos sobre el crecimiento de *C. acutatum*. Colonias representativas de *C. acutatum* expuestas a las diferentes mezclas y concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$) (a). Los tratamientos incluyeron: C (control), M1 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M2 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M3 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$), M4 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M5 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M6 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M7 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M8 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M9 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M10 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-750 $\mu\text{g/mL}$) y M11 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$). Inhibición del crecimiento radial en respuesta a los tratamientos (b). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas; el experimento se realizó en dos réplicas biológicas independientes. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según el ANOVA de un factor, seguida de la prueba post hoc de Tukey ($p \leq 0.01$).

Fig. 5. Effect of mixtures of HE obtained from individual cultures and co-cultures on the growth of *C. acutatum*. Representative colonies of *C. acutatum* exposed to different mixtures and concentrations of HE (0, 150, 300, 450, 600, and 750 $\mu\text{g/mL}$) (a). Treatments included: C (control), M1 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M2 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M3 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$), M4 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M5 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M6 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M7 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M8 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M9 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M10 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-750 $\mu\text{g/mL}$), and M11 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$). Radial growth inhibition in response to the treatments (b). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates; the experiment was performed with two independent biological replicates. Different letters indicate statistically significant

differences among treatments according to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p \leq 0.01$).

4. Discusión

C. acutatum es un fitopatógeno cosmopolita responsable de la antracnosis en múltiples hospederos. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antifúngico de los EH obtenidos mediante el cultivo individual o el co-cultivo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp. contra *C. acutatum* suplementados con el MDCa. Los EH obtenidos de los cultivos individuales indujeron el desarrollo de halos miceliales difusos y el crecimiento irregular en los bordes de las colonias de *C. acutatum*. Adicionalmente, a nivel microscópico se observaron hifas delgadas. Dichos cambios morfológicos suelen utilizarse como indicadores de respuesta al estrés (Chávez-Avilés *et al.*, 2024). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Emanuel *et al.* (2020), quienes sugirieron que el adelgazamiento de las hifas y la formación de septos son consecuencia de la actividad antagonista inducida por la exposición a compuestos orgánicos, lo cual sugiere que los EH contienen compuestos orgánicos con actividad antagónica contra *C. acutatum*.

Además, los EH obtenidos de los co-cultivos generaron efectos diferenciales sobre *C. acutatum* en comparación con los EH obtenidos de los cultivos individuales, particularmente, los EH no generaron un efecto dependiente de la concentración, ya que, a concentraciones de 150, 600 y 700 $\mu\text{g/mL}$ se promovió el crecimiento radial de *C. acutatum*. Estos efectos bifásicos podrían ser consecuencia de un efecto de hormesis multifásica. En este sentido, Ávila-Oviedo *et al.* (2024) reportaron que la exposición a los COVs producidos por algunas rizobacterias estimula el crecimiento radial de colonias de *Phytophthora capsici*. Otras investigaciones reportaron que la exposición a concentraciones subletales puede estimular la germinación, la esporulación o el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (Pradhan *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2022). Estos resultados resaltan la importancia de seleccionar concentraciones adecuadas de metabolitos bioactivos, ya que concentraciones inadecuadas podrían favorecer al patógeno en lugar de inhibirlo.

Por otro lado, los EH estimularon el desarrollo de micelio aéreo, incrementaron la pigmentación marrón de las colonias, distorsionaron las hifas e inhibieron el crecimiento radial de las colonias del fitopatógeno. Estas respuestas sugieren que la interacción entre ACB (*B. subtilis* y *Trichoderma* sp.) en presencia de MDCa (como inductor) modula el metabolismo microbiano y promueve la síntesis diferencial de compuestos con efecto antifúngico. Al respecto, las interacciones intra- e interespecíficas entre microorganismos en un mismo medio de cultivo constituyen una estrategia eficaz para estimular la producción de compuestos diferenciales y potencialmente novedosos (Peng *et al.*, 2021).

Emanuel *et al.* (2020) identificaron diversos compuestos químicos orgánicos extraídos con hexano a partir de los co-cultivos de cepas de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, inducidos mediante micelio desactivado de *C. gloeosporioides*. Los compuestos obtenidos, de naturaleza difusible y volátil, incluyeron ésteres, éteres de glicol, ácidos carboxílicos, aromáticos orgánicos, alcoholes fenólicos, ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados de cadena larga, los cuales mostraron potencial antifúngico contra *C.*

gloeosporioides. La exposición del fitopatógeno a estos EH provocó inhibición del crecimiento radial, disminución en la producción de conidios y la formación de colonias laxas.

Por otro lado, Chávez-Avilés *et al.* (2024) reportaron la producción de COVs durante la interacción entre las cepas de *Trichoderma* sp. (evaluadas en el presente trabajo) y *C. acutatum*. Estos COVs pertenecen a familias químicas como cetonas, terpenos, compuestos heterocíclicos y organosulfurados; los cuales causaron el desarrollo de colonias laxas, alteración en la pigmentación de la colonia y la inhibición del micelio aéreo.

Dado que los fenotipos observados en ambos estudios son similares a los reportados en el presente trabajo, se infiere que los EH evaluados podrían contener compuestos pertenecientes a las familias químicas mencionadas previamente.

