



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. y evaluación de su actividad antagonista
contra *Fusarium* sp. patogénico del plátano**

Por: Lineth Barría 9-759-1874

**Proyecto de tesis presentado como requisito
para optar al Grado de Licenciatura en Biología
Con Orientación en Microbiología y Parasitología.**

Asesorado por el profesor Cecilio Puga.

Panamá, Abril 2026.

Dedicatoria

A la niña que fui,
por nunca dejar de soñar.

Agradecimientos

Con profunda gratitud y humildad, dedico este trabajo.

En primer lugar, a Dios, por su inmenso amor y por guiar cada uno de mis pasos.

A mi profesor, Cecilio Puga, por su apoyo, mentoría, paciencia y por inspirarme a alcanzar nuevas metas. Al Laboratorio 214 de Biotecnología Microbiana, por ser el espacio donde mi creatividad floreció, en donde pude investigar, aprender y consolidar esta tesis.

A todos mis profesores, cuya dedicación iluminó cada etapa de mi formación académica.

A mi querida tía Magaly Barría, por su inquebrantable apoyo; a mis sobrinos que con su ternura y alegría me brindaron consuelo en mis días más difíciles; a mi hermosa abuela Gladys por su dulzura, a mi bella madre por su cariño; a mi padre, hermanos y a toda mi familia, pilares fundamentales de mi vida, quienes con su amor incondicional hicieron posible este logro.

A mis queridos amigos y compañeros de esta travesía universitaria, quienes hicieron cada desafío más llevadero. Asimismo, a la Universidad de Panamá, mi casa de estudios, por brindarme la oportunidad de crecer. Finalmente gracias a cada uno de ustedes por formar parte de este importante capítulo de mi vida.

Resumen

Este estudio se centró en la caracterización morfológica detallada de 15 cepas de hongos (14 *Trichoderma* spp. y 1 *Gliocladium* sp.) y en la evaluación de su capacidad antagonista *in vitro* contra una cepa de *Fusarium* sp., patogénica del plátano. Todas las cepas mostraron actividad antagonista contra la cepa de *Fusarium* sp., con lo que se destacó la competencia por el espacio y los nutrientes en 11 cepas y por el micoparasitismo en 4 cepas (N3, N4, N12, N15); además, 3 cepas (N3, N4, N12) produjeron pigmentos en la zona de interacción. Por otra parte, la cepa N15 parasitó sin pigmentación aparente y se destacó por producir clamidosporas inusualmente grandes, tanto en formas globosas ($\varnothing = 11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$) como en formas irregulares con dimensiones de $16.01 \pm 2.75 \times 10.88 \pm 1.48 \mu\text{m}$. Adicionalmente, se observó una aceleración en la esporulación de *Trichoderma* en presencia de *Fusarium*. Así, se concluyó que estos aislados poseen un significativo potencial para futuros estudios de biocontrol contra *Fusarium* spp.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Fusarium*, control biológico, caracterización morfológica, antagonismo fúngico, *Gliocladium*, confrontación dual, tallo de plátano, Panamá.

Abstract

This study focused on the detailed morphological characterization of 15 fungal strains (14 *Trichoderma* spp. and 1 *Gliocladium* sp.) and the evaluation of their in vitro antagonistic capacity against a pathogenic *Fusarium* sp. strain affecting bananas. All strains exhibited antagonistic activity against *Fusarium* sp., with 11 strains showing competition for space and nutrients, and 4 strains (N3, N4, N12 and N15) demonstrating mycoparasitism; furthermore, 3 strains (N3, N4, and N12) produced pigments within the interaction zone. Notably, strain N15 parasitized without apparent pigmentation and was distinguished by the production of unusually large chlamydospores, both in globose forms ($\varnothing = 11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$) and irregular shapes with dimensions of $16.01 \pm 2.75 \times 10.88 \pm 1.48 \mu\text{m}$. Additionally, an acceleration in the sporulation of *Trichoderma* was observed in the presence of *Fusarium*. With this, it was concluded that these isolates possess significant potential for future biocontrol studies against *Fusarium* spp.

Keywords: *Trichoderma*, *Fusarium*, biological control, morphological characterization, fungal antagonism, *Gliocladium*, dual confrontation, banana stem, Panama.

Tabla de Contenido

Introducción	13
Objetivos	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Capítulo I. Antecedentes Teóricos.....	18
<i>Trichoderma</i> : Historia y Taxonomía.....	18
Características Generales de <i>Trichoderma</i>	20
Capítulo II. Metodología	22
Procesamiento y Obtención de las Muestras	22
Selección y Caracterización de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	22
Aislamiento y Caracterización de la Cepa Experimental de <i>Fusarium</i> Patogénico.....	25
Técnicas de Identificación Taxonómica y Preservación	26
Bioensayo de Antagonismo	27
Capítulo III. Resultados y Discusión	28
Características Morfológicas e Identificación	28
Cultivo de las Cepas de <i>Trichoderma</i>	28
Evaluación de Crecimiento de las 15 Cepas de <i>Trichoderma</i>	29
Identificación Morfológica de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	31
Aislamiento e Identificación Morfológica de <i>Fusarium</i> sp.	59
Evaluación de la Actividad Antagonista.	61
Discusión.....	71
Análisis Morfológico del Patógeno <i>Fusarium</i> sp.	74

Antagonismo e Interacciones.....	74
Mecanismos de Acción Observados	75
Conclusiones.....	81
Recomendaciones y Limitaciones	83
Recomendaciones	83
Limitaciones.....	84
Perspectivas Futuras	85
Referencias.....	87
Anexos.....	94

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Taxonomía propuesta</i>	19
Tabla 2 Cuadro Comparativo de las características morfológicas y morfométricas de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	54
Tabla 3 <i>Caracterización morfométrica de las estructuras conidiogénicas de Trichoderma spp.</i>	54
Tabla 4 <i>Crecimiento radial micelial de las cepas de Trichoderma spp. en cultivo in vitro durante 72 horas</i>	55
Tabla 5 <i>Tasa de crecimiento micelial (TCM) de cepas de Trichoderma spp. clasificadas como de baja velocidad de crecimiento. GRUPO A: evaluadas entre las 24 y 72 horas</i>	56
Tabla 6 <i>Tasa de crecimiento micelial (TCM) de cepas de Trichoderma spp. clasificadas como de alta velocidad de crecimiento GRUPO B: evaluadas entre las 24 y 48 horas</i>	56
Tabla 7 <i>Caracterización Morfológica de los aislados de Trichoderma spp. basada en características coloniales y estructuras reproductivas</i>	57

Lista de Figuras

Figura 1 Técnica de cultivo en placa.....	24
Figura 2 Métodos de conservación de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	29
Figura 3 Patrón de crecimiento radial y técnica de medición de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en placas de agar PDA.....	30
Figura 4 Caracterización macro y microscópica de la cepa N1: Trj Pae 1.	31
Figura 5 Desarrollo morfológico de la cepa N1Trj-Pae.....	31
Figura 6 Morfología macro y microscópica de la cepa N2-Trj PC86.....	33
Figura 7 Desarrollo morfológico de la cepa N2-Trj PC86	33
Figura 8 Morfología macro y microscópica de la cepa N3 <i>Gliocladium</i> sp.	35
Figura 9 Desarrollo morfológico de la cepa N3- <i>Gliocladium</i> sp.	35
Figura 10 Morfología macro y microscópica de la cepa N4 <i>Trichoderma</i> sp.	37
Figura 11 Desarrollo morfológico de la cepa N4 (Tr PH-V 0019) (<i>Trichoderma</i> sp.).....	37
Figura 12 Morfología macro y microscópica de las cepas N 5, N 7, N 8 y N 9. (<i>Trichoderma</i> sp.)	39
Figura 13 Desarrollo morfológico de la cepa N 7. (<i>Trichoderma</i> sp.).....	39
Figura 14 Morfología macro y microscópica de las cepas N 6 y N 14 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	41
Figura 15 Desarrollo morfológico de la cepa N 6 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	41
Figura 16 Morfología macro y microscópica de la Cepa N 10 (<i>Trichoderma</i> sp.)	43
Figura 17 Desarrollo morfológico de la cepa N 10 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	43
Figura 18 Morfología macro y microscópica de la cepa N 11 (<i>Trichoderma</i> sp.)	45
Figura 19 Desarrollo morfológico de la cepa N 11 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	45
Figura 20 Morfología macro y microscópica de la cepa N 12 (<i>Trichoderma</i> sp.)	47

