

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



**Producción masiva de Trichodermas nativos de la rizosfera de
banano en sustratos orgánicos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo

Autor: Br. Luis Infante Gálvez

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



Producción masiva de Trichodermas nativos de la rizosfera de banano en sustratos orgánicos

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete (presidente)

Dr. Jalmer Fidel Campaña Olaya (secretario)

Dr. Ramon García Seminario (Vocal)

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



Producción masiva de Trichodermas nativos de la rizosfera de banano en sustratos orgánicos

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Bach. Luis Infante Galvez (ejecutor)

Dr. Ramon García Seminario (asesor)

M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad (Co –asesor)

Blga. Leslie Diana Luis Arismendiz (Co –asesor)

Tumbes, 2026



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA**



"Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PRESENCIAL

En Tumbes, a los dieciséis días del mes de marzo de dos mil veintiséis, siendo las nueve horas, con cinco minutos (9:05), de la mañana, de forma presencial, se reunieron en el aula 2 de la Facultad de Ciencias Agrarias, el Jurado Calificador, designado por Resolución N° 075-2024/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D, **Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete** (Presidente), **Dr. Jalmer Fidel Campaña Olaya** (Secretario), **Dr. Ramón García Seminario** (Vocal), reconociendo en la misma resolución además, al **Dr. Ramón García Seminario**, como **Asesor** y **M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad y Blga. Leslie Diana Luis Arismendiz** como **Co-asesores** se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, "**Producción masiva de Trichodermas nativos de la rizosfera de banano en sustratos orgánicos**", para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo presentado por el **Bach. Luis Infante Gálvez**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 75 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al: **Bach. LUIS INFANTE GÁLVEZ** aprobado, por Unanimidad, con el calificativo Muy Bueno.

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica.
En consecuencia, queda esto para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.
Siendo las diez horas y cuarenta minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 16 de marzo de 2026.

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete DNI N° <u>16532820</u> CODIGO ORCID <u>0000-0002-3324-3341</u> Presidente	Dr. Jalmer Fidel Campaña Olaya DNI N° <u>00236469</u> CODIGO ORCID <u>0000-0002-0804-1308</u> Secretario
Dr. Ramón García Seminario DNI N° <u>03683231</u> CODIGO ORCID <u>0000-0003-0756-0935</u> Vocal	

C.C. - JURADOS (03) -ASESOR Y(CO)-INTERESADO-ARCHIVO (Decanato)
S. Acad.

autor desconocido

Turnitin TESIS INFANTE GALVEZ LUIS

 Asesor de Tesis de sustratos

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:589472600

Fecha de entrega

12 may 2026, 10:39 GMT-5

Fecha de descarga

12 may 2026, 10:49 GMT-5

Nombre del archivo

Turnitin TESIS INFANTE GALVEZ LUIS Vale.docx

Tamaño del archivo

30.0 MB

90 páginas

15.537 palabras

88.844 caracteres



Dr. Ramon Garcia Seminario
Asesor

Cod. Orcid
0000-0003-0756-0935




3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

- 2%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



Dr. Ramon Garcia Seminario
Asesor

Cod. Orcid
0000-0003-0756-0935

Fuentes principales

- 2% Fuentes de Internet
- 1% Publicaciones
- 2% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	sidalc.net	<1%
2	Internet	scholar.archive.org	<1%
3	Internet	repository.tudelft.nl	<1%
4	Internet	repositorio.espe.edu.ec	<1%
5	Internet	repository.lib.ncsu.edu	<1%
6	Internet	biblioteca.concytec.gob.pe	<1%
7	Internet	www.dtic.mil	<1%
8	Internet	www.comune.raddainchianti.si.it	<1%
9	Trabajos del estudiante	Colorado School of Mines on 2018-12-13	<1%
10	Trabajos del estudiante	UM, Twin Cities on 2005-12-22	<1%
11	Internet	d-nb.info	<1%

Dr. Ramon Garcia Seminario
Asesor

Cod. Orcid
0000-0003-0756-0935

12	Internet	es.scribd.com	<1%
13	Trabajos del estudiante	Universidad del Valle de Guatemala on 2025-11-17	<1%
14	Trabajos del estudiante	Universidad de Almeria on 2025-06-30	<1%
15	Internet	www.agilent.com	<1%



Dr. Ramon Garcia Seminario
Asesor

Cod. Orcid
0000-0003-0756-0935

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por darme fuerza, salud y sabiduría necesaria para culminar este proyecto, en segundo a mi esposa y a mi hija, por ser mi mayor fuente de motivación a lo largo de este proceso y en tercer lugar, pero no menos importante a mi asesor, por su orientación y su compromiso durante el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor, Dr. Ramon García Seminario un buen docente, y fiel amigo
conocedor de la ciencia de microbiología.

A mi querida esposa, por estar siempre conmigo y apoyarme incondicionalmente
en cada fase de mi tesis; de lo contrario, este trabajo no hubiese podido ser.

A los miembros del jurado calificador, Dr. Carlos Deza Navarrete, Dr. Jalmer fidel
Campaña Olaya. Dr. Ramón García Seminario y Dr. Milton Valladolid Ramos, por
sus sugerencias con el fin de mejorar la presente investigación.

A cada uno de los docentes de mi etapa universitaria, por brindarme sus mejores
conocimientos, en especial a un gran amigo y colega, el Mg. Néstor Delfín Diaz
Castillo, que hoy nos guía desde el cielo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xviii
CAPITULO I	
INTRODUCCION	23
CAPITULO II	
REVISION DE LITERATURA.....	25
2.1. El cultivo de banano (<i>Musa spp.</i>) en el contexto agrícola actual.....	25
2.1.1. Importancia económica y productiva	25
2.1.2. Principales problemas fitosanitarios del banano	26
2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc TR4)	26
2.2.1. Etiología y epidemiología	26
2.2.2. Síntomas y mecanismos de patogenicidad.....	27
2.2.3. Impacto económico y manejo del patógeno	28
2.3. Características generales del género <i>Trichoderma</i>	29
2.3.1. Taxonomía, biología y características morfológicas	29
2.3.2. Mecanismos de acción en el control biológico	30
2.3.3. Adaptación y ventajas de <i>Trichoderma</i> nativo	32
2.3.4. Sistemas, parámetros e indicadores de calidad en la producción masiva de <i>Trichoderma spp.</i>	34
CAPITULO III	
MATERIALES Y METODOS	39
3.1. Aislamiento, caracterización morfológica y conservación de <i>Trichodermas</i> nativos de la rizosfera del cultivo de banano	35
3.1.1. Área de estudio y recolección de muestras	39
3.1.2. Aislamiento de hongos rizosféricos	42
3.1.3. Caracterización morfológica	44
3.1.4. Conservación de los aislamientos	46
3.2. Pruebas de antagonismo de <i>Trichodermas</i> contra fitopatógenos.	46

3.2.1. Preparacion del material biologico	48
3.2.2. Diseño experimental del cultivo dual	44
3.2.3. Medición del crecimiento micelial	48
3.2.4. Cálculo del porcentaje de inhibición	48
3.2.5. Evaluación del micoparasitismo	49
3.2.6. Registro y organización de datos	49
3.3. Identificación molecular de <i>Trichodermas</i> con capacidad antagonista.	50
3.3.1. Extracción de ADN de la cepa de <i>Trichoderma sp</i>	51
3.3.2. Amplificación de la región ITS por PCR	52
3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa	53
3.3.4. Secuenciamiento y análisis bioinformático	54
3.4. Ensayos de masificación de <i>Trichoderma sp</i> en sustratos orgánicos	54
3.4.1. Diseño experimental	55
3.4.2. Preparación y acondicionamiento de los sustratos	56
3.4.3. Inoculación con <i>Trichoderma sp</i>	56
3.4.4. Incubación de los sustratos inoculados	56
3.4.5. Obtención de suspensiones para el recuento de esporas	57
3.4.6. Recuento de esporas en cámara Neubauer	53
3.4.7. Organización de datos y selección de tratamientos	54
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	59
4.1. Aislamiento de <i>Trichoderma spp</i> nativos de la rizosfera del cultivo de banano.	59
4.2. Pruebas de antagonismo de <i>Trichodermas</i> contra fitopatógenos.	65
4.3. Evaluaciones de grupos control (testigo) y cultivos duales al cuarto día	68
4.3.1. Controles (testigo) de cultivos de <i>Trichoderma sp.</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4.	68
4.3.2. Cultivos duales de <i>Trichoderma sp</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza	70

4.4. Evaluaciones de grupos control (testigo) y cultivos duales al onceavo día	76
4.4.1. Controles (testigo) de cultivos de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4.	768
4.4.2. Cultivos duales de <i>Trichoderma</i> sp y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4	83
4.5. Identificación molecular de Trichodermas que con capacidad antagonista ...	89
4.6. Ensayos de masificación de Trichodermas en sustratos orgánicos	95
4.6.1. Sustratos individuales (arroz, trigo, bagazo y biochar)	95
4.6.2. Combinaciones de sustratos	96
4.6.3. Combinación de sustratos con biochar (biochar + cereales o bagazo)...	98
4.6.4. Análisis comparativo de sustratos.	99
CAPITULO V	
CONCLUSIONES	103
CAPITULO VI	
RECOMENDACIONES	105
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	107

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: <i>Coordenadas de puntos de muestreo para el aislamiento de Trichoderma spp</i>	395
Tabla 2: <i>Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS</i>	52
Tabla 3: <i>Mezcla de reacción para PCR (Volumen final: 25 µL)</i>	52
Tabla 4: <i>Condiciones de amplificación por PCR para la región ITS</i>	53
Tabla 5: <i>Descripción de los sustratos utilizados según tratamiento</i>	51
Tabla 6: <i>Porcentaje de inhibición radial del crecimiento de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (FOC4) y grado de micoparasitismo de cepas de Trichoderma sp. a los once días de evaluación in vitro</i>	66
Tabla 7: <i>Porcentaje de inhibición radial del crecimiento de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (FOC4) y grado de micoparasitismo de cepas de Trichoderma sp. a los once días de evaluación in vitro.</i>	62
Tabla 8. <i>Datos de alineamiento BLASTn para Trichoderma sp</i>	90
Tabla 9: <i>Resultados de ensayo de masificación de trichocermas en sustratos individuales en arroz, trigo, bagazo y biochar</i>	951
Tabla 10: <i>Resultados de ensayo de masificación de trichocermas en sustratos en combinaciones de sustratos</i>	973
Tabla 11: <i>Ensayo de Masificación de Trichodermas en combinaciones con biochar (biochar + cereales o bagazo</i>	98
Tabla 12: <i>Tratamientos con mayor biomasa (UFC/g)</i>	100
Tabla 13: <i>Tratamientos con mayor esporulación (esporas/g)</i>	101
Tabla 14: <i>Tratamientos con mayor porcentaje de viabilidad de Trichoderma spp. producidos en sustratos orgánicos mediante fermentación en estado sólido</i>	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Recolección de muestras. a) Indumentaria de biosegurida utilizada (mandil desechable, cubre calzado desechable, guantes y mascarilla) y b) Cooler con gelpack para el traslado de la muestra.	40
Figura 2: Recolección de muestras. a) Desinfección de herramientas con alcohol al 70 % y b) Rizosfera de banano en bolsa ziplock.	41 <u>7</u>
Figura 3: Aislamiento de hongos rizosféricos a) disección y pesado de la muestra rizosferica b) homogenización de la muestra c) siembra en medio PDA y d) esparcimiento de la muestra en placa Petri.	43
Figura 4: Caracterización morfológica. Visualización microscópica de los diferentes aislados de <i>Trichodermas</i> spp, provenientes de la rizosfera del cultivo de banano	45
Figura 5: Cepa de <i>Fusarium oxysporum</i> f Cepa de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Raza 4 Tropical FoMb-8. a) Crecimiento de cultivo en medio PDA. Estructuras microscópicas. b) Macroconidios en forma falcada, c) Microconidios. d) Clamidosporas, e) Monofialides, f) Falsas cabezas. Barras de escala B – E= 20 μ m.	47
Figura 6: Pruebas de antagonismo de trichodermas contra fitopatógenos. a) Toma de disco de <i>Trichoderma</i> b) enfrentamiento dual c) Posicionamiento de discos en extremos de la placa Petri.	50
Figura 7: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. (LIG1) en una de las placas testigo.	59
Figura 8: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG2 en una de las placas testigo.	60 <u>6</u>
Figura 9: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG3 en una de las placas testigo.	60
Figura 10: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG4 en una de las placas testigo.	61
Figura 11: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG5 en una de las placas testigo	61
Figura 12: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG6 en una de las placas testigo	62

Figura 13: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG7 en una de las placas testigo.	628
Figura 14: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG8 en una de las placas testigo	63
Figura 15: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG9 en una de las placas testigo.	63
Figura 16: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG10 en una de las placas testigo.	64
Figura 17: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG11 en una de las placas testigo.	64
Figura 18: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG12 en una de las placas testigo.	65
Figura 19: Porcentaje de inhibición radial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza 4 (FOC4) por cepas de <i>Trichoderma</i> sp. a los 4 y 11 días de incubación in vitro y grado de mico parasitismo.....	67
Figura 20: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza 4. (FOC4) en una de las placas testigo	68
Figura 21: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. (LIG1) en una de las placas testigo.....	68
Figura 22: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG2 en una de las placas testigo.	69
Figura 23: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG3 en una de las placas testigo	69
Figura 24: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG4 en una de las placas testigo.	70
Figura 25: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG5 en una de las placas testigo.	70
Figura 26: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG6 en una de las placas testigo	71
Figura 27: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG7 en una de las placas testigo.	71
Figura 28: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG8 en una de las placas testigo	72

Figura 29: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG9 en una de las placas testigo	72
Figura 30: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG10 en una de las placas testigo	73
Figura 31: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG11 en una de las placas testigo.	73
Figura 32: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG12 en una de las placas testigo.	74
Figura 33: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG1) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	74
Figura 34: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG2) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	75
Figura 35: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG3) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	75
Figura 36: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG4) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	76
Figura 37: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG5) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	76
Figura 38: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG6) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	77
Figura 39: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG7) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	77
Figura 40: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG8) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	784

Figura 41: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra <i>Trichoderma</i> sp. (LIG9) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	79
Figura 42: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra <i>Trichoderma</i> sp. (LIG10) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	79
Figura 43: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra <i>Trichoderma</i> sp. (LIG11) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	80
Figura 44: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra <i>Trichoderma</i> sp. (LIG12) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	80
Figura 45: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza 4. (FOC4) en una de las placas testigo	81
Figura 46: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG1 en una de las placas testigo	81
Figura 47: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG2 en una de las placas testigo.	82
Figura 48: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG3 en una de las placas testigo	828
Figura 49: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG4 en una de las placas testigo.	838
Figura 50: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG5 en una de las placas testigo.	849
Figura 51: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG6 en una de las placas testigo	849
Figura 52: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG7 en una de las placas testigo	85
Figura 53: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG8 en una de las placas testigo	85
Figura 54: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. LIG9 en una de las placas testigo	861

Figura 55: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG10 en una de las placas testigo.	86
Figura 56: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp. LIG11 en una de las placas testigo.	872
Figura 57: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de Trichoderma sp LIG12 en una de las placas testigo.	872
Figura 58: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG1) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	88
Figura 59: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG2) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	88
Figura 60: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG3) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.	89
Figura 61: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG4) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	89
Figura 62: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG5) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	85
Figura 63: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG6) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	905
Figura 64: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG7) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	91
Figura 65: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG8) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	916
Figura 66: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG9) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	92

Figura 67: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG10) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	927
Figura 68: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG11) -derecha en la placa- en una de las repeticiones ..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 69: Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra Trichoderma sp. (LIG12) -derecha en la placa- en una de las repeticiones	88
Figura 70: . Estadística de nucleótidos:.....	94
Figura 71: Producción de UFC, esporas y viabilidad de Trichoderma en sustratos individuales	96
Figura 72: Producción de UFC, esporas y viabilidad de Trichoderma en sustratos combinados	97
Figura 73: UFC, número de esporas y viabilidad en sustratos combinables.....	99
Figura 74: Tratamientos con mayor biomasa (UFC/g).....	100
Figura 75: Tratamientos con mayor esporulación (esporas/g).....	101
Figura 76: Tratamientos con mayor viabilidad (%).	102

RESUMEN

El estudio tuvo como finalidad evaluar la producción masiva de *Trichoderma spp.* nativos aislados de la rizosfera del banano (*Musa sp.*), utilizando diversos orgánicos con el propósito de identificar formulaciones eficientes para su aplicación como agentes de control biológico. Se obtuvieron 12 cepas con características morfológicas compatibles con el género *Trichoderma* que fueron purificadas y conservadas para su evaluación frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc TR4), uno de los principales patógenos en banano. Las pruebas de antagonismo revelaron diferencias marcadas entre las cepas. Al día 11 de confrontación, los porcentajes de inhibición variaron entre 52.06 % y 72.43 %. Las cepas LIG1, LIG2 y LIG3 mostraron el mejor desempeño, superando el 71 % de inhibición y registrando grados de micoparasitismo entre 3 y 4, asociados a mecanismos como contacto hifal, enrollamiento y sobrecrecimiento. LIG11 obtuvo la inhibición más baja y menor capacidad micoparasítica. La cepa sobresaliente, identificada molecularmente mediante secuenciamiento ITS fue *Trichoderma harzianum* con 99.52 % de similitud. Para masificación se evaluaron 21 formulaciones basadas en arroz, trigo, bagazo de caña y biochar. Los sustratos con biochar lograron las mayores concentraciones de esporas (hasta 2.73×10^9 esporas/g), mientras que el bagazo registró la viabilidad más alta (99.05 %). La mezcla arroz + trigo alcanzó la mayor producción de biomasa (6.72×10^8 UFC/g), destacándose como una formulación equilibrada para la multiplicación fúngica. Estos resultados demuestran que los sustratos orgánicos constituyen una alternativa técnica, económica y ambientalmente viable para la producción masiva de *Trichoderma spp.* nativos. La identificación de cepas con alta capacidad antagónica frente a Foc TR4 y la disponibilidad de sustratos eficientes representan un avance relevante para el desarrollo de bioinsumos destinados al manejo sostenible de enfermedades del suelo en banano, frente a la amenaza creciente de Foc TR4 en el Perú.

Palabras clave: bioinsumos, control biológico, cultivo dual, Foc TR4, patógeno

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mass production of native *Trichoderma* spp. isolated from the banana (*Musa* sp.) rhizosphere, using various organic substrates in order to identify efficient formulations for their application as biological control agents. A total of 12 strains with morphological characteristics consistent with the genus *Trichoderma* were obtained, purified, and preserved for evaluation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (Foc TR4), one of the main pathogens affecting banana. Antagonism tests revealed marked differences among strains. On day 11 of confrontation, inhibition percentages ranged from 52.06% to 72.43%. Strains LIG1, LIG2, and LIG3 showed the best performance, exceeding 71% inhibition and exhibiting mycoparasitism grades between 3 and 4, associated with mechanisms such as hyphal contact, coiling, and overgrowth. In contrast, LIG11 showed the lowest inhibition and reduced mycoparasitic capacity. The most outstanding strain, molecularly identified through ITS sequencing, was *Trichoderma harzianum* with 99.52% similarity. For mass production, 21 formulations based on rice, wheat, sugarcane bagasse, and biochar were evaluated. Substrates containing biochar achieved the highest spore concentrations (up to 2.73×10^9 spores/g), while bagasse showed the highest viability (99.05%). The rice + wheat mixture reached the highest biomass production (6.72×10^8 CFU/g), standing out as a balanced formulation for fungal multiplication. These results demonstrate that organic substrates constitute a technically, economically, and environmentally viable alternative for the mass production of native *Trichoderma* spp. The identification of strains with high antagonistic capacity against Foc TR4 and the availability of efficient substrates represent a significant advance for the development of bioinputs aimed at the sustainable management of soil-borne diseases in banana, in the face of the growing threat of Foc TR4 in Peru.

Keywords: bioinputs, biological control, dual culture, Foc TR4, pathogen

CAPITULO I

INTRODUCCION

El banano (*Musa spp.*) es un cultivo de importancia económica y agroecológica a nivel mundial, es la fruta fresca más exportada, con más de 119 millones de toneladas/año y un valor superior a 13.3 mil millones de dólares (Zhu *et al.*, 2023). En el Perú, además de ser un alimento básico, sustenta economías regionales. En 2023, la producción nacional superó los 2.4 millones de toneladas en más de 160 000 ha, destacando Piura con cerca de 416 000 toneladas (MIDAGRI, 2024). En el valle del Chira-Sullana, existen condiciones favorables para el cultivo orgánico de banano variedad Cavendish, debido a su clima seco y suelos arenosos que permiten ciclos prolongados (FreshFruitPortal, 2024). Este sistema productivo, enfocado en la exportación a Estados Unidos y Europa, tiene un importante impacto socioeconómico al involucrar a numerosos pequeños y medianos productores.

La enfermedad de la Sigatoka negra es causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* y se ha identificado como una limitación importante para la producción mundial de banano y plátano (Yonow *et al.*, 2019). No obstante, las enfermedades del suelo representan la mayor amenaza, destacando la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), cuya raza TR4 ha generado pérdidas incluso en variedades Cavendish (Zhu *et al.*, 2023). En Sullana, la presencia de este patógeno junto con otros como *Rhizoctonia spp.*, *Pythium spp.* y nematodos complica el manejo fitosanitario, debido a la limitada eficacia de los fungicidas convencionales.

Frente a esta situación y a la necesidad de alternativas sostenibles, el control biológico cobra relevancia, escenario en el cual destaca *Trichoderma spp.* por su eficacia y versatilidad, ya que actúa mediante micoparasitismo, competencia, producción de antibióticos y activación de defensas en la planta huésped. Su uso ofrece ventajas ambientales y agronómicas al disminuir el uso de agroquímicos, evitar residuos tóxicos y conservar la microbiota del suelo. (Zhu *et al.*, 2023).

Por su parte Cortes-Hernández *et al* (2023) señalan que dentro de las alternativas biológicas está el uso de insumos a base de microorganismos benéficos, como el género *Trichoderma*. Los cuales se han utilizado en los campos agrícolas para el control biológico contra un gran número de fitopatógenos. Sin embargo, aún son poco conocidas otras propiedades benéficas de este género para las plantas que coloniza y el ecosistema. Además contribuye al crecimiento vegetal mediante la producción de enzimas, metabolitos antifúngicos, fitohormonas, solubilización de nutrientes y mejora la estructura del suelo.

Las cepas de *Trichoderma spp.* pueden inhibir significativamente el crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, alcanzando valores superiores al 50 % e incluso mayores al 90 % dependiendo de la cepa (Ortiz Quintero *et al.*, 2025). Estudios recientes han demostrado que cepas de *Trichoderma spp.* pueden inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* TR4 en porcentajes cercanos al 80% u 85 % en condiciones *in vitro*, dependiendo de la cepa (Damodaran *et al.*, 2020). En este contexto Ortiz Quintero *et al.* (2025) expresan que las cepas nativas son más relevantes, pues están mejor adaptadas a las condiciones locales y colonizan más eficiente las raíces, aumentando el éxito del biocontrol.

Para la aplicación de *Trichoderma spp.*, es básico contar con métodos eficientes de producción masiva, como la fermentación en estado sólido (SSF) utilizando sustratos orgánicos. Este tiene ventajas como menor consumo de agua y energía, menor generación de residuos y mayor esporulación en comparación con la fermentación sumergida (Pandey *et al.*, 2000). Además, el uso de insumos locales reduce costos y permite lograr biofertilizantes que mejoran la fertilidad del suelo.

El uso de cepas nativas de *Trichoderma spp.* es una alternativa eficaz y sostenible y en conjunto con técnicas de producción en sustratos orgánicos permite mejorar la sanidad del cultivo y reducir el uso de agroquímicos (Zhu *et al.*, 2023). En este contexto, la investigación tuvo como objetivo desarrollar métodos eficientes para la producción masiva de *Trichoderma spp.* en sustratos orgánicos. Se planteó que el uso de herramientas de microbiología molecular permitirá producir cepas nativas de la rizósfera del banano, contribuyendo así al desarrollo de una tecnología biológica que fortalezca el manejo integrado del cultivo en Sullana, Piura.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1. El cultivo de banano (*Musa spp.*) en el contexto agrícola actual

2.1.1. Importancia económica y productiva

La producción de banano ha experimentado un notable incremento a lo largo del último siglo, impulsada por la creciente demanda global de esta fruta. Aunque su origen se ubica en el sudeste asiático, hoy en día se cultiva en más de 135 países ubicados en zonas tropicales y subtropicales. Este crecimiento productivo se basa principalmente en una sola variedad: Cavendish, la cual domina casi por completo el mercado de exportación bajo sistemas de monocultivo extensivo, además de constituir una proporción significativa del comercio interno, representando más del 40 % de todo el banano producido en el mundo (Drenth *et al.*, 2021).

El banano constituye uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, no solo por su alto consumo, sino también por su contribución a la seguridad alimentaria en países en desarrollo, donde actúa como alimento básico. Asimismo, desempeña un papel fundamental en la generación de ingresos para pequeños agricultores, quienes dependen de este cultivo tanto para el autoconsumo como para el mercado local (FAO, 2024).

Como se ha mencionado anteriormente, el banano es la fruta más exportada a nivel mundial, de gran dinamismo en el comercio internacional, generando miles de millones de dólares anuales, lo que evidencia su papel estratégico como commodity agrícola y su significativa contribución a la economía de numerosos países productores.

2.1.2. Principales problemas fitosanitarios del banano

El cultivo del banano enfrenta múltiples enfermedades y plagas que afectan su rendimiento y calidad. Entre las enfermedades fúngicas destaca la marchitez por *Fusarium* (Panama disease), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). En particular, la raza Tropical 4 (TR4) ataca a las variedades Cavendish actualmente dominantes y constituye una amenaza global de expansión rápida. En los últimos años, ha aumentado significativamente los países afectados, intensificando su estatus como una de las enfermedades más destructivas del cultivo (Munhoz *et al.*, 2024). En América Latina, TR4 fue detectado por primera vez en Colombia en 2019 y posteriormente en Perú en 2021, principalmente en zonas del norte del país, donde su dispersión se ha visto favorecida por factores ambientales y de manejo (Acuña *et al.*, 2022).

Otra enfermedad fúngica crítica es la Sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis*. Este patógeno foliar genera lesiones necróticas que reducen significativamente la fotosíntesis, y se considera una de las enfermedades más destructivas del banano a nivel mundial (Arango-Isaza *et al.*, 2016). La Sigatoka amarilla (*Pseudocercospora musae*) es menos agresiva, pero afecta áreas productoras donde predominan cultivares susceptibles. Otras enfermedades fúngicas relevantes incluyen la cercosporiosis y la antracnosis del fruto por *Colletotrichum* spp., aunque su impacto es inferior comparado con *Fusarium* y Sigatoka. Enfermedades como la marchitez por *Fusarium* y la Sigatoka negra constituyen amenazas globales que requieren material vegetal libre de patógenos, rotaciones y uso de variedades resistentes (Martínez de la Parte *et al.*, 2024).

2.2. Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc TR4)

2.2.1. Etiología y epidemiología

El agente causal del Mal de Panamá es un hongo del complejo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), patógeno vascular y habitante del suelo (*soil-borne*) (FAO, 2025a). Dentro de Foc se distinguen “razas” de acuerdo con la respuesta diferencial de cultivares de *Musa*, y la Raza 4 Tropical (TR4) se caracteriza por infectar severamente a Cavendish en condiciones

tropicales, a diferencia de la “Raza 4 subtropical”, que suele requerir estrés/condiciones predisponentes (ProMusa, 2023). Estudios filogenómicos han propuesto que TR4 corresponde al linaje conocido como *Fusarium odoratissimum*; sin embargo, en la práctica fitosanitaria y productiva aún se usa ampliamente el término Foc TR4 (ProMusa, 2023; EPPO, 2023).

Desde el punto de vista epidemiológico, TR4 es crítico porque produce estructuras de resistencia (clamidoporas) capaces de persistir por largos periodos en el suelo y en residuos infectados, lo que dificulta la erradicación una vez establecido (FAO, 2025b; Ploetz, 2015). La dispersión ocurre principalmente por movimiento de suelo contaminado (maquinaria, herramientas, calzado), material de siembra infectado y agua (riego, escorrentía, inundaciones), por lo que la bioseguridad y la cuarentena son determinantes (EPPO, 2023; Ploetz, 2015; FAO, 2025a).

En términos de expansión geográfica, TR4 se reportó inicialmente en Asia y luego se extendió a Oceanía, África y América Latina. En el periodo reciente, se confirmó en Colombia (2019) y posteriormente en Perú (2021), con expansión regional en el norte peruano, lo que ha elevado el nivel de alerta fitosanitaria en la región (Dita *et al.*, 2024).

2.2.2. Síntomas y mecanismos de patogenicidad

Los síntomas externos típicos incluyen amarillamiento progresivo (iniciando en hojas viejas), marchitez, colapso de hojas y, en fases avanzadas, rajaduras del pseudotallo; internamente se observa discoloración vascular marcada en cormo y pseudotallo (EPPO, 2023). La fisiopatología está asociada a la colonización del xilema, donde el hongo se multiplica y contribuye a la obstrucción del transporte de agua, desencadenando estrés hídrico, marchitez y colapso funcional del sistema vascular (Ploetz, 2015; FAO, 2025a).

El proceso infeccioso inicia en raíces: las hifas penetran y avanzan hacia el cilindro vascular; una vez en xilema, TR4 produce conidios y biomasa que facilitan la diseminación interna. Paralelamente, la planta activa respuestas

de defensa estructurales como tilosas y oclusiones vasculares; la eficacia de estas respuestas varía entre cultivares susceptibles y resistentes/tolerantes (Zhou *et al.*, 2023). A nivel molecular, se ha descrito la relevancia de efectores secretados en xilema (familia SIX) en *Fusarium oxysporum* como parte de la interacción patógeno–hospedero; la composición y expresión de estos efectores contribuye a la especificidad y agresividad de ciertos linajes (Ploetz, 2015).

2.2.3. Impacto económico y manejo del patógeno

El banano y el plátano son cultivos estratégicos para seguridad alimentaria e ingresos rurales; además, el Cavendish domina la exportación global, lo que hace que TR4 represente un riesgo sistémico para cadenas de valor y empleo (FAO, 2024; FAO, 2025b). En América Latina y el Caribe, donde se concentra una parte sustancial del comercio internacional, la entrada de TR4 ha implicado costos altos en vigilancia, contención, erradicación parcial y bioseguridad, además del riesgo de expansión a nuevas zonas productivas (Dita *et al.*, 2024).

En Perú, por ejemplo, se han reportado impactos directos en productores (incluyendo sistemas orgánicos) y pérdidas económicas por hectárea asociadas a reducción de productividad y restricciones operativas, afectando la viabilidad financiera de unidades agrícolas pequeñas (Alliance of Bioversity International & CIAT, 2025). En Colombia, la experiencia ha mostrado que la respuesta temprana con medidas de cuarentena y contención puede reducir la expansión, aunque no elimina el riesgo de reintroducciones y nuevos focos (Dita *et al.*, 2024).

El manejo del patógeno específicamente comprende lo siguiente:

- a) **Prevención y exclusión:** cuarentena, trazabilidad de material de siembra, vigilancia y diagnóstico oportuno (FAO, 2025a; EPPO, 2023).
- b) **Bioseguridad estricta en campo:** control de accesos, limpieza/desinfección de calzado, herramientas y vehículos; manejo del agua y drenaje para evitar dispersión (FAO, 2025a; Ploetz, 2015).

- c) **Contención/erradicación focal:** aislamiento de focos, destrucción de plantas afectadas, restricción de movimientos y barreras físicas para reducir diseminación (FAO, 2025a; Dita *et al.*, 2024).
- d) **Limitaciones del control químico:** no existen tratamientos curativos efectivos una vez el suelo está infestado; por ello, los fungicidas no resuelven el problema de base (Ploetz, 2015; EPPO, 2023).
- e) **Opciones biológicas y manejo de suelo:** se investiga el papel de microbiomas y suelos supresivos y el potencial de biocontrol, aunque con resultados dependientes del contexto y usualmente como parte de manejo integrado (Ploetz, 2015).
- f) **Resistencia genética:** el desarrollo/adopción de cultivares resistentes o tolerantes es ampliamente considerado el enfoque más sostenible a mediano-largo plazo, aunque con retos agronómicos, comerciales y de aceptación (Ploetz, 2015; Dita *et al.*, 2024).

2.3. Características generales del género *Trichoderma*

2.3.1. Taxonomía, biología y características morfológicas

El género *Trichoderma* comprende hongos filamentosos pertenecientes al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Hypocreaceae, cuyo estado sexual ha sido tradicionalmente asignado al género *Hypocrea* (Kubicek *et al.*, 2008; Druzhinina *et al.*, 2011). Se trata de un grupo altamente diverso y cosmopolita, con más de 370 especies descritas hasta la fecha, ampliamente distribuidas en suelos agrícolas, forestales y ecosistemas naturales, donde actúan principalmente como saprófitos eficientes y colonizadores de la rizosfera (Druzhinina *et al.*, 2011; Harman *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista biológico, *Trichoderma* se caracteriza por un rápido crecimiento micelial, elevada capacidad de esporulación y una notable plasticidad metabólica, lo que le permite adaptarse a condiciones ambientales variables y competir exitosamente con otros microorganismos del suelo (Kubicek *et al.*, 2011). Muchas especies establecen interacciones beneficiosas con plantas, colonizando la rizosfera y, en algunos casos,

tejidos radiculares como endófitos no patogénicos, sin causar daño al hospedero (Harman *et al.*, 2004; Martínez-Medina *et al.*, 2017).