Adicionalmente, se observó que la producción de conidios en las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH se alteró. Este efecto sugiere que los compuestos presentes en los EH pueden modular aspectos específicos del desarrollo o de los procesos reproductivos del fitopatógeno. Se ha demostrado que compuestos de distintas naturalezas químicas, como terpenoides, flavonoides, ácidos grasos, alcoholes aromáticos y lipopéptidos, afectan las estructuras reproductivas de los fitopatógenos, particularmente durante el proceso de germinación de conidios (Savi *et al.*, 2019; Tu *et al.*, 2022; Montejano-Ramírez *et al.*, 2024; Popescu *et al.*, 2024). Los compuestos presentes en los EH interfieren en los procesos metabólicos esenciales para el desarrollo fúngico, lo que los convierte en posibles candidatos para el control biológico de enfermedades causadas por hongos del género *Colletotrichum*.

En este estudio, se demostró que los EH obtenidos de los cultivos individuales de las cepas de *Trichoderma*, así como de sus co-cultivos con *B. subtilis*, reducen la germinación de esporas en más del 50%, entre los que se destacan los metabolitos producidos por T1. Además, se observaron alteraciones morfológicas en los conidios y en el desarrollo de los tubos germinativos, que incluyen el adelgazamiento, el curvamiento e inhibición del desarrollo del tubo germinativo (S5). Estos efectos podrían indicar alteraciones en la homeostasis de la membrana celular, las cuales podrían afectar la virulencia del hongo (Chen *et al.*, 2024; Peng *et al.*, 2024).

Medina-Romero *et al.* (2017) evaluaron los efectos individuales y combinados de seis COVs sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Mientras que los compuestos individuales lograron inhibir el crecimiento radial del patógeno entre un 20% y 50%, su combinación produjo un efecto sinérgico, al alcanzar niveles de inhibición de hasta el 100%. Estos resultados sugieren que, al identificar los compuestos presentes en los EH y evaluarlos de forma individual o combinada, se podrían obtener efectos más significativos en la inhibición del crecimiento de *C. acutatum*.

En la presente investigación, los valores de inhibición fueron menores en comparación con lo reportado por Medina-Romero *et al.* (2017) al estudiar el efecto de los COVs. Esta diferencia podría atribuirse a las condiciones experimentales. En sistemas cerrados, donde los COVs actúan directamente sobre el fitopatógeno, su actividad biológica suele ser mayor.

En cambio, en medios envenenados, la interacción con el medio de cultivo puede reducir la biodisponibilidad de los compuestos suplementados y, por lo tanto, disminuir su eficacia (Tyagi y Malik, 2011; Bammou *et al.*, 2016).

Por ejemplo, los aceites esenciales de tomillo rojo y clavo presentan un amplio espectro de acción en fase de vapor, pero muestran menor eficacia cuando se incorporan directamente al medio de cultivo (Fialho *et al.*, 2010). En este contexto, la determinación de los EH en su forma pura y la selección de un vehículo adecuado podrían potenciar su actividad antifúngica frente a *C. acutatum*.

En este estudio se analizaron las alteraciones inducidas por la exposición a los EH sobre *C. acutatum*, y se evaluaron mezclas estratégicas para determinar si dichas alteraciones se intensificaban. Las mezclas M11 y M9 mostraron una mayor capacidad de inhibición del crecimiento radial de *C. acutatum* en comparación con los efectos observados al aplicar los EH de forma individual (1.71 y 2.06 veces superiores, respectivamente). Asimismo, se detectaron alteraciones más marcadas en las hifas, como enrollamiento, distorsión, adelgazamiento y despolimerización. Estos efectos sugieren que la combinación de EH podría interferir con el crecimiento polarizado de *C. acutatum* (Riquelme *et al.*, 2018), posiblemente al aumentar la concentración de los metabolitos activos o al enriquecer la diversidad química de los compuestos.

Los hallazgos de esta investigación son significativos, ya que se identificaron diversas alteraciones morfológicas y una disminución de la germinación de los conidios, lo que podría afectar el ciclo de vida del hongo y reducir su capacidad infectiva. En conjunto, estos resultados destacan el potencial de los compuestos presentes en los EH, obtenidos tanto de cultivos individuales como de co-cultivos, como una estrategia prometedora para la identificación de nuevos agentes antifúngicos contra *C. acutatum*.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos respaldan el potencial de los EH, derivados de cultivos individuales y co-cultivos de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp. inducidos por MDCa, como fuente prometedora de compuestos con actividad antifúngica. No obstante, para avanzar en la comprensión de sus mecanismos de acción, es indispensable identificar los compuestos presentes en cada EH evaluado. Además, se requiere investigación complementaria para determinar si estos extractos poseen actividad antagónica frente a otras especies del género *Colletotrichum*, lo que ampliaría su aplicabilidad en el control biológico de fitopatógenos.