Figura 21 Desarrollo morfológico de la cepa N 12 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	47
Figura 22 Morfología macro y microscópica de la Cepa N 13 (<i>Trichoderma</i> sp.)	49
Figura 23 Desarrollo morfológico de la Cepa N 13 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	49
Figura 24 Morfología macro y microscópica de la Cepa N 15 (<i>Trichoderma</i> sp.)	51
Figura 25 Desarrollo morfológico de la cepa N 15 (<i>Trichoderma</i> sp.).....	51
Figura 26 Morfología colonial de 15 aislados de <i>Trichoderma</i> spp. en cultivo in vitro al quinto día de incubación.	58
Figura 27 Sintomatología necrótica en tallo de plátano	59
Figura 28 Aislamiento de <i>Fusarium</i> en medio de cultivo PDA.	60
Figura 29 Morfología macro y microscópica de la Cepa de <i>Fusarium</i> sp.....	60
Figura 30 Crecimiento micelial progresivo de la cepa de control de <i>Fusarium</i> sp. durante diez días de incubación.....	62
Figura 31 Desarrollo Radial de <i>Fusarium</i> sp.....	62
Figura 32 Cepa N1 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	63
Figura 33 Cepa N2 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	64
Figura 34 Cepa N3 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	64
Figura 35 Cepa N4 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	65
Figura 36 Cepa N5, N7, N8 Y N9 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental.....	66
Figura 37 Conjunto de cepas N6 y N14 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental.....	67
Figura 38 Cepa N 10 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	68
Figura 39 Cepa N 11 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	68
Figura 40 Cepa N 12 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	69
Figura 41 Cepa N 13 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	70

Figura 42 Cepa N15 contra la cepa de <i>Fusarium</i> experimental	70
Figura 43 Carta de Colores: códigos de tonalidades de verdes, utilizados en la caracterización de <i>Trichoderma</i> spp.....	94
Figura 44 Secuencia del desarrollo de las estructuras conidiogénicas en <i>Trichoderma</i> sp.	95

Lista de Anexos

Anexo 1. Escala cromática para la caracterización de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	94
Anexo 2. Dibujo de las estructuras conidiogénicas del género <i>Trichoderma</i>	95

Introducción

Trichoderma constituye un hongo filamentoso versátil con múltiples aplicaciones agrícolas. Entre sus propiedades destaca la capacidad de controlar enfermedades fúngicas mediante la inhibición del crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas de patógenos (Mesa et al., 2019). Numerosos estudios se han orientado al análisis del potencial biológico y al desarrollo de formulaciones basadas en especies de *Trichoderma* spp. con actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos (Marchuk et al., 2024; Álvarez, 2023; Colquehuanca y Blanco, 2021; Sinha et al., 2018; García et al., 2017; Thangavelu y Gopi, 2015; De Souza et al., 2009). Además de inhibir patógenos vegetales, este hongo favorece el crecimiento de las plantas y mejora la calidad del suelo, lo que lo convierte en una herramienta valiosa para la agricultura sostenible (Marchuk et al., 2024). Su eficacia se explica por diversos mecanismos de acción, entre los que se incluyen la producción de antibióticos, la competencia por recursos y la activación de defensas en las plantas. Asimismo, muchas especies de *Trichoderma* presentan capacidad de endofitismo en diversas plantas (Harman, 2024; Ramírez et al., 2022).

Las enfermedades fúngicas causadas por *Fusarium* spp. constituyen una amenaza significativa para la agricultura en Panamá. Estas infecciones ocasionan pérdidas económicas importantes y afectan la seguridad alimentaria (Martínez et al., 2020; Damodaran et al., 2020; Medina et al., 2019). Entre los cultivos susceptibles se encuentra el plátano, el cual resulta vulnerable a este patógeno de rápida propagación. La enfermedad que lo afecta se denomina fusariosis del banano, también conocida como “Mal de Panamá”. Esta enfermedad fúngica ataca el banano a escala global y recibe su nombre debido a que Panamá fue el país donde se identificó por primera vez. El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de esta enfermedad, fue descrito en la década de 1950 en territorio panameño, como lo indicó su denominación

común (Stover, 1962, como se citó en Ploetz, 1994). Sin embargo, la enfermedad se observó por primera vez en 1890 en Costa Rica y Panamá. Posteriormente, se expandió con rapidez hacia gran parte de América tropical y África (Ploetz, 1994).

Aunque existe un informe previo de Bancroft (1876, como se citó en Ploetz, 1994) sobre una enfermedad similar en la caña de azúcar (azúcar seda) en Australia, la mayor parte de las investigaciones iniciales sobre el Mal de Panamá se concentró en la variedad de banano Gros Michel (Stover, 1962, como se citó en Ploetz, 1994). Este interés investigativo respondió al impacto que la enfermedad produjo en el comercio de exportación de banano. Los actores vinculados a este sector resultaron gravemente afectados por la rápida propagación del patógeno y por la severidad de los daños en los cultivos. En consecuencia, gran parte del conocimiento inicial sobre la enfermedad de Panamá provino de un segmento relativamente reducido de la producción mundial de banano (Ploetz, 1994).

En la actualidad, el manejo de la fusariosis en plantaciones de plátano y banano no depende de una única estrategia, sino de un conjunto de prácticas. Entre estas se incluyen la aplicación de fungicidas químicos y biológicos, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, la eliminación de plantas enfermas, la incorporación de microelementos y el desarrollo de resistencia genética (López y Castaño, 2019). No obstante, el uso excesivo de fungicidas químicos puede generar consecuencias negativas a largo plazo. Un amplio sector industrial ha adoptado esta estrategia para combatir el patógeno, lo que ha suscitado preocupación tanto por su impacto ambiental como por la aparición de resistencia en los patógenos (Cortés et al., 2024; González et al., 2022; Rodríguez, 2019). En este contexto, surge la necesidad de desarrollar alternativas de control sostenibles y ambientalmente responsables para el manejo biológico de *Fusarium* spp. (Ismaila et al., 2023).

El empleo de *Trichoderma* spp. como biofungicida constituye una alternativa prometedora para reducir la dependencia de fungicidas químicos. Investigaciones como la de Caballero (2011) demostraron el potencial de este género en el manejo integrado de la fusariosis. Asimismo, Harman (2024) profundizó en su capacidad para incorporarse a la rizosfera y actuar como endófito, lo que refuerza su función de protección y promoción del crecimiento vegetal. Además, la baja incidencia en el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y su reducido impacto ambiental, aspectos destacados por Cortés et al. (2024), posicionan a *Trichoderma* como una alternativa sostenible para el manejo de enfermedades en cultivos.

A pesar de los avances, *Fusarium* spp. continúa como un problema persistente a escala global en los cultivos de banano y plátano. Esta situación exige el perfeccionamiento continuo de las medidas de control dirigidas a este patógeno. El control biológico basado en cepas antagonistas de *Trichoderma* spp. ha mostrado potencial dentro del manejo integrado de esta enfermedad (López y Castaño, 2019). Sin embargo, todavía se requiere mayor validación mediante ensayos de laboratorio y de campo.

Asimismo, no todas las cepas de *Trichoderma* resultan adecuadas para su aplicación agrícola (Harman, 2024; Parmar et al., 2015; Michel et al., 2019). Por esta razón, se requiere la evaluación de la actividad antagonista frente a patógenos específicos. Este proceso debe priorizar el uso de cepas nativas adaptadas a las condiciones locales y correctamente caracterizadas.

El presente estudio se orienta a la evaluación de 15 cepas de *Trichoderma* aisladas de distintas localidades y sustratos en Panamá, entre las que se incluyen endófitos de plátano. Se espera que los resultados contribuyan a la selección de las cepas más eficaces para el control biológico de *Fusarium oxysporum* bajo estudio y para su incorporación en el manejo integrado

de esta enfermedad. De esta manera, se favorece la adopción de prácticas agrícolas más sostenibles y se fortalece la seguridad alimentaria.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de distintos sustratos y localidades en Panamá y analizar su capacidad antagonista *in vitro* contra la cepa experimental de *Fusarium* sp.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar e identificar morfológicamente las cepas de *Trichoderma* spp.
2. Aislar e identificar morfológicamente la cepa de *Fusarium* sp.
3. Determinar la actividad antagonista *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. contra la cepa de *Fusarium* sp.