Morfológicamente, el género presenta un micelio hialino, septado y altamente ramificado. Los conidióforos son erectos o postrados, con ramificación irregular o verticilada, portando fiálides ampuliformes o lageniformes, a partir de las cuales se forman conidios unicelulares, subglobosos a elipsoidales, típicamente de color verde en masa (Samuels *et al.*, 2012). Muchas especies producen clamidosporas de pared gruesa como estructuras de resistencia, lo que contribuye a su persistencia en el suelo (Kubicek *et al.*, 2011). A nivel funcional, *Trichoderma* destaca por la intensa secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares (quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteasas y celulasas) y por la biosíntesis de una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos, rasgos clave asociados a su potencial como agente de control biológico (Harman *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2011).

2.3.2. Mecanismos de acción en el control biológico

El control biológico ejercido por *Trichoderma spp.* es de naturaleza multifactorial, resultado de la acción sinérgica de mecanismos directos e indirectos sobre los fitopatógenos y la planta hospedera. Estos mecanismos incluyen la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la producción de metabolitos antimicrobianos y la inducción de resistencia sistémica en plantas, los cuales suelen operar de manera simultánea (Harman *et al.*, 2004; Kubicek *et al.*, 2011). Dichos mecanismos de acción del *Trichoderma spp.* se detallan a continuación:

a) Competencia por espacio y nutrientes

Trichoderma spp. exhiben una elevada capacidad competitiva en la rizosfera debido a su rápido crecimiento micelial y aprovechamiento eficiente de recursos (Harman *et al.*, 2004). La colonización temprana de superficies radiculares permite a *Trichoderma* ocupar nichos ecológicos antes que los patógenos, limitando físicamente su acceso a los tejidos vegetales (Benítez *et al.*, 2004). A nivel fisiológico, estas especies

presentan una alta afinidad por fuentes de carbono simples, nitrógeno y micronutrientes, lo que conduce al agotamiento de recursos esenciales para los hongos fitopatógenos (Lorito *et al.*, 2010). Esta competencia metabólica reduce la germinación de esporas, el crecimiento micelial y la capacidad infectiva de muchos patógenos del suelo (Harman *et al.*, 2004).

b) Micoparasitismo

Es uno de los mecanismos más distintivos del género *Trichoderma*, implica el reconocimiento específico del hongo hospedero, seguido por la adhesión, enrollamiento y penetración de las hifas del patógeno (Lorito *et al.*, 2010; Kubicek *et al.*, 2011). A nivel molecular, *Trichoderma* detecta componentes de la pared celular del patógeno (como quitina y glucanos), lo que desencadena la expresión de genes que codifican enzimas líticas (Mukherjee *et al.*, 2013).

Entre las enzimas más relevantes se encuentran las quitinasas, β -1,3-glucanasas y proteasas, que degradan la pared celular del hongo parasitado, provocando lisis, colapso citoplasmático y muerte celular (Lorito *et al.*, 2010). Genes como *ech42* y *nag1* en *T. harzianum* han sido ampliamente estudiados y se consideran determinantes en la eficacia micoparasítica del género (Benítez *et al.*, 2004). Este mecanismo permite a *Trichoderma* utilizar al patógeno como fuente de nutrientes, eliminándolo directamente del ecosistema del suelo.

c) Producción de metabolitos antimicrobianos

Trichoderma spp. produce una diversidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, fenómeno conocido como antibiosis (Druzhinina *et al.*, 2011). Se incluyen peptaiboles, poliquétidos, terpenoides, lactonas y compuestos volátiles orgánicos (VOCs), muchos de los cuales poseen actividad fungistática o fungicida (Vinale *et al.*, 2008).

Un metabolito ampliamente estudiado es la 6-pentil- α -pirona, producida por varias especies de *Trichoderma*, la cual inhibe el crecimiento micelial y la germinación de esporas de diversos fitopatógenos, además de actuar

como señal bioactiva en plantas (Vinale *et al.*, 2008). Asimismo, los peptaiboles alteran la permeabilidad de membranas celulares del patógeno, causando desbalance osmótico y muerte celular (Mukherjee *et al.*, 2013). Los metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma* pueden actuar a distancia, inhibiendo patógenos sin contacto físico directo, lo que amplía el rango de acción del control biológico (Vinale *et al.*, 2008).

d) Inducción de resistencia sistémica en plantas

Más allá del antagonismo directo, *Trichoderma spp.* pueden activar las defensas innatas de las plantas, induciendo un estado de resistencia sistémica conocido como *Trichoderma-induced systemic resistance* (TISR) (Harman *et al.*, 2004; Martínez-Medina *et al.*, 2017). La colonización radicular por *Trichoderma* desencadena la percepción de elicitores fúngicos por la planta, activando complejas redes de señalización hormonal mediadas principalmente por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), y en ciertos contextos también por ácido salicílico (SA) (Martínez-Medina *et al.*, 2017).

Como consecuencia, se incrementa la expresión de genes de defensa, incluyendo proteínas relacionadas con patogénesis (PR), quitinasas, glucanasas y enzimas del metabolismo fenólico (Shoresh *et al.*, 2010). Este estado de “priming” permite que la planta responda de manera más rápida y eficaz ante infecciones posteriores, reduciendo la severidad de la enfermedad incluso frente a patógenos que no son directamente antagonizados por *Trichoderma* (Pieterse *et al.*, 2014). A nivel molecular, estudios transcriptómicos muestran que *Trichoderma* modula la expresión de cientos de genes asociados a inmunidad, crecimiento y metabolismo secundario en la planta hospedera (Martínez-Medina *et al.*, 2017).

2.3.3. Adaptación y ventajas de *Trichoderma* nativo

Las especies del género *Trichoderma* son componentes frecuentes y funcionalmente relevantes de la microbiota del suelo, particularmente en la rizósfera de cultivos agrícolas tropicales y subtropicales. Numerosos estudios han demostrado que las cepas nativas de *Trichoderma*, aisladas

directamente de rizósferas agrícolas, presentan ventajas adaptativas y funcionales frente a cepas exógenas o comerciales, debido a su coevolución con el ecosistema edáfico y con las plantas hospedantes (Harman *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2011).

a) Adaptación al ecosistema rizosférico

La rizósfera constituye un microambiente altamente dinámico y competitivo, determinado por exudados radiculares, gradientes fisicoquímicos y una elevada densidad microbiana. Las cepas nativas de *Trichoderma* han evolucionado bajo estas condiciones específicas, lo que se traduce en una mayor aptitud ecológica para colonizar raíces, persistir en el suelo y competir con microorganismos residentes (Harman *et al.*, 2004; Kubicek *et al.*, 2011).

Diversos trabajos han demostrado que *Trichoderma* nativo presenta una colonización rizosférica más eficiente, tanto superficial como endofítica, en comparación con cepas foráneas, debido a su mejor adaptación al pH, temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes del suelo local (Druzhinina *et al.*, 2011 y Martínez - Medina *et al.*, 2017). A nivel molecular, estas cepas suelen poseer repertorios génicos amplios asociados a la degradación de polisacáridos complejos, secreción de enzimas hidrolíticas y producción de metabolitos secundarios, lo que refleja su adaptación funcional al nicho rizosférico (Kubicek *et al.*, 2011).

Esta adaptación permite que *Trichoderma* nativo establezca interacciones estables con la planta hospedera, promoviendo la inducción de resistencia sistémica y la protección frente a patógenos del suelo, incluso bajo condiciones ambientales fluctuantes (Martínez - Medina *et al.*, 2017).

b) Ventajas sobre cepas exógenas

El uso de cepas nativas de *Trichoderma* ofrece ventajas claras frente a cepas exógenas o comerciales introducidas desde otros ecosistemas. Estudios comparativos han evidenciado que los aislados autóctonos muestran mayor persistencia poblacional, mejor capacidad competitiva y

una eficacia superior en el control de patógenos locales (Jambhulkar *et al.*, 2024; Correa-Delgado *et al.*, 2024).

Estas ventajas se explican por la coevolución de las cepas nativas con el microbioma del suelo y con los patógenos endémicos, lo que les permite responder de forma más eficiente a señales químicas del entorno y superar la competencia microbiana establecida (Harman *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2011). En contraste, cepas exógenas pueden presentar dificultades para establecerse de manera estable, sufrir antagonismo por la microbiota residente o perder eficacia bajo condiciones edafoclimáticas distintas a las de su origen (Jambhulkar *et al.*, 2024).

Desde una perspectiva ecológica y agronómica, el empleo de *Trichoderma* nativo reduce el riesgo de desequilibrios microbianos y favorece una integración armónica en el ecosistema agrícola, lo que se traduce en un control biológico más consistente y sostenible a largo plazo (Kubicek *et al.*, 2011; Lorito *et al.*, 2010).

2.3.4. Sistemas, parámetros e indicadores de calidad en la producción masiva de *Trichoderma* spp.

La producción masiva de *Trichoderma* spp. constituye un componente esencial para su aplicación como agente de control biológico a escala comercial. La eficiencia del proceso productivo depende del sistema de fermentación empleado, de la optimización de parámetros fisicoquímicos críticos y de la calidad final del inóculo, evaluada a través de indicadores como el rendimiento, la esporulación y la viabilidad (Kumar *et al.*, 2023).

a) Sistemas de producción masiva: fermentación sumergida vs. fermentación sólida (SSF).

La fermentación en estado sólido (SSF) se basa en el crecimiento del hongo sobre un sustrato sólido con humedad controlada y ausencia de agua libre. Este sistema reproduce de forma más cercana las condiciones ecológicas naturales de *Trichoderma*, favoreciendo particularmente la formación de

conidias aéreas (Kumar *et al.*, 2023). Diversos estudios han demostrado que la SSF permite alcanzar altas densidades de esporas utilizando sustratos agrícolas de bajo costo, como cáscara de arroz, bagazo de caña, residuos de yuca o subproductos del té). En estos sistemas se han reportado rendimientos superiores a 10^9 – 10^{10} conidias por gramo de sustrato en periodos relativamente cortos (Zhang *et al.*, 2022).

Las principales ventajas de la SSF incluyen su bajo costo operativo, el uso de residuos agroindustriales y la alta eficiencia en esporulación (Kumar *et al.*, 2023). Sin embargo, presenta limitaciones importantes, como la dificultad de escalamiento, el menor control de variables ambientales y una mayor susceptibilidad a contaminaciones microbianas cuando no se implementan condiciones estrictas de esterilidad (Kumar *et al.*, 2023).

En contraste, la fermentación sumergida (SmF) se realiza en medios líquidos bajo condiciones controladas de agitación y aireación, lo que facilita su escalabilidad y control de parámetros del proceso (Rezende *et al.*, 2020). Sin embargo, en este sistema *Trichoderma* tiende a desarrollarse principalmente como biomasa micelial, mientras que la producción de conidias es limitada en medios líquidos, en comparación con la fermentación en estado sólido (Rimkus *et al.*, 2023).

Avances recientes han demostrado que la optimización de variables nutricionales y ambientales en SmF puede inducir conidiación eficiente. Rezende *et al.* (2020) lograron incrementar significativamente la producción de conidias de *T. asperelloides* mediante el ajuste de pH, fuentes de carbono y condiciones de aireación, obteniendo rendimientos comparables a los sistemas sólidos. En consecuencia, la SmF se perfila como una alternativa viable para la producción industrial estandarizada de *Trichoderma*, especialmente cuando se requiere uniformidad y control de calidad estricto (Kumar *et al.*, 2023).

b) Parámetros para la producción masiva: humedad, aireación, pH, temperatura

La optimización de parámetros ambientales es determinante para maximizar la producción y calidad del inóculo de *Trichoderma* spp., independiente del sistema de fermentación utilizado.

La humedad constituye un factor crítico en la fermentación en estado sólido (SSF). Diversos estudios indican que contenidos de humedad entre 60 y 80 % favorecen el crecimiento microbiano y la esporulación, mientras que niveles bajos generan limitaciones por disponibilidad de agua y niveles elevados reducen la porosidad y la transferencia de oxígeno en el sistema (Pandey *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2023). En SmF, la humedad está implícita en el medio líquido, pero la actividad de agua y la osmolaridad deben mantenerse en rangos que no limiten el metabolismo fúngico (Rezende *et al.*, 2020).

La aireación es indispensable debido al carácter estrictamente aeróbico de *Trichoderma*. En SmF, la transferencia de oxígeno depende de la velocidad de agitación y del flujo de aire, siendo necesario evitar tanto la limitación de oxígeno como el daño mecánico del micelio por agitación excesiva (Rezende *et al.*, 2020). En SSF, la aireación se ve condicionada por la estructura del sustrato; la ventilación forzada o el volteo periódico del material sólido han demostrado mejorar significativamente la esporulación (Zhang & Yang, 2015).

El pH influye de manera directa en la fisiología y la conidiación de *Trichoderma*. La mayoría de las especies presentan un óptimo de crecimiento en rangos ligeramente ácidos (pH 4–6). En fermentación líquida, el pH ha sido identificado como uno de los factores más influyentes en la inducción de esporulación. Rezende *et al.* (2020) demostraron que valores de pH cercanos a 3.5 incrementaron significativamente la producción de conidias en *T. asperelloides*, mientras que desviaciones de este rango redujeron el rendimiento.

La temperatura óptima para la mayoría de las cepas de *Trichoderma* se sitúa entre 25 y 30 °C. Temperaturas inferiores reducen la tasa metabólica y prolongan el proceso fermentativo, mientras que valores superiores a 35 °C afectan negativamente la viabilidad y la calidad de las esporas (Kumar *et al.*, 2023; Rimkus *et al.*, 2023). En SSF, el control térmico es especialmente importante debido a la acumulación de calor metabólico en el lecho sólido, lo que requiere sistemas de disipación adecuados (Zhang *et al.*, 2022).

c) Indicadores de calidad: Rendimiento, esporulación y viabilidad

La calidad del producto final de *Trichoderma* spp. se evalúa principalmente a través del rendimiento, la capacidad de esporulación y la viabilidad de los propágulos producidos. Estos parámetros determinan la eficacia biológica y la estabilidad del bioinsumo durante su almacenamiento y aplicación en campo (Kumar *et al.*, 2023).

El rendimiento suele expresarse como unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo o mililitro de producto. En formulaciones comerciales se consideran aceptables concentraciones mínimas del orden de 10^7 - 10^9 UFC g^{-1} , dependiendo de la normativa local y del tipo de formulación (Rimkus *et al.*, 2023). Estudios en SSF han reportado rendimientos superiores a 10^9 UFC g^{-1} en sistemas optimizados, incluso a escala piloto e industrial (Zhang *et al.*, 2022). La esporulación eficiente es deseable porque las conidias representan la principal unidad infectiva y de supervivencia del biofungicida. Un alto número de esporas permite reducir la dosis de aplicación y mejorar la competitividad del producto en campo (Kumar *et al.*, 2023).

La viabilidad se refiere a la capacidad de las esporas para germinar y colonizar el sustrato tras el almacenamiento. Rimkus *et al.* (2023) demostraron que las condiciones de cultivo y la formulación influyen significativamente en la estabilidad de *Trichoderma*, observándose pérdidas progresivas de viabilidad durante el almacenamiento si no se optimizan factores como humedad residual, tipo de portador y temperatura de conservación. En términos comerciales, se considera crítico que los productos mantengan concentraciones viables por encima de los umbrales

regulatorios durante al menos 6 - 12 meses (Rimkus *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2023).

En particular, la producción masiva exitosa de *Trichoderma* spp. requiere no solo maximizar la cantidad de biomasa o esporas producidas, sino garantizar que estas mantengan alta viabilidad y estabilidad, asegurando su eficacia como agente de control biológico en condiciones reales de campo.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Aislamiento, caracterización morfológica y conservación de *Trichodermas* nativos de la rizosfera del cultivo de banano.

3.1.1. Área de estudio y recolección de muestras

El muestreo se realizó en parcelas de producción de banano (*Musa* spp.) ubicadas en el sector Garabato chico, del centro poblado Mallaritos, del distrito de Marcavelica, provincia Sullana, departamento de Piura, georreferenciadas mediante GPS portátil para asegurar la reproducibilidad del estudio. Los puntos de muestreo fueron seleccionados considerando la representatividad del sistema agrícola, la homogeneidad del suelo y la ausencia de disturbios recientes (labores mecánicas, aplicaciones de agroquímicos, riego inmediato o microorganismos).

Tabla 1

*Coordenadas de puntos de muestreo para el aislamiento de *Trichoderma* spp*

Muestra	Latitud (°S)	Longitud (°W)	UTM Este (m)	UTM Norte (m)	Elevación (m asl)
1	-4.871815	-80.7147961	531622.29	9461498.37	46.48
2	-4.87093	-80.7158006	531510.96	9461596.24	45.28
3	-4.8715082	-80.7196145	531088.06	9461532.5	45.08
4	-4.8720606	-80.7223928	530779.98	9461471.57	46.38
5	-4.8717122	-80.7247288	530520.99	9461510.19	46.38
6	-4.8716929	-80.7256609	530417.64	9461512.36	46.38
7	-4.8700448	-80.7263535	530340.92	9461694.57	46.58
8	-4.8695598	-80.7265502	530319.13	9461748.19	45.86
9	-4.8698077	-80.72686	530284.77	9461720.81	50.53
10	-4.8707679	-80.7262587	530351.4	9461614.64	46.36

Durante toda la actividad de campo se implementaron estrictas medidas de bioseguridad con el fin de evitar la contaminación del material biológico y

garantizar la seguridad del personal y de la muestra. Cada integrante utilizó guantes de látex, mascarilla KN95, protector facial y mandil impermeable, los cuales fueron reemplazados o desinfectados cuando fue necesario. Además, todos los instrumentos de campo se mantuvieron en una bandeja estéril dentro de un contenedor cerrado para minimizar la exposición a contaminantes ambientales.

Para la extracción del suelo rizosférico se empleó una pala metálica previamente lavada con agua y detergente, enjuagada con agua destilada y desinfectada con alcohol al 70 %. Este procedimiento de desinfección se repitió rigurosamente entre cada planta muestreada con el fin de evitar la transferencia de microorganismos entre puntos. Se seleccionaron plantas de banano aparentemente sanas, sin síntomas visibles de estrés biótico o abiótico, y con un sistema radicular accesible.



Figura 1

Recolección de muestras. a) Indumentaria de bioseguridad utilizada (mandil desechable, cubre calzado desechable, guantes y mascarilla) y b) Cooler con gelpack para el traslado de la muestra.

La recolección se efectuó removiendo cuidadosamente la capa superficial del suelo hasta exponer las raíces absorbentes. El suelo rizosférico definido como el suelo firmemente adherido a las raíces finas se recolectó manualmente utilizando espátulas estériles, obteniéndose aproximadamente

200 a 300 g por planta. El muestreo se realizó a una profundidad de entre 10 y 20 cm, donde se concentra la mayor actividad microbiana asociada a la rizosfera.

Las muestras fueron inmediatamente depositadas en bolsas estériles tipo Ziplock, las cuales fueron selladas y rotuladas con el código del punto de muestreo, fecha, hora y datos de la planta. A fin de preservar la estabilidad fisicoquímica y microbiológica del suelo, las bolsas fueron almacenadas en conservadoras térmicas a 4 a 8 °C y trasladadas al laboratorio de microbiología de AGROBIOTEC SAC, en un tiempo no mayor a 3 horas desde su recolección. Finalmente, las muestras fueron procesadas dentro de un periodo máximo de 24 horas para garantizar la conservación de la microbiota nativa y evitar alteraciones en la composición comunitaria debido a cambios de temperatura, humedad o disponibilidad de oxígeno.



Figura 2

Recolección de muestras. a) Desinfección de herramientas con alcohol al 70 % y b) Rizosfera de banano en bolsa ziplock.

3.1.2. Aislamiento de hongos rizosféricos

En el laboratorio, las muestras de suelo rizosférico fueron procesadas bajo condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar de la marca BIOBASE modelo BBS-H1500, para minimizar la contaminación externa. Se pesaron exactamente 10 g de suelo rizosférico utilizando una balanza analítica previamente calibrada, y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer estéril que contenía 90 mL de agua destilada estéril. Esta suspensión inicial se agitó vigorosamente durante 15 minutos en una agitadora orbital a 150 rpm con el propósito de desprender los microorganismos adheridos a las partículas de suelo y homogenizar la mezcla.

A partir de esta suspensión madre (10^{-1}), se prepararon diluciones decimales seriadas hasta 10^{-4} , transfiriendo 1 mL de la dilución anterior a 9 mL de agua estéril en tubos Falcon de 15 mL. Cada tubo fue agitado manualmente mediante movimientos rotatorios para asegurar la dispersión uniforme de las esporas y fragmentos miceliales presentes en la suspensión.

De cada una de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se sembraron 100 μ l en placas de Petri estériles que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). El PDA fue suplementado con cloranfenicol a una concentración final de 100 mg/L, con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano y favorecer la recuperación de hongos filamentosos presentes en el suelo. La siembra se realizó mediante la técnica de extensión en superficie (spread plate), utilizando un esparcidor de acero inoxidable, la cual se esterilizó antes de cada uso mediante inmersión en etanol al 70 % y flameado directo.

Las placas inoculadas se almacenaron en posición invertida y se incubaron en una estufa microbiológica a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 5 a 7 días. Durante la incubación se monitoreó diariamente el crecimiento fúngico para observar la emergencia de colonias de distintos morfotipos.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se seleccionaron las colonias que presentaban características macroscópicas compatibles con el género *Trichoderma*, tales como:

a) Crecimiento rápido y expansivo

- b) Micelio inicialmente blanco, tornándose verde o verde-oliva
- c) Textura compacta o algodonosa
- d) Pigmentación verde esporulante en el centro de la colonia
- e) Bordes definidos y aspecto granuloso debido a la producción de conidios.

Cada colonia presumiblemente perteneciente a *Trichoderma* fue purificada mediante repiques sucesivos en placas con PDA fresco. Para ello, se tomó un fragmento de micelio activo (5 mm) utilizando una aguja estéril, transfiriéndolo a una nueva placa bajo condiciones asépticas. Este proceso se repitió hasta garantizar la obtención de cultivos monospóricos y libres de otros hongos o bacterias. Las colonias puras obtenidas fueron codificadas, fotografiadas y conservadas para su posterior caracterización morfológica y análisis molecular.



Figura 3

Aislamiento de hongos rizosféricos a) disección y pesado de la muestra rizosferica b) homogenización de la muestra c) siembra en medio PDA y d) esparcimiento de la muestra en placa Petri.

3.1.3. Caracterización morfológica

Los aislamientos fúngicos previamente purificados se cultivaron en placas con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados a 25 a 28 °C durante 5 a 7 días para favorecer el desarrollo de estructuras reproductivas. Una vez alcanzado un crecimiento óptimo, los cultivos se emplearon para la caracterización morfológica macro y micromorfológica, siguiendo protocolos estandarizados de identificación de *Trichoderma*.

A nivel macroscópico, se registraron características como velocidad de crecimiento radial, coloración del micelio, tonalidad de los conidios, textura superficial, compactación del micelio, formación de anillos conidiales y producción de pigmentos difusibles. Estas características se describieron basándose en los criterios originales establecidos en la taxonomía del género por Rifai (1969) y reformulados posteriormente en la revisión sistemática de Bissett (1991).

Para la observación micromorfológica, se prepararon montajes semipermanentes utilizando azul de lactofenol sobre portaobjetos estériles. Los fragmentos de micelio y conidióforos se obtuvieron con una aguja de disección estéril desde zonas activas del margen de la colonia. Las preparaciones se examinaron bajo un microscopio óptico a 40× y 100× (con aceite de inmersión cuando fue necesario), evaluándose las siguientes estructuras:

- a)** Conidióforos: ramificación típica en verticilos, presencia de ramas primarias y secundarias, grosor y ornamentación de la hifa portadora.
- b)** Fiálides: forma (infladas basalmente o alargadas), ángulo de inserción, disposición (solitarias, en verticilos o en racimos), longitud y apertura del cuello.
- c)** Conidios: forma (globosos, elipsoidales), tamaño, lisura u ornamentación superficial, coloración verde característica y disposición en cadenas cortas o cúmulos.

Las observaciones morfológicas se compararon con las claves taxonómicas establecidas por:

- a) Rifai, M. A. (1969). *A revision of the genus Trichoderma*. Mycological Papers, 116, 1–56.
- b) Bissett, J. (1991a). *A revision of the genus Trichoderma. I. Section Trichoderma and section Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany, 69(11), 2357–2372.
- c) Bissett, J. (1991b). *A revision of the genus Trichoderma. II. Section Pachybasium*. Canadian Journal of Botany, 69(11), 2373–2417.
- d) Bissett, J. (1991c). *A revision of the genus Trichoderma. III. Additional notes on section Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany, 69(11), 2418–2420.

La información obtenida se documentó mediante fotografía digital, empleando una cámara de celular acoplada al microscopio, lo que permitió generar un registro visual detallado del patrón morfológico de cada aislamiento. Estas imágenes fueron utilizadas para corroborar la identidad preliminar de los aislamientos y apoyar la posterior validación molecular.



Figura 4

Caracterización morfológica. Visualización microscópica de los diferentes aislados de *Trichodermas* spp, provenientes de la rizosfera del cultivo de banano

3.1.4. Conservación de los aislamientos

La conservación de los aislamientos puros de *Trichoderma* spp. se realizó siguiendo protocolos estándar de mantenimiento de colecciones microbiológicas, con el propósito de preservar la viabilidad, estabilidad genética y características fenotípicas de cada cepa.

Inicialmente, cada aislamiento purificado fue transferido a tubos falcon de 50 ml que contenían medio Papa Dextrosa Agar (PDA) en posición inclinada, lo que permitió generar una mayor superficie de crecimiento. Los cultivos se incubaron durante 3 a 5 días a 25 a 28 °C hasta alcanzar un desarrollo micelial uniforme. Posteriormente, los tubos fueron almacenados a 4 °C, condición adecuada para la conservación a mediano plazo sin restricciones de viabilidad.

Para la preservación a largo plazo, se prepararon suspensiones criogénicas. Fragmentos de micelio activo fueron transferidos a crioviales estériles que contenían una solución de glicerol al 20 %, utilizado como crioprotector para evitar la formación de cristales de hielo que comprometan la integridad celular. Los crioviales fueron homogenizados suavemente y almacenados a -20 °C, asegurando la estabilidad genética de las cepas durante meses o incluso años.

Cada aislamiento fue codificado mediante un sistema de identificación único que incluía información sobre el número de aislamiento, código del punto de muestreo, fecha de obtención y características preliminares (morfología y origen del cultivo). Estos datos fueron organizados en una base de datos interna del laboratorio, donde se registraron adicionalmente la fecha de repique, método de conservación empleado, fotografías de referencia y observaciones relevantes sobre el comportamiento de cada cepa.

3.2. Pruebas de antagonismo de Trichodermas contra fitopatógenos.

Para las pruebas de antagonismo se empleó una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 Tropical (Foc TR4), utilizada como patógeno de referencia en este estudio. Esta cepa proviene de la tesis titulada “Caracterización e identificación de cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas de banano con síntomas de

marchitez vascular procedentes de varias zonas productoras de la provincia de Sullana, Piura”, desarrollada por la tesista Andrea Esperanza Cardoza Viera, en un trabajo colaborativo entre la Universidad Nacional de Piura y AGROBIOTEC SAC. La cepa fue proporcionada por AGROBIOTEC SAC bajo condiciones controladas, garantizando su autenticidad y pureza microbiológica para su uso en las pruebas de enfrentamiento con los 12 aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

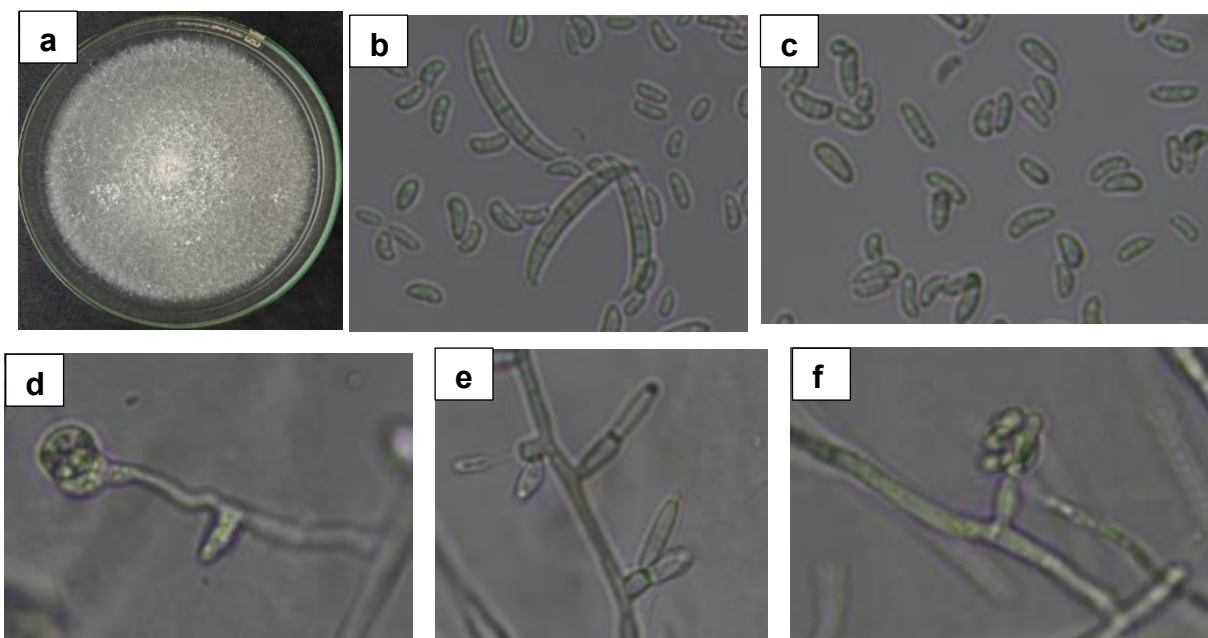


Figura 5

Cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical FoMb-8. a) Crecimiento de cultivo en medio PDA. Estructuras microscópicas. b) Macroconidios en forma falcada, c) Microconidios. d) Clamidosporas, e) Monofiálides, f) Falsas cabezas. Barras de escala B – E= 20 μ m.

3.2.1. Preparación del material biológico

Las pruebas de antagonismo se realizaron utilizando 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. previamente purificados y conservados en PDA, así como una cepa fitopatógena del género *Fusarium* (FOC4 u otra especie indicada), la cual fue reactivada en PDA durante 5 días a 25 a 28 °C para obtener micelio activo.

De cada cepa, tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma*, se obtuvieron discos de micelio de 6,5 mm de diámetro utilizando un sacabocados estéril, tomados desde el margen de crecimiento activo de la colonia.

3.2.2. Diseño experimental del cultivo dual

La interacción antagonista se evaluó mediante el método de cultivo dual en placas de Petri de 90 mm, siguiendo las recomendaciones descritas por Ezziyyani et al. (2004). En cada placa se colocó un disco de *Fusarium* a 1 cm del borde de la placa y un disco del aislamiento de *Trichoderma* a 6 cm de distancia del patógeno, ubicados en posición opuesta para favorecer la interacción frontal. Cada aislamiento de *Trichoderma* fue enfrentado individualmente contra el patógeno en placas por duplicado.

Asimismo, se incluyeron: Testigo del patógeno: *Fusarium* creciendo solo en PDA y un testigo de cada aislamiento: *Trichoderma* creciendo solo en PDA. Esto permitió comparar el crecimiento radial real frente al crecimiento en competencia. Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento a 28 ± 2 °C, en oscuridad parcial, durante un máximo de 12 días, dependiendo del ritmo de crecimiento de cada aislamiento.

3.2.3. Medición del crecimiento micelial

Las evaluaciones se realizaron a los 6 días y 12 días posteriores a la siembra. El crecimiento micelial de cada hongo se midió usando un calibrador tipo pie de rey, registrando el radio mayor (Rmax) y el radio menor (Rmin). A partir de ambos valores se obtuvo el radio promedio efectivo (R):

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

Estos valores se registraron tanto para el testigo del patógeno (R1) como para el cultivo dual (R2).

3.2.4. Cálculo del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (%I) ejercido por cada cepa de *Trichoderma* sobre *Fusarium* se calculó siguiendo la fórmula propuesta por Ezziyyani et al. (2004):

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

Donde: R1 = Radio del patógeno en el testigo y

R2 = Radio del patógeno en cultivo dual

Un mayor valor de porcentaje de inhibición indica una mayor capacidad inhibitoria del aislamiento de *Trichoderma*.