Contribución de los autores

José Luis Ávila-Oviedo: Investigación, redacción, borrador original, visualización, administración del proyecto. Mauricio Nahuam Chávez-Avilés: Conceptualización, recursos, redacción, revisión y edición, visualización, supervisión y obtención de financiamiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

Abdelshafy Mohamad, O. A., Ma, J. B., Liu, Y. H., Zhang, D., Hua, S., Bhute, S., Li, L. 2020. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. Front. Plant Sci. 11, 47. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00047>

Ávila-Oviedo, J. L., Méndez-Inocencio, C., Rodríguez-Torres, M. D., Angoa-Pérez, M. V., Chávez-Avilés, M. N., Martínez-Mendoza, E. K., Villar-Luna, E. 2024. Antagonistic effects and volatile organic compound profiles of rhizobacteria in the biocontrol of *Phytophthora capsici*. Plants. 13(22), 3224. <https://doi.org/10.3390/plants13223224>

Aljawasim, B. D., Samtani, J. B., Rahman, M. 2023. New insights in the detection and management of anthracnose diseases in strawberries. Plants. 12(21), 3704. <https://doi.org/10.3390/plants12213704>

Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M., López-Herrera, C. J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. Eur. J. Plant Pathol. 140(2), 385–397. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0472-z>

Awad-Allah, E. F., Shams, A. H., Helaly, A. A., Ragheb, E. I. 2022. Effective applications of *Trichoderma* spp. as biofertilizers and biocontrol agents mitigate tomato *Fusarium* wilt disease. Agriculture. 12(11), 1950. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111950>

Bae, S. J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Bae, H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biological Control. 92, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>

Bautista-Ortega, P. I., Hernández-Hernández, I., Pérez-Pérez, R., Soria-Leal, S.-L. L. Y., Chávez-Avilés, M. N. 2022. Modulación diferencial de la actividad enzimática lítica de la pared celular entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* durante el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro. CL. 6, 732–768. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.3568

Bammou, M., Bouhlali, E. D. T., Sellam, K., Ibjibijen, J., Lhoussaine, E. R., Laila, N. A. S. S. I. R. I. 2016. Liquid and vapour-phase bioactivity of *Hertia maroccana* (Batt.) Maire essential oil: An endemic Asteraceae from Morocco. J. Appl. Pharm. Sci. 6(3), 131–136. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60322>

Barroso-Ake, A. C., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Tucuch-Pérez, M. A., Olalde-Portugal, V., Robles-Yerena, L. 2021. Manejo in vitro de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. ERA. 8(2). <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.3038>

Boukaew, S., Petlamul, W., Srinuanpan, S., Nooprom, K., Zhang, Z. 2024. Heat stability of *Trichoderma asperelloides* SKRU-01 culture filtrates: Potential applications for controlling fungal spoilage and AFB1 production in peanuts. Int. J. Food Microbiol. 409, 110477. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110477>

Chávez-Avilés, M. N., García-Álvarez, M., Ávila-Oviedo, J. L., Hernández-Hernández, I., Bautista-Ortega, P. I., Macías-Rodríguez, L. I. 2024. Volatile organic compounds produced by *Trichoderma asperellum* with antifungal properties against *Colletotrichum acutatum*. Microorganisms. 12(10), 2007. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102007>

Chen, W., Meng, F., Li, F., Tian, C. 2024. The core septin gene *CgSEP5* is associated with the formation of infection structures and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. Int. J. Biol. Macromol. 283, 137759. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137759>

Ciofini, A., Negrini, F., Baroncelli, R., Baraldi, E. 2022. Management of post-harvest anthracnose: Current approaches and future perspectives. Plants. 11(14), 1856. <https://doi.org/10.3390/plants11141856>

Cortez Lázaro, A. A., Vázquez-Medina, P. J., García-Evangelista, J. V., Cortez-Lázaro, R. A., Rojas-Paz, J. L., Pesantes-Rojas, C. R., Leiva-Espinoza, S. T. 2025. Global trends in the research of *Trichoderma* secondary metabolites in sustainable agricultural bioprotection. Front. Microbiol. 16, 1595946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1595946>

Emanuel, R. V., César Arturo, P. U., Lourdes Iveth, M. R., Homero, R. D. L. C., Mauricio Nahuam, C. A. 2020. In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. 3 Biotech. 10, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>

Espinoza-Acosta, J. L., González-Estrada, R. R., Valencia-Rivera, D. E., Martínez-Robinson, K. G., Ledesma-Osuna, A. I., Blancas-Benítez, F. J., Montaña-Leyva, B. 2023. Antifungal and physicochemical properties of starch-lignin based-films. Mex. J. Biotechnol. 8(4), 24-45. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.4.24>

Evren, G., Korkom, Y., Saboori, A., Cakmak, I. 2025. Exploring the potential of *Trichoderma* secondary metabolites against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Invertebr. Pathol. 211, 108299. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2025.108299>

Fialho, M. B., Toffano, L., Pedroso, M. P., Augusto, F., Pascholati, S. F. 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. World J. Microbiol. Biotechnol. 26(5), 925-932. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0255-4>