Capítulo I. Antecedentes Teóricos

***Trichoderma*: Historia y Taxonomía**

Este género de hongos ha sido objeto de estudio durante décadas debido a su amplia distribución y a sus beneficios en la agricultura. Investigaciones como las de Kubicek y Harman (1998) señalaron que la primera descripción del género se atribuyó a Persoon en 1794. En sus primeros escritos, este autor describió cuatro especies de *Trichoderma* de manera imprecisa. Persoon desconocía que estaba confundiendo distintos estados de desarrollo del hongo, puesto que describió únicamente su fase asexual (anamorfa) y omitió la fase sexual (teleomorfa), situación que dificultó clasificaciones posteriores. Kubicek y Harman (1998) también indicaron que el vínculo entre *Trichoderma viride* y su estado teleomorfo, *Hypocrea rufa*, no se esclareció sino hasta 1865, cuando se estableció que ambos correspondían a la misma especie en diferentes etapas de su ciclo de vida. El género *Hypocrea* fue descrito por primera vez por Fries (1825). Posteriormente, en 1957, científicos como Dingley, Rifai y Webster confirmaron que los hongos *Trichoderma* y *Hypocrea* constituyen formas de vida distintas de un mismo organismo (Kubicek y Harman, 1998).

Hasta 1969, todos los aislados de *Trichoderma* se atribuían a *Trichoderma viride*, debido a que Bisby (1939, como se citó en Kubicek y Harman, 1998) sostuvo que la variación morfológica podía explicarse dentro de una sola especie, *T. viride*. Sin embargo, Rifai (1969) reconoció nueve “especies agregadas” dentro del género *Trichoderma*. Este autor afirmó que los nueve taxones diferenciados no correspondían a entidades biológicas asociadas con una única especie teleomorfa, debido a que se basaban en características morfológicas difíciles de distinguir. A partir de estos hallazgos se desarrollaron numerosas investigaciones orientadas a la caracterización del género. Posteriormente, estudios como los de Doi (1969, 1972, como se citó

en Kubicek y Harman, 1998) ofrecieron una descripción extensa de teleomorfos y anamorfos en Japón, aunque las cepas originales se perdieron. Este y otros trabajos, en particular los de Samuels et al. (1994, 1996, como se citó en Kubicek y Harman, 1998), reactivaron el interés por la taxonomía de los teleomorfos y ampliaron el conocimiento sobre *Hypocrea*, lo que proporcionó herramientas adicionales para la identificación del género *Trichoderma*.

Los pioneros de la micología establecieron las bases para la identificación de *Trichoderma* mediante observaciones morfológicas, entre ellas la forma de las conidias. En la actualidad, la incorporación de herramientas moleculares ha transformado la sistemática de *Trichoderma*. Estas herramientas permiten una resolución filogenética más precisa y detallada, superan las limitaciones de la morfología tradicional y revelan la amplia diversidad genética presente en este género.

Tabla 1

Taxonomía propuesta

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

Nota. Adaptado de “*Trichoderma*: a biocontrol approaching for soil borne disease management”, en *IRJMST*, por Shrivastava et al., 2015.

En la actualidad, el uso de filogenética molecular permite reconocer más de 441 especies de *Trichoderma* descritas hasta el momento (Cao et al., 2024). No obstante, solo un porcentaje de estas especies cuenta con una identificación plenamente confirmada (Samuels, 2006). En relación con la fase sexual de *Trichoderma* (estado teleomorfo), Kuhls et al. (1996, como se citó en Martínez et al., 2015) señalaron que las especies del género *Trichoderma* constituyen un

grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual. Asimismo, Samuels et al. (2006) indicaron que *Trichoderma* se clasifica como un hongo anamórfico, mientras que su estado teleomorfo se ha identificado únicamente en pocas especies. Debido a la importancia de *Trichoderma*, su complejidad taxonómica y la variabilidad de resultados reportados en estudios previos, resulta necesario emplear una estrategia taxonómica con mayor nivel de detalle. Esta estrategia debe integrar características morfológicas, fisiológicas, de compatibilidad vegetativa y moleculares con el fin de lograr una identificación a nivel de especie. Aunque las claves taxonómicas pueden presentar ciertas inexactitudes, constituyen el punto de partida fundamental en cualquier proceso de identificación (Martínez et al., 2015).

Características Generales de *Trichoderma*

Las colonias de este género suelen presentar una coloración verde característica y un crecimiento rápido. La textura puede variar desde algodonosa hasta pulverulenta. Entre los rasgos relevantes se incluyen la presencia de micelio aéreo, la formación de anillos concéntricos, la pigmentación del reverso de las colonias y la estructura de los conidióforos, fiálides y conidias. Las colonias pueden presentar tonalidades verde grisáceo, verde oliva o verde intenso, mientras que el reverso puede mostrar coloración incolora, crema, amarillo claro o amarillo oscuro. La conidiación puede aparecer de forma difusa o mediante pústulas de color verde. Las fiálides se organizan en verticilos con formas cruciformes, ampulliformes o lageniformes. Algunas especies presentan apéndices terminales en el extremo del conidióforo, el cual puede poseer un eje principal con ramificación piramidal. Las conidias son unicelulares, hialinas o verdes, con superficie lisa u ornamentada, y presentan forma globosa o elipsoidal. Otra

característica relevante consiste es la presencia de clamidosporas (Gómez et al., 2013; Jang et al., 2018).

Capítulo II. Metodología

Procesamiento y Obtención de las Muestras

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Biotecnología Microbiana (Lab. 214) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá. Para el estudio se emplearon 28 cepas presuntamente pertenecientes al género *Trichoderma*, seleccionadas de varias colecciones fúngicas conservadas en el laboratorio de Biotecnología Microbiana. Además, se aislaron cepas de *Fusarium* spp. a partir de muestras de tallo de plátano enfermo.

Todo el trabajo experimental se desarrolló en un ambiente controlado y estéril mediante el uso de una cámara de flujo laminar tipo II (SELSTAR). Para el cultivo de las cepas se utilizó agar PDA (Potato Dextrose Agar), un medio rico en nutrientes que favorece el crecimiento de una amplia variedad de hongos, entre ellos *Trichoderma* (Ortuño et al., 2013). Posteriormente, las cepas se incubaron a 28° C en oscuridad, temperatura óptima para el desarrollo de estos géneros.

Selección y Caracterización de las Cepas de Trichoderma spp.

En una primera etapa se prepararon placas de Petri estériles con medio de cultivo PDA para la inoculación de las cepas de *Trichoderma* que serían caracterizadas. Con un asa de inoculación esterilizada se extrajo un pequeño fragmento de micelio (taquito de agar) de cada cepa evaluada. Estos fragmentos se colocaron en el centro de una placa de Petri con agar y luego se incubaron. El crecimiento de las cepas se monitoreó durante cinco días consecutivos o durante el tiempo necesario hasta alcanzar el máximo desarrollo del hongo. Posteriormente se realizó una preselección de aislamientos fúngicos basada en características macroscópicas típicas del género, como la textura y la pigmentación de las colonias. Aquellos aislamientos que presentaron rasgos

morfológicos preliminares compatibles con el género *Trichoderma* se seleccionaron para un análisis más detallado.

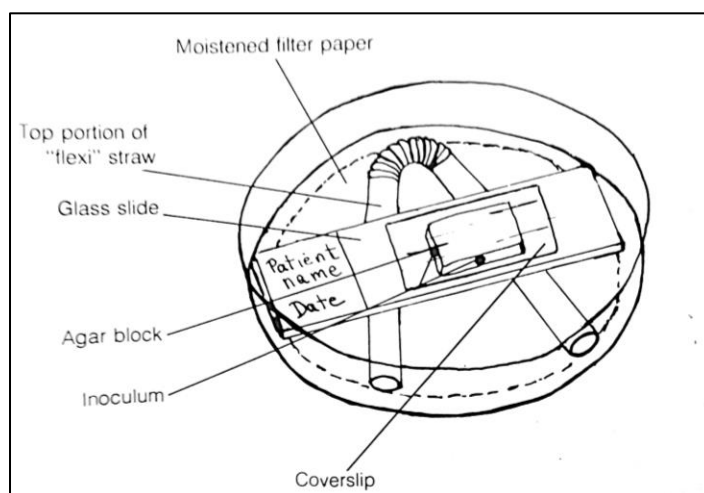
Las muestras purificadas se replicaron tres veces en platos de PDA. En estos cultivos se determinó la tasa promedio de crecimiento micelial mediante la medición del diámetro de las colonias cada 24 horas, según lo indicado por Silva y Páez (2021). Posteriormente se transfirieron fragmentos de estas colonias a tubos con agar inclinado mediante la técnica descrita por Moller et al. (1995). Este método consiste en inocular un pequeño fragmento del hongo en un tubo que contiene un medio de cultivo sólido (PDA). Este procedimiento requiere mayor tiempo que el anterior, puesto que se debe esperar hasta que las cepas de *Trichoderma* presenten la coloración verdosa característica asociada con la producción de conidias. Este desarrollo conidial resulta esencial para la identificación precisa del género. Esta estrategia de cultivo permitió observar con mayor detalle la apariencia de cada cepa, incluyendo la forma de los márgenes, la altura y profundidad de las colonias y las texturas, de acuerdo con los criterios taxonómicos establecidos en manuales y claves especializadas del género.