3.2.5. Evaluación del micoparasitismo

De manera paralela, se registraron observaciones macroscópicas relacionadas con la interacción entre ambos hongos, tales como:

- a) crecimiento direccional,
- b) sobrecrecimiento micelial,
- c) formación de zonas de inhibición,
- d) cambios en pigmentación,
- e) producción de esporas del antagonista en contacto con el patógeno.

El grado de micoparasitismo se evaluó según la escala cualitativa propuesta por Elías y Arcos (1984), citada en Ezziyyani et al. (2004):

Grado	Descripción del micoparasitismo
0	Ninguna invasión de la superficie del patógeno
1	Invasión de ¼ de la colonia del patógeno
2	Invasión de ½ de la colonia del patógeno
3	Invasión total de la colonia del patógeno
4	Invasión total con esporulación abundante sobre el patógeno

Las observaciones se registraron fotográficamente para su análisis posterior.

3.2.6. Registro y organización de datos

Para cada aislamiento se elaboró una matriz que incluyó:

- a) Códigos de los 12 aislados de *Trichoderma*
- b) Radios miceliales (R1, R2) en los días 6 y 12
- c) Porcentaje (%) de inhibición
- d) Grado de micoparasitismo

e) Observaciones morfológicas cualitativas

f) Fotografías de las interacciones

Estos datos fueron utilizados posteriormente para el análisis comparativo entre aislamientos.



Figura 6

Pruebas de antagonismo de trichodermas contra fitopatógenos. a) Toma de disco de *Trichoderma* b) enfrentamiento dual c) Posicionamiento de discos en extremos de la placa Petri.

3.3. Identificación molecular de *Trichodermas* con capacidad antagonista.

La extracción de ADN se realizó a partir de la cepa de *Trichoderma* spp. que presentó el mayor porcentaje de inhibición y el mayor grado de micoparasitismo frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 Tropical (Foc TR4), empleando el protocolo CTAB descrito por Kadu (2019), con ligeras modificaciones, según los pasos que se describen a continuación:

3.3.1. Extracción de ADN de la cepa de *Trichoderma sp*

- a)** Se tomó un fragmento aproximado de 1 cm² de micelio activo procedente de un cultivo de *Trichoderma* de 7 días de crecimiento en PDA, evitando arrastrar partículas de agar, y se colocó en un microtubo estéril de 1,5 mL.
- b)** El micelio se lavó con 1 mL de agua destilada estéril, luego se centrifugó a 12 000 rpm durante 2 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante, conservando el pellet.
- c)** Paralelamente, se precalentó el PRE-BUFFER y la solución de CTAB al 10 % en un baño María a 60 °C.
- d)** El micelio se maceró dentro del microtubo con ayuda de una punta estéril o pistilo desechable y se añadió el buffer CTAB 2X (395 µL de Pre-buffer, 100 µL de CTAB al 10 % y 5 µL de β-mercaptoetanol), mezclando suavemente hasta homogeneizar.
- e)** Se incorporaron 2,5 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) y se agitó brevemente en vortex.
- f)** La mezcla se incubó a 55 °C por 1 hora, realizando agitaciones suaves cada 15 - 20 minutos para favorecer la lisis celular y la digestión de proteínas.
- g)** Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 700 µL de una mezcla Fenol: Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión.
- h)** Se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 minutos; posteriormente, se transfirió cuidadosamente la fase acuosa superior a un nuevo microtubo estéril, evitando arrastrar la interfase.
- i)** A la fase acuosa recuperada se añadió un volumen igual de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1), se agitó por inversión y se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm durante 15 minutos.
- j)** Se recuperaron aproximadamente entre 250 y 300 µL del sobrenadante (fase acuosa) y se transfirieron a otro microtubo limpio.
- k)** Para la precipitación del ADN, se añadió 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 500 µL de isopropanol frío, mezclando por inversión suave.
- l)** La mezcla se incubó a - 20 °C/1 hora para ayudar la precipitación del ADN.
- m)** Tras la incubación, se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante sin perturbar el pellet de ADN.

- n) El pellet se lavó añadiendo 400 μL de etanol al 75 %, seguido de una nueva centrifugación a 13 000 rpm durante 10 minutos.
- o) Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet al aire dentro de la campana de bioseguridad cerca de 15 m, hasta la completar evaporación del solvente.
- p) El ADN precipitado se resuspendió en 50 μL de buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), mezclando suavemente para fácil disolución.
- q) Se añadió 1 μL de RNasa (10 mg/mL) para eliminar ARN residual, incubando la mezcla a 37 °C durante 1 hora.
- r) Finalmente, el ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su uso en las reacciones de PCR.

3.3.2. Amplificación de la región ITS por PCR

La identificación taxonómica de la cepa de *Trichoderma* con mayor antagonismo se realizó mediante amplificación de la región ITS del ADN ribosomal por PCR. Para ello se utilizaron los cebadores universales:

Tabla 2

Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS

Cebador	Secuencia (5'-3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tabla 3

Mezcla de reacción para PCR (Volumen final: 25 μL)

Componente	Volumen	Concentración final
Master Mix 2X	12,5 μL	Taq, dNTPs, MgCl_2 y buffer
Cebador ITS1 (10 μM)	1 μL	—
Cebador ITS4 (10 μM)	1 μL	—
ADN genómico	2 μL	20 a 50 ng
Agua libre de nucleasas	Completar a 25 μL	—

Tabla 4*Condiciones de amplificación por PCR para la región ITS*

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 a 95 °C	3–5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 s	
Alineamiento (annealing)	55 °C	30 s	35 ciclos
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

Nota: Los productos de PCR se almacenaron a 4 °C hasta su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los amplicones de la región ITS se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia, calidad y tamaño del fragmento amplificado.

a) Se preparó un gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X, disolviendo la agarosa mediante calentamiento en horno microondas hasta la completa solubilización.

b) Cuando la solución alcanzó una temperatura adecuada, se añadió un agente intercalante (por ejemplo, bromuro de etidio o un colorante alternativo seguro) y se vertió la mezcla en la bandeja de gel con la peineta en posición para formar los pocillos.

c) Una vez solidificado el gel, se colocó en la cuba de electroforesis y se cubrió con buffer TAE 1X.

d) Cada muestra de PCR se preparó mezclando 8 µL del amplicón con 2 µL de buffer de carga, y posteriormente se depositó en los pocillos.

e) Se incluyó un marcador de peso molecular (DNA ladder) para estimar el tamaño del fragmento amplificado.

f) La corrida electroforética se realizó a un voltaje de 80–100 V hasta que el frente de migración alcanzó aproximadamente 2/3 de la longitud del gel.

g) Finalizada la corrida, el gel se colocó sobre un transiluminador UV y se documentó la imagen mediante un sistema de foto documentación, verificando la presencia de una banda única y definida en la región esperada (~550–700 pb).

3.3.4. Secuenciamiento y análisis bioinformático

Los amplicones correspondientes a la cepa de *Trichoderma* con mayor antagonismo se enviaron a secuenciamiento mediante la técnica de Sanger en un servicio especializado externo. Antes del envío, las muestras se purificaron y, cuando fue necesario, se diluyeron en agua ultrapura siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta BLASTn del NCBI, comparándolas con la base de datos de nucleótidos para determinar la identidad taxonómica de la cepa. Se consideraron coincidencias significativas aquellas con:

- a)** Porcentaje de identidad ≥ 99 %,
- b)** Cobertura de consulta alta (cercana al 100 %), y,
- c)** Valor E (E-value) aproximado a 0.

Con base en estos parámetros se confirmó la identidad de la cepa de *Trichoderma* seleccionada como la de mayor potencial antagonista frente a Foc TR4.

3.4. Ensayos de masificación de *Trichoderma sp* en sustratos orgánicos

Con el fin de evaluar la capacidad de crecimiento, colonización y producción de esporas de *Trichoderma sp.* bajo diferentes condiciones nutricionales, se llevaron a cabo ensayos de masificación utilizando diversos sustratos orgánicos y combinaciones de estos. La selección de los sustratos se basó en su disponibilidad local, bajo costo, composición rica en carbohidratos y potencial para favorecer la esporulación del hongo. Estos ensayos permitieron identificar los materiales más eficientes para la multiplicación semindustrial del microorganismo, información clave para futuras aplicaciones en bioinsumos agrícolas.

3.4.1. Diseño experimental

Los ensayos de masificación se realizaron bajo lineamientos de un diseño completamente al azar, con 21 tratamientos y 2 repeticiones que conciernen a los diferentes sustratos orgánicos y sus combinaciones. Se uso una cepa de *Trichoderma* sp. previamente seleccionada por su mayor capacidad antagonista. Cada unida experimental estuvo representada por una cantidad fija de sustrato estéril inoculado con *Trichoderma* sp. Los tratamientos evaluados se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 5

Descripción de los sustratos utilizados según tratamiento

Código	Tratamiento	Descripción del sustrato
T ₁	Arroz partido	Grano de arroz triturado
T ₂	Arroz en polvo	Arroz completamente molido
T ₃	Trigo entero	Grano de trigo sin moler
T ₄	Trigo en polvo	Trigo molido
T ₅	Bagazo de caña	Fibra residual de caña
T ₆	Arroz partido + Arroz en polvo	Mezcla
T ₇	Arroz partido + Trigo entero	Mezcla
T ₈	Arroz partido + Trigo en polvo	Mezcla
T ₉	Arroz partido + Bagazo de caña	Mezcla
T ₁₀	Arroz en polvo + Trigo en polvo	Mezcla
T ₁₁	Arroz en polvo + Bagazo de caña	Mezcla
T ₁₂	Trigo entero + Trigo en polvo	Mezcla
T ₁₃	Trigo en polvo + Bagazo de caña	Mezcla
T ₁₄	Trigo entero + Bagazo de caña	Mezcla
T ₁₅	Biochar + Trigo molido	Mezcla
T ₁₆	Biochar + Trigo entero	Mezcla
T ₁₇	Biochar + Arroz en polvo	Mezcla
T ₁₈	Biochar + Arroz partido	Mezcla
T ₁₉	Biochar	Carbón vegetal activo
T ₂₀	Biochar + Bagazo de caña	Mezcla
T ₂₁	Arroz en polvo + Trigo en polvo	Mezcla

3.4.2. Preparación y acondicionamiento de los sustratos

Para cada tratamiento se pesaron 100 g de sustrato (o mezcla de sustratos, en proporción 1:1 p/p en los tratamientos combinados) en frascos Erlenmeyer de 500 mL o bolsas autoclavables resistentes al calor. Se ajustó la humedad de cada sustrato al 60 % a 65 % mediante la adición de agua destilada estéril, mezclando manualmente o con espátula para distribuir homogéneamente la humedad en toda la masa. Posteriormente, los sustratos se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg² por 20 minutos a 30 minutos. Una vez completado el ciclo de esterilización, los frascos o bolsas se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25 °C a 28 °C) durante 24 horas antes de la inoculación.

3.4.3. Inoculación con *Trichoderma* sp.

La cepa de *Trichoderma* sp. seleccionada fue reactivada en PDA durante 5 a 7 días para obtener un micelio activo y abundante esporulación. A partir de estas placas se preparó una suspensión de conidias, añadiendo agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 80, y raspando suavemente la superficie con una espátula o asa estéril. La concentración de conidias se ajustó aproximadamente a 1×10^8 esporas/mL mediante conteo en cámara de Neubauer y dilución con agua estéril cuando fue necesario. Para la inoculación, se añadieron 5 mL de la suspensión conidial a cada unidad experimental (frascos o bolsas con 100 g de sustrato), distribuyendo la suspensión de forma uniforme sobre el sustrato. Luego, se mezcló cuidadosamente mediante agitación manual o con movimientos de amasado, asegurando una adecuada colonización inicial del material.

3.4.4. Incubación de los sustratos inoculados

Los sustratos inoculados se incubaron en una sala o cámara de crecimiento de 25 °C a 28 °C, en oscuridad parcial, durante un periodo de 7 a 10 días. Durante la incubación, se realizaron inspecciones visuales cada 48 horas para observar: **i)** La velocidad de colonización del sustrato, **ii)** La intensidad del micelio verde característico de *Trichoderma*, y **iii)** Posibles signos de

contaminación por otros hongos o bacterias. Solo se consideraron para el conteo aquellos tratamientos que no presentaron contaminación visible.
no usar viñetas.

3.4.5. Obtención de suspensiones para el recuento de esporas

Al término del periodo de incubación, se procedió a la cuantificación de esporas de *Trichoderma* producidas en cada tratamiento.

- a) De cada unidad experimental se tomó una muestra representativa de sustrato colonizado (por ejemplo, 1 g), la cual se colocó en un matraz Erlenmeyer o tubo estéril de 250 mL.
- b) Se añadieron 100 mL de agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 80 como agente tensioactivo para facilitar el desprendimiento de conidias.
- c) La mezcla se agitó en agitador orbital o se sometió a agitación manual vigorosa durante 10 a 15 minutos para desprender las esporas del sustrato.
- d) Cuando fue necesario, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión inicial para obtener recuentos adecuados en el microscopio, de acuerdo con el factor de dilución ($F_{dil} = 80$) registrado en la tabla de resultados.

3.4.6. Recuento de esporas en cámara de Neubauer

El recuento de esporas se efectuó utilizando una cámara de Neubauer bajo microscopio óptico.

- a) Se colocó una gota de la suspensión adecuadamente homogeneizada sobre la cámara de Neubauer y se cubrió con un cubreobjetos.
- b) Para cada tratamiento y repetición se realizaron recuentos en 25 cuadrículas de la cámara (N° Cuadr. = 25), registrándose los valores en las celdas M1, M2, M3, M4 y M5 para cada repetición, tal como se presenta en la tabla de datos.
- c) A partir de estos valores se calculó el promedio de esporas observadas (\bar{X}) para cada tratamiento.
- d) Se utilizó el factor de volumen de la cámara ($F_{vol} = 1,00 \times 10^4$) y el factor de dilución ($F_{dil} = 80$) para estimar la concentración de esporas por mililitro (N° esporas/mL) y posteriormente el número de esporas por gramo de sustrato (N° esporas/g), de acuerdo con la fórmula general:

$$N^{\circ} \text{ esporas/mL} = \bar{X} \times F_{\text{vol}} \times F_{\text{dil}}$$

$$N^{\circ} \text{ esporas/g} = N^{\circ} \text{ esporas/mL}$$

factor de conversión según la relación g/mL usada

Los valores obtenidos para N° esporas/mL y N° esporas/g para cada tratamiento se registraron en la tabla correspondiente, así como el orden de los tratamientos según su capacidad de producción de esporas.

3.4.7. Organización de datos y selección de tratamientos

Los datos de recuento (M1–M5 por repetición), promedio (\bar{X}), número de esporas/mL, número de esporas/g y orden relativo de cada tratamiento fueron organizados en una hoja de cálculo. Con base en el número de esporas/g de sustrato, se estableció un ranking de tratamientos, identificando aquellos sustratos o mezclas que permitieron una mayor masificación de *Trichoderma* sp., y que permitió identificar a los tratamientos que más destacaron, según el orden de producción de esporas registrado en la columna “ORDEN”.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos de aislamiento, antagonismo, identificación molecular y de masificación en sustratos orgánicos, se presentan a continuación:

4.1. Aislamiento de *Trichoderma spp* nativos de la rizosfera del cultivo de banano.

A partir del proceso de aislamiento, purificación y caracterización morfológica descrito, se obtuvo un conjunto de aislamientos fúngicos provenientes del suelo rizosférico de banano. De acuerdo con los criterios macroscópicos establecidos para el género *Trichoderma*, se identificaron 12 cepas que presentaron características compatibles con este género, incluyendo crecimiento acelerado, micelio inicialmente blanco y posteriormente verde esporulante, producción abundante de conidios, conidióforos ramificados en verticilos y fiálides típicas.

a) *Trichoderma* sp. (LIG1)

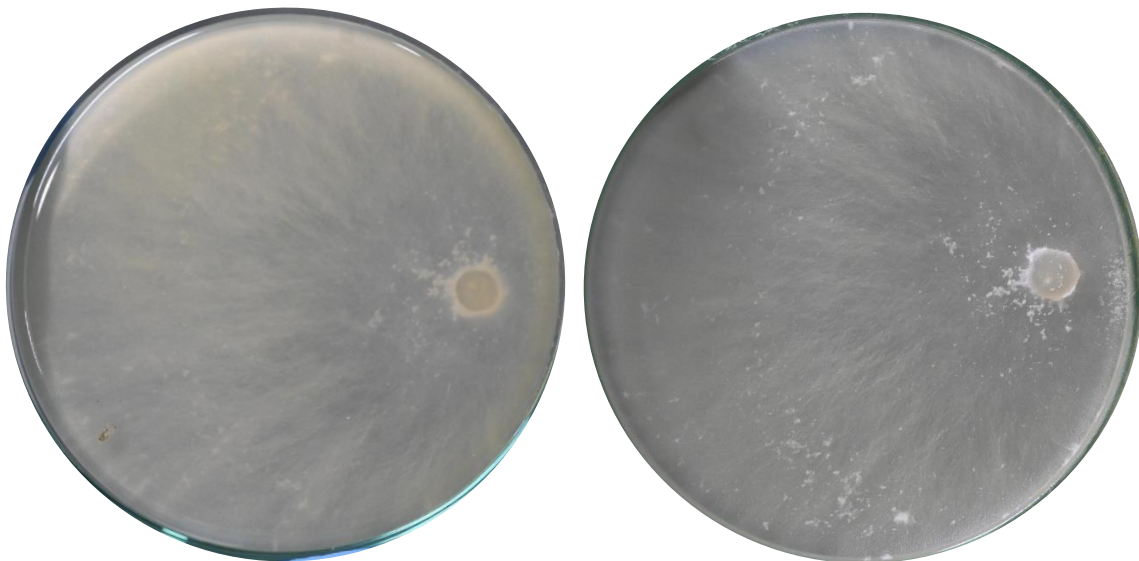


Figura 7

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. (LIG1) en una de las placas testigo.

Estos aislamientos fueron seleccionados para su conservación y posterior evaluación en las fases de antagonismo, micoparasitismo y análisis molecular, constituyendo el conjunto de cepas nativas representativas de la rizosfera de banano en la zona de estudio.

b) *Trichoderma* sp. (LIG2)

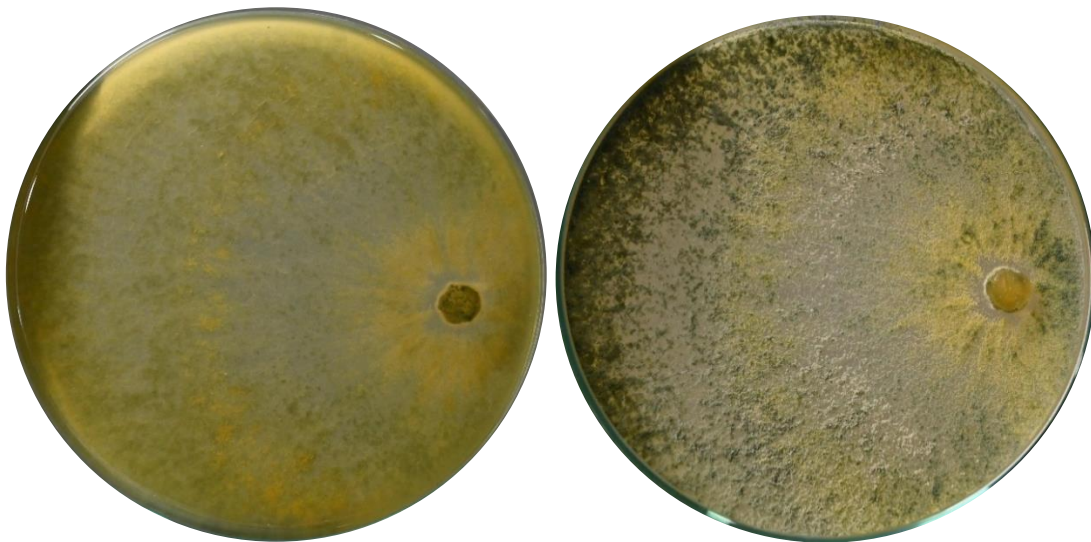


Figura 8

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG2 en una de las placas testigo.

c) *Trichoderma* sp. (LIG3)

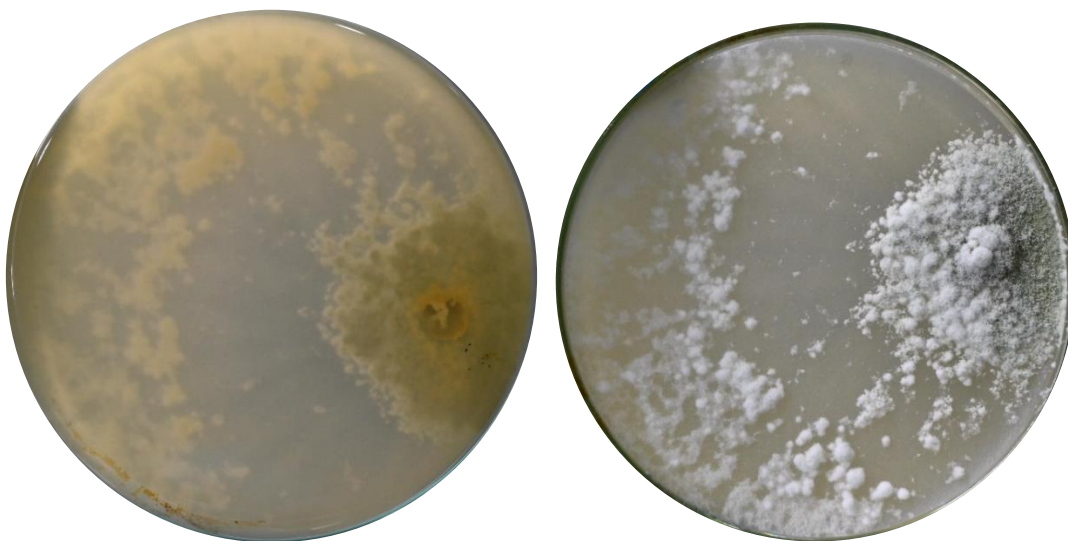


Figura 9

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG3 en una de las placas testigo.

d) *Trichoderma* sp. (LIG4)

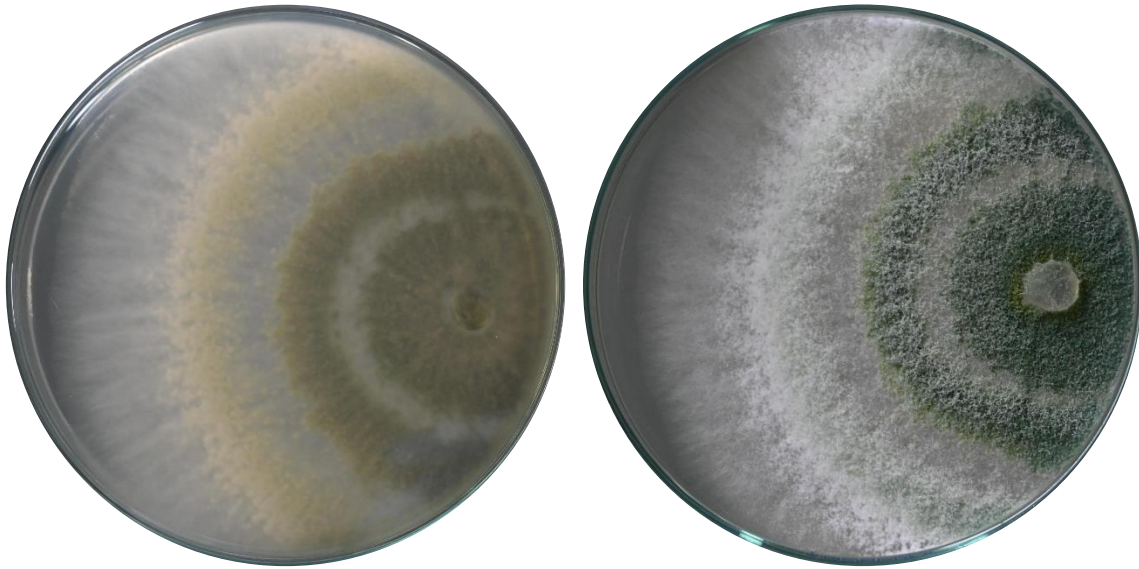


Figura 10

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG4 en una de las placas testigo.

e) *Trichoderma* sp. (LIG5)

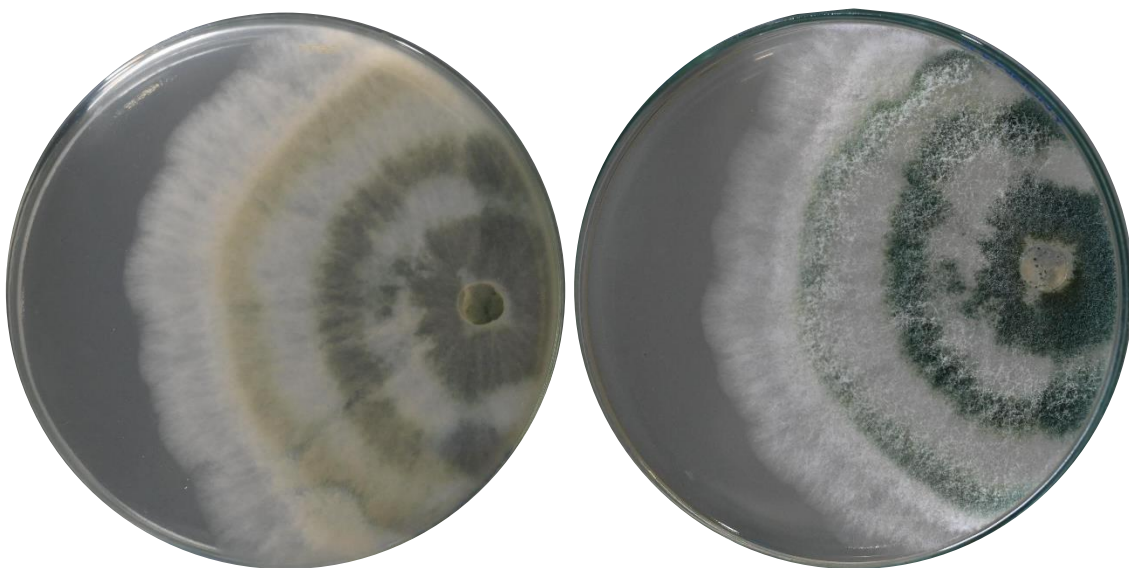


Figura 11

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG5 en una de las placas testigo

f) *Trichoderma* sp. (LIG6)

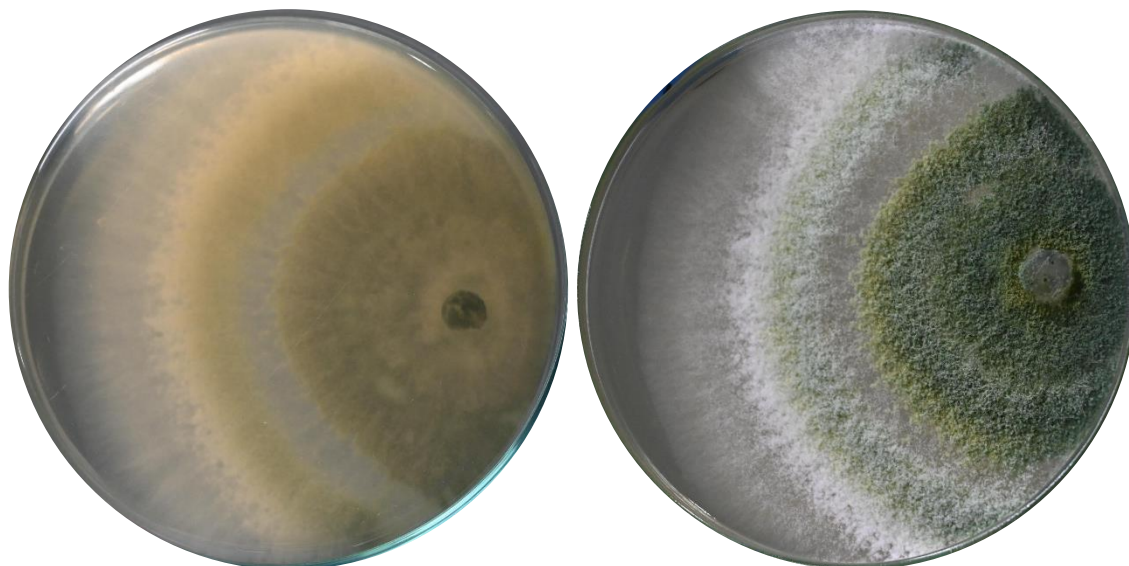


Figura 12

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG6 en una de las placas testigo.

g) *Trichoderma* sp. (LIG7)

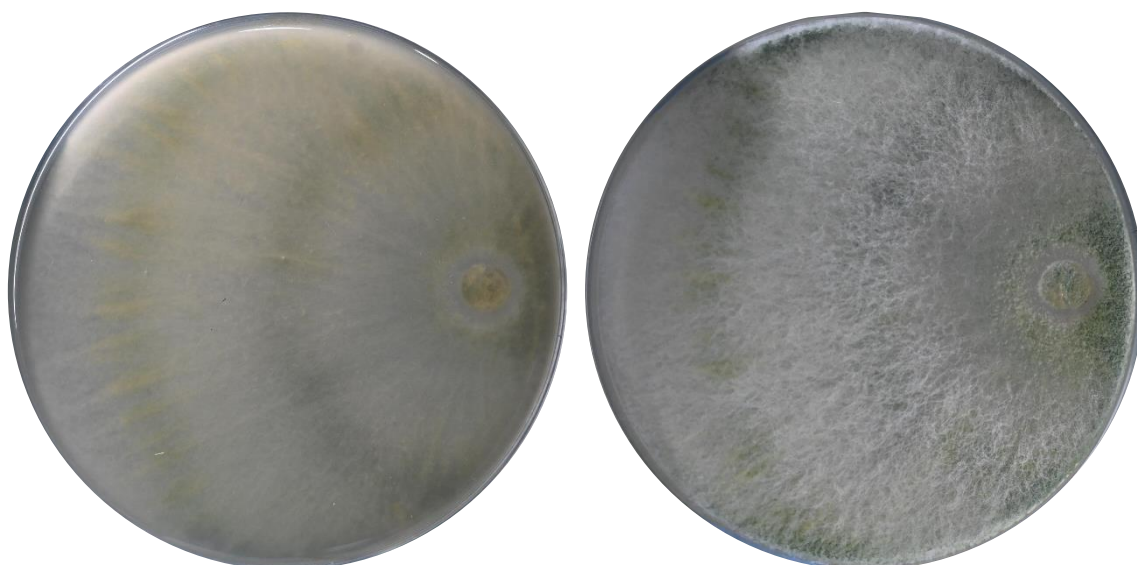


Figura 13

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG7 en una de las placas testigo.

h) *Trichoderma* sp. (LIG8)

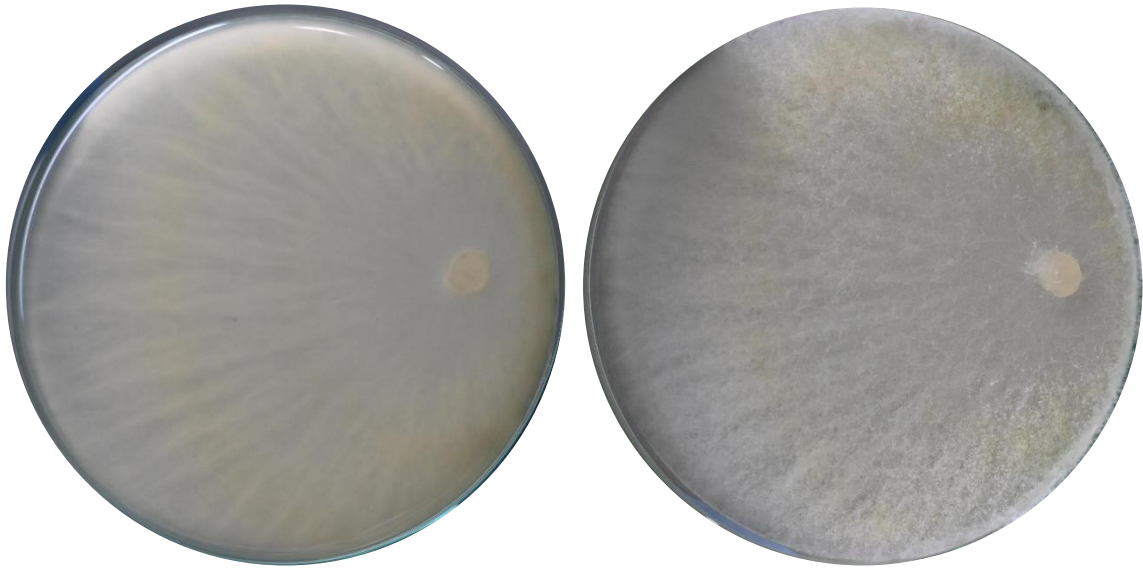


Figura 14

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG8 en una de las placas testigo

i) *Trichoderma* sp. (LIG9)