- Fifani, B., Steels, S., Helmus, C., Delacuvellerie, A., Deracinois, B., Phalip, V., Jacques, P. 2022. Coculture of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* based on metabolic cross-feeding modulates lipopeptide production. *Microorganisms*. 10(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051059>
- Gama, A. B., Gasparoto, M. C. D. G., Poole, G. H., Bock, C. H., Gottwald, T. R., Amorim, L., Dewdney, M. M. 2025. Dispersal of *Colletotrichum acutatum* Ssensu Lato conidia from infected citrus and strawberry under simulated rainfall and different laminar and turbulent wind speeds. *Phytopathology*. 115(5), 507–520. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-24-0342-R>
- Gallardo-Camarena, M. V., Torres-Acosta, M. A., Licona-Cassani, C. 2025. Economic evaluation of large-scale production for *Colletotrichum* antagonists as biocontrol agents against anthracnose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 100(5), 1117–1128. <https://doi.org/10.1002/jctb.7850>
- Guzmán-Guzmán, P., Etesami, H., Santoyo, G. 2025. *Trichoderma*: A multifunctional agent in plant health and microbiome interactions. *BMC Microbiol.* 25(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04158-2>
- Jin, S., Alberti, F. 2025. Advances in the discovery and study of *Trichoderma* natural products for biological control applications. *Nat. Prod. Rep.* <https://doi.org/10.1039/D5NP00017C>
- Joo, J. H., Hussein, K. A. 2022. Biological control and plant growth promotion properties of volatile organic compound-producing antagonistic *Trichoderma* spp. *Front. Plant Sci.* 13, 897668. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.897668>
- Joo, M. H., Yeo, Y. M., Seo, J. W., Park, M. J., Park, J. S., Yu, Y. B., Lee, Y. J. 2025. *Lysimachia foenum-graecum* Herba extract inhibits the mycelial growth of *Colletotrichum acutatum* and controls anthracnose in pepper. *J. Plant Biotechnol.* 52(1), 100–106. <https://doi.org/10.5010/JPB.2025.52.012.100>
- Juárez-Campusano, Y. S., Chávaro-Ortíz, M. del S., López-González, R. C., Pacheco-Aguilar, J. R. 2020. Dynamic of biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on grape leaves. *Mex. J. Biotechnol.* 5(2), 70. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.70>
- Kong, W. L., Ni, H., Wang, W. Y., Wu, X. Q. 2022. Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Trichoderma koningiopsis* T2 against *Verticillium dahliae*. *Front. Microbiol.* 13, 1013468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1013468>
- López y López, V. E. L., Tolibia, S. E. M., Pacheco, A. D., Goné, A. M. L., Martínez, P. S., Girón, J. D. T. 2023. Influence of nutrient feeding variations on AbrB accumulation, sporulation and cry1Ac expression during fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Mex. J. Biotechnol.* 8(4), 46-67. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.4.46>

- Liang, C., Zhang, B., Zhou, Y., Yin, H., An, B., Lin, D., Luo, H. 2021. CgNPG1 as a novel pathogenic gene of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis* in mycelial growth, conidiation, and the invasive structures development. *Front. Microbiol.* 12, 629387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629387>
- Li, T., Tang, J., Karuppiyah, V., Li, Y., Xu, N., Chen, J. 2020. Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biological Control.* 140, 104122. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104122>
- McLaughlin, M. S., Abbasi, S., Abbasi, P. A., Ali, S. 2024. Apple bitter rot and Glomerella leaf spot: A comprehensive review of causal species and their biology, fungicide sensitivities, and management strategies. *Plant Disease.* 108(12), 3432–3445. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-24-0552-FE>
- Medina-Romero, Y. M., Roque-Flores, G., Macías-Rubalcava, M. L. 2017. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(22), 8209–8222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Montejano-Ramírez, V., Ávila-Oviedo, J. L., Campos-Mendoza, F. J., Valencia-Cantero, E. 2024. Microbial volatile organic compounds: Insights into plant defense. *Plants.* 13(15), 2013. <https://doi.org/10.3390/plants13152013>
- Moreno-López, X. J., Villarruel-Ordaz, J. L., Valenzuela-Soto, J. H., Maldonado-Bonilla, L. D. 2023. A *Trichoderma brevicompactum* strain isolated in Mexico inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Mex. J. Biotechnol.* 8(3), 1–24. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.3.1>
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., Horwitz, B. A. 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biol. Rev.* 39, 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Ntui, V. O., Uyoh, E. A., Ita, E. E., Markson, A. A. A., Tripathi, J. N., Okon, N. I., Tripathi, L. 2021. Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. *Mol. Plant. Pathol.* 22(10), 1302–1314. <https://doi.org/10.1111/mpp.13107>
- Peng, X. Y., Wu, J. T., Shao, C. L., Li, Z. Y., Chen, M., Wang, C. Y. 2021. Co-culture: Stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms. *Mar. Life Sci. Technol.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00077-5>

Peng, Y., Chen, B. 2024. Role of cell membrane homeostasis in the pathogenicity of pathogenic filamentous fungi. *Virulence*. 15(1), 2299183. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2299183>

Poling, E. B. 2008. Anthracnose on Strawberry: Its Etiology, Epidemiology, and Pathology, Together with Management Strategies for Strawberry Nurseries: Introduction to the Workshop. *HortScience*. 43(1), 59–65. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.1.59>