Cuando las colonias alcanzaron un tamaño adecuado, se tomaron muestras de micelio y esporas para su observación microscópica. Para ello se emplearon técnicas como el método de montaje con cinta adhesiva, el cual consiste en tomar una muestra de la colonia fúngica mediante una tira de cinta adhesiva de aproximadamente 4 cm. La superficie adhesiva se presionó sobre la colonia y luego se colocó sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. De forma adicional se aplicó la técnica de cultivo en placa descrita por Larone (1995), cuyo objetivo consiste en promover el crecimiento fúngico y facilitar su análisis microscópico. Este procedimiento se basa en la creación de un ambiente húmedo dentro de una placa de Petri. En primer lugar, se colocó un bloque de agar sobre un portaobjetos estéril y se inoculó la cepa

evaluada. Las muestras se incubaron en condiciones óptimas para su desarrollo y se supervisó su crecimiento. Posteriormente se observó el portaobjetos directamente al microscopio mediante el objetivo 10× para identificar estructuras completas, como conidióforos con sus esporas u otros rasgos distintivos del hongo. Como etapa final para garantizar la preservación de las muestras y permitir su observación a largo plazo, las preparaciones se tiñeron con azul de lactofenol y se sellaron con esmalte de uñas. Este procedimiento permitió elaborar preparaciones permanentes y asegurar la disponibilidad de un registro visual para investigaciones posteriores.

Figura 1

Técnica de cultivo en placa



Nota. Tomado de *Laboratory procedures. Medically important fungi: a guide to identification*, por Larone, 1995, p. 217.

El análisis microscópico incluyó un examen detallado de cada cepa. Mediante microscopía óptica se evaluaron las estructuras reproductivas de los hongos, entre ellas la longitud y el patrón de ramificación de los conidióforos, así como las características de las fiálides y las conidias. También se analizaron rasgos como la morfología, el tamaño, la coloración, las hifas y la presencia de otras estructuras propias del género *Trichoderma*. Esta

observación microscópica permitió determinar diferentes especies de *Trichoderma* y confirmar la identidad de las cepas a nivel de género o especie.

La identificación precisa de las cepas de *Trichoderma* requiere una caracterización morfológica detallada. Por esta razón se evaluaron características macroscópicas como el color de la colonia (anverso y reverso), la textura, la velocidad de crecimiento y los patrones de crecimiento, entre ellos la formación de anillos concéntricos. Asimismo, se adaptó la metodología propuesta por Esparza (2009), que permite estimar visualmente el nivel de esporulación de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Este procedimiento clasifica la esporulación en tres niveles: abundante, moderada y escasa. Se consideró esporulación abundante cuando cubrió más del 50 % de la placa de Petri, moderada cuando se presentó en menos del 50 %, y escasa cuando fue cercana o inferior al 10 %. A partir de estos criterios se describió esta característica junto con otros rasgos morfológicos.

A nivel microscópico se describieron características como la morfología de los conidióforos, fiálides, conidios e hifas, así como la presencia de clamidosporas. Además, se empleó terminología botánica especializada para describir con precisión la morfología de las estructuras fúngicas de *Trichoderma* spp.

Aislamiento y Caracterización de la Cepa Experimental de Fusarium Patogénico

La posible cepa experimental de *Fusarium* sp. se aisló a partir de varias muestras de tallo de plátano que presentaban síntomas típicos de fusariosis (Figura 27). Estas muestras procedían de una finca platanera ubicada en la provincia de Chiriquí, Panamá. El aislamiento de *Fusarium*, considerado el posible agente causal de los síntomas observados, se realizó mediante la metodología descrita por Agrios (1995). Este procedimiento correspondió al método de aislamiento directo de fitopatógenos. En primer lugar, se efectuó una esterilización superficial de

las muestras. Luego se seleccionaron pequeños fragmentos del tejido interno como inóculo. Posteriormente, los fragmentos de tallo se colocaron en un medio de cultivo PDA. Después de un período de incubación a 28 °C, se seleccionaron las colonias que presentaban rasgos repetitivos en todas las muestras. Estas colonias distintivas se aislaron con el propósito de obtener cultivos puros.

Las cepas aisladas se sometieron a un proceso de caracterización morfológica similar al aplicado para *Trichoderma*. En una primera etapa se efectuó una preselección de los aislamientos con base en características macroscópicas típicas de *Fusarium*, entre ellas la producción de pigmentos característicos –con frecuencia rosados, púrpuras o rojizos– (Agrios, 1995), la velocidad de crecimiento y la textura algodonosa de las colonias. Los aislamientos que cumplieron con estos criterios preliminares se transfirieron a otros platos y a tubos de agar inclinado con el fin de realizar un análisis macroscópico más detallado. La confirmación de la identidad de *Fusarium* se realizó mediante la observación microscópica de preparaciones elaboradas con la técnica de cultivo en placa descrita por Larone (1995).

Técnicas de Identificación Taxonómica y Preservación

La identificación de las cepas aisladas se basó en un análisis detallado que incluyó observaciones macroscópicas y microscópicas. Para este proceso se emplearon manuales y claves taxonómicas de referencia con el objetivo de asegurar una identificación adecuada.

En el caso de *Trichoderma* se utilizaron los manuales de Kubicek y Harman (1998), Moller et al. (1995) y Wang y Zabel (1990). Para *Fusarium* se emplearon los de Wang y Zabel (1990) y Fothergill et al. (1998), entre otros. Con el propósito de garantizar la viabilidad a largo plazo de las cepas, estas se conservaron en crioviales mediante la técnica descrita por Smith y Onions (1983). Con un mantenimiento adecuado, estas cepas preservadas pueden conservarse

durante diez años o más, lo que facilita su disponibilidad para futuros estudios relacionados con estos géneros fúngicos.

Bioensayo de Antagonismo

El potencial antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. se evaluó mediante ensayos *in vitro* que incluyeron pruebas de crecimiento dual y confrontación directa. Estas pruebas se orientaron al análisis de competencia y parasitismo y siguieron las metodologías descritas por Silva y Páez (2021). El grado de inhibición del patógeno se determinó mediante la medición del diámetro de las colonias de ambos hongos y la comparación del crecimiento de *Fusarium* en presencia y en ausencia de las cepas antagonistas. A partir de estos datos se calculó el índice de parasitismo, lo que permitió realizar una evaluación cuantitativa de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. y de su potencial como agente de biocontrol, conforme a lo señalado en estudios previos por Ruiz et al. (2018) e Infante et al. (2009).

Capítulo III. Resultados y Discusión

Características Morfológicas e Identificación

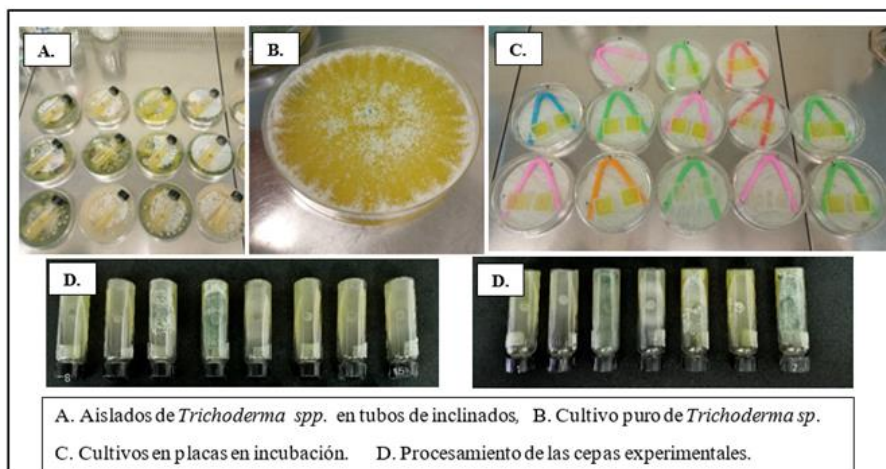
Cultivo de las Cepas de Trichoderma

Los cultivos en placas de Petri proporcionaron colonias densas y homogéneas de *Trichoderma*, demostrando ser una metodología efectiva para el aislamiento y cultivo puro lo que facilitó la observación de características morfológicas relevantes, adicionalmente los resultados obtenidos en los cultivos en tubos inclinados corroboraron las características morfológicas observadas en las placas Petri. Las colonias de *Trichoderma* spp. mostraron un crecimiento y una morfología consistentes en ambos tipos de cultivos.