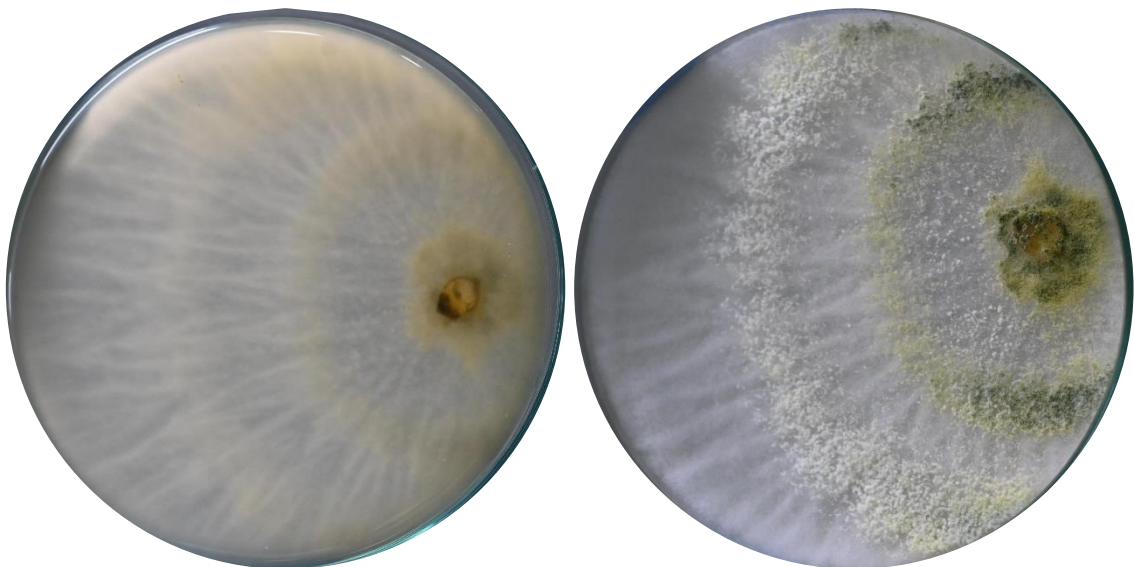


Figura 15

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG9 en una de las placas testigo.

j) *Trichoderma* sp. (LIG10)

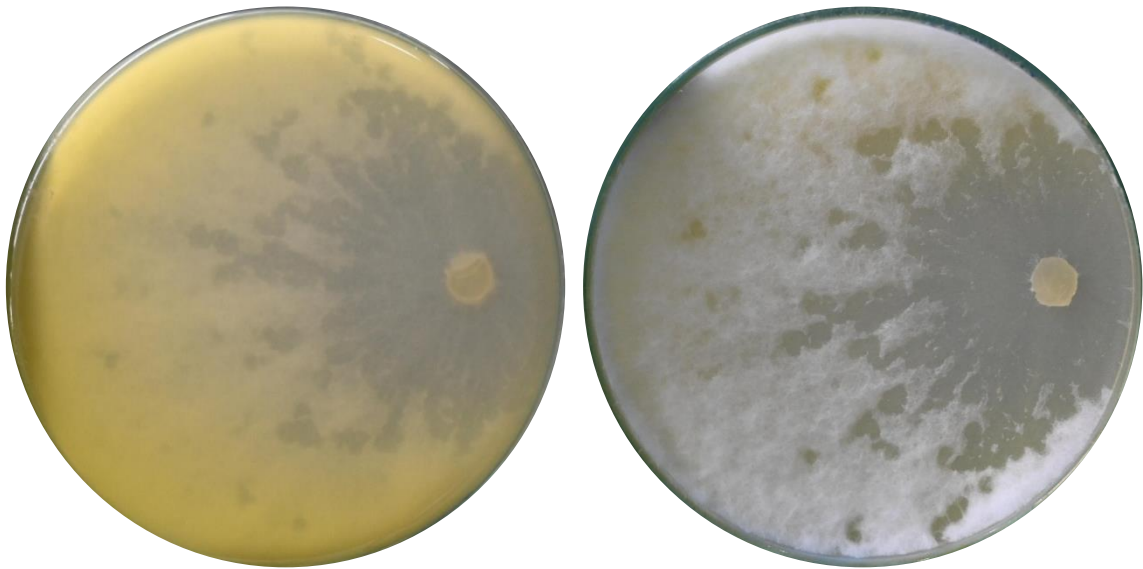


Figura 16

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG10 en una de las placas testigo.

k) *Trichoderma* sp. (LIG11)

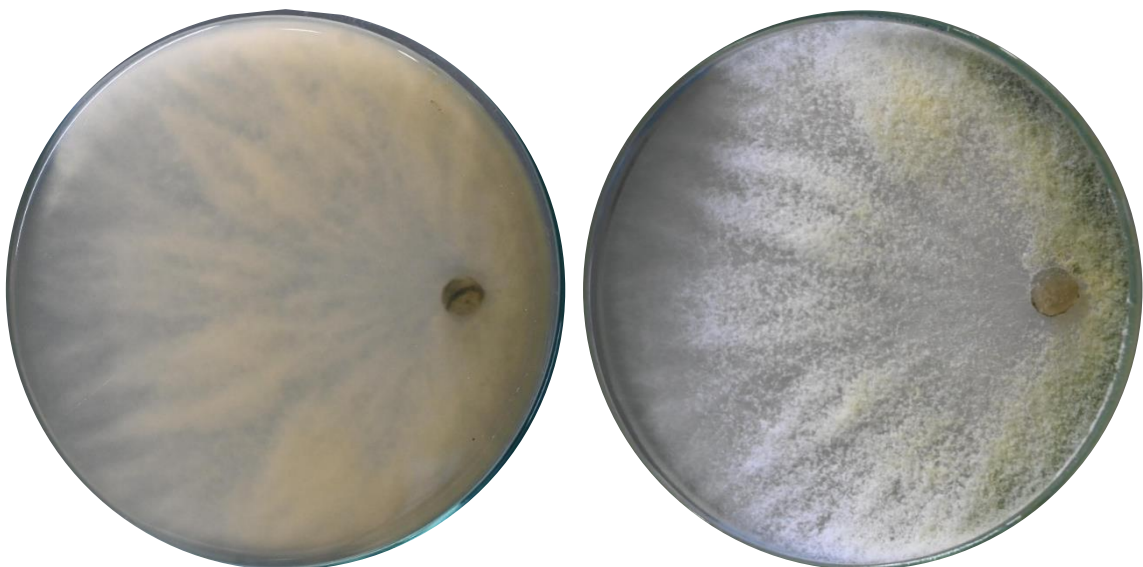


Figura 17

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG11 en una de las placas testigo.

I) *Trichoderma* sp. (LIG12)

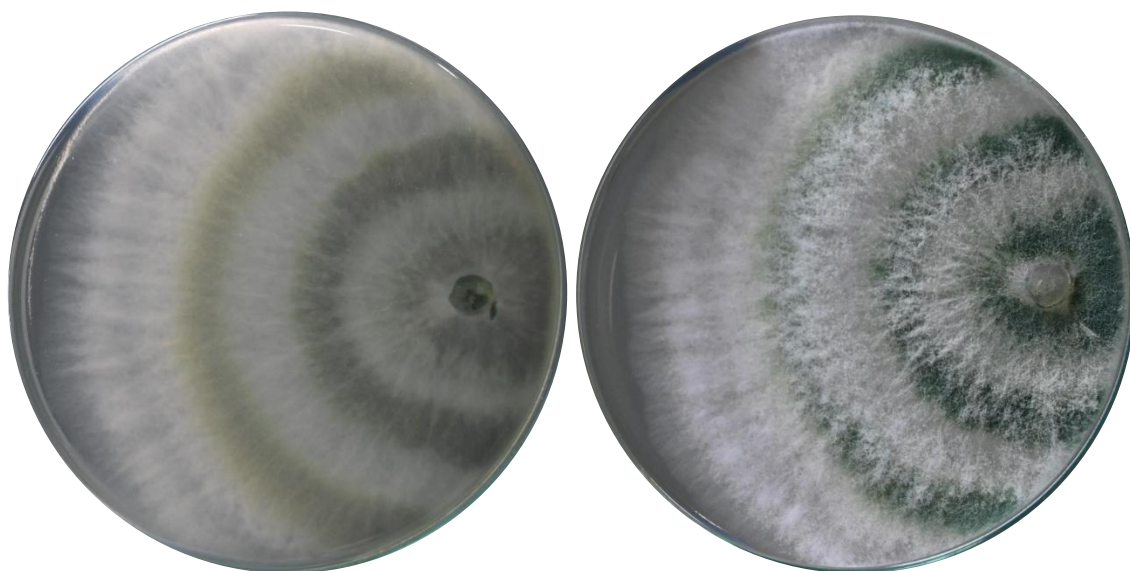


Figura 5

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG12 en una de las placas testigo.

4.2. Pruebas de antagonismo de Trichodermas contra fitopatógenos.

La evaluación in vitro del antagonismo entre cepas de *Trichoderma spp.* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 (FOC4) evidenció diferencias en el grado de inhibición del crecimiento radial del patógeno y en el grado de micoparasitismo expresado (Tabla 8). A los cuatro días de incubación, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* sp. ejercieron un antagonismo leve a moderado sobre el crecimiento radial de FOC4, con porcentajes de inhibición entre 52,06 % – 72,43 %. Las cepas LIG1, LIG2 y LIG3 destacaron como las más efectivas en esta etapa temprana, alcanzando inhibiciones de 72.43 %,72,43 %,71,18 %, respectivamente.

En contraste, las cepas LIG5, LIG6, LIG9 y LIG11 mostraron una inhibición muy baja (o nula, en el caso de LIG6) durante los primeros días, lo cual sugiere un establecimiento inicial lento frente al patógeno. Solo dos aislados (LIG8 y LIG10) presentaron micoparasitismo observable, ambos de Grado 2, caracterizado por invasión micelial de aproximadamente la mitad de la superficie del hongo patógeno. (Tabla 9)

Tabla 6

Porcentaje de inhibición radial del crecimiento de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (FOC4) y grado de micoparasitismo de cepas de Trichoderma sp. a los cuatro días de evaluación in vitro.

Patógeno	Antagonista	Promedio R1	Promedio R2	Prom. % Inhibición	Micoparasitismo
FOC4	LIG1	1.49	1.015833333	31.8232662	
FOC4	LIG2	1.49	1.045	29.8657718	
FOC4	LIG3	1.49	1.058333333	28.9709172	
FOC4	LIG4	1.49	1.356666667	8.94854586	
FOC4	LIG5	1.49	1.424166667	4.41834452	
FOC4	LIG6	1.49	1.49	0	
FOC4	LIG7	1.49	1.356666667	8.94854586	
FOC4	LIG8	1.49	1.34	10.0671141	Grado 2
FOC4	LIG9	1.49	1.470833333	1.28635347	
FOC4	LIG10	1.49	1.164166667	21.8680089	Grado 2
FOC4	LIG11	1.49	1.435	3.69127517	
FOC4	LIG12	1.49	1.333333333	10.5145414	

Tabla 7

Porcentaje de inhibición radial del crecimiento de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (FOC4) y grado de micoparasitismo de cepas de Trichoderma sp. a los once días de evaluación in vitro.

Cód.	Antagonista	Promedio R1	Promedio R2	Prom. % Inhibición	Prom. % mico parasitismo
FOC4	LIG1	3.73	1.028333333	72.4307417	Grado 3
FOC4	LIG2	3.73	1.028333333	72.4307417	Grado 4
FOC4	LIG3	3.73	1.075	71.1796247	Grado 4
FOC4	LIG4	3.73	1.498333333	59.8302055	Grado 4
FOC4	LIG5	3.73	1.61	56.8364611	Grado 4
FOC4	LIG6	3.73	1.629166667	56.3226095	Grado 4
FOC4	LIG7	3.73	1.360833333	63.5165326	Grado 4
FOC4	LIG8	3.73	1.413333333	62.1090259	Grado 4
FOC4	LIG9	3.73	1.506666667	59.6067918	Grado 4
FOC4	LIG10	3.73	1.161666667	68.8561215	Grado 4
FOC4	LIG11	3.73	1.788333333	52.0554066	Grado 1
FOC4	LIG12	3.73	1.338333333	64.1197498	Grado 4

A los once días de incubación, el antagonismo ejercido por las cepas de *Trichoderma* sp. se incrementó notablemente respecto a la evaluación inicial. Las cepas LIG1, LIG2 y LIG3 provocaron los mayores porcentajes de inhibición, con valores superiores al 71 %, superando claramente al resto de los aislados. En este periodo, la mayor parte de las cepas mostraron micoparasitismo de Grado 4, caracterizado por invasión completa, sobrecrecimiento y esporulación sobre la colonia del patógeno, indicando una respuesta biocontroladora desarrollada. La cepa LIG10 también presentó un alto nivel de inhibición (68.86 %) acompañado de micoparasitismo de Grado 4, posicionándose entre las cepas más agresivas contra FOC4. En contraste, LIG11 evidenció el menor desempeño, con solo 52.06 % de inhibición y micoparasitismo limitado (Grado 1).

Se determinó que la cepa LIG2 constituía la mejor candidata para estudios posteriores (pruebas moleculares y ensayos de masificación); pues, además de su elevado porcentaje de inhibición (72.43 %) y micoparasitismo de Grado 4, LIG2 mostró una esporulación visiblemente más abundante (en comparación con LIG1, LIG3 y LIG10), manifestada como una mayor intensidad de coloración verde en los cultivos confrontados. Este rasgo representa una ventaja clave en la etapa de masificación, ya que una mayor producción de esporas favorece la obtención de inóculos más concentrados, estables y eficientes para aplicaciones en campo.

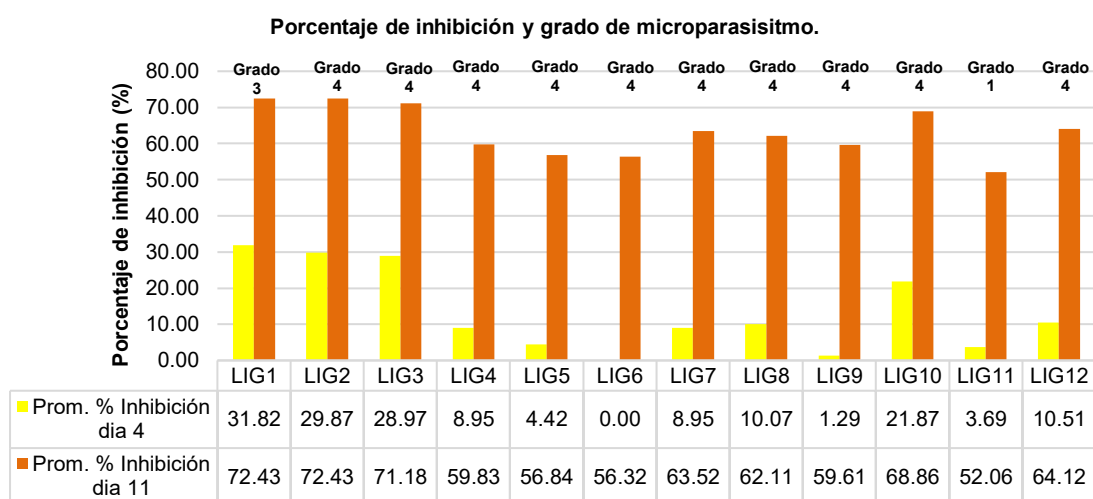


Figura 19

Porcentaje de inhibición radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (FOC4) por cepas de *Trichoderma* sp. a los 4 y 11 días de incubación in vitro y grado de mico parasitismo.

4.3. Evaluaciones de grupos control (testigo) y cultivos duales al cuarto día

4.3.1. Controles (testigo) de cultivos de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4.

a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4)

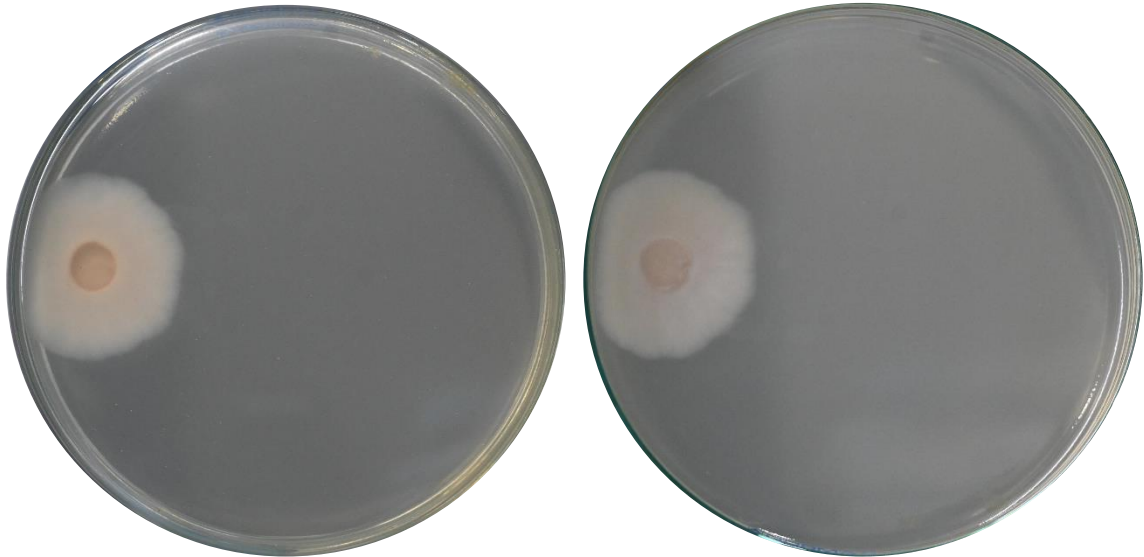


Figura 20

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) en una de las placas testigo

b) *Trichoderma* sp. (LIG1)

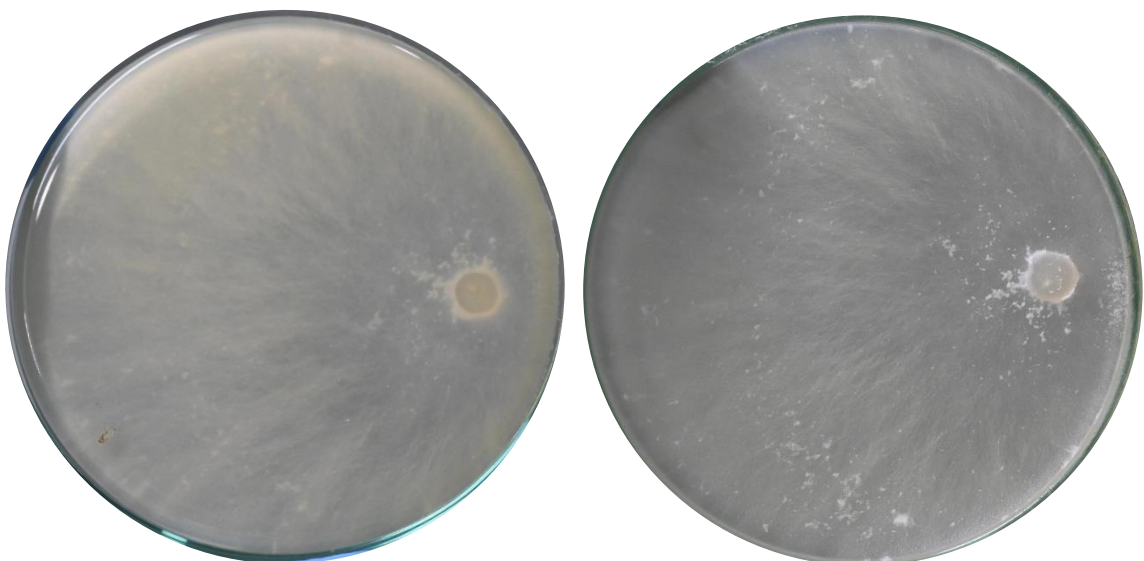


Figura 21

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. (LIG1) en una de las placas testigo

c) *Trichoderma* sp. (LIG2)

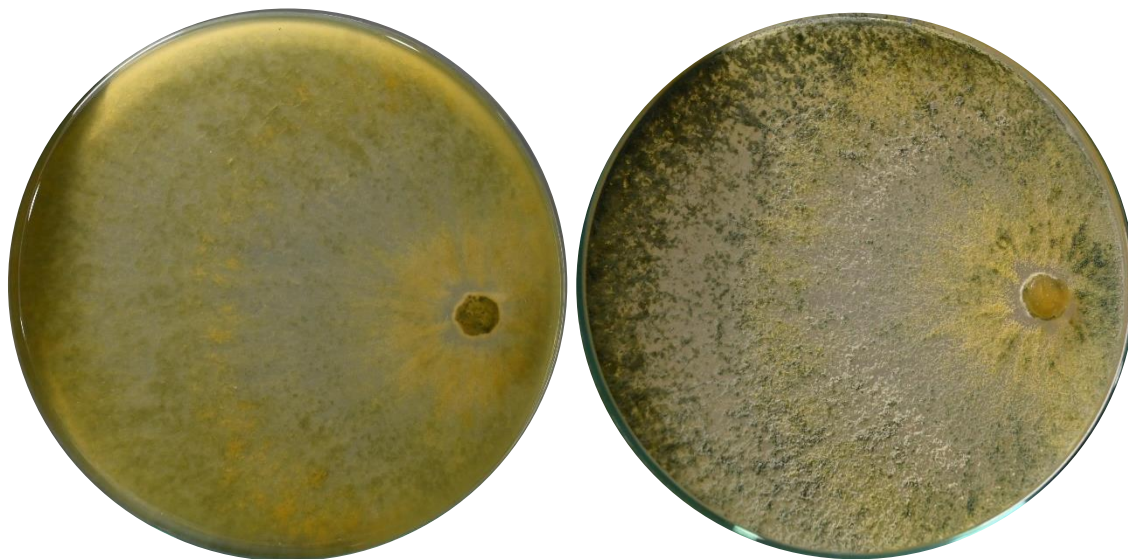


Figura 22

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG2 en una de las placas testigo.

d) *Trichoderma* sp. (LIG3)

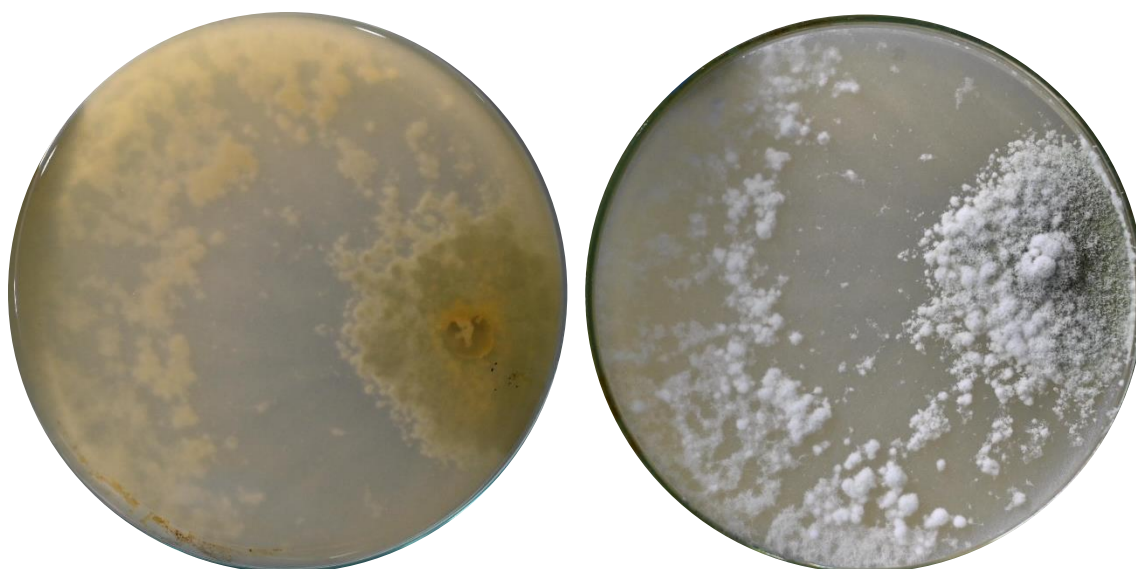


Figura 23

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG3 en una de las placas testigo

e) *Trichoderma* sp. (LIG4)

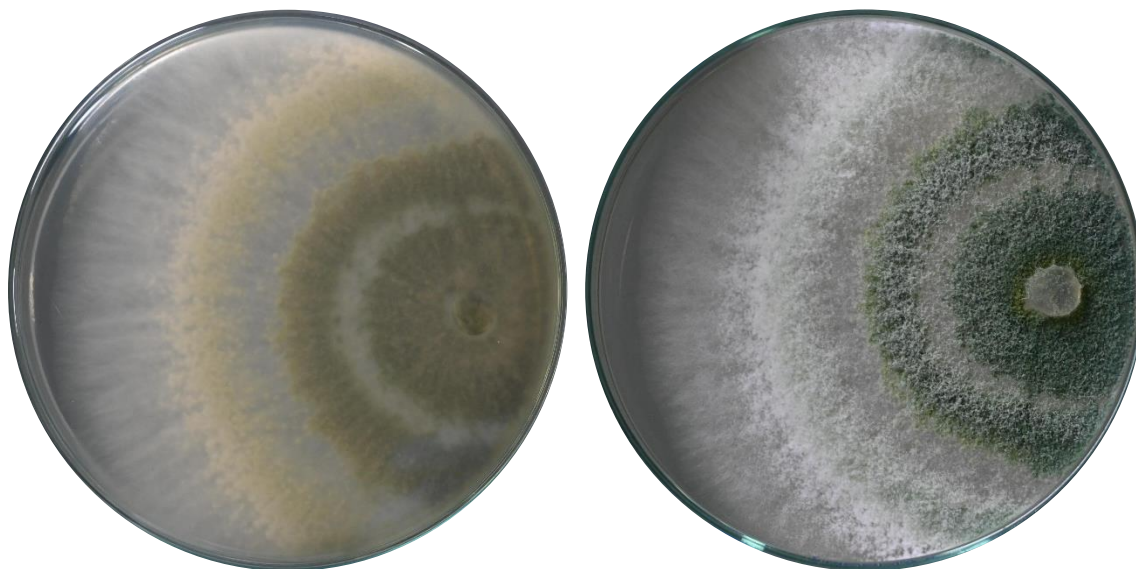


Figura 24

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG4 en una de las placas testigo.

f) *Trichoderma* sp. (LIG5)

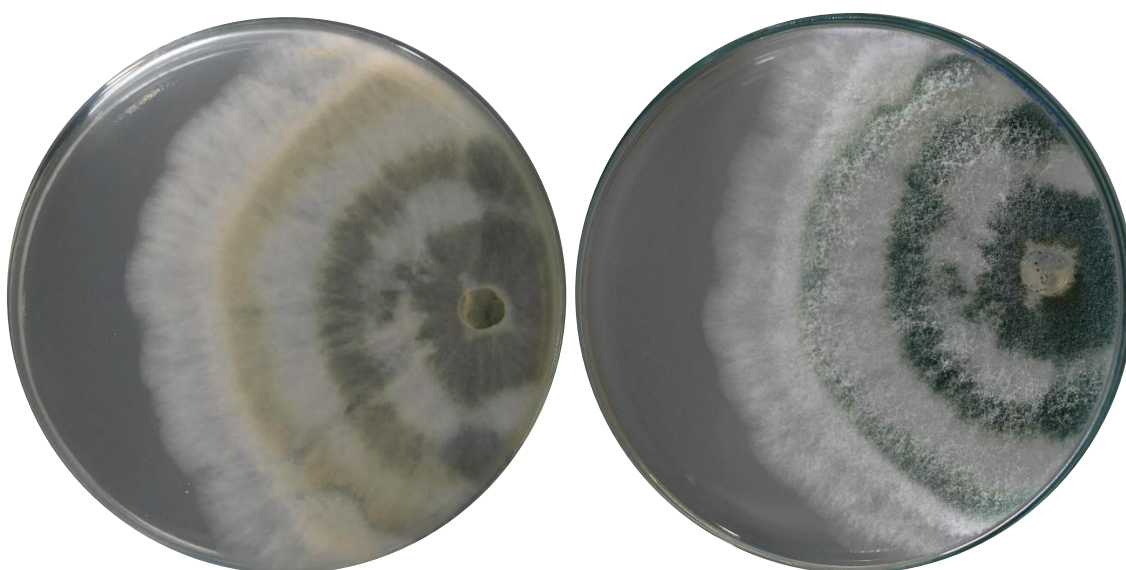


Figura 25

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG5 en una de las placas testigo.

g) *Trichoderma* sp. (LIG6)

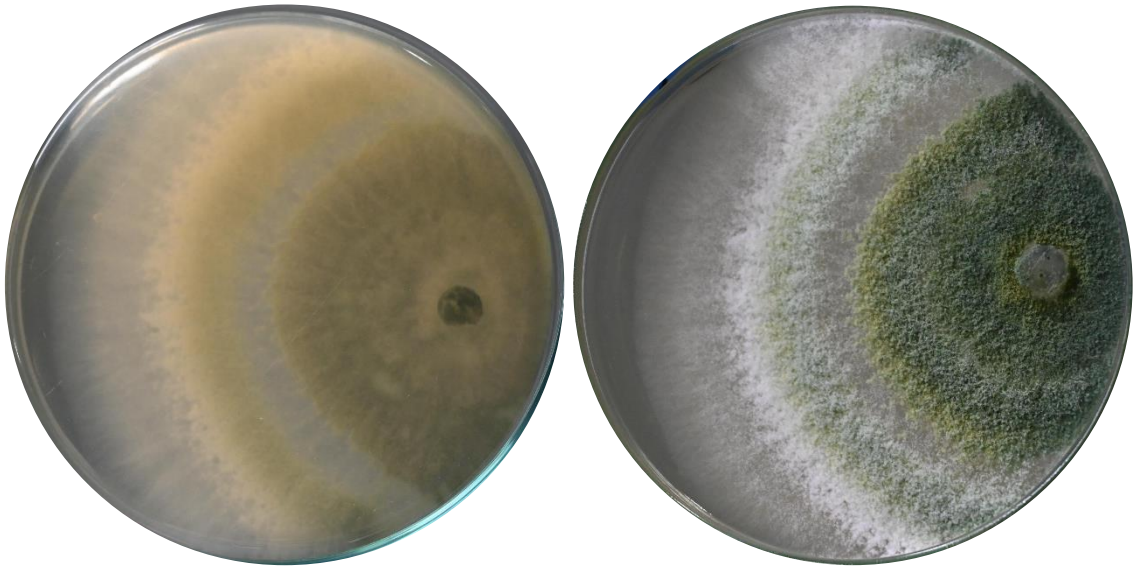


Figura 26

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG6 en una de las placas testigo

h) *Trichoderma* sp. (LIG7)

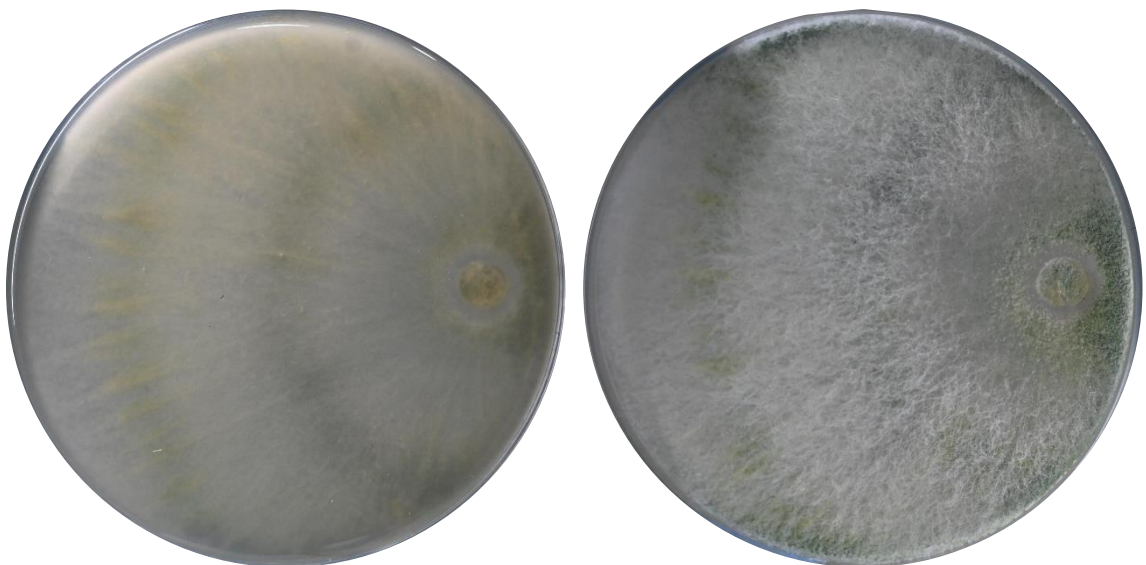


Figura 27

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG7 en una de las placas testigo.

i) *Trichoderma* sp. (LIG8)