Popescu, I., Loganathan, A. K., Graham, H. R., Avis, T. J. 2024. Antifungal activity of *Bacillus velezensis* and *Pseudomonas azotoformans* isolated from compost tea against anthracnose (*Colletotrichum* spp.) on strawberry fruit. *Plant. Pathol.* 73(9), 2419–2428. <https://doi.org/10.1111/ppa.13983>

Pradhan, S., Flores, F. J., Melouk, H., Walker, N. R., Molineros, J. E., Garzon, C. D. 2017. Chemical hormesis on plant pathogenic fungi and oomycetes. In *Pesticide dose: effects on the environment and target and non-target organisms*. Am. Chem. Soc. 121-133 <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch009>

Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Fischer, R. 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82(2), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.00068-17>

Rodríguez-González, L. V., Martínez-Medina, G. A., Torres-León, C., Chávez-González, M. L., Lafuente-Rincón, D. F., Rodríguez-González, J., Ramírez-Guzmán, N. 2025. Agroindustrial residues exploration to maximize metabolites production in fungal biocontrol co-culture. *Mex. J. Biotechnol.* 10(2), 64-88. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2025.10.2.64-88>

Savi, D. C., Shaaban, K. A., Gos, F. M., Thorson, J. S., Glienke, C., Rohr, J. 2019. Secondary metabolites produced by *Microbacterium* sp. LGMB471 with antifungal activity against the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa*. *Folia Microbiol.* 64, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-00668-x>

Savary, S., Willocquet, L. 2020. Modeling the impact of crop diseases on global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 58(1), 313–341. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-010820-012856>

Silva, A. O., Savi, D. C., Gomes, F. B., Gos, F. M. W. R., Silva, G. J., Glienke, C. 2017. Identification of *Colletotrichum* species associated with post bloom fruit drop in Brazil through GAPDH sequencing analysis and multiplex PCR. *Eur. J. Plant. Pathol.* 147, 731–748. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1038-z>

Sousa, E. S., de Melo, M. P., Barguil, B. M., da Silva Matos, K., Pires, L. L., da Silva, B. A., Beserra Jr, J. E. A. 2025. Diversity of *Colletotrichum* spp. in legumes and weeds in Northeast Brazil, with a description of a new species in the *C. acutatum* complex. *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/ppa.70009>

Song, J., Han, C., Zhang, S., Wang, Y., Liang, Y., Dai, Q., Xu, K. 2022. Hormetic effects of carbendazim on mycelial growth and aggressiveness of *Magnaporthe oryzae*. J. Fungi. 8(10), 1008. <https://doi.org/10.3390/jof8101008>

Stange, P., Kersting, J., Sivaprakasam Padmanaban, P. B., Schnitzler, J. P., Rosenkranz, M., Karl, T., Benz, J. P. 2024. The decision for or against mycoparasitic attack by *Trichoderma* spp. is taken already at a distance in a prey-specific manner and benefits plant-beneficial interactions. Fungal Biol. Biotechnol. 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40694-024-00183-4>

Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G., Cacciola, S. O. 2020. Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. J. Fungi. 6(4), 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>

Trkulja, V., Čojić, B., Trkulja, N., Tomić, A., Matić, S., Ikanović, J., Popović Milovanović, T. 2024. Colletotrichum species associated with apple bitter rot and *Glomerella* leaf spot: A comprehensive overview. J. Fungi. 10(9), 660. <https://doi.org/10.3390/jof10090660>

Tyagi, A. K., Malik, A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chem. 126(1), 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.002>

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Jaroszuk-Ścisiel, J. 2022. *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. Int. J. Mol. Sci. 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Tu, P. W., Chiu, J. S., Lin, C., Chien, C. C., Hsieh, F. C., Shih, M. C., Yang, Y. L. 2022. Evaluation of the antifungal activities of *Photorhabdus akhurstii* and its secondary metabolites against phytopathogenic *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Fungi. 8(4), 403. <https://doi.org/10.3390/jof8040403>

Vos, C. M., De Cremer, K., Cammue, B. P., De Coninck, B. 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. Mol. Plant. Pathol. 16(4), 400–412. <https://doi.org/10.1111/mpp.12189>

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., Chen, J. 2023. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. Front. Microbiol. 14, 1160551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>

Zakaria, L. 2021. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. Agriculture. 11(4), 297. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040297>

Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., Liu, Y. 2022. Microbial volatile organic compounds: antifungal mechanisms, applications, and challenges. Front. Microbiol. 13, 922450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>