El cultivo en placa permite una observación detallada y continua del hongo, desde las primeras hifas hasta la formación de conidios, facilitando así la comprensión de sus diferentes etapas de desarrollo, las imágenes obtenidas revelaron una amplia diversidad morfológica y permitieron la caracterización de las estructuras reproductivas de cada cepa, facilitando su identificación y comparación.

Figura 2

Métodos de conservación de aislados de Trichoderma spp.



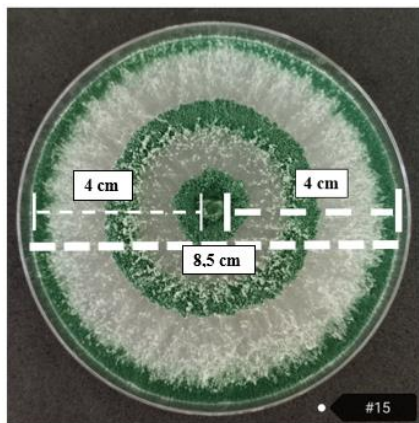
Evaluación de Crecimiento de las 15 Cepas de Trichoderma

El crecimiento radial de las colonias se midió en centímetros cada 24 horas, durante 3 días.

Las cepas de *Trichoderma* se cultivaron en placas Petri de 8,5 cm de diámetro, conteniendo agar papa dextrosa. El inóculo que medía solo 0,5 cm se depositó en el centro de la placa Petri. El diámetro de la colonia se midió en una sola dirección a partir del punto de inoculación central y la medición se realizó considerando que la colonia presentaba una forma circular y uniforme sin zonas de crecimiento diferencial, hasta ocupar la totalidad de la superficie disponible en la placa, alcanzando un diámetro total de 8 cm (correspondiente a un crecimiento radial de 4 cm desde el centro).

Figura 3

Patrón de crecimiento radial y técnica de medición de cepas de Trichoderma spp. en placas de agar PDA



Ecuación: $TCM = \frac{\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}}{\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial}}$.

La fórmula utilizada nos permitió calcular la velocidad promedio de crecimiento durante todo el experimento, considerando todos los datos disponibles.

De las 28 muestras fúngicas evaluadas, solo 14 de esas muestras resultaron pertenecer a este género de *Trichoderma* y solo 1 perteneciente al género *Gliocladium*. En total fueron caracterizadas quince cepas fúngicas.

Identificación Morfológica de las Cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa N1: Trj-Pae 1 (*Trichoderma* sp.)

Figura 4

Caracterización macro y microscópica de la cepa N1: Trj Pae 1

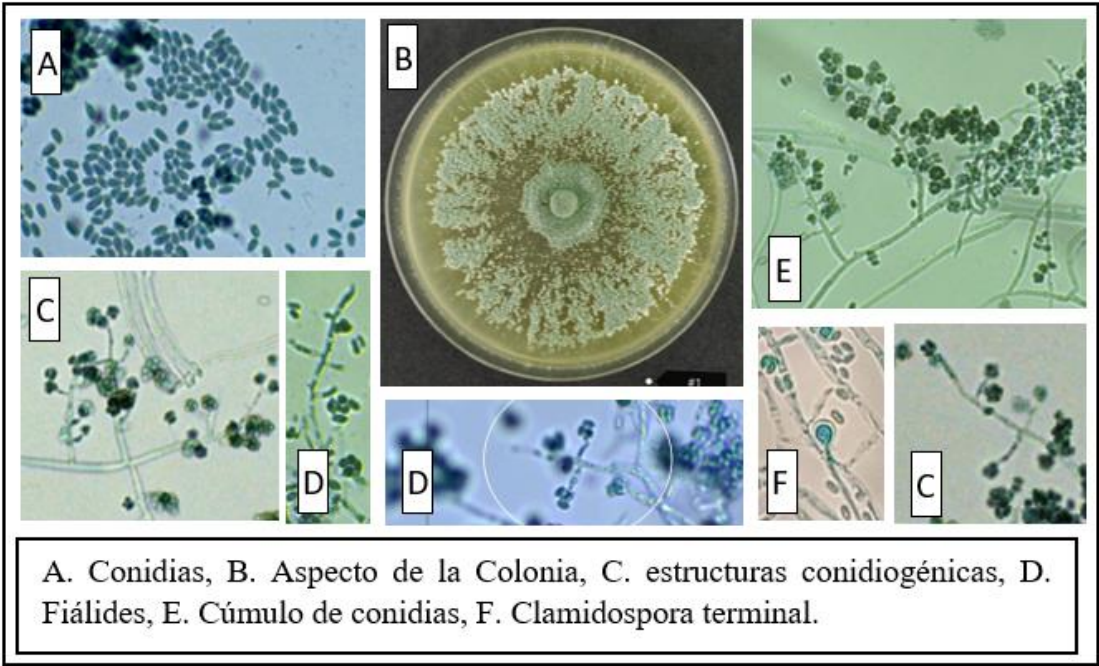


Figura 5

Desarrollo morfológico de la cepa N1Trj-Pae

Crecimiento de la cepa N1 durante 120 h de incubación					
Cepa	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
N1 Trj Pae					

Cepa N1: Trj-Pae 1 (*Trichoderma* sp.)

Esta colonia exhibe un crecimiento radial que se extiende rápidamente colonizando por completo la placa de Petri en un período de 3 días. Inicialmente, el micelio es de color blanco, pero experimenta un cambio gradual, adquiriendo una tonalidad verde grisácea (código #9DAA8A) a partir del cuarto día de incubación, lo que es un indicativo de la notable producción de conidios verdes. Su aspecto es algo granuloso, pulverulento y el micelio aéreo es abundante, crece formando un pequeño círculo denso y abundante desde el punto de inoculación. La esporulación suele iniciarse desde el centro de la colonia y se extiende uniformemente hacia los márgenes, presenta una zona muy poca esporulada, y otra zona de gran grosor muy esporulada, pero difusa con bordes blancos e irregulares. El reverso de la colonia presenta una coloración verde claro amarilloso casi blanco (#C5C971).

Las estructuras conidiogénicas crecen muy similarmente a una inflorescencia en forma de racimo. Las fiálides se presentan solitarias sobre los conidióforos ramificados y sostienen pocas conidias en sus puntas, que posteriormente se liberan. La mayoría de los conidios presentan una forma oblonga o elipsoidal, son lisos y sin ornamentaciones, sus densidades son de aproximadamente $2.00 \pm 0.14 \times 1.16 \pm 0.07 \mu\text{m}$, en relación largo por ancho. Adicionalmente se observan abundantes estructuras esféricas de pared gruesa, que corresponden a las clamidosporas.

Cepa N2-Trj PC86 (*Trichoderma* sp.)