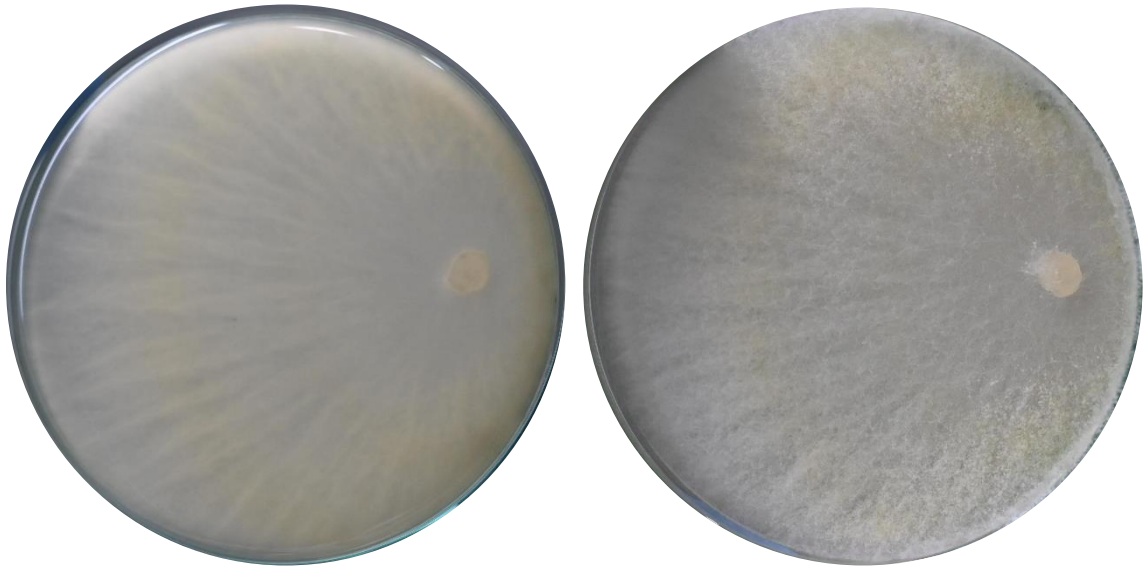


Figura 28

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG8 en una de las placas testigo

j) *Trichoderma* sp. (LIG9)

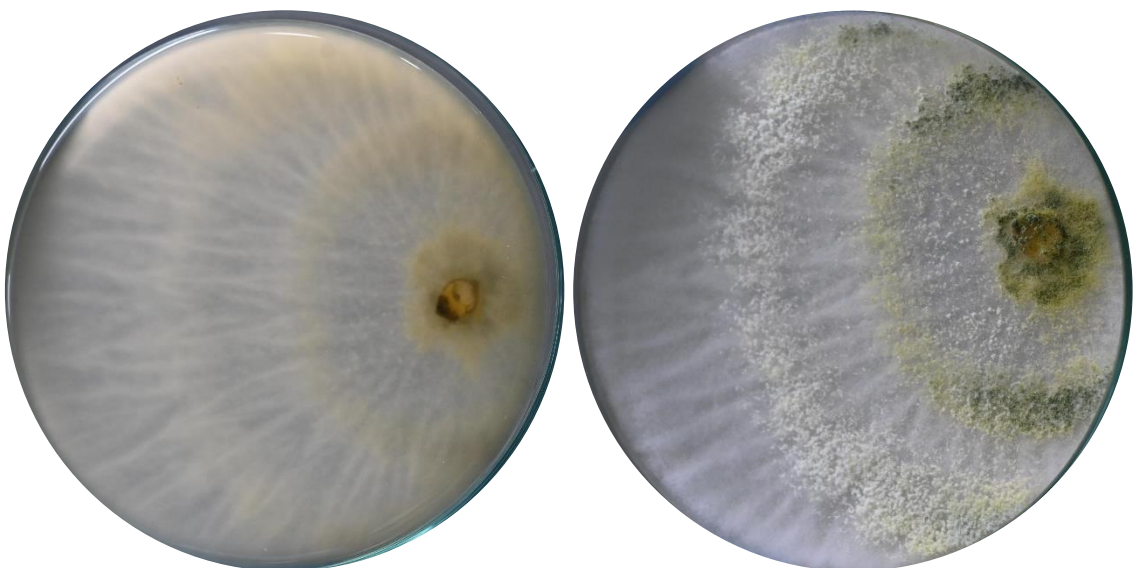


Figura 29

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG9 en una de las placas testigo

k) *Trichoderma* sp. (LIG10)

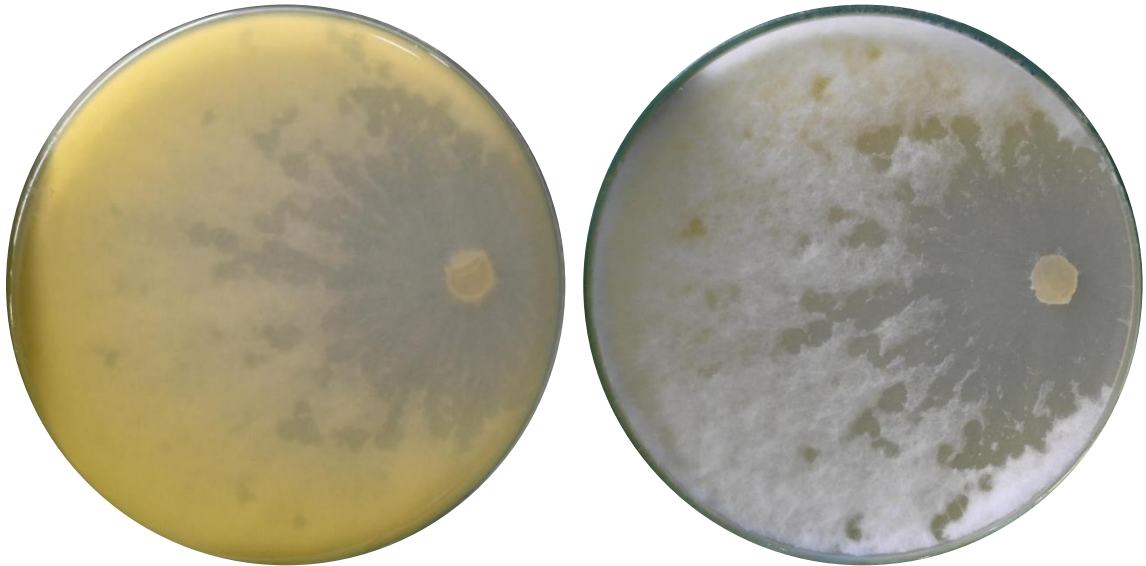


Figura 30

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG10 en una de las placas testigo

l) *Trichoderma* sp. (LIG11)

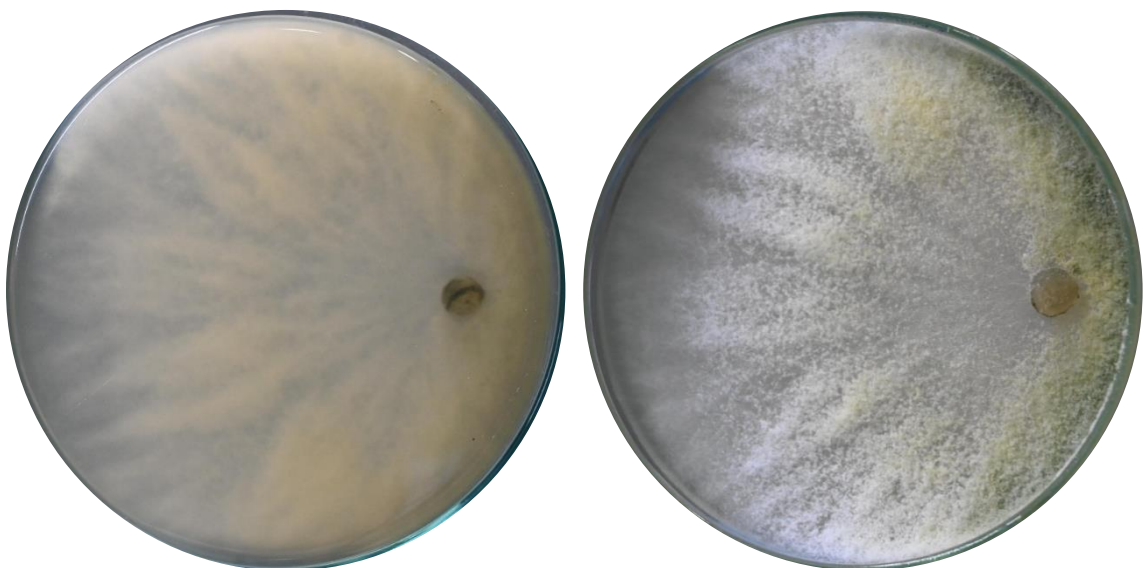


Figura 31

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG11 en una de las placas testigo.

m) *Trichoderma* sp. (LIG12)

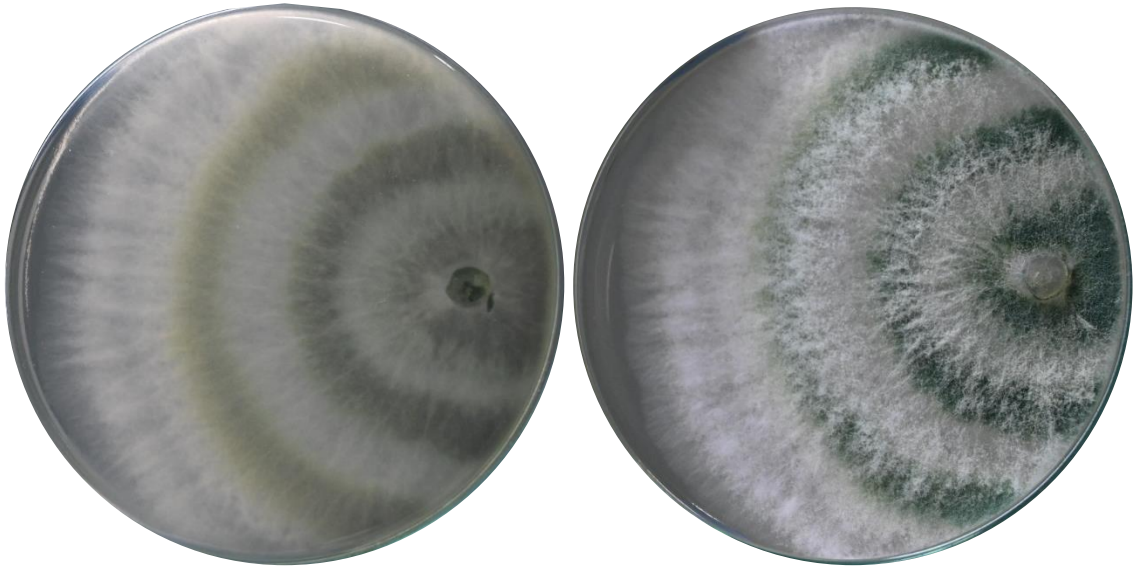


Figura 32

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG12 en una de las placas testigo

4.3.2. Cultivos duales de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4

a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG1)

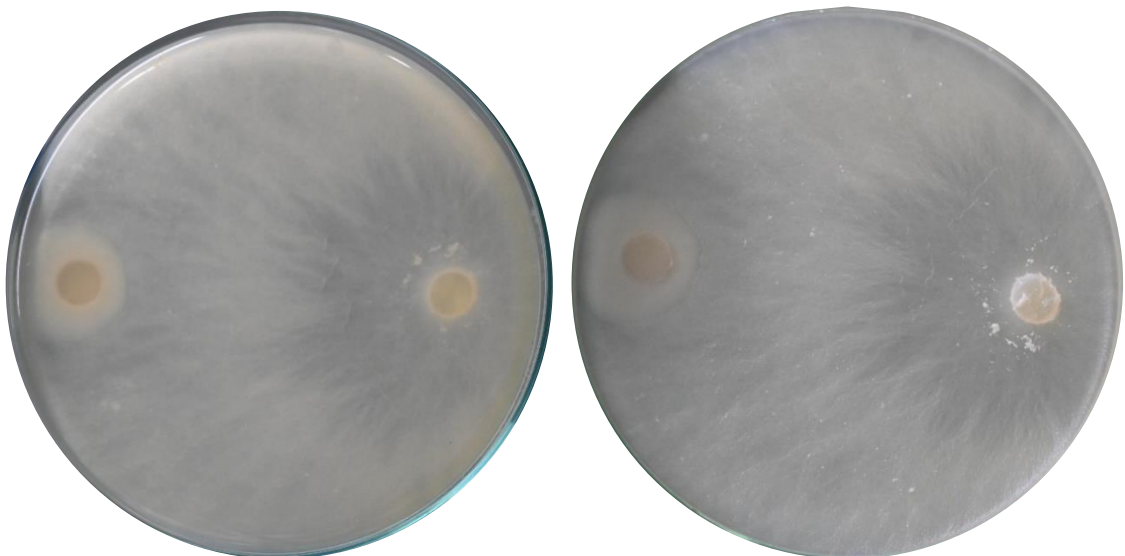


Figura 33

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG1) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG2)

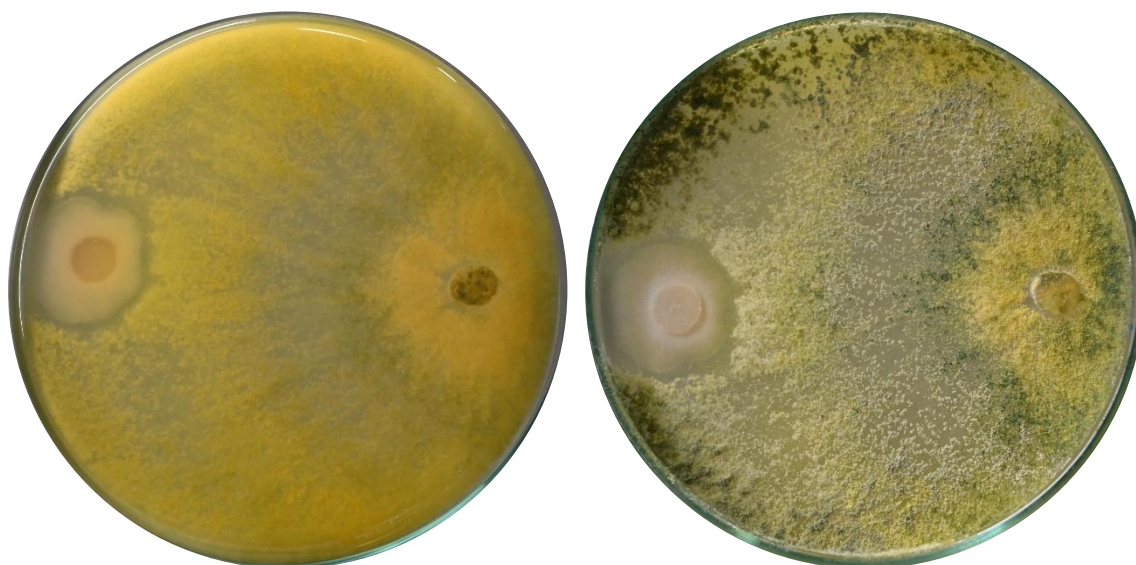


Figura 34

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG2) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

c) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG3)

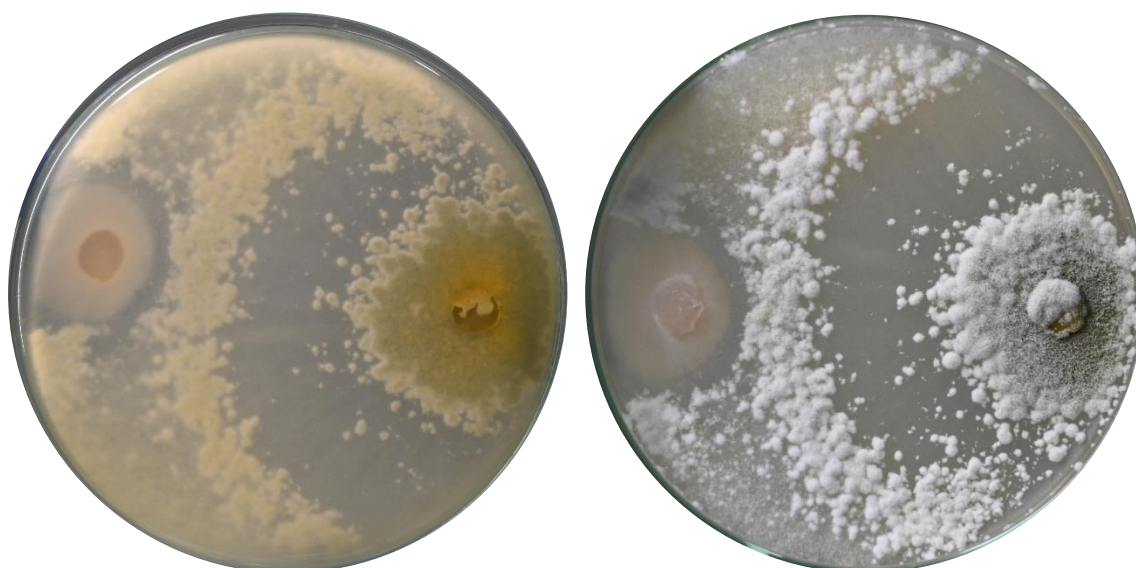


Figura 35

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG3) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

d) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG4)

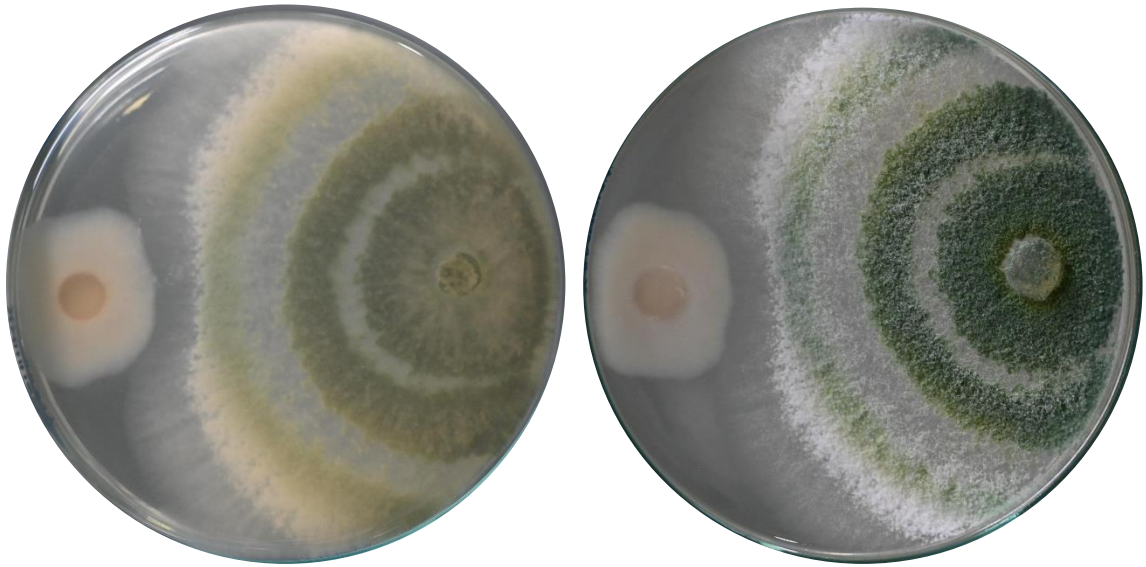


Figura 36

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG4) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

e) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG5)

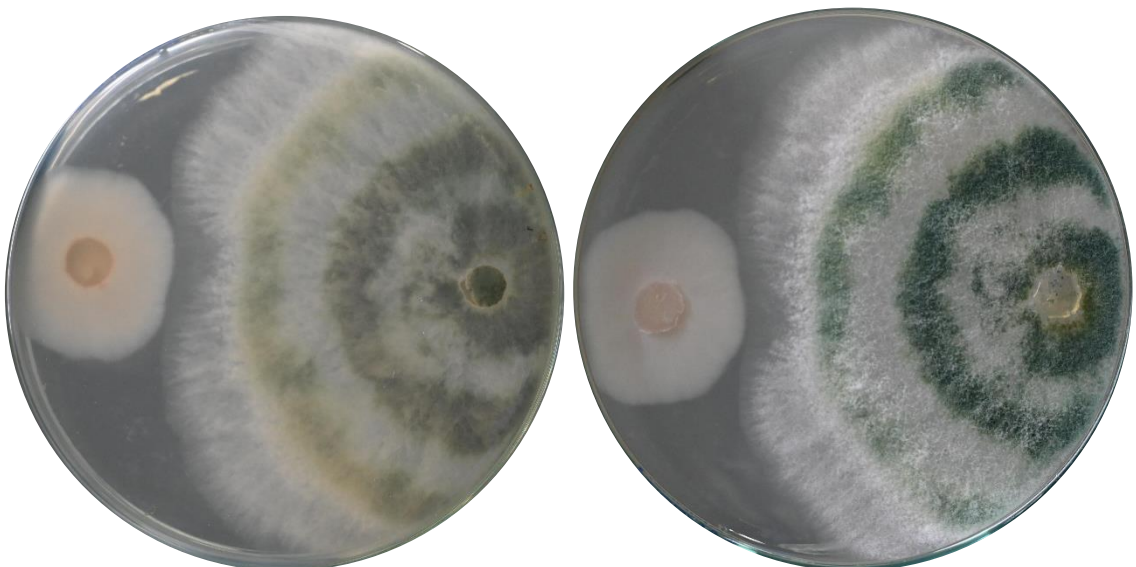


Figura 37

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG5) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

f) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG6)

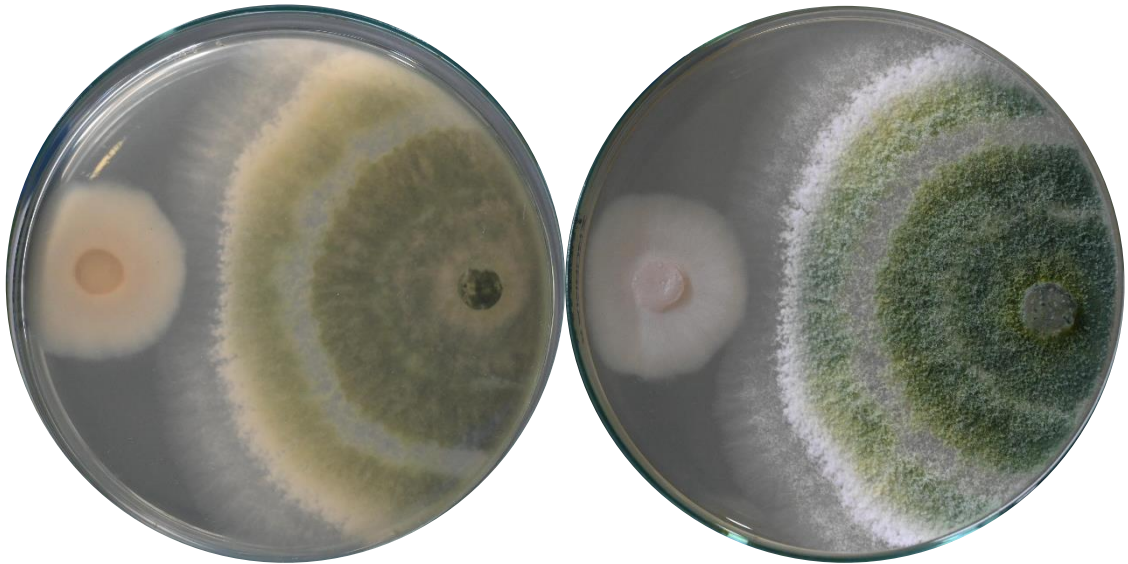


Figura 38

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG6) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

g) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG7)

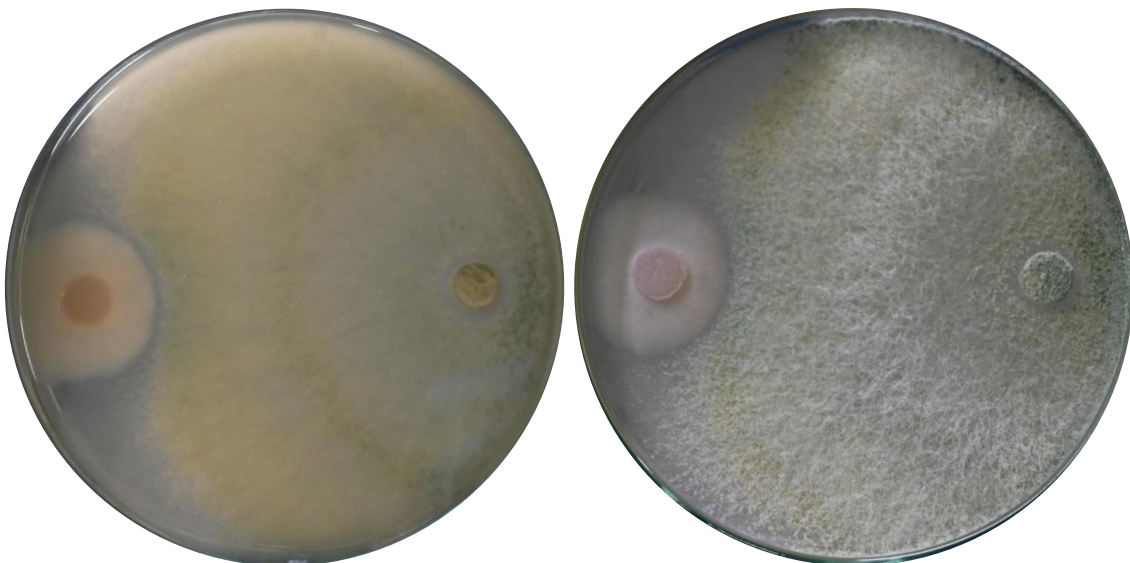


Figura 39

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG7) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

h) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG8)

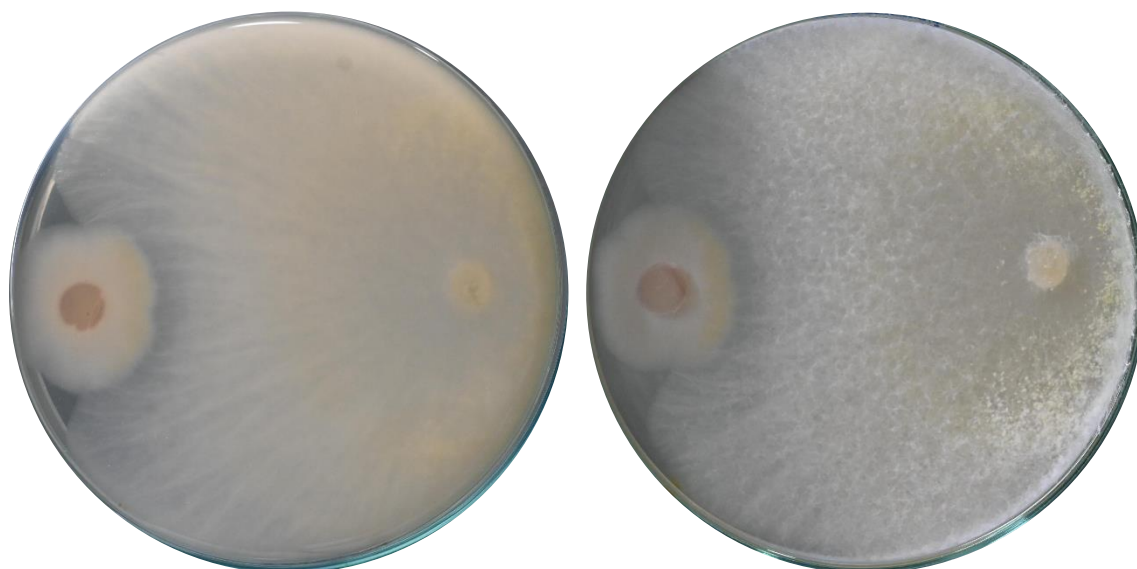


Figura 40

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG8) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

i) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG9)

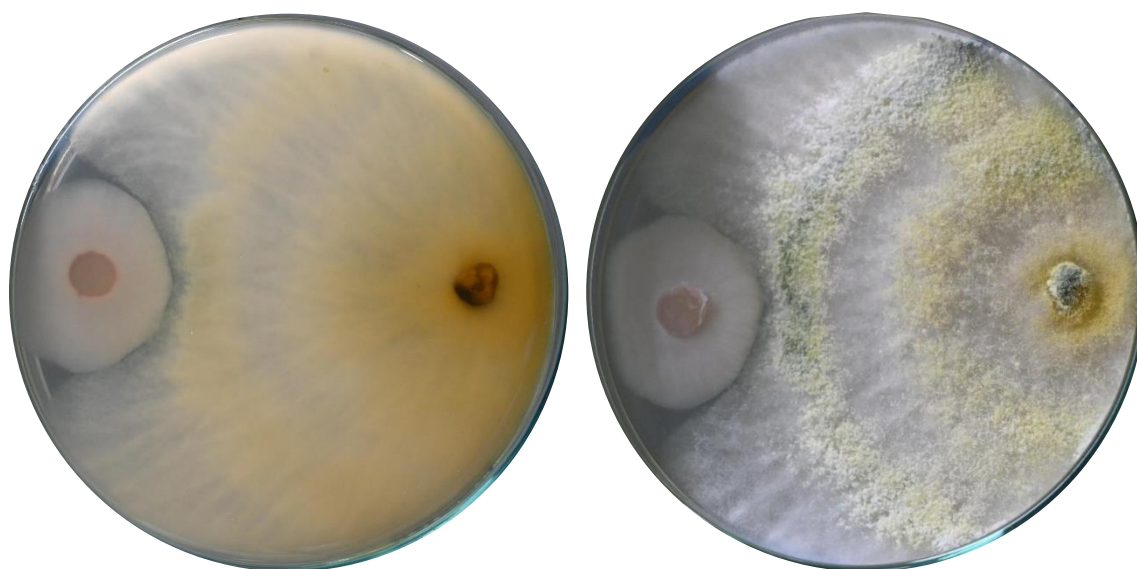


Figura 6

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG9) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

j) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG10)

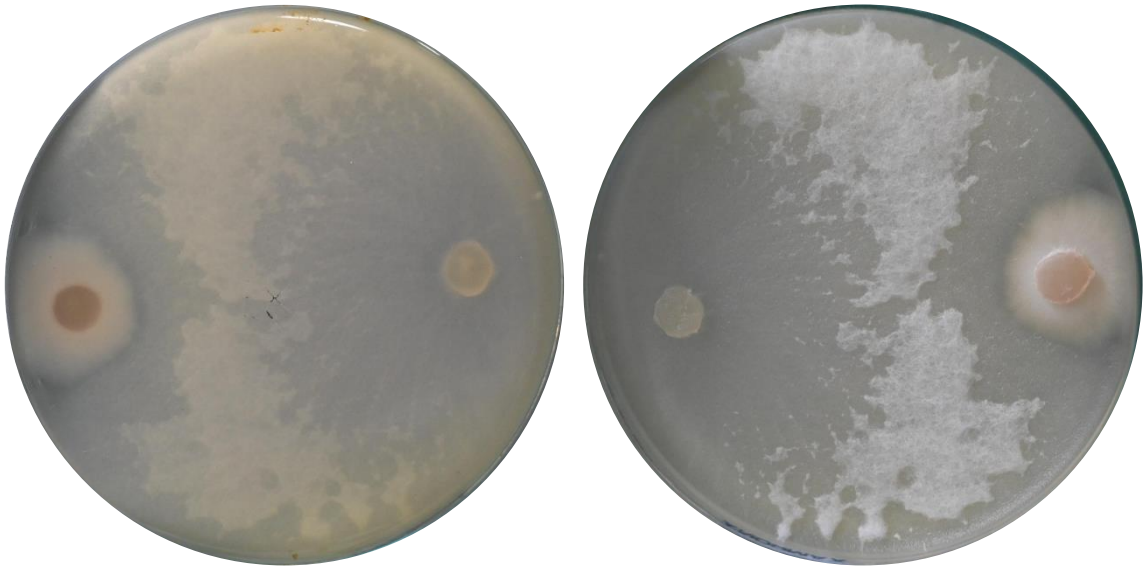


Figura 7

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG10) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

k) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG11)

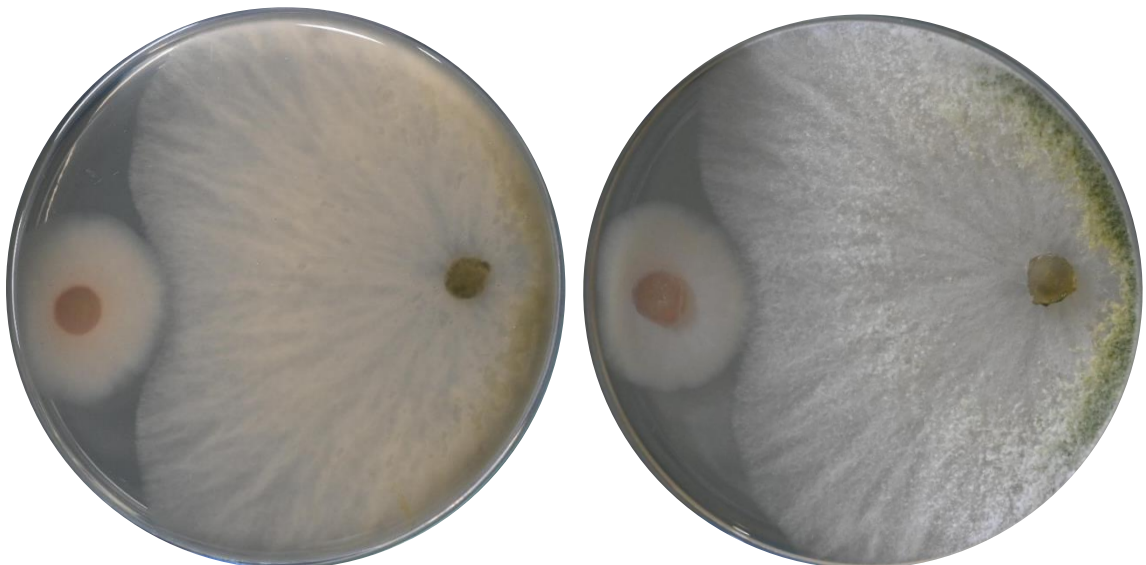


Figura 8

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG11) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

I) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG12)

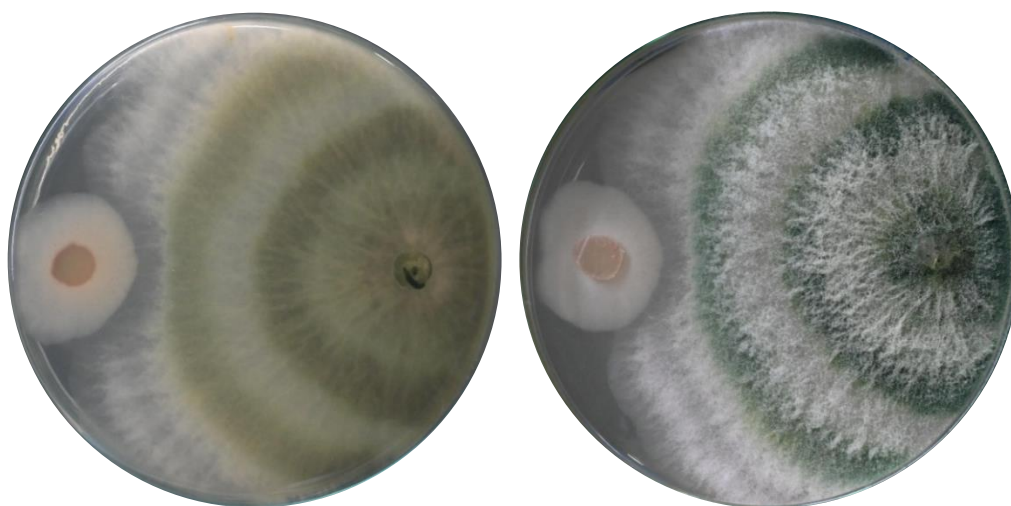


Figura 9

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG12) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

4.4. Evaluaciones de grupos control (testigo) y cultivos duales al onceavo día

4.4.1. Controles (testigo) de cultivos de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4.

a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4)

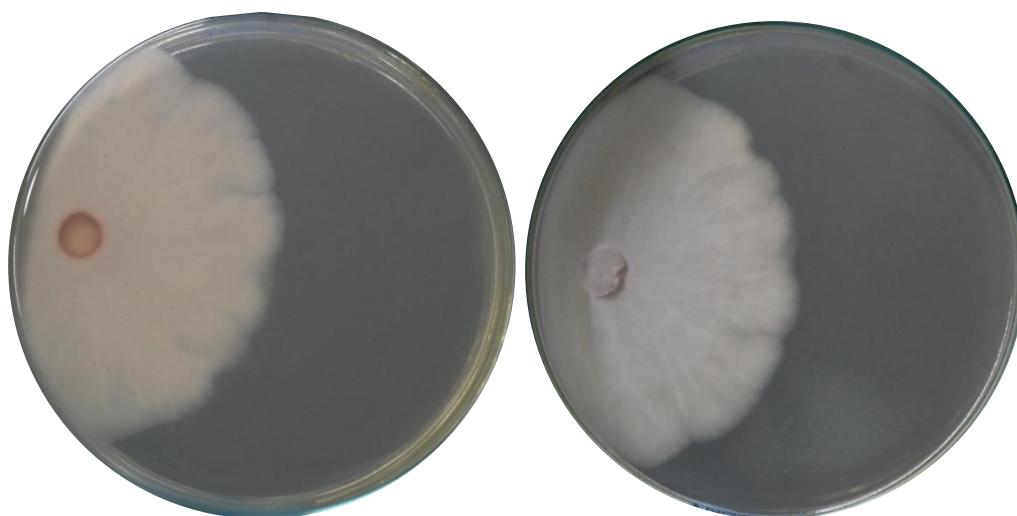


Figura 10

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) en una de las placas testigo.

b) *Trichoderma* sp. (LIG1)

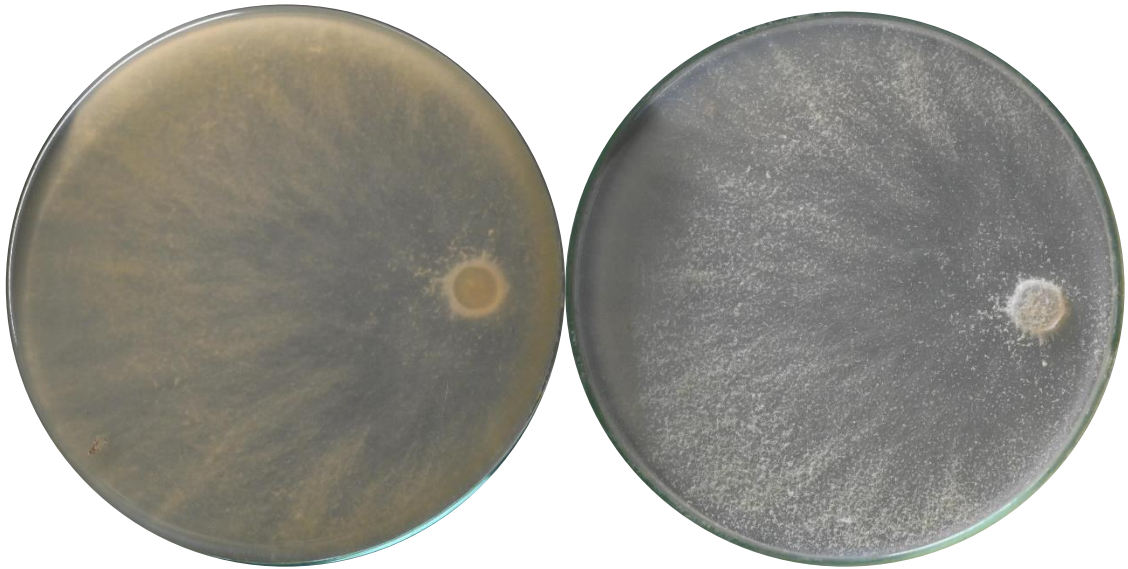


Figura 11

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. (LIG1) en una de las placas testigo.

c) *Trichoderma* sp. (LIG2)

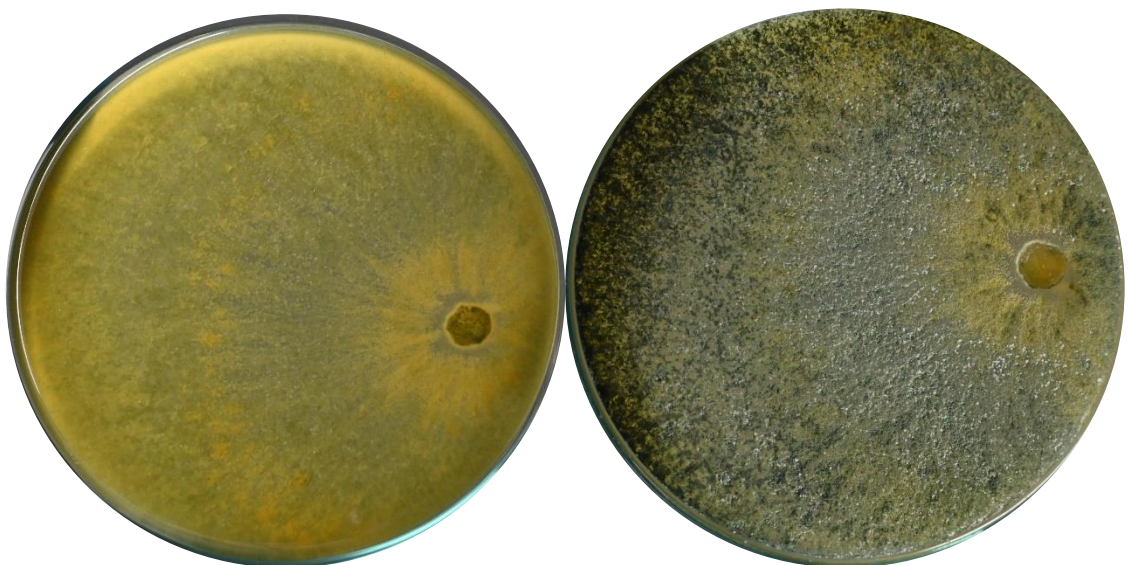


Figura 12

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG2 en una de las placas testigo

d) *Trichoderma* sp. (LIG3)

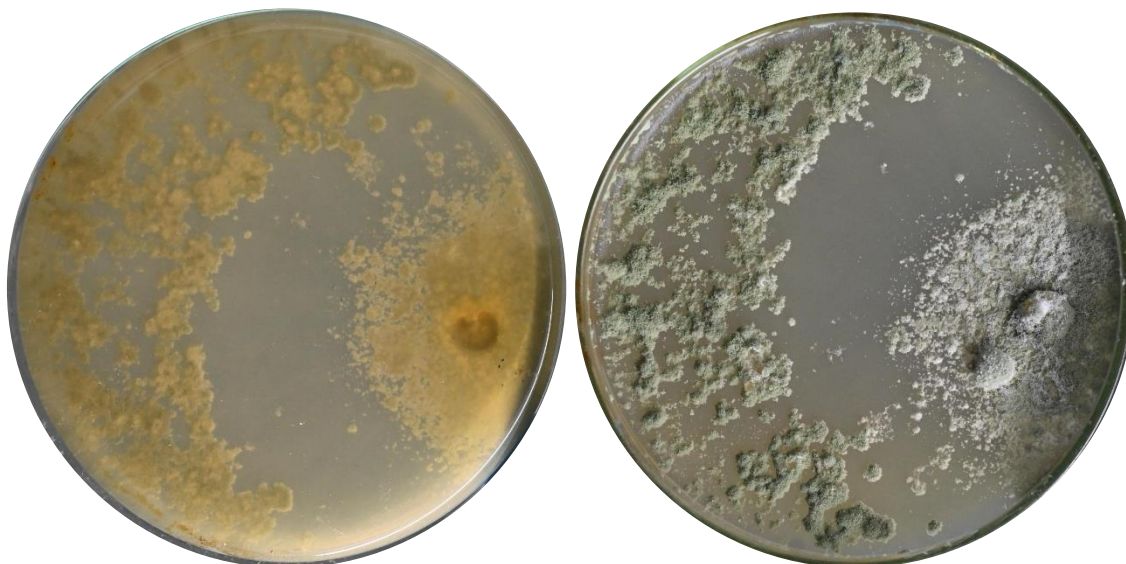


Figura 13

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG3 en una de las placas testigo.

e) *Trichoderma* sp. (LIG4)

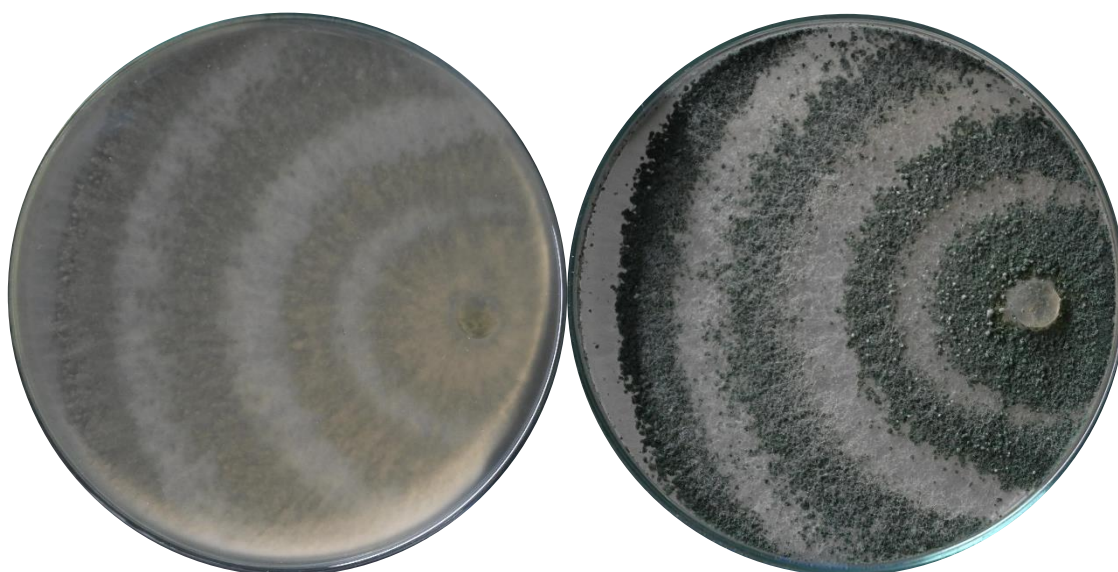


Figura 14

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG4 en una de las placas testigo

f) *Trichoderma* sp. (LIG5)

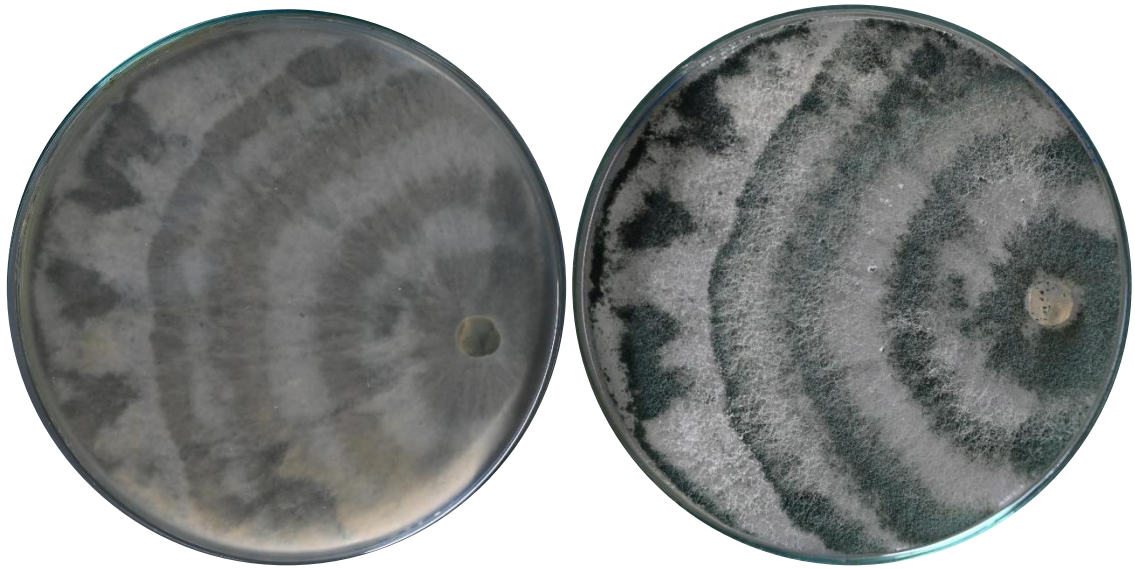


Figura 15

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG5 en una de las placas testigo.

g) *Trichoderma* sp. (LIG6)



Figura 51

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. (LIG6) en una de las placas testigo.

h) *Trichoderma* sp. (LIG7)

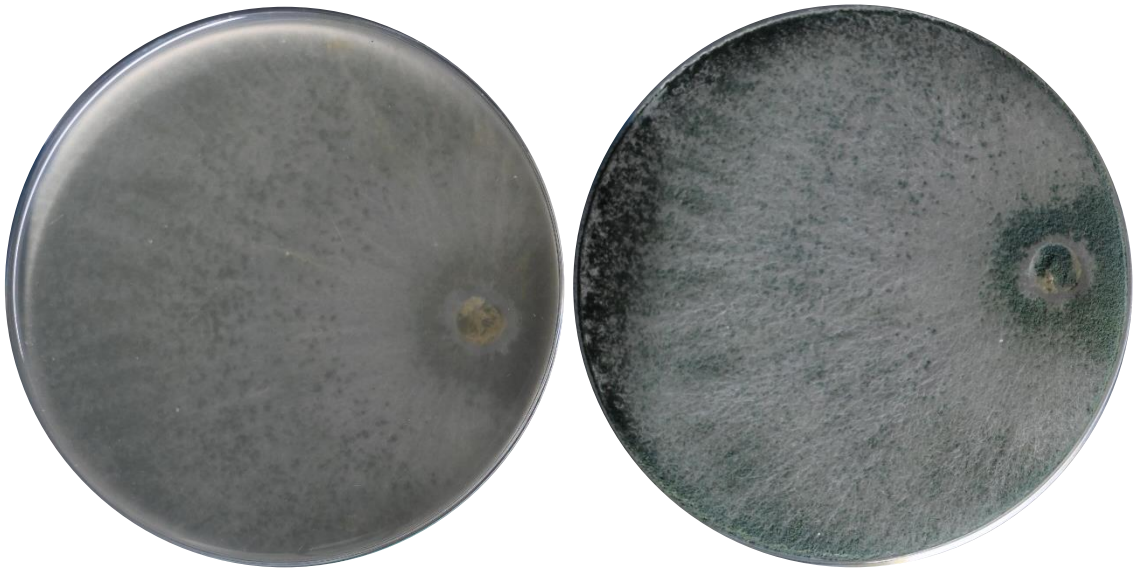


Figura 52

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG7 en una de las placas testigo.

i) *Trichoderma* sp. (LIG8)

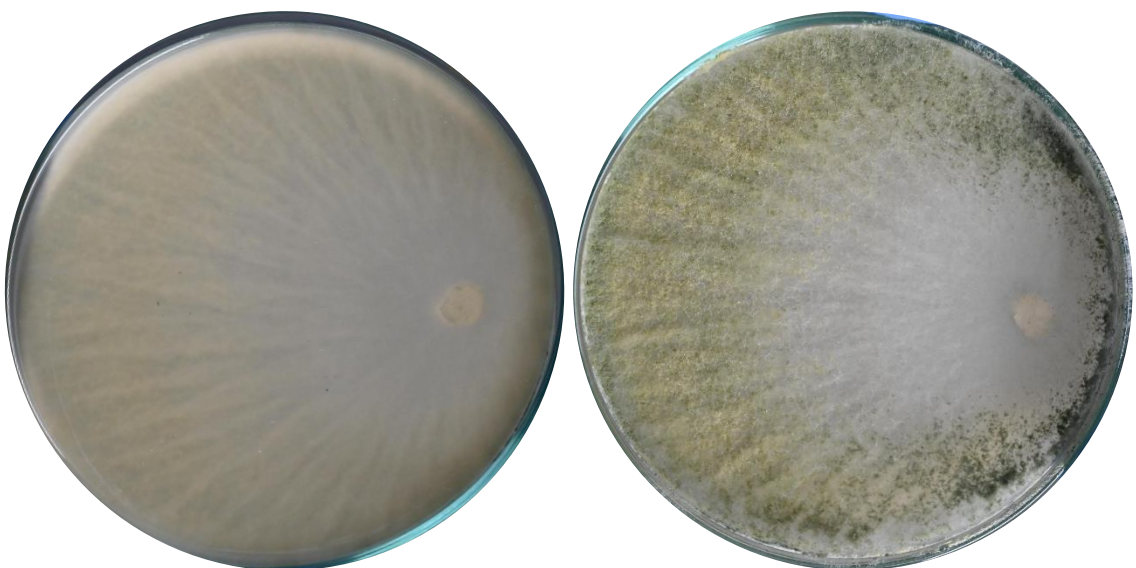


Figura 53

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG8 en una de las placas testigo

j) *Trichoderma* sp. (LIG9)

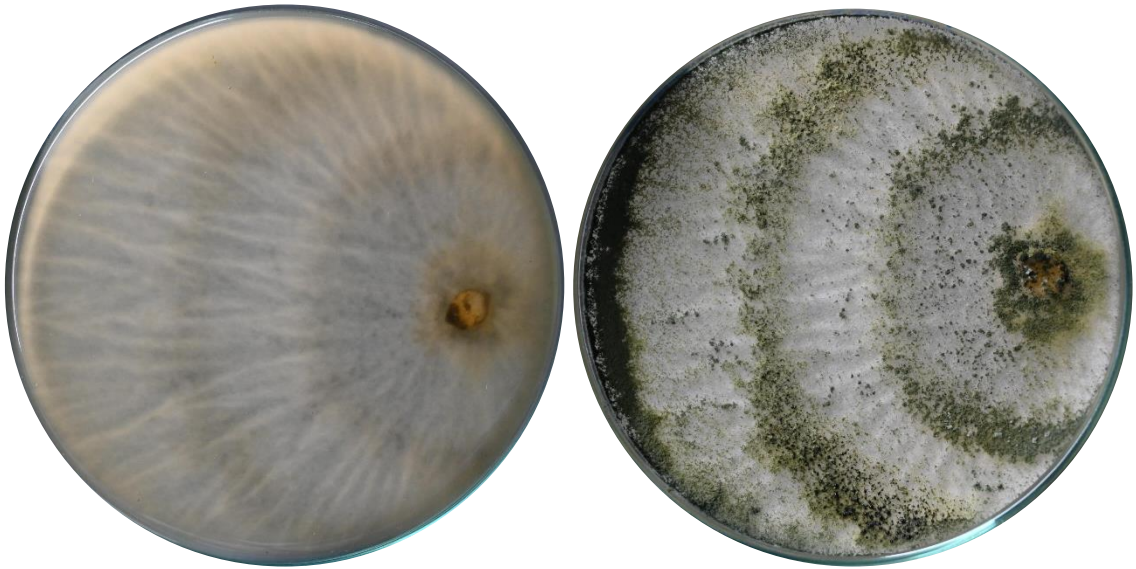


Figura 54

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG9 en una de las placas testigo

k) *Trichoderma* sp. (LIG10)

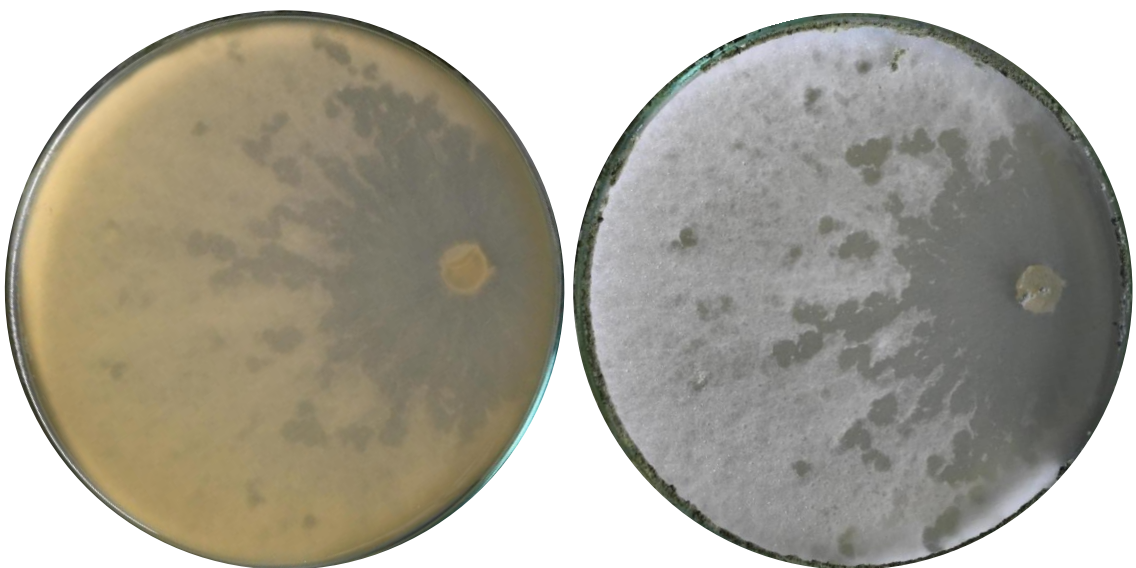


Figura 55

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG10 en una de las placas testigo

l) *Trichoderma* sp. (LIG11)

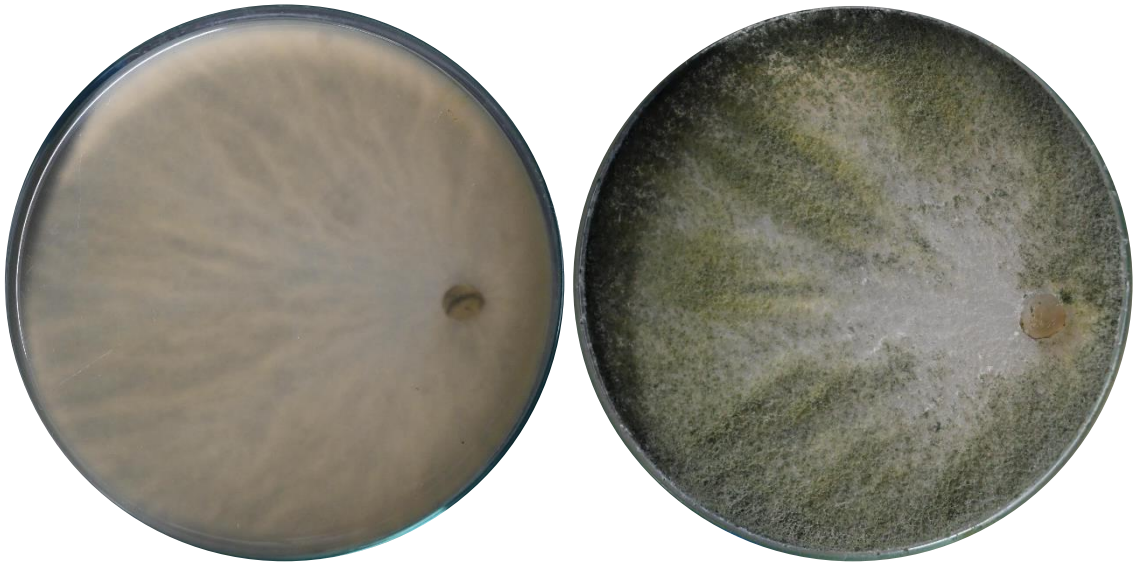


Figura 56

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG11 en una de las placas testigo

m) *Trichoderma* sp. (LIG12)

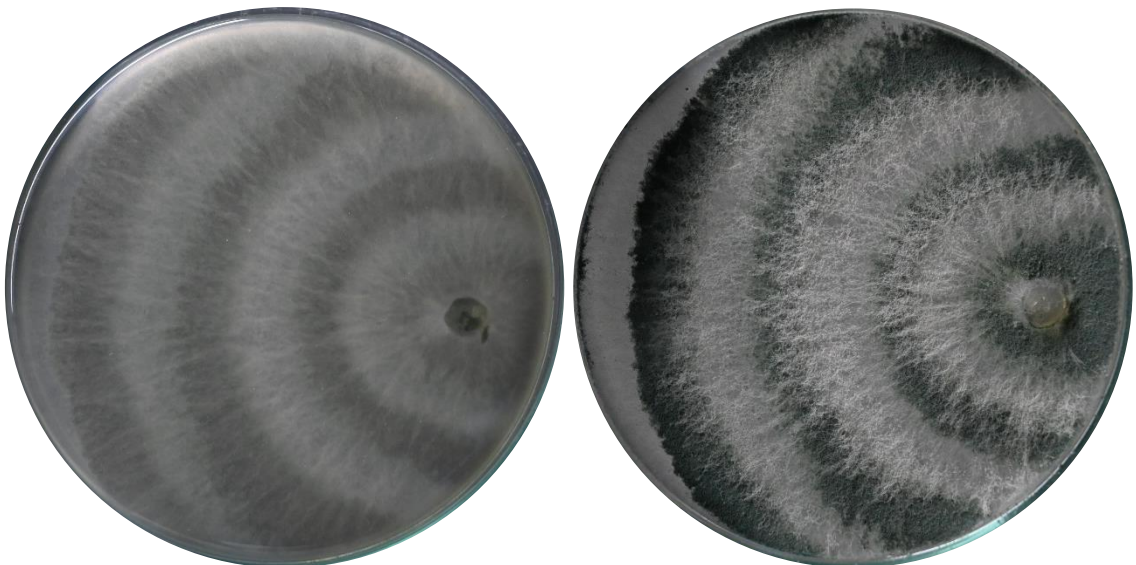


Figura 57

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. LIG12 en una de las placas testigo.