Material suplementario

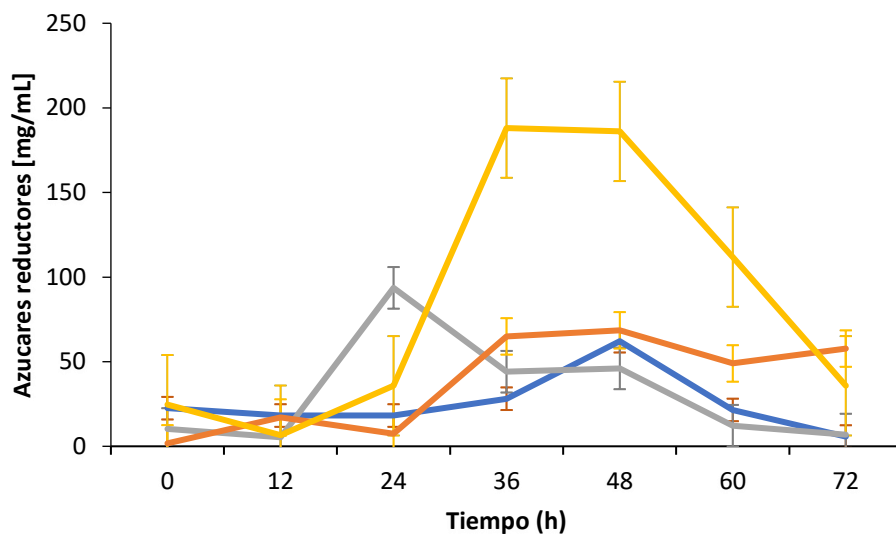


Fig. S1. Cinética de producción de azúcares reductores en los cultivos individuales. Las determinaciones se realizaron cada 12 horas durante 72 horas. T1 (línea naranja), T2 (línea gris), T3 (línea azul), Bs (línea amarilla). Las líneas verticales indican la desviación estándar de la media, con tres réplicas técnicas por experimento; el experimento se realizó en dos réplicas biológicas independientes.

Fig. S1. Kinetics of reducing sugar production in individual cultures. Measurements were taken every 12 hours over 72 hours. T1 (orange line), T2 (gray line), T3 (blue line), Bs (yellow line). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates per experiment; the experiment was conducted with two independent biological replicates.

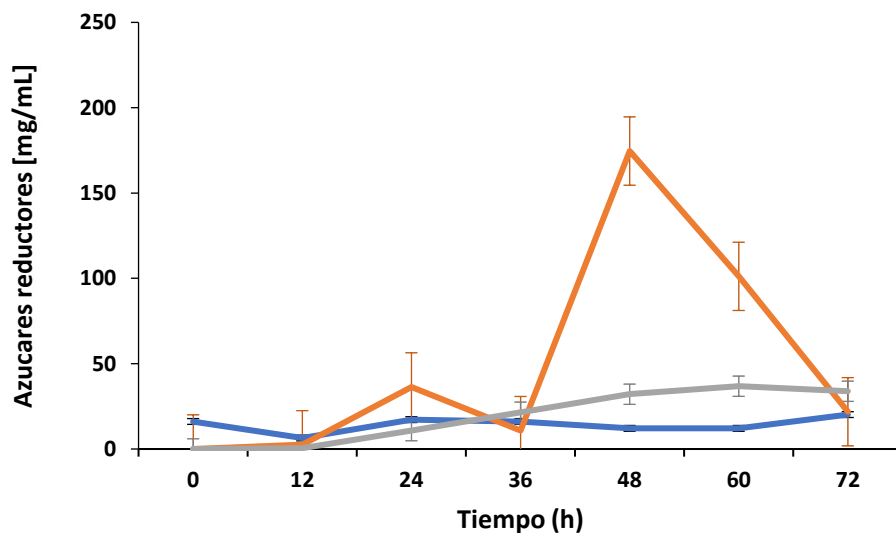


Fig. S2. Cinética de producción de azúcares reductores en los co-cultivos. Las determinaciones se realizaron cada 12 horas durante 72 horas. CC1 (línea naranja), CC2 (línea gris), CC3 (línea azul). Las líneas verticales indican la desviación estándar de la media a partir de tres réplicas técnicas por experimento; el experimento se realizó en dos réplicas biológicas independientes.

Fig. S2. Kinetics of reducing sugar production in co-cultures. Measurements were taken every 12 hours over 72 hours. CC1 (orange line), CC2 (gray line), CC3 (blue line). Vertical lines represent the standard deviation of the mean from three technical replicates per experiment; the experiment was conducted with two independent biological replicates.