Figura 6

Morfología macro y microscópica de la cepa N2-Trj PC86

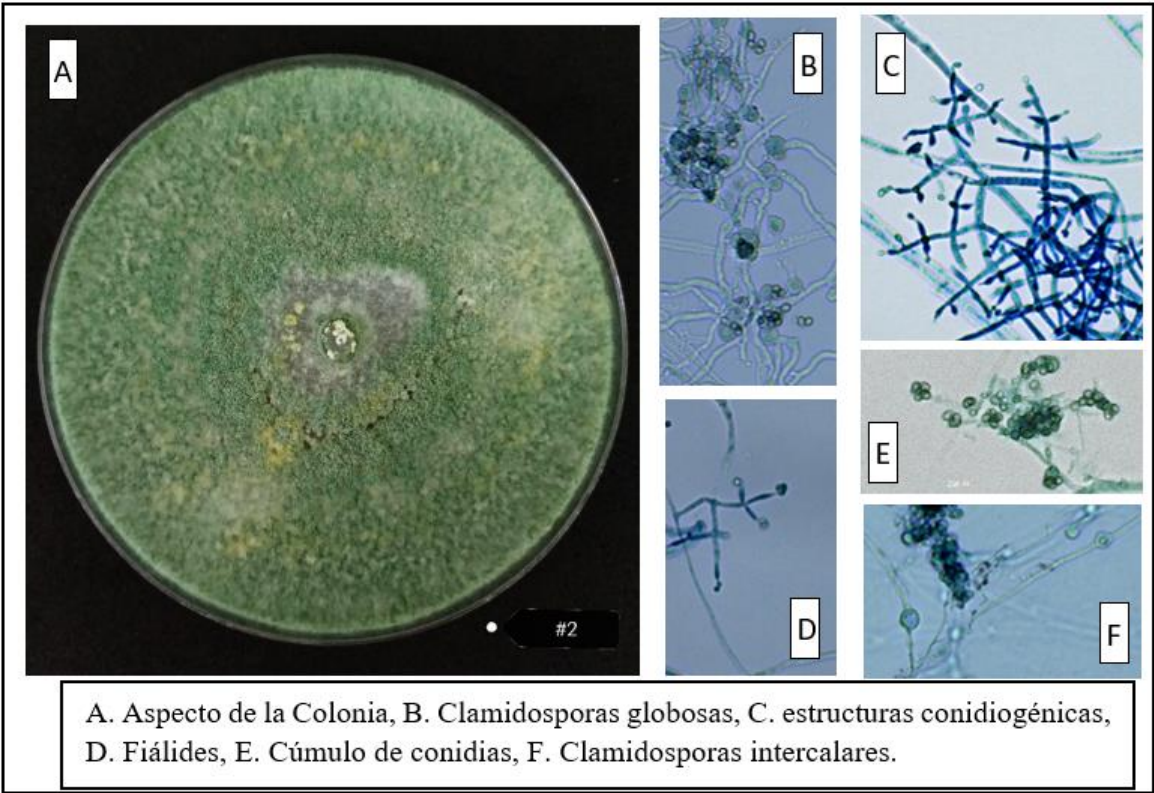


Figura 7

Desarrollo morfológico de la cepa N2-Trj PC86

Crecimiento de la cepa N2 durante 120 h de incubación					
Cepa	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
N2-Trj PC86					

Cepa N2: Trj PC86 (*Trichoderma* sp.)

La colonia presenta un abundante micelio aéreo, con un crecimiento es radialmente arrugado o granuloso de forma irregular que se expande de manera uniforme desde el punto central hacia los bordes de la placa, sin anillos concéntricos. Presenta una pigmentación verde oliva (#677C60) a partir del quinto día de incubación y el reverso de la colonia permaneció casi blanco (#ABAD90). Su crecimiento es notablemente rápido, cubriendo la placa en 3 días.

Las estructuras conidiogénicas se muestran en forma de Tirso en su fase madura, y en su fase juvenil se muestran en forma de cima simple, con conidióforos ramificados y las fiálides crecen muy separadas de otras y con su forma característica de frasco o ampolla. Los conidios se muestran lisos y globosos con un diámetro promedio de $2.73 \pm 0.23 \mu\text{m}$. Es visible una abundante presencia de clamidosporas con dimensiones promedio de 6.39 ± 0.78 .

Cepa N3: (*Gliocladium* sp.)

Figura 8

Morfología macro y microscópica de la cepa N3 Gliocladium sp

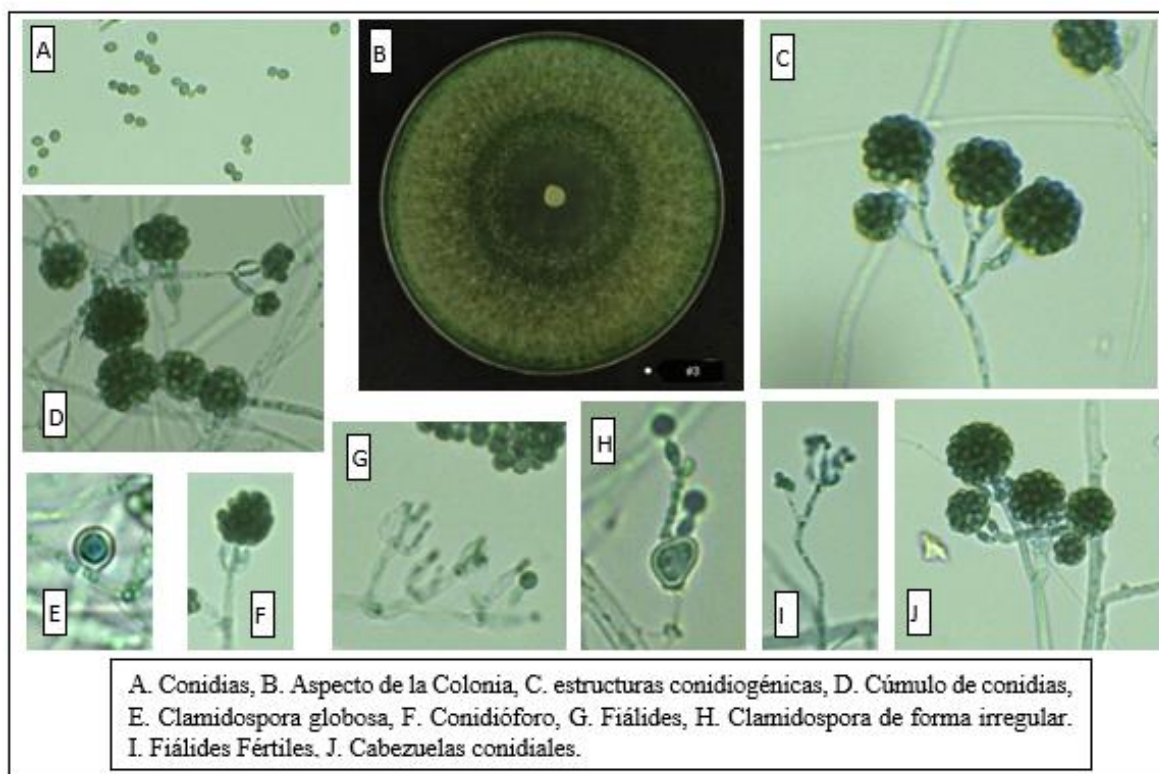
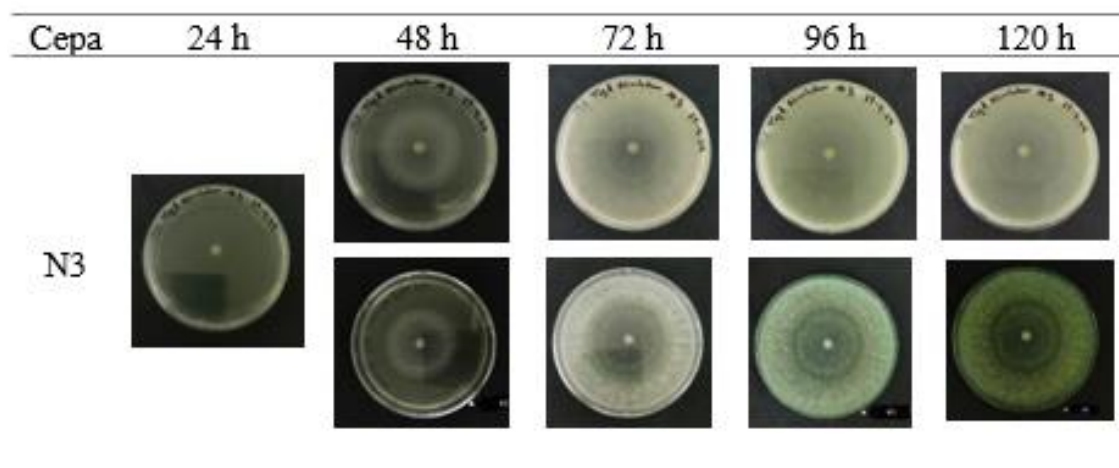


Figura 9

Desarrollo morfológico de la cepa N3-Gliocladium sp.



Cepa N3: (*Gliocladium* sp.)

La colonia muestra un abundante micelio aéreo con una textura hiloza o vellosa con 3 anillos concéntricos y dos coloraciones distintas, mostrando una zona verde oscura, pero intensa, (#273219) y otra zona más clara (#394725). El reverso de la colonia presenta un color verde levemente amarillosa (#7D7F6A) y su crecimiento es relativamente rápido.

Las estructuras conidiogénicas se muestran en forma de cima simple con 3 fiálides agrupadas en el extremo o punta de los conidióforos.

Los conidios se observan en grandes cantidades agrupados en densos glomérulos o cabezas conidiales bien definidas y compactas, formando estructuras esféricas cubiertas de esporas, que recuerdan a un racimo de uvas sobre las fiálides. Presentan una forma globosa con un diámetro promedio de $3.66 \pm 1.17 \mu\text{m}$. Se observa una moderada producción de clamidosporas con medidas promedio de 8.20 ± 1.13 .