4.4.2. Cultivos duales de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4.

a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG1)

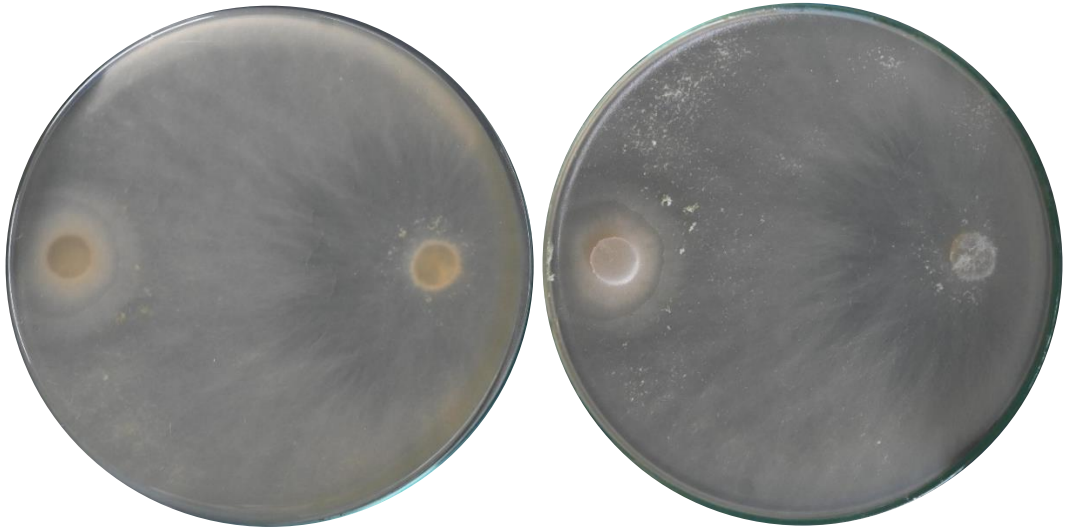


Figura 58

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG1) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG2)



Figura 59

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG2) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

c) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG3)

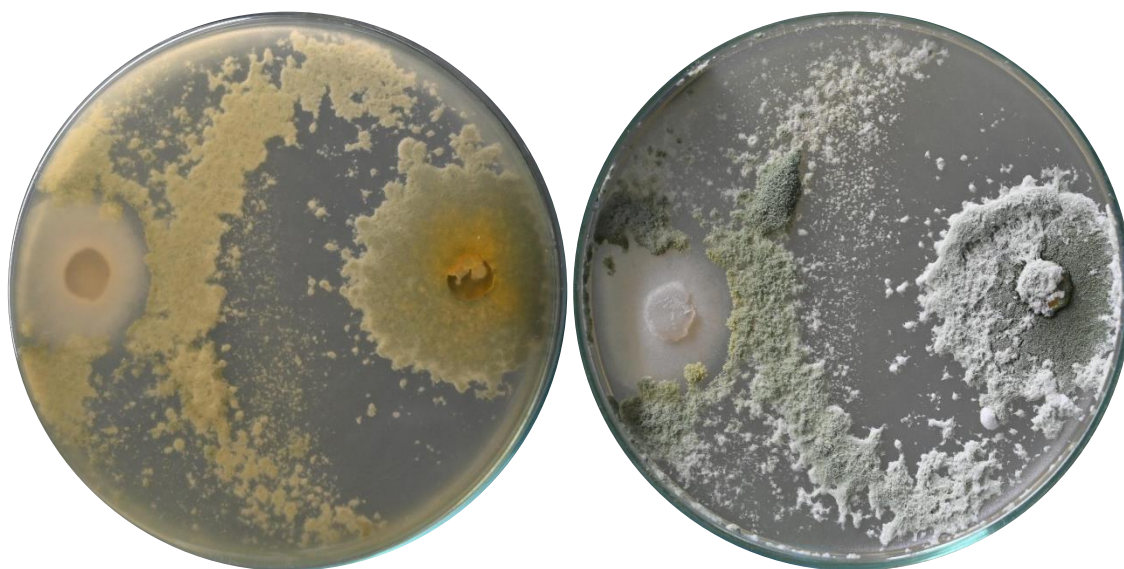


Figura 60

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG3) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

d) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG4)



Figura 61

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG4) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

e) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG5)

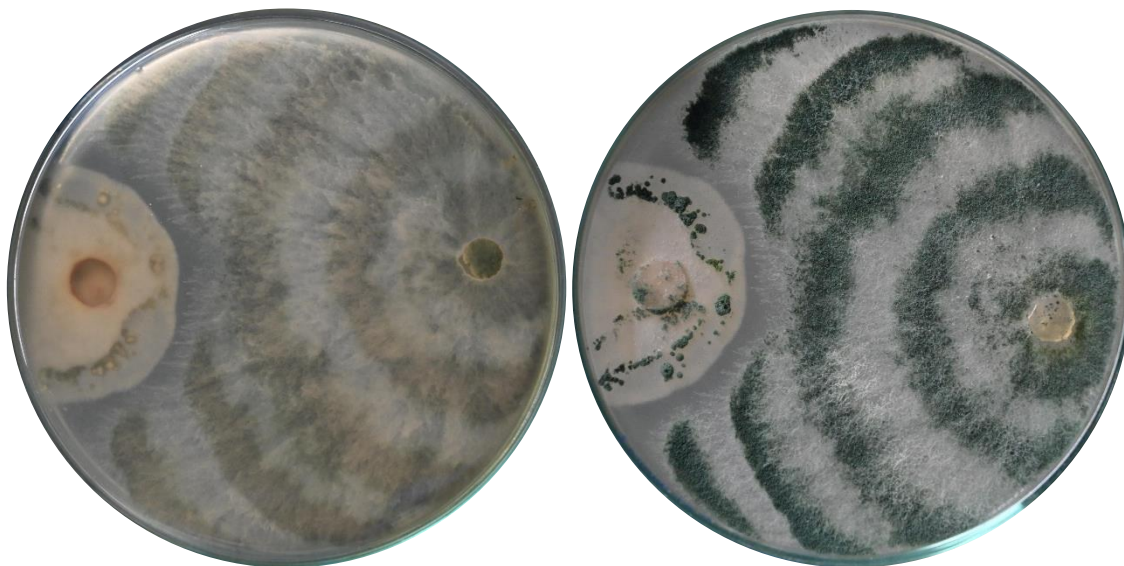


Figura 62

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG5) -derecha en la placa- en una de las repeticiones.

f) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG6)

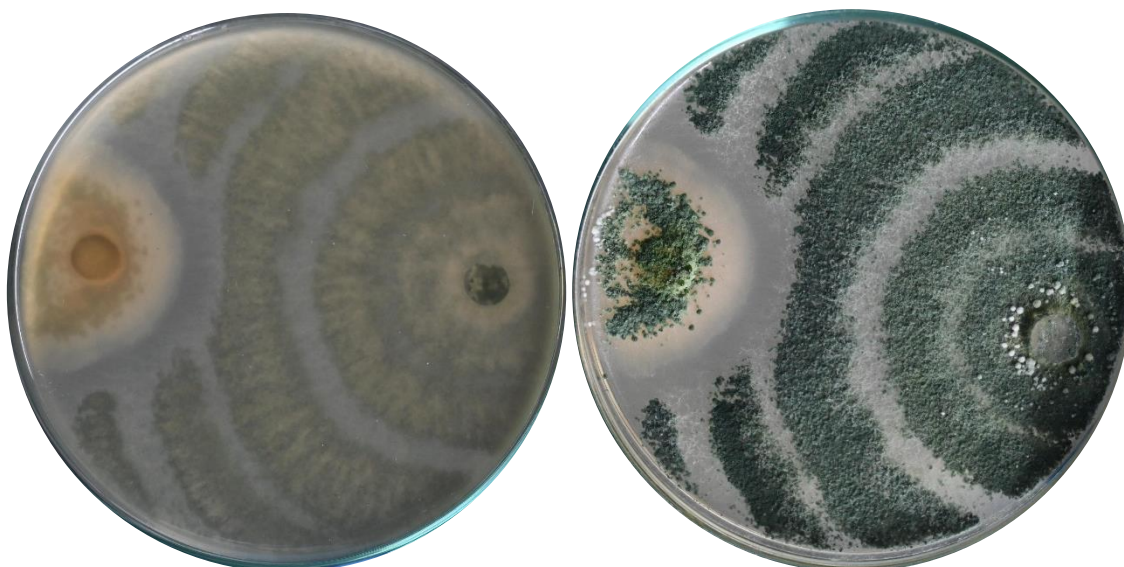


Figura 63

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG6) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

g) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. **(FOC4)** vs *Trichoderma* sp. **(LIG7)**

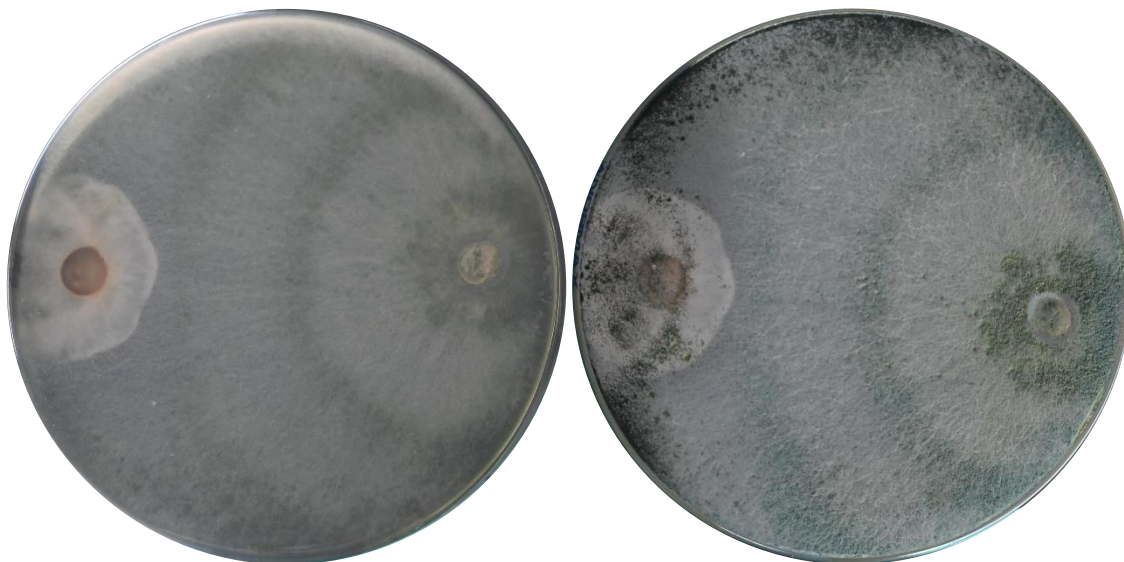


Figura 64

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG7) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

h) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. **(FOC4)** vs *Trichoderma* sp. **(LIG8)**

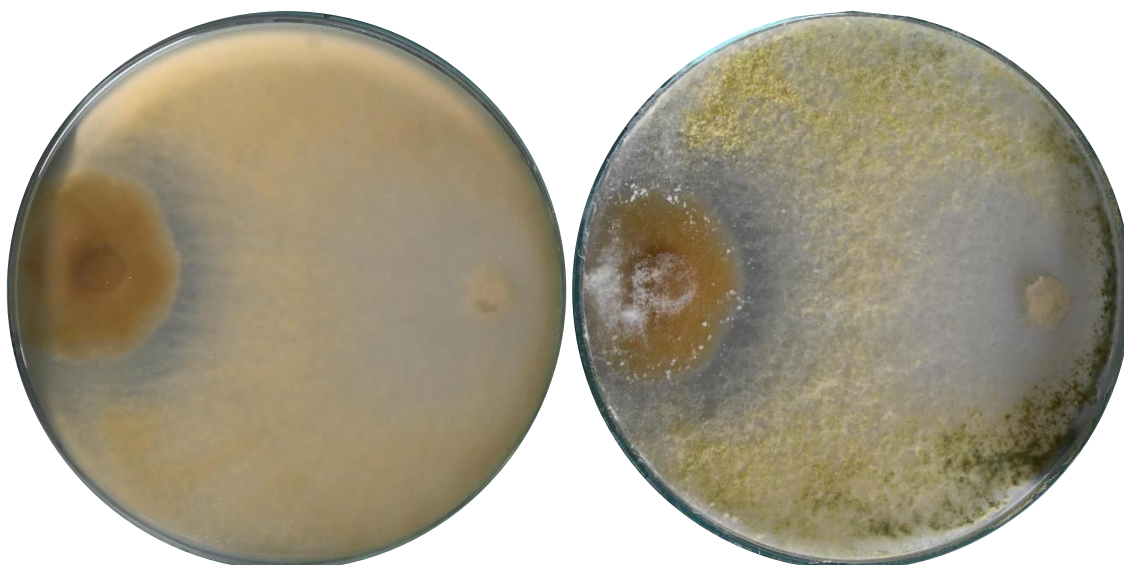


Figura 65

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG8) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

i) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG9)



Figura 66

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG9) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

j) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG10)

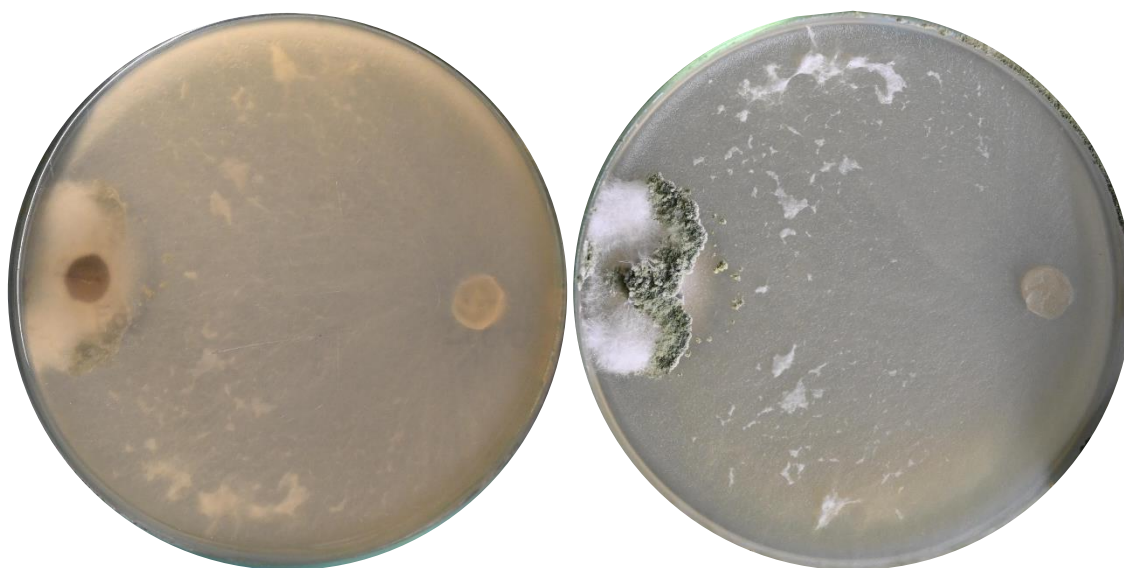


Figura 67

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG10) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

k) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG11)

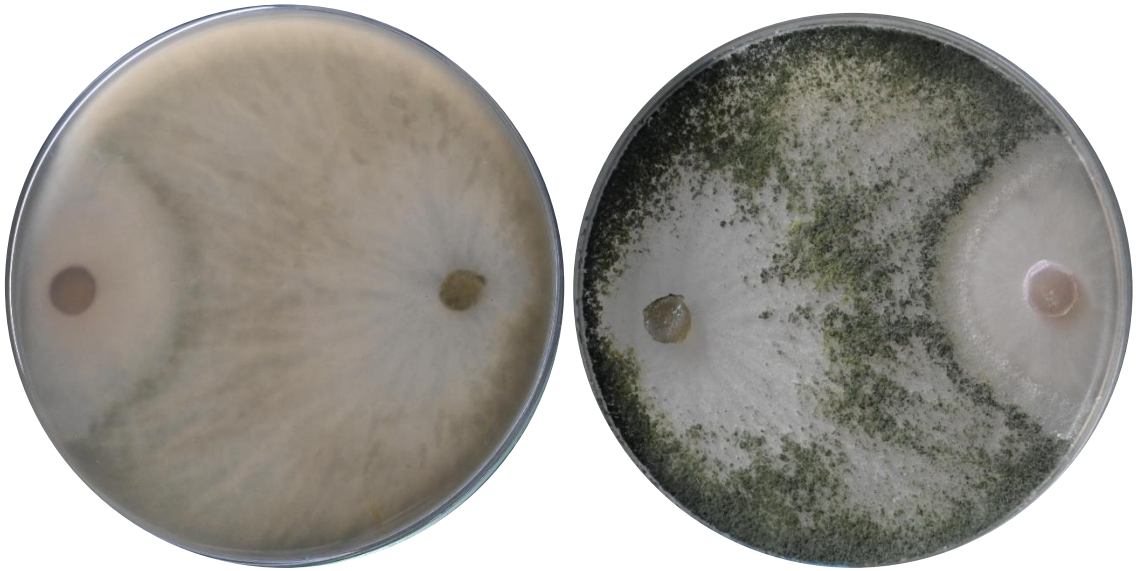


Figura 68

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG11) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

l) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4. (FOC4) vs *Trichoderma* sp. (LIG12)

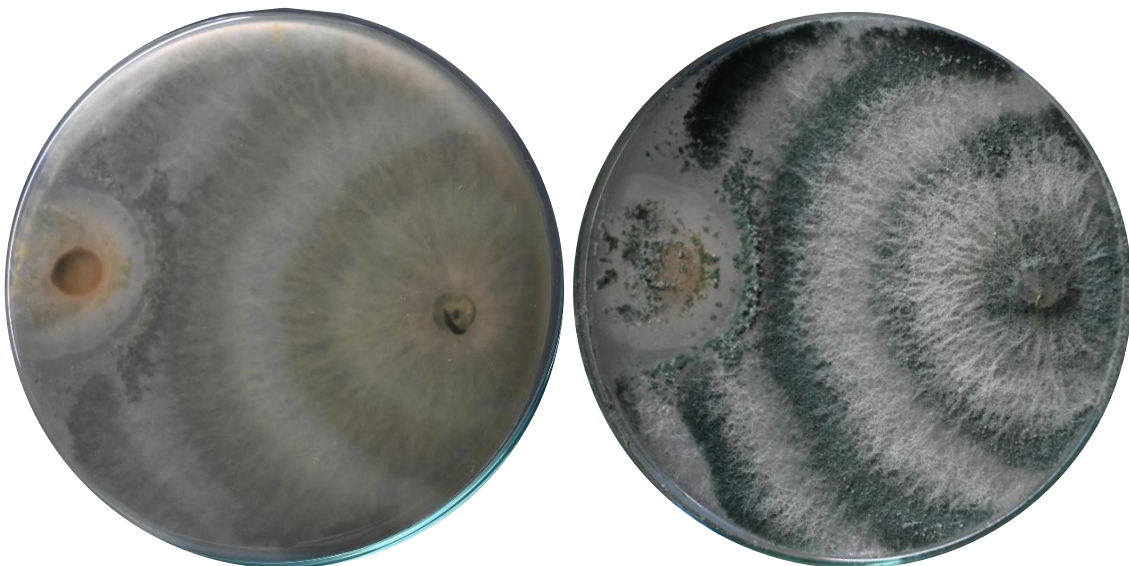


Figura 69

Reverso (izquierda) y anverso (derecha) del enfrentamiento del patógeno FOC4 -izquierda en la placa- contra *Trichoderma* sp. (LIG12) -derecha en la placa- en una de las repeticiones

4.5. Identificación molecular de Trichodermas con capacidad antagonista

El análisis molecular de la cepa evaluada permitió confirmar su identidad como *Trichoderma harzianum*. La secuencia obtenida presentó valores de alineamiento altamente confiables en el análisis BLASTn, con un Max Score y Total Score de 1138, lo que indica una correspondencia óptima con la secuencia de referencia. La cobertura del 100% (Query Cover) asegura que la totalidad de la región amplificada se encuentra representada en el alineamiento, mientras que el valor E igual a 0 refleja que la similitud detectada no es producto del azar.

El porcentaje de identidad del 99.52% confirma que la secuencia evaluada corresponde taxonómicamente a *T. harzianum*, especie ampliamente reportada como agente de biocontrol debido a su elevada capacidad de competencia, producción de metabolitos antifúngicos y expresión de mecanismos de micoparasitismo. El número de acceso PX314669.1 se encuentra asociado a secuencias validadas dentro de este complejo taxonómico, reforzando la precisión de la identificación.

La identificación molecular obtenida es coherente con el comportamiento registrado en los bioensayos, donde esta cepa mostró los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento y una marcada actividad micoparasítica frente a los fitopatógenos evaluados. Estos resultados son concordantes con la literatura, que describe a *T. harzianum* como una de las especies más eficaces en la colonización de sustratos, la degradación de paredes celulares fúngicas mediante enzimas líticas y la competencia por espacio y nutrientes.

En conjunto, los parámetros moleculares y fenotípicos respaldan la clasificación de esta cepa como un genotipo con alto potencial para su uso como agente de control biológico, justificando su selección como candidato principal dentro de los procesos de masificación y formulación evaluados en este estudio.

Tabla 8

Datos de alineamiento BLASTn para *Trichoderma sp*

Nombre científico	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Numero de acceso.
<i>Trichoderma harzianum</i>	1138	1138	100%	0	99.52%	631	PX314669.1

Secuencia nucleotídica obtenida

```

AGTAAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGTGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTT
TACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCC
CGGGTGCCTCGCAGCCCCGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTG
TATACCCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTT
CGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCGAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTC
GAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTTGGCGGTGGCCGTCTCC
GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCG
GGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
    
```

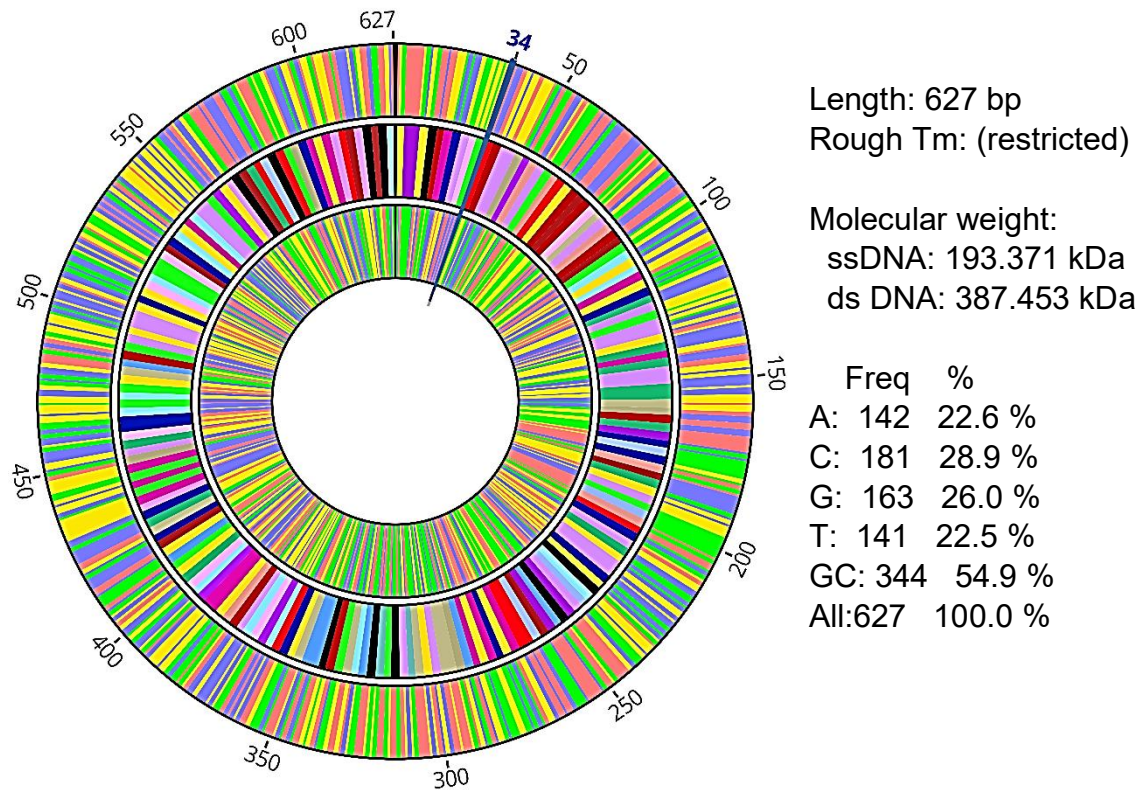


Figura 70

Estadística de nucleótidos

4.6. Ensayos de masificación de *Trichodermas* en sustratos orgánicos

Los ensayos de masificación permitieron comparar el rendimiento de *Trichoderma* en 21 sustratos y combinaciones orgánicas, evaluando 3 indicadores clave: UFC/g, número de esporas/g y viabilidad. Los resultados muestran diferencias marcadas entre sustratos simples, combinados y aquellos enriquecidos con biochar.

4.6.1. Sustratos individuales (arroz, trigo, bagazo y biochar)

La evaluación de los sustratos individuales permitió identificar diferencias claras en la capacidad de cada material para sostener el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. El arroz partido (T1) mostró un desempeño notable, con altos valores de UFC/g y una viabilidad superior al 75 %, lo que confirma que su estructura granulada favorece una adecuada aireación, disponibilidad de humedad y difusión de nutrientes. En contraste, el arroz en polvo (T2), si bien produjo una elevada cantidad de esporas, presentó una viabilidad baja (21 %), lo que sugiere que la compactación del sustrato afecta negativamente la germinación.

Los sustratos basados en trigo (T3 y T4) registraron valores intermedios en producción de biomasa y conidios, indicando que, aunque aptos, no alcanzan el rendimiento observado en arroz partido. El bagazo de caña (T5) destacó por obtener la mayor viabilidad del conjunto (99 %), lo que evidencia que su estructura fibrosa y porosa crea condiciones favorables para la germinación y fisiología del hongo, aun cuando los valores de esporulación fueron moderados. Finalmente, el biochar (T19) se confirmó como un sustrato insuficiente por sí solo: aunque permitió cierto nivel de conidiación, su aporte nutricional limitado resultó en una producción extremadamente baja de biomasa (UFC/g), junto con una viabilidad casi nula.

Tabla 9

Resultados de ensayo de masificación de trichodermas en sustratos individuales en arroz, trigo, bagazo y biochar

Tratamiento	Sustrato	UFC/g	Esporas/g	Viabilidad
T1	Arroz partido	2.72E+08	3.48E+08	78.16%
T2	Arroz en polvo	1.52E+08	7.22E+08	21.05%
T3	Trigo entero	2.00E+08	7.72E+08	25.91%
T4	Trigo en polvo	1.20E+08	3.58E+08	33.52%
T5	Bagazo de caña	2.08E+08	2.10E+08	99.05%
T19	Biochar	2.40E+06	3.92E+08	0.61%

Masificación de trichodermas en sustratos individuales

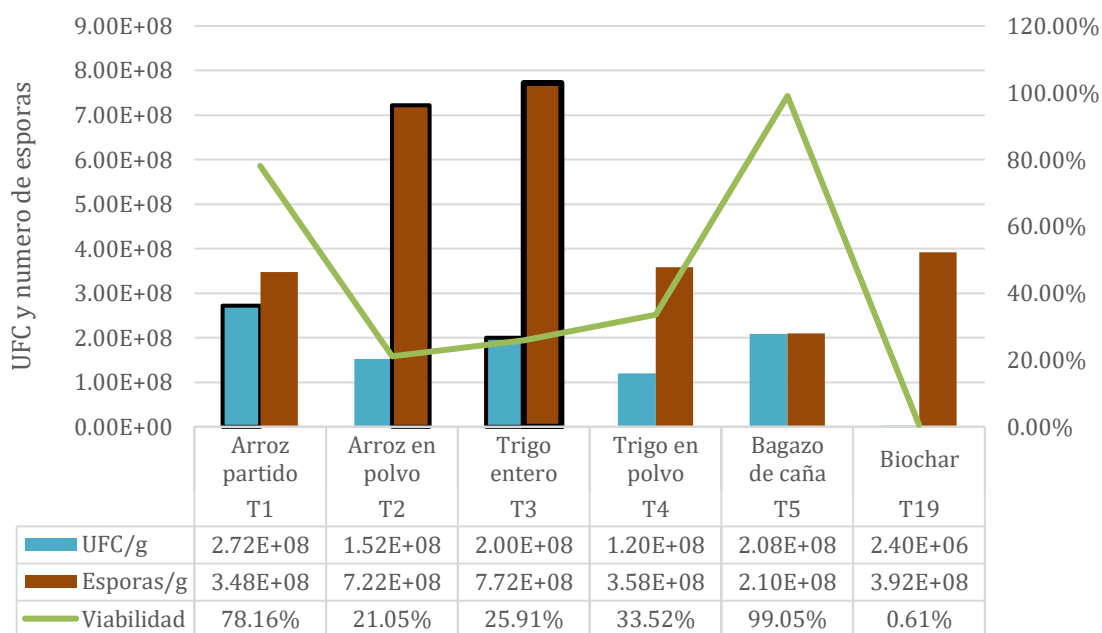


Figura 71

Producción de UFC, esporas y viabilidad de *Trichoderma* en sustratos individuales

4.6.2. Combinaciones de sustratos

Las combinaciones de sustratos mostraron comportamientos diferenciados según el tipo de asociación entre materiales ricos en carbono, fibra y almidón. Las mezclas basadas en arroz partido, trigo y bagazo produjeron respuestas que variaron desde incompatibilidades fisiológicas, como en el caso de T7 (0 % de viabilidad), hasta sinergias importantes, como en T9, cuyo contenido de UFC/g (4.00×10^8) y esporas/g (1.00×10^9) se ubicó entre los más altos del conjunto.

Dentro de este grupo, destaca el tratamiento T21 (Arroz polvo + Trigo polvo), que no solo registró el valor más elevado de UFC/g del estudio completo (6.72×10^8), sino también altos niveles de esporulación y una viabilidad robusta (72.73 %). Este resultado sugiere que las mezclas de cereales finamente molidos proporcionan un balance óptimo entre nutrientes disponibles, humedad y superficie efectiva para el desarrollo del micelio.

Las combinaciones con bagazo (T11, T12) mostraron buenos niveles de biomasa y conidios, lo que evidencia que la adición de fibra vegetal contribuye a una aireación adecuada del sustrato. No obstante, algunas mezclas como T13 y T14 reflejan niveles de esporulación elevados, pero viabilidades extremadamente bajas, lo que indica que la estructura del sustrato genera un estrés que favorece la conidiación, pero limita la germinación.

Tabla 10

Resultados de ensayo de masificación de trichocermas en sustratos en combinaciones de sustratos

Tratamiento	Sustrato	UFC/g	Esporas/g	Viabilidad
T6	Arroz partido + Arroz en polvo	2.00E+08	1.87E+09	10.67 %
T7	Arroz partido + Trigo entero	0.00E+00	2.40E+08	0.00 %
T8	Arroz partido + Trigo en polvo	4.80E+07	1.24E+08	38.71 %
T9	Arroz partido + Bagazo	4.00E+08	1.00E+09	40.00 %
T10	Arroz en polvo + Trigo en polvo	1.60E+08	2.00E+08	80.00 %
T11	Arroz en polvo + Bagazo	3.60E+08	5.74E+08	62.72 %
T12	Trigo entero + Trigo en polvo	1.28E+08	2.22E+08	57.66 %
T13	Trigo en polvo + Bagazo	1.60E+07	2.84E+08	5.63 %
T14	Trigo entero + Bagazo	2.56E+07	7.40E+08	3.46 %
T21	Arroz polvo + Trigo polvo	6.72E+08	9.24E+08	72.73 %

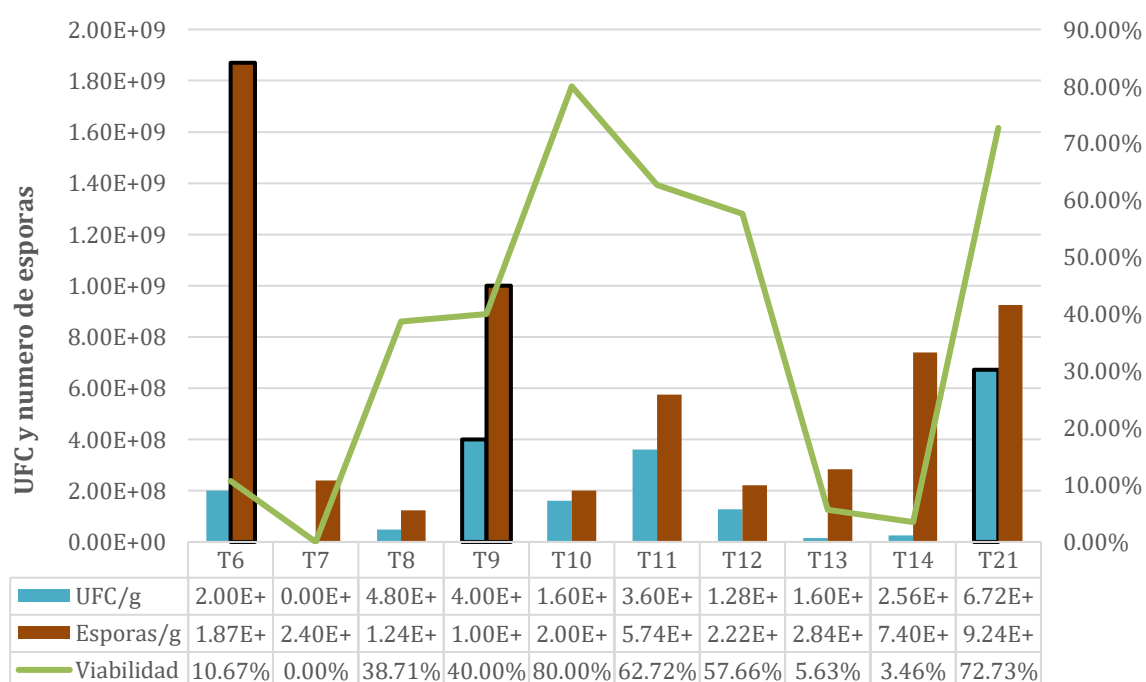


Figura 72

Producción de UFC, esporas y viabilidad de Trichoderma en sustratos combinados

4.6.3. Combinación de sustratos con biochar (biochar + cereales o bagazo).

Las mezclas que incorporaron biochar presentaron los niveles más altos de esporulación de todo el estudio, evidenciando que este material actúa como un regulador físico que aumenta la aireación, la superficie de adhesión y la porosidad del sustrato. Los tratamientos T15, T16, T17 y T18 lograron esporulaciones superiores a 1.5×10^9 conidios/g, alcanzando valores máximos en T17 (2.73×10^9), lo cual posiciona estas combinaciones como altamente efectivas cuando el objetivo es generar grandes cantidades de conidios.

Sin embargo, la viabilidad observada en estas mezclas fue en general baja (entre 13 % y 22 %), lo que indica que el biochar favorece la esporulación, pero no las condiciones ideales para la germinación. Esta observación coincide con el comportamiento fisiológico típico de *Trichoderma* bajo condiciones de estrés: mayor conidiación como estrategia de supervivencia, pero menor disponibilidad de conidios metabólicamente activos.

El tratamiento T20 (Biochar + Bagazo) fue el único dentro del grupo que mostró una viabilidad más elevada (42.86 %), lo que podría atribuirse a la capacidad del bagazo de retener humedad y aportar compuestos carbonados más accesibles, amortiguando parcialmente el estrés osmótico generado por el biochar.

Tabla 11

Ensayo de Masificación de Trichodermas en combinaciones con biochar (biochar + cereales o bagazo)

Tratamiento	Sustrato	UFC/g	Esporas/g	Viabilidad
T15	Biochar + Trigo molido	3.36E+08	1.60E+09	21.00%
T16	Biochar + Trigo entero	4.80E+08	2.09E+09	22.99%
T17	Biochar + Arroz en polvo	3.68E+08	2.73E+09	13.50%
T18	Biochar + Arroz partido	4.16E+08	1.84E+09	22.63%
T20	Biochar + Bagazo de caña	1.20E+08	2.80E+08	42.86%

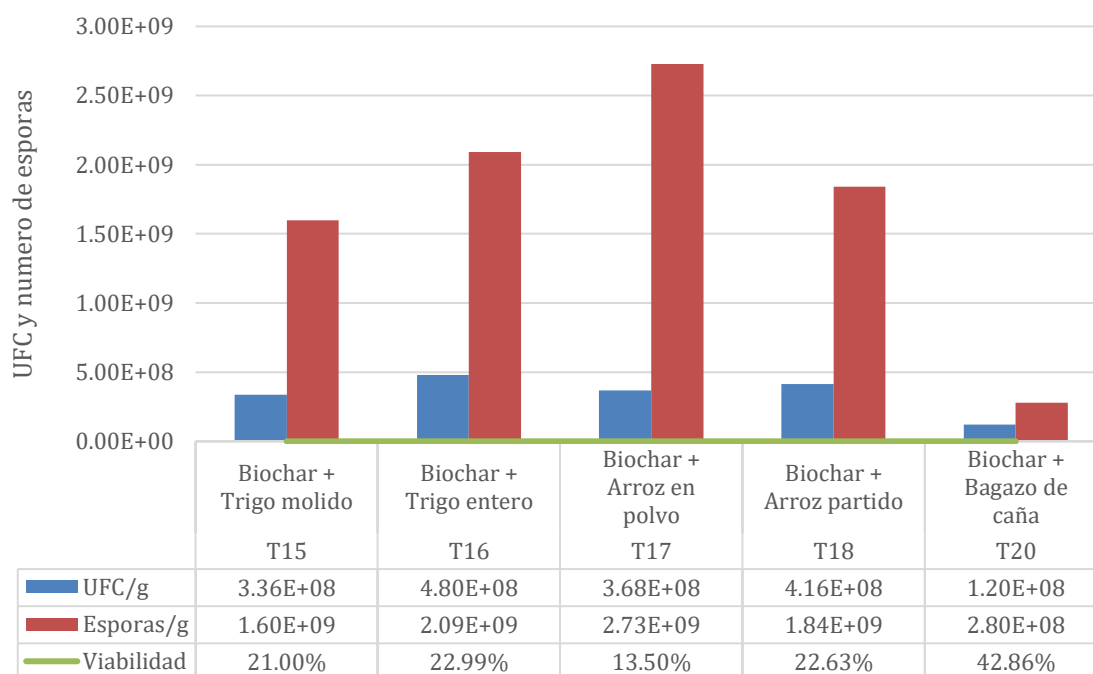


Figura 73

UFC, numero de esporas y viabilidad en sustratos combinables

4.6.4. Análisis comparativo de sustratos.

La síntesis comparativa revela patrones claros que facilitan la selección del sustrato adecuado según el objetivo productivo. Para la **producción de biomasa (UFC/g)**, la mezcla T21 (Arroz polvo + Trigo polvo) constituye la formulación más eficiente, superando ampliamente al resto de tratamientos, seguida por combinaciones con biochar (T16 y T18), lo que indica que tanto la molienda fina como la aireación adicional contribuyen al crecimiento micelial.