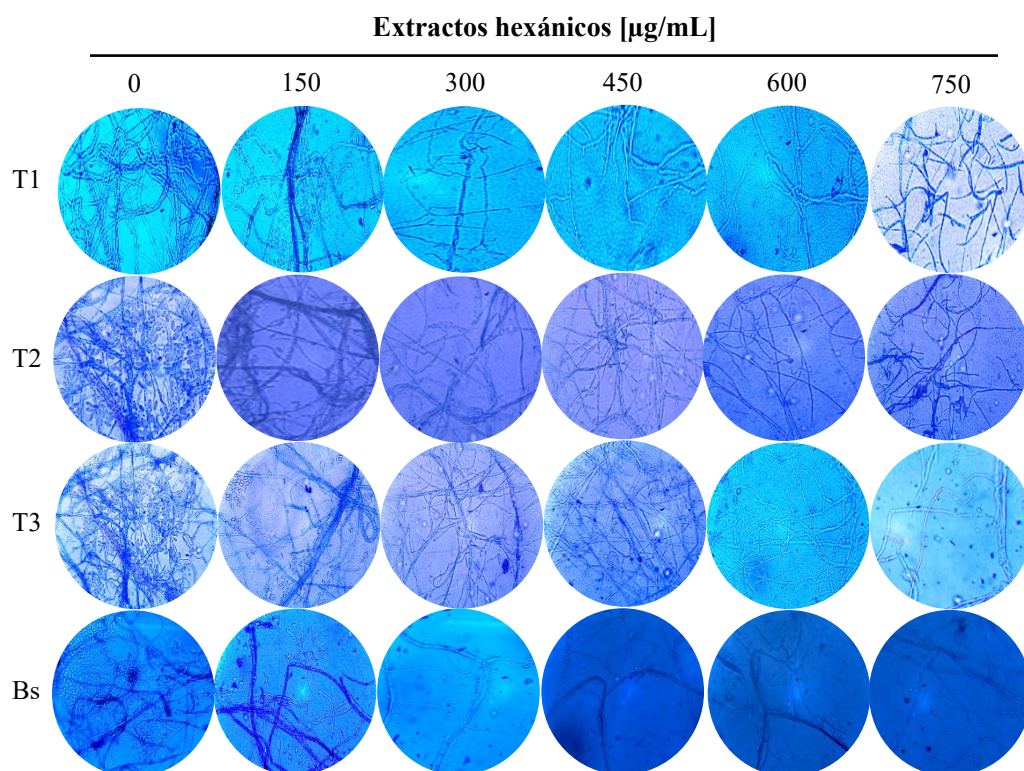


Fig. S3. Análisis morfológico de las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH obtenidos de los cultivos individuales (T1, T2, T3 y Bs) durante 12 días. Se observan cambios en la morfología del micelio a diferentes concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$).

Fig. S3. Morphological analysis of *C. acutatum* colonies exposed to HE from individual cultures (T1, T2, T3, and Bs) for 12 days. Morphological changes in the mycelium are shown at different HE concentrations (0, 150, 300, 450, 600, and 750 $\mu\text{g/mL}$).

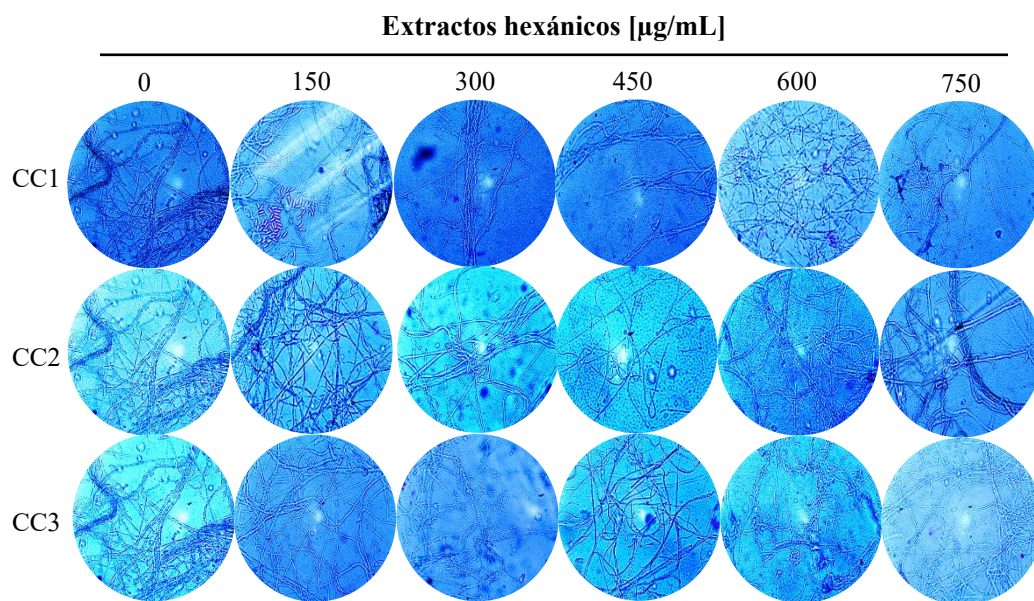


Fig. S4. Análisis morfológico de las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH obtenidos de los co-cultivos (CC1, CC2 y CC3) durante 12 días. Se observan cambios en la morfología del micelio a diferentes concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$).

Fig. S4. Morphological analysis of *C. acutatum* colonies exposed to HE from co-cultures (CC1, CC2, and CC3) for 12 days. Morphological changes in the mycelium are shown at different HE concentrations (0, 150, 300, 450, 600, and 750 $\mu\text{g/mL}$).