Cepa N 4 (Tr PH-V 0019) (*Trichoderma* sp.)

Figura 10

Morfología macro y microscópica de la cepa N4 Trichoderma sp.

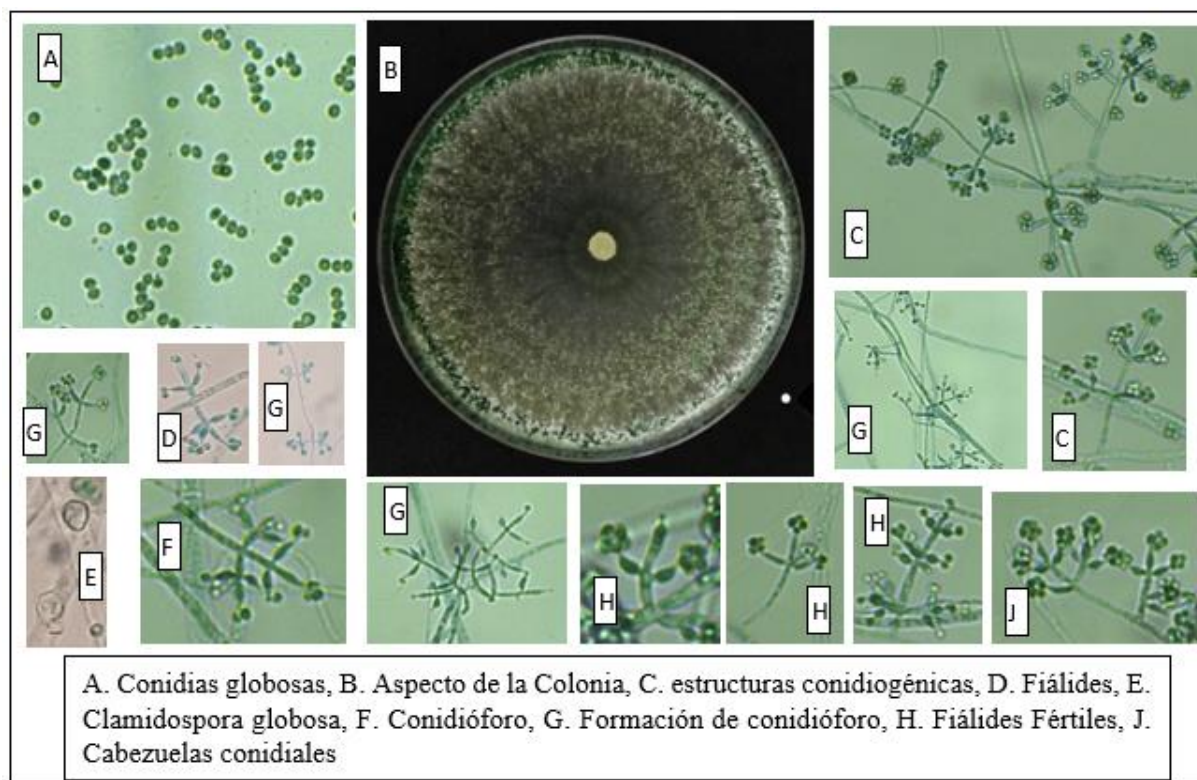
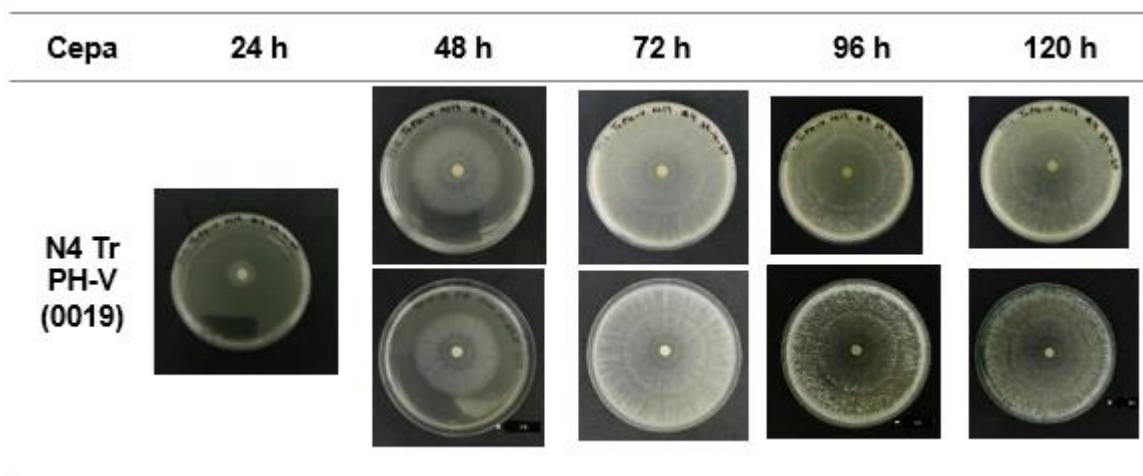


Figura 11

*Desarrollo morfológico de la cepa N4 (Tr PH-V 0019) (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N4 (Tr PH-V 0019) (*Trichoderma* sp.)

La colonia mostró un crecimiento rápido, textura pulverulenta, con micelio aéreo moderado y una coloración verde blanquecina (#83896A), con un borde verde un poco más intenso (#3D4B35), pero difuso. Crece de forma radial con 3 zonas tenues, levemente marcadas, mientras que el reverso de la colonia se muestra casi traslúcido, pero con bordes blancos.

Las estructuras conidiogénicas se muestran en forma de tirso y con gran cantidad de conidios en grupo de apenas cuatro y se presentan globosos, lisos y con un diámetro promedio de $2.76 \pm 0.12 \mu\text{m}$. Se observa una moderada producción de clamidosporas intercalares.

Conjunto de cepas: N 5, N 7, N 8 y N 9 (*Trichoderma* sp.)

Figura 12
Morfología macro y microscópica de las cepas N 5, N 7, N 8 y N 9. (*Trichoderma* sp.)

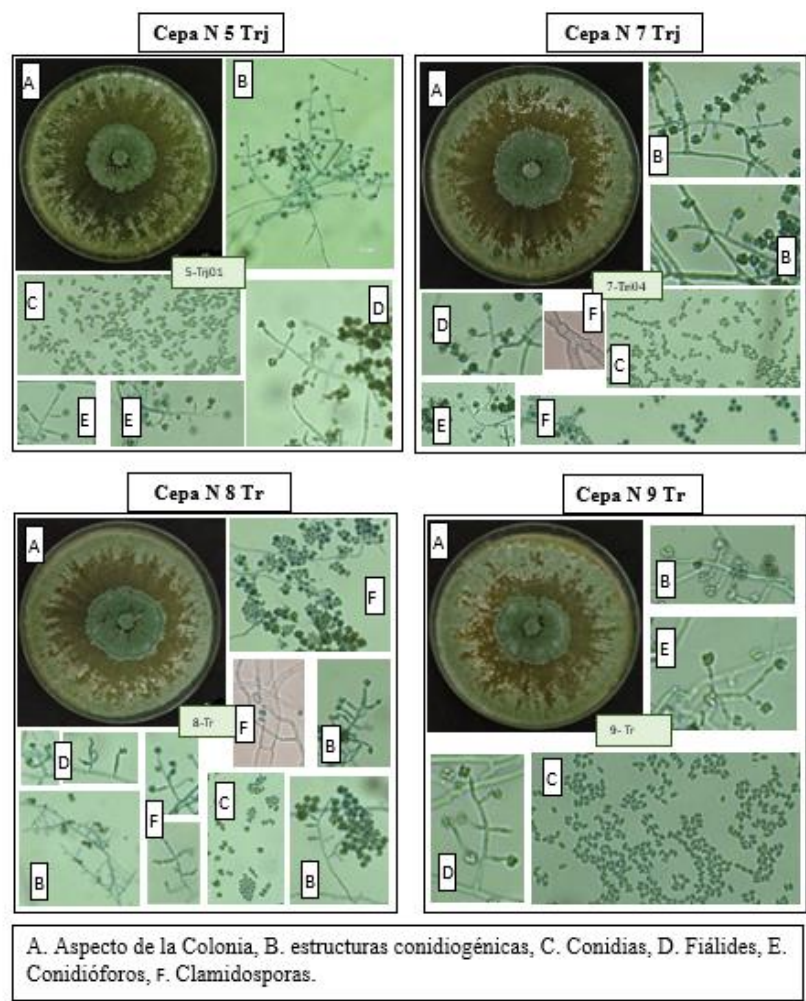
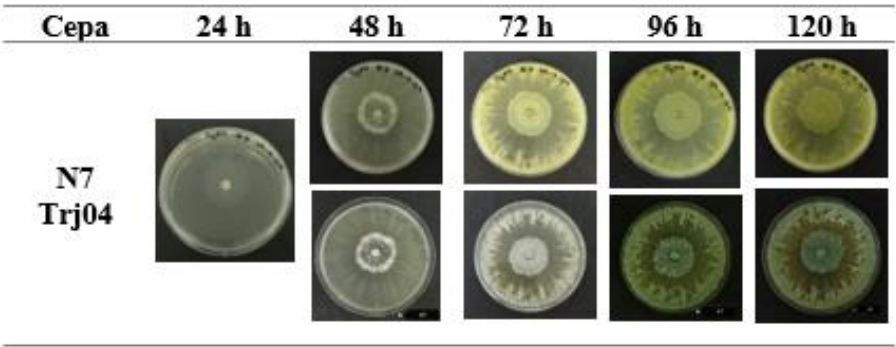


Figura 13
Desarrollo morfológico de la cepa N 7. (*Trichoderma* sp.)