En términos de **esporulación**, las mezclas enriquecidas con biochar se posicionaron como las más efectivas, con T17 alcanzando la esporulación más alta del estudio (2.73×10^9 esporas/g). Este comportamiento confirma el rol del biochar como estimulador físico del proceso de conidiación. Sin embargo, estas mismas formulaciones no fueron necesariamente las mejores en cuanto a germinación.

Finalmente, la **viabilidad** estuvo dominada por los sustratos con mayor aporte de fibra orgánica y humedad estable, principalmente el bagazo de

caña (T5), que superó el 99 %, seguido por mezclas de cereales como T10 y T21. Esto demuestra que la estructura del sustrato es el factor más determinante para la germinación, mientras que la esporulación responde con mayor sensibilidad a la disponibilidad de aireación y superficie.

a) Tratamientos con mayor biomasa (UFC/g)

En esta tabla se presentan los tratamientos que alcanzaron los valores más altos de UFC/g, reflejando qué formulaciones ofrecieron las mejores condiciones para el desarrollo micelial. Estos resultados permiten identificar sustratos con alto potencial para procesos de producción donde se requiera maximizar la proliferación del hongo antes de la etapa de esporulación.

Tabla 12

Tratamientos con mayor biomasa (UFC/g)

Tratamiento	Sustrato	UFC/g
T21	Arroz en polvo + Trigo en polvo	6.72×10^8
T16	Biochar + Trigo entero	4.80×10^8
T18	Biochar + Arroz partido	4.16×10^8
T9	Arroz partido + Bagazo	4.00×10^8

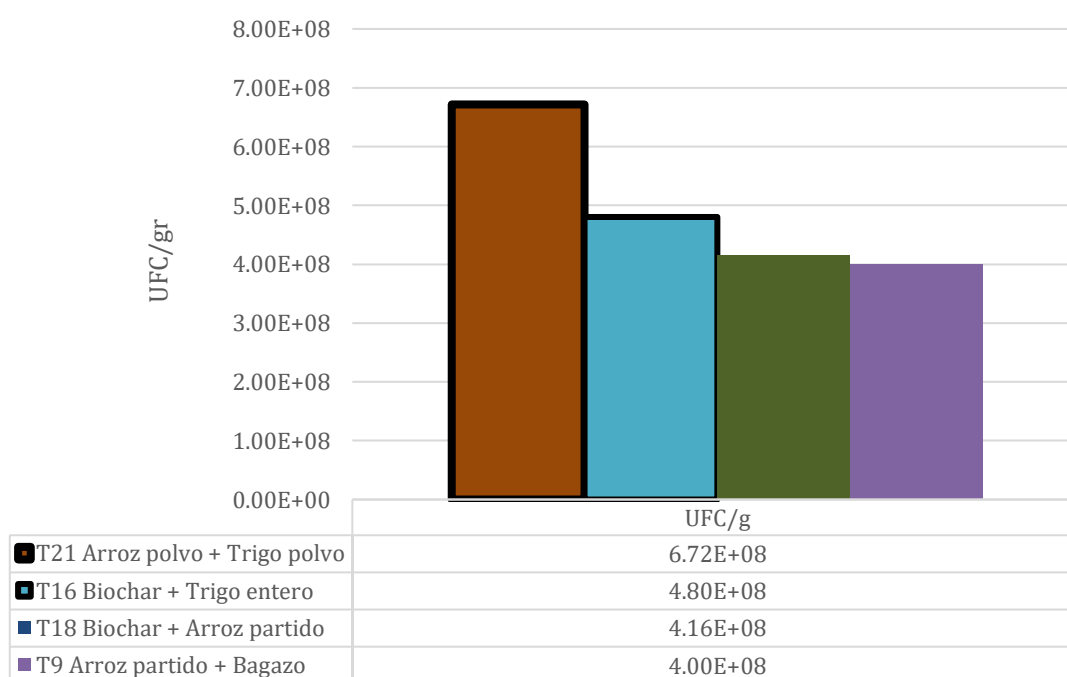


Figura 74

Tratamientos con mayor biomasa (UFC/g)

b) Tratamientos con mayor esporulación (esporas/g)

La esporulación representa un parámetro fundamental para la generación de inóculos comerciales de *Trichoderma*, ya que la concentración de conidios determina directamente la calidad biológica y el poder infectivo del producto final. La siguiente tabla resume los tratamientos que alcanzaron las mayores concentraciones de esporas por gramo, permitiendo distinguir aquellos sustratos que favorecieron la conidiación masiva. Esta información es esencial para seleccionar formulaciones orientadas a la producción de altos volúmenes de conidios viables para uso agrícola.

Tabla 13

Tratamientos con mayor esporulación (esporas/g)

Tratamiento	Sustrato	Esporas/g
T17	Biochar + Arroz en polvo	2.73E+09
T16	Biochar + Trigo entero	2.09E+09
T18	Biochar + Arroz partido	1.84E+09
T15	Biochar + Trigo molido	1.60E+09
T21	Arroz polvo + Trigo polvo	9.24E+08

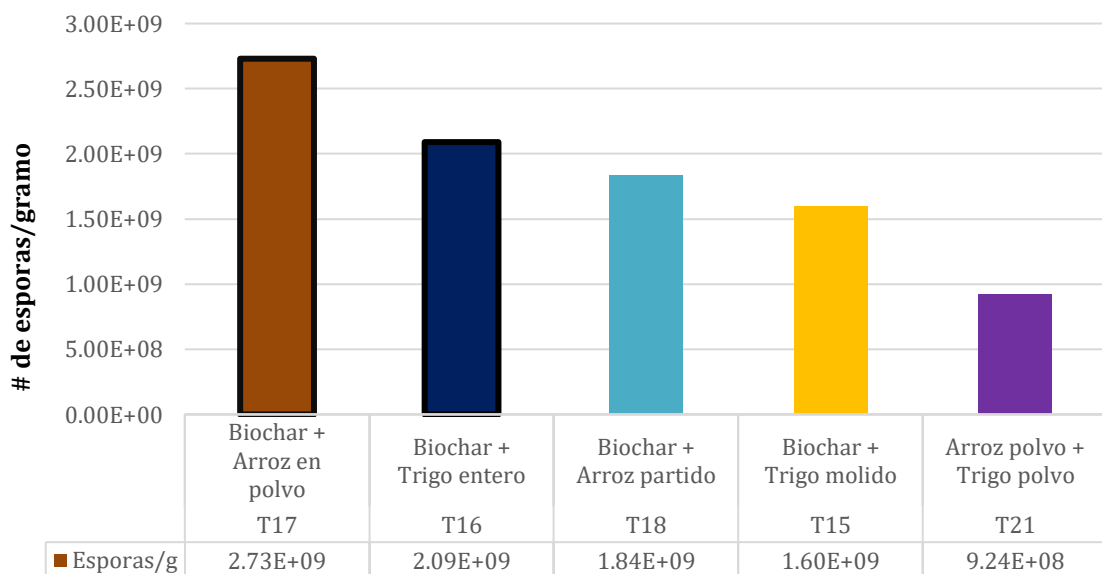


Figura 75

Tratamientos con mayor esporulación (esporas/g).

c) Tratamientos con mayor viabilidad (%)

La viabilidad de los conidios refleja la proporción de esporas capaces de germinar y establecer colonias activas, siendo un parámetro determinante para la eficacia biológica de los productos basados en *Trichoderma*. En esta tabla se muestran los tratamientos que registraron los mayores porcentajes de viabilidad, evidenciando qué sustratos proporcionaron las condiciones más favorables para la germinación. Estos resultados son cruciales para identificar formulaciones con alto potencial para aplicaciones donde la calidad fisiológica del inóculo es más importante que la cantidad total de esporas.

Tabla 14

Tratamientos con mayor porcentaje de viabilidad de Trichoderma spp. producidos en sustratos orgánicos mediante fermentación en estado sólido

Tratamiento	Sustrato	Viabilidad
T5	Bagazo de caña	99.05 %
T10	Arroz polvo + Trigo polvo	80.00 %
T1	Arroz partido	78.16 %
T21	Arroz polvo + Trigo polvo	72.73 %

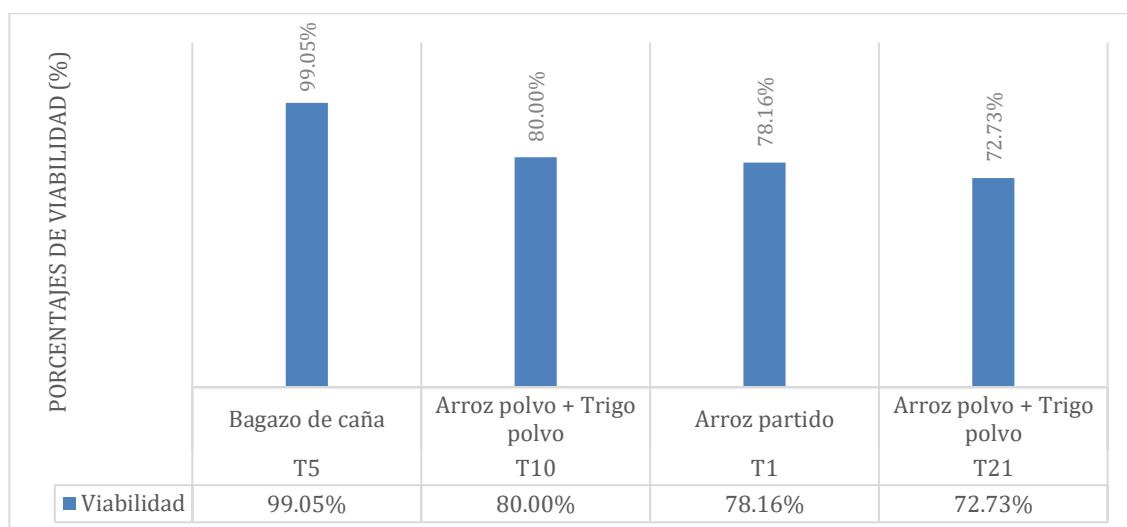


Figura 76

Tratamientos con mayor viabilidad (%).

Los resultados obtenidos y mostrados en los ítems anteriores nos permiten plantear las siguientes **discusiones**:

El aislamiento de *Trichoderma* spp. nativos a partir de la rizosfera del cultivo de banano (*Musa* sp.) en la provincia de Sullana - Piura confirma que este nicho edáfico constituye un reservorio natural relevante de hongos antagonistas con potencial para el control biológico de patógenos del suelo. Diversos estudios coinciden en que la rizosfera de banano alberga una alta diversidad de especies del género *Trichoderma*, particularmente en sistemas agrícolas donde existe una interacción constante entre la planta hospedera, el suelo y la microbiota asociada, lo que favorece la selección natural de microorganismos adaptados a condiciones locales y capaces de competir eficazmente en ese entorno.

En este contexto, la obtención de 12 cepas con características morfológicas compatibles con *Trichoderma* spp. en el presente estudio es consistente con lo reportado en investigaciones realizadas en otras regiones productoras de banano, donde se han recuperado múltiples aislados rizosféricos con variabilidad fenotípica y funcional. Estudios desarrollados en suelos rizosféricos de banano en Europa, Asia y América (Colagiero *et al.*, 2025, Delgado *et al.*, 2024, Yao *et al.*, 2024 y Ciancio *et al.*, 2022).

De las 12 cepas que se lograron aislar de la rizosfera del cultivo de banano (*Musa* sp.), la cepa que presentó la mayor capacidad de inhibición del crecimiento micelial y los niveles más altos de micoparasitismo frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc TR4) fue identificada molecularmente como *Trichoderma harzianum*, lo cual concuerda con numerosos antecedentes científicos que posicionan a esta especie como uno de los antagonistas más eficaces contra el agente causal de la fusariosis del banano.

La identificación de *T. harzianum* como la cepa sobresaliente en el presente estudio es consistente con reportes que indican que los aislados de esta especie, particularmente aquellos obtenidos de la rizosfera del cultivo hospedero, presentan una elevada capacidad competitiva y un comportamiento antagonista superior frente a Foc, atribuible a su adaptación ecológica al sistema suelo-raíz del banano

(Bubici *et al.*, 2019). Diversos estudios han demostrado que *T. harzianum* puede inhibir significativamente el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en ensayos de confrontación dual, alcanzando porcentajes de inhibición superiores al 70 %, valores comparables a los obtenidos en esta investigación, lo que confirma la robustez de su acción antagonista (Khan *et al.*, 2017).

Asimismo, la elevada capacidad micoparasítica observada en la cepa identificada como *T. harzianum*, evidenciada por contacto hifal, enrollamiento y sobrecrecimiento sobre el micelio del patógeno, coincide con los mecanismos descritos en la literatura como determinantes en el control biológico de *Fusarium* en banano, donde el micoparasitismo activo se considera un rasgo clave para la supresión del patógeno en el suelo (Castillo *et al.*, 2019).

Adicionalmente, estudios realizados en condiciones de vivero y campo han demostrado que la aplicación de *T. harzianum*, sola o en consorcio con otros microorganismos benéficos, reduce significativamente la severidad de la marchitez por *Fusarium* en plantas de banano infectadas con Foc, incluyendo aislamientos altamente virulentos asociados a la Raza 4 Tropical, y mejora parámetros fisiológicos y de crecimiento del hospedero, lo que sugiere no solo un efecto antagonista directo, sino también un rol en la inducción de resistencia sistémica en la planta (Wong *et al.*, 2021).

En este sentido, los resultados del presente estudio refuerzan la evidencia científica existente que señala a *Trichoderma harzianum* como un agente de control biológico altamente eficiente y confiable para el manejo sostenible de la fusariosis del banano, y destacan la importancia de la selección de cepas nativas de la rizosfera como una estrategia clave frente a la amenaza creciente que representa Foc TR4 en los sistemas productivos bananeros.

Los resultados obtenidos en los ensayos de masificación de *Trichoderma spp.* evidencian que el tipo, la estructura física y la composición nutricional del sustrato influyen de manera determinante en la producción de biomasa, la esporulación y la viabilidad de los conidios. Estos hallazgos concuerdan con diversos estudios previos que señalan que la eficiencia productiva de *Trichoderma* en fermentación

sólida depende principalmente de la disponibilidad de carbono fácilmente asimilable, la porosidad del sustrato y la capacidad de retención de humedad (Pandey *et al.*, 2000).

En los sustratos individuales, el arroz partido mostró un desempeño equilibrado entre producción de UFC/g y viabilidad, lo que puede atribuirse a su estructura granulada, que favorece una adecuada aireación y una difusión homogénea de nutrientes. Esto ha sido ampliamente documentado en procesos de fermentación sólida con *Trichoderma*, donde sustratos como el arroz actúan como matrices eficientes (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2010). Por su parte Naeimi (2020) sugiere que la compactación excesiva afecta la aireación del sustrato y la viabilidad de los conidios, tal como ha sido reportado en procesos de fermentación sólida con *Trichoderma*.

El bagazo de caña destacó por registrar la mayor viabilidad de todo el estudio (> 99 %), confirmando que los sustratos fibrosos con alta capacidad de retención de humedad favorecen la germinación y la estabilidad fisiológica de los conidios. Lo que ha sido reportado en estudios sobre fermentación sólida utilizando residuos lignocelulósicos en *Trichoderma* (Rodríguez-León *et al.*, 1999). No obstante, su menor esporulación relativa indica que, aunque es ideal para mantener viabilidad, no necesariamente maximiza la producción de inóculo cuando se busca alta concentración de conidios.

Las combinaciones de sustratos mostraron respuestas diferenciadas, evidenciando efectos sinérgicos y antagonistas entre los componentes. El tratamiento T21 (arroz en polvo + trigo en polvo) registró el mayor valor de UFC/g del estudio, lo que sugiere que la combinación de cereales finamente molidos optimiza la disponibilidad de carbohidratos, aminoácidos y superficie de colonización, favoreciendo la proliferación micelial. Resultados similares han sido reportados en estudios de fermentación sólida donde se señala que la combinación de sustratos mejora la disponibilidad de nutrientes y la producción de biomasa fúngica (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas combinaciones, como arroz partido + trigo entero, mostraron viabilidad nula, lo que pone de manifiesto que no todas las asociaciones físicas son compatibles desde el punto de vista fisiológico.

La incorporación de biochar en los sustratos generó los niveles más altos de esporulación observados en el estudio, alcanzando hasta 2.73×10^9 esporas/g. Este comportamiento confirma el rol del biochar como modulador físico del microambiente, incrementando la porosidad, la aireación y la superficie de adhesión para el micelio. Diversos autores han señalado que el biochar induce respuestas de estrés controlado en hongos benéficos, estimulando la conidiación como mecanismo adaptativo (Lehmann *et al.*, 2011; Blok *et al.*, 2017 y Sánchez-Monedero *et al.*, 2020).

No obstante, la baja viabilidad asociada a estas mezclas indica que el estrés generado compromete la calidad fisiológica de los conidios, un aspecto crítico para aplicaciones agrícolas. El tratamiento biochar + bagazo de caña mostró una mejora relativa en la viabilidad, lo que sugiere que la fibra vegetal actúa como un amortiguador del estrés osmótico inducido por el biochar. Este resultado es consistente con estudios que destacan la importancia de combinar materiales estructurales con fuentes orgánicas más blandas para equilibrar producción y calidad del inóculo

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Se aislaron doce cepas nativas de *Trichoderma* spp. a partir de la rizósfera de banano (*Musa* spp.), las cuales presentaron características morfológicas típicas del género, evidenciando su alta diversidad y adaptación a las condiciones edafoclimáticas locales.
2. Todas las cepas mostraron actividad antagonista in vitro frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc TR4), aunque con diferencias significativas en su eficacia, confirmando la dependencia del potencial biocontrolador respecto al genotipo.
3. Las cepas LIG1, LIG2 y LIG3 registraron los mayores niveles de inhibición (> 71 %) y altos grados de micoparasitismo (Grados 3 ó 4), evidenciando mecanismos de control efectivos como sobrecrecimiento, invasión del patógeno y esporulación activa.
4. La cepa LIG2 fue la más destacada, con 72,43 % de inhibición, micoparasitismo Grado 4 y alta capacidad esporulante, lo que la posiciona como candidata óptima para producción masiva y formulación de bioinsumos.
5. La identificación molecular (región ITS) confirmó que la cepa LIG2 corresponde a *Trichoderma harzianum* (99,52 % de similitud), validando su identificación y respaldando su uso como agente de control biológico.
6. La fermentación en estado sólido con sustratos orgánicos agroindustriales demostró ser una alternativa viable y de bajo costo para la producción masiva de *Trichoderma*, con altos niveles de colonización y esporulación.

7. Los sustratos con biochar (combinados con arroz o trigo) alcanzaron las mayores concentraciones de esporas (hasta $2,73 \times 10^9$ esporas/g), evidenciando su efecto positivo en la aireación y retención de humedad.
8. El bagazo de caña destacó por su alta viabilidad (99,05 %), siendo adecuado para formulaciones donde se prioriza la estabilidad del inoculante.
9. La formulación T21 (arroz + trigo) presentó la mayor biomasa viable ($6,72 \times 10^8$ UFC/g), constituyendo una opción eficiente y accesible para producción semindustrial.
10. La producción masiva de *Trichoderma harzianum* nativo en sustratos orgánicos locales es técnica y económicamente factible, representando una alternativa sostenible para el manejo de Foc TR4 en banano.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

1. Continuar con la evaluación de la cepa *Trichoderma harzianum* LIG2 en condiciones de vivero y campo, con el fin de validar su eficacia biocontroladora frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 Tropical (Foc TR4) bajo condiciones reales de cultivo, considerando diferentes estados fenológicos del banano y tipos de suelo representativos de la región.
2. Elaborar una formulación del inoculante en diferentes presentaciones (polvo mojable, gránulos, suspensión concentrada o compost enriquecido), utilizando los sustratos orgánicos que mostraron mayor desempeño (biochar, arroz y trigo), con el objetivo de mejorar la estabilidad, vida útil y facilidad de aplicación del producto en campo.
3. Optimizar los parámetros de fermentación en estado sólido, tales como humedad inicial, tamaño de partícula del sustrato, aireación, tiempo de incubación y concentración inicial de inóculo, para maximizar la producción de esporas y garantizar la uniformidad del producto a escala semindustrial.
4. Realizar estudios de compatibilidad de la cepa *Trichoderma harzianum* LIG2 con otras prácticas de manejo agronómico, como fertilización orgánica, biofertilizantes microbianos, enmiendas orgánicas y uso de microorganismos benéficos consorciados, a fin de integrar su uso dentro de programas de manejo integrado del cultivo.
5. Evaluar el impacto del biochar inoculado con *Trichoderma* sobre la microbiota del suelo, incluyendo posibles efectos sobre microorganismos benéficos nativos, propiedades fisicoquímicas del suelo y supresividad

natural frente a patógenos, mediante estudios microbiológicos y, de ser posible, análisis metagenómicos.

6. Estandarizar protocolos de producción, control de calidad y conservación del inoculante, incluyendo pruebas de viabilidad, concentración de esporas, pureza microbiológica y estabilidad durante el almacenamiento, para garantizar un producto confiable y reproducible.
7. Evaluar la persistencia y capacidad de colonización rizosférica de la cepa *Trichoderma harzianum* LIG2 en el tiempo, mediante re-aislamientos periódicos o herramientas moleculares, con el fin de determinar la frecuencia óptima de aplicación en campo.
8. Capacitar a productores y técnicos agrícolas en el uso adecuado de bioinsumos a base de *Trichoderma*, enfatizando buenas prácticas de manejo, momentos de aplicación y compatibilidad con otros insumos, para maximizar la eficacia del control biológico y promover su adopción sostenible.
9. Analizar la viabilidad económica del proceso de producción masiva, comparando costos de sustratos, infraestructura y mano de obra con biofungicidas comerciales disponibles, a fin de fortalecer la toma de decisiones para su eventual escalamiento y comercialización.
10. Realizar investigaciones que incluyan evaluaciones integrales de impacto ambiental, considerando la reducción del uso de fungicidas sintéticos, la mejora de la salud del suelo y los beneficios ecosistémicos asociados al uso de microorganismos nativos, contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas bananeros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, R. K., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, J. A., Ureta, C., Cabrera-Pintado, R. M., Rojas, J. C., López, D., Cenci, A., Cuellar, W. J., & Dita, M. (2022). *First report of Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 causing Fusarium wilt in Cavendish bananas in Peru*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>
- Alliance of Bioversity International & CIAT. (2025). Banana farmers in Piura face the hidden cost of Fusarium TR4: The potential to wipe out their livelihoods. CGIAR. <https://alliancebioiversityciat.org/newsevents/news/bananafarmers-piura-face-hidden-cost-fusarium-tr4>
- Arango-Isaza, R. E., Díaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C., Dardick, C., De Maayer, P., Debode, J., De Vries, R. P., Dietrich, R., et al. (2016). *Combating a global threat to a clonal crop: Banana black Sigatoka pathogen Pseudocercospora fijiensis genomes reveal clues for disease control*. PLOS Genetics, 12(8), e1005876. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260. <https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>
- Bissett, J. (1991a). A revision of the genus Trichoderma. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357–2372. <https://doi.org/10.1139/b91-297>
- Bissett, J. (1991b). A revision of the genus Trichoderma. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2373–2417. <https://doi.org/10.1139/b91-298>
- Bissett, J. (1991c). A revision of the genus Trichoderma. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2418–2420. <https://doi.org/10.1139/b91-299>
- Blok, C., van der Salm, C., Hofland-Zijlstra, J., Streminska, M., Eveleens-Clark, B., Regelink, I., Fryda, L., & Visser, R. (2017). *Biochar for horticultural rooting media improvement: Evaluation of biochar from gasification and slow pyrolysis*. *Agronomy*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010006>

- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). *Biological control agents against Fusarium wilt of banana*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Castillo, A. G., Puig, C. G., & Cumagun, C. J. R. (2019). Non-synergistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Pathogens*, 8(2), 43. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020043>
- Ciancio, A., Rosso, L. C., Lopez-Cepero, J., & Colagiero, M. (2022). Rhizosphere metabarcoding profiles. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855110>
- Correa-Delgado, R., Brito-López, P., Jaizme Vega, M. C., & Laich, F. (2024). Biodiversity of *Trichoderma* species. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1376602.
- Cortes-Hernández, Fabiola del Carmen; Alvarado-Castillo, Gerardo & Sánchez-Viveros (2023). *Trichoderma* spp., una alternativa para la agricultura sostenible: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XXV, núm. 2, pp. 73-87, 2023. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v25n2.111384>
- Damodaran T, Rajan S, Muthukumar M, Ram Gopal, Yadav K, Kumar S, Ahmad I, Kumari N, Mishra VK and Jha SK (2020) Biological Management of Banana Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 Using Antagonistic Fungal Isolate CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*). *Front. Microbiol.* 11:595845. doi: 10.3389/fmicb.2020.595845
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2024). *Fusarium* Tropical Race 4 in Latin America. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1397617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1397617>
- Drenth, A., & Kema, G. (2021). Vulnerability of bananas. *Phytopathology*, 111(12), 2146–2161.
- Druzhinina, I. S., et al. (2011). *Trichoderma* genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759.
- EPPO. (2023). *Fusarium oxysporum* TR4. <https://gd.eppo.int/taxon/FUSACU>

- Ezziyyani, M., Pérez, C., Sid A., Requena, M., & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). In *Anales de biología* (Vol. 26, No. 26, pp. 35-45). Murcia, Spain: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. <https://bucketvirtualprivate.s3.amazonaws.com/files-bv/20061001/20061001-043.pdf>
- FAO (2024) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). *Urges more cooperation in banana sector, significant for some least developed and low-income food-deficit countries and smallholder farmers*. https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-urges-more-cooperation-in-banana-sector--significant-for-some-least-developed-and-low-income-food-deficit-countries-and-smallholder-farmers/en?utm_source=chatgpt.com
- FAO. (2024). Preventing global plant health threats. <https://www.fao.org>
- FAO. (2025a). Conceptos básicos sobre la Raza 4 Tropical. <https://www.fao.org>
- FAO. (2025b). TR4 Basics. <https://www.fao.org>
- FreshFruitPortal. (2024). Fusarium TR4 cuts Piura production. <https://www.freshfruitportal.com>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.
- Jambhulkar, P. P., Singh, B., Raja, M., Ismaiel, A., Lakshman, D. K., Tomar, M., & Sharma, P. (2024). *Genetic diversity and antagonistic properties of Trichoderma strains from the crop rhizospheres in southern Rajasthan, India*. *Scientific Reports*, 14, 8610. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58302-5>
- Kadu, T. P., Gade, R. M., Rathod, J. P., Paraskar, S., Malghane, B., & Shedmake, A. (2019). *Rapid and efficient procedure for genomic DNA extraction from Trichoderma spp.* *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(5), 993–996. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.805.116>
- Khan, R. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2017). *Bioactive secondary metabolites from Trichoderma spp. against Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08922-5>

- Kubicek, C. P., et al. (2011). Comparative genome analysis of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40.
- Kumar, V., et al. (2023). Mass production of *Trichoderma*. *Agriculture*, 13(10), 2022.
- Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., & Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 395–417.
- Martínez de la Parte, E., Pérez-Vicente, L., García-Bastidas, F. A., Bermúdez-Carballoso, I., Schnabel, S., Meijer, H. J. G., & Kema, G. H. J. (2024). *The vulnerability of Cuban banana production to Fusarium wilt caused by Tropical Race 4*. *Phytopathology*, 114(1), 111–118. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-23-0127-R>
- Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., & Van Wees, S. C. M. (2017). *Phyto-stimulation and biocontrol by Trichoderma spp.: New insights into mechanisms and applications*. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.010>
- MIDAGRI (2024). Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego *Estadísticas de producción de plátano en el Perú 2023*. Lima, Perú. <https://agraria.pe/noticias/produccion-de-banano-de-peru-alcanzo-las-2-414-382-toneladas-37112>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma research in the genome era*. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Munhoz, T., Vargas, J., Teixeira, L., Staver, C., & Dita, M. (2024). *Fusarium Tropical Race 4 in Latin America and the Caribbean: status and global research advances towards disease management*. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1397617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1397617>
- Naeimi, S., Khosravi, V., Varga, A., Vágvolgyi, C., & Kredics, L. (2020). Evaluación de sustratos orgánicos para la fermentación en estado sólido, viabilidad y

- bioeficacia de *Trichoderma harzianum* AS12-2, una cepa de biocontrol contra la enfermedad de la vaina del arroz. *Agronomía*, 10 (9), 1258. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091258>
- Ortiz Quintero, K. M., Pinzón Núñez, A. M., Pérez Ochoa, G. M., Arango Palacio, L., & Zapata Henao, S. (2025). *Evaluación de cepas de Trichoderma spp. con actividad antagónica contra Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 1 en la región de Urabá, Colombia*. *Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia* 2(1): 99 <https://www.acorbat-rtc.com/volumenes/vol25/4-ARTC-2599.pdf>
- Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). *New developments in solid-state fermentation: I – Bioprocesses and products*. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
- Ploetz, R. C. (2015). *Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4*. *Crop Protection*, 73, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007>
- ProMusa. (2023). *Tropical Race 4 (TR4)*. Disponible en: <https://www.promusa.org/Tropical+Race+4+-+TR4>
- Rezende, L. C. et al. (2020) *Optimizing mass production of Trichoderma asperelloides by submerged liquid fermentation and its antagonism against Sclerotinia sclerotiorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s11274-020-02882-7
- Rifai, M. A. (1969). Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116, 1–56.
- Rimkus et al. (2023). *Impact of Growth Conditions on the Viability of Trichoderma asperellum during Storage*. *Microorganisms*. https://www.mdpi.com/2076-2607/11/4/1084?utm_source=chatgpt.com
- Rodríguez-León, J. A., Domenech, F., León, M., Méndez, T., Rodríguez, D. E., & Pandey, A. (1999). *Production of spores of Trichoderma harzianum on sugar cane molasses and bagasse pith in solid-state fermentation for biocontrol*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(1). <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000100010>

- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M.-C., De Respinis, S., & Petrini, O. (2012). *Trichoderma asperellum sensu lato consists of two cryptic species*. *Mycologia*, 104(4), 944–966. <https://doi.org/10.3852/11-389>
- Sánchez-Monedero, M. A., Cayuela, M. L., Roig, A., Jindo, K., Mondini, C., & Bolan, N. (2020). Role of biochar as an additive in organic waste composting. *Bioresource Technology*, 247, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.193>
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Vinale, F., et al. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10.
- Wong, M. H., CABI authors, et al. (2021). *Biological control of Fusarium wilt of banana: current status and future prospects*. *Crop Protection*, 143, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105>
- Yonow T, Ramirez-Villegas J, Abadie C, Darnell RE, Ota N, Kriticos DJ. Black Sigatoka in bananas: Ecoclimatic suitability and disease pressure assessments. *PLoS One*. 2019 Aug 14;14(8):e0220601.
Doi: 10.1371/journal.pone.0220601. PMID: 31412052; PMCID: PMC6693783.
- Zhang, C., Ali Khan, R. A., Wei, H., Wang, R., Hou, J., & Liu, T. (2022). *Rapid and mass production of biopesticide Trichoderma Brev T069 from cassava peels using newly established solid-state fermentation bioreactor system*. *Journal of Environmental Management*, 313, 114981. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114981>
- Zhang, J. D., & Yang, Q. (2015). *Optimization of solid-state fermentation conditions for Trichoderma harzianum using an orthogonal test*. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1771–1781. <https://doi.org/10.4238/2015.March.13.4>

- Zhou, G.-D., He, P., Tian, L., Xu, S., Yang, B., Liu, L., Wang, Y., Bai, T., Li, X., Li, S., & Zheng, S.-J. (2023). *Disentangling the resistant mechanism of Fusarium wilt TR4 interactions with different cultivars and its elicitor application*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1145837. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145837>
- Zhu, Y., et al. (2023). *Banana (Musa spp.) production, trade, and challenges in sustainable cultivation*.