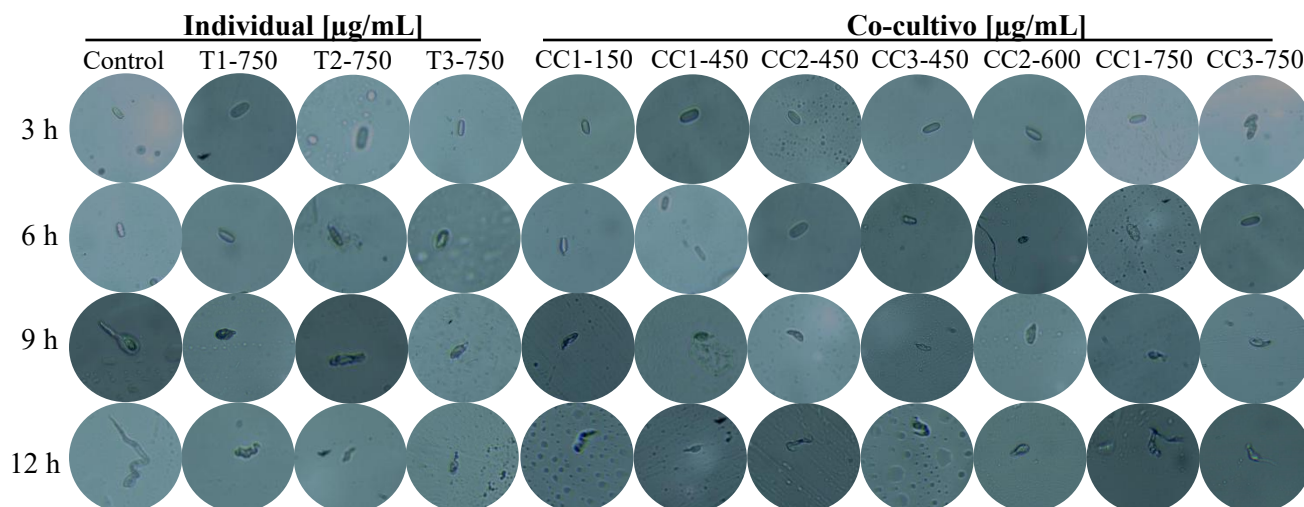


Fig. S5. Cinética de germinación de los conidios obtenidos de las colonias de *C. acutatum* expuestas a los EH de los cultivos individuales y co-cultivos. Se muestran imágenes representativas de los ensayos de germinación que evidencian diferencias en la tasa de germinación entre los distintos tratamientos.

Fig. 5. S5. Germination kinetics of *C. acutatum* conidia obtained from colonies exposed to HE from individual cultures and co-cultures. Representative images of the germination assays are shown, highlighting differences in germination rates among treatments.

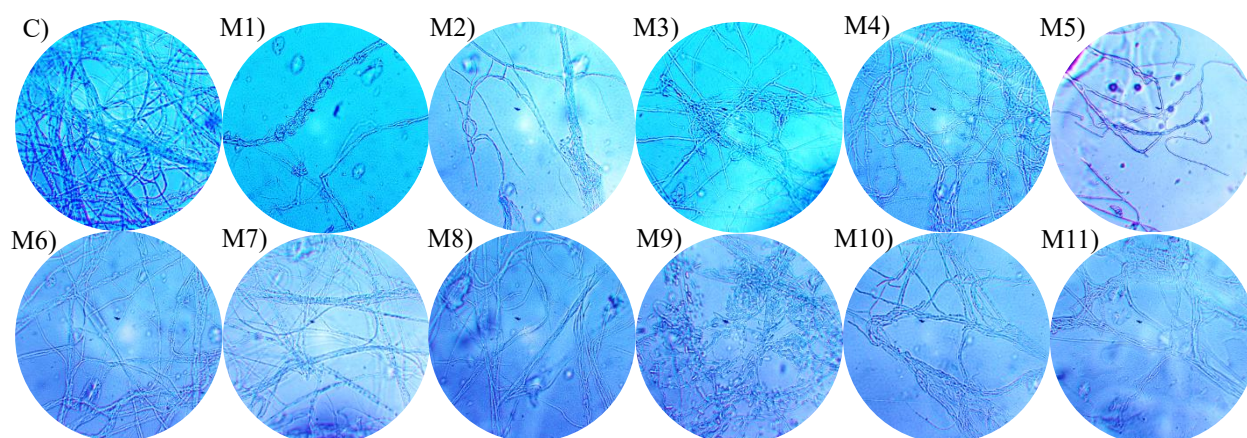


Fig. S6. Análisis morfológico de las colonias de *C. acutatum* después de la exposición a las mezclas de los EH obtenidos de los cultivos individuales y co-cultivos durante 12 días. Se observan cambios en la morfología del micelio a diferentes concentraciones de EH (0, 150, 300, 450, 600 y 750 $\mu\text{g/mL}$). Los tratamientos incluyeron: C (control), M1 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M2 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M3 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$), M4 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M5 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M6 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M7 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M8 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M9 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M10 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-750 $\mu\text{g/mL}$) y M11 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$).

Fig. S6. Morphological analysis of *C. acutatum* colonies after exposure to mixtures of HE from individual cultures and co-cultures for 12 days. Morphological changes in the mycelium are shown at different HE concentrations (0, 150, 300, 450, 600, and 750 $\mu\text{g/mL}$). Treatments included: C (control), M1 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M2 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M3 (T1-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$), M4 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M5 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M6 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-450 $\mu\text{g/mL}$), M7 (T2-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC3-750 $\mu\text{g/mL}$), M8 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-150 $\mu\text{g/mL}$), M9 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-450 $\mu\text{g/mL}$), M10 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC1-750 $\mu\text{g/mL}$), and M11 (T3-750 $\mu\text{g/mL}$ + CC2-450 $\mu\text{g/mL}$).