Descripción del conjunto de cepas: N 5, N 7, N 8 y N 9.

Las cuatro cepas de *Trichoderma* evaluadas mostraron un perfil fenotípico idéntico. En cuanto a la morfología de las colonias como su forma, textura y color, como también microscópicamente, al observar las características de las estructuras reproductivas (conidióforos, fiálides y conidias), no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

Las colonias mostraron un abundante micelio aéreo con un crecimiento rápido y una textura algodonosa desmenuzable y granulada, crece de forma radial con 2 anillos concéntricos con una coloración ligeramente diferente entre las cepas que van desde un verde oliva (#4D643C) a otra con una zona tenue (#6D7A57) o submersa. El reverso se presenta de manera radial, con líneas que van desde los bordes hasta el centro de la colonia con una coloración verde amarillosa (#8A8E43).

Las estructuras conidiogénicas se muestran en forma de racimo y todas las cepas presentaron conidióforos ramificados, fiálides solitarias en forma de botella y conidias con formas elipsoidales y lisas, cuyas dimensiones se muestran en la Tabla 2. La producción de clamidosporas varió entre las cepas, siendo más abundante en algunas que en otras; no obstante, la presencia de clamidosporas fue una característica común entre estas cepas.

Conjunto de Cepas: N 6 y N 14 (*Trichoderma* sp.)

Figura 14

*Morfología macro y microscópica de las cepas N 6 y N 14 (*Trichoderma* sp.)*

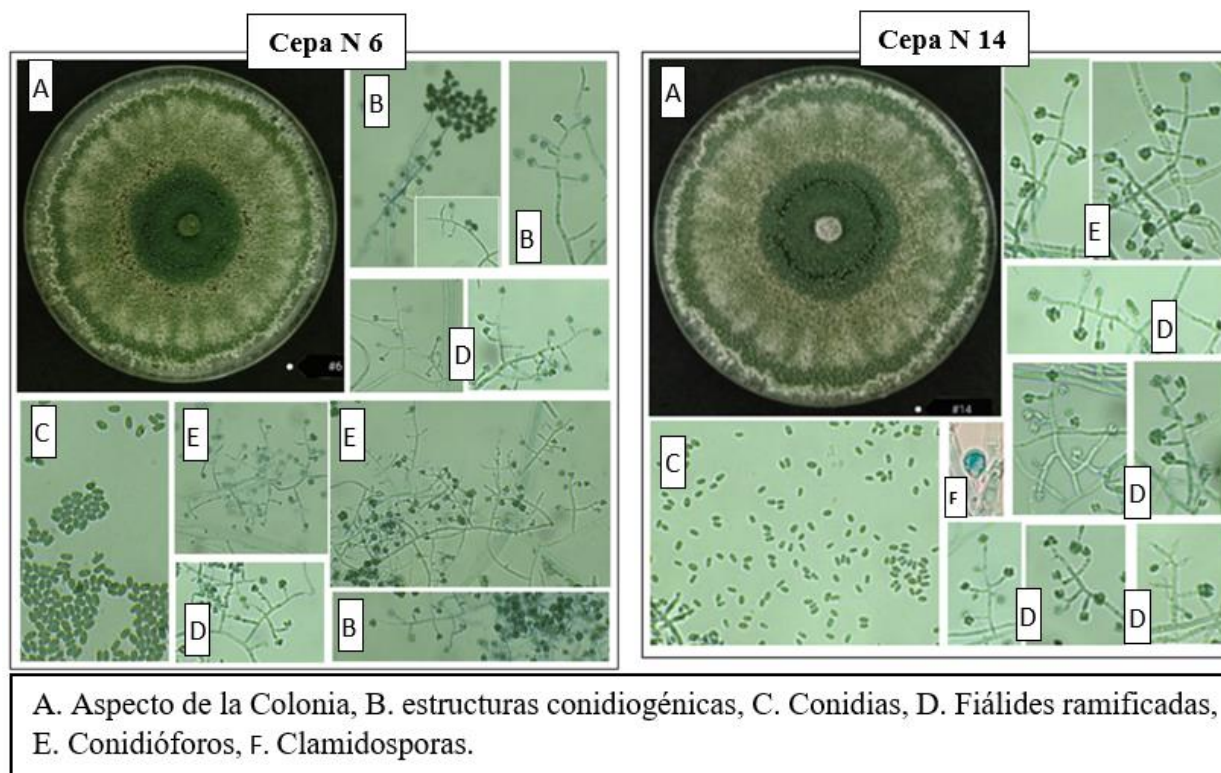
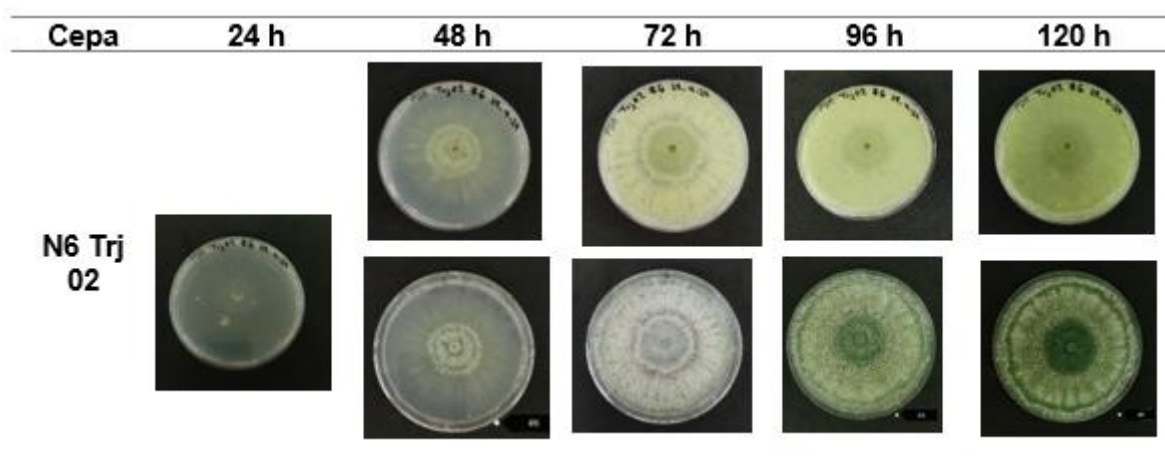


Figura 15

*Desarrollo morfológico de la cepa N 6 (*Trichoderma* sp.)*



Descripción del conjunto de cepas: N6 y N14

Las colonias de estas cepas exhiben un crecimiento radial, crecen muy rápido en un período relativamente corto. Muestran zonas con ciertas variaciones en la tonalidad, pero la pigmentación predominante es verde (#253E1C) con ciertas zonas lineales más blancuzcas (#728455). La textura de las colonias es ligeramente pulverulenta, con un aspecto denso, granular o aterciopelado, debido a la presencia de abundante micelio aéreo. El reverso de la colonia es un verde amarilloso blanquecino (#B4BC6B).

Los conidióforos se muestran ramificados, hialinos. Se observa una alta producción de conidias, las cuales se agrupan entre unas 4 conidias sobre las fiálides. Estas presentan una morfología predominantemente elipsoidal, con paredes lisas y sin ornamentaciones con tamaño promedio señalados en la Tabla 2. Además la presencia de clamidosporas es notoria.

Cepa N 10-Tr2-3s (*Trichoderma* sp.)

Figura 16

*Morfología macro y microscópica de la Cepa N 10 (*Trichoderma* sp.)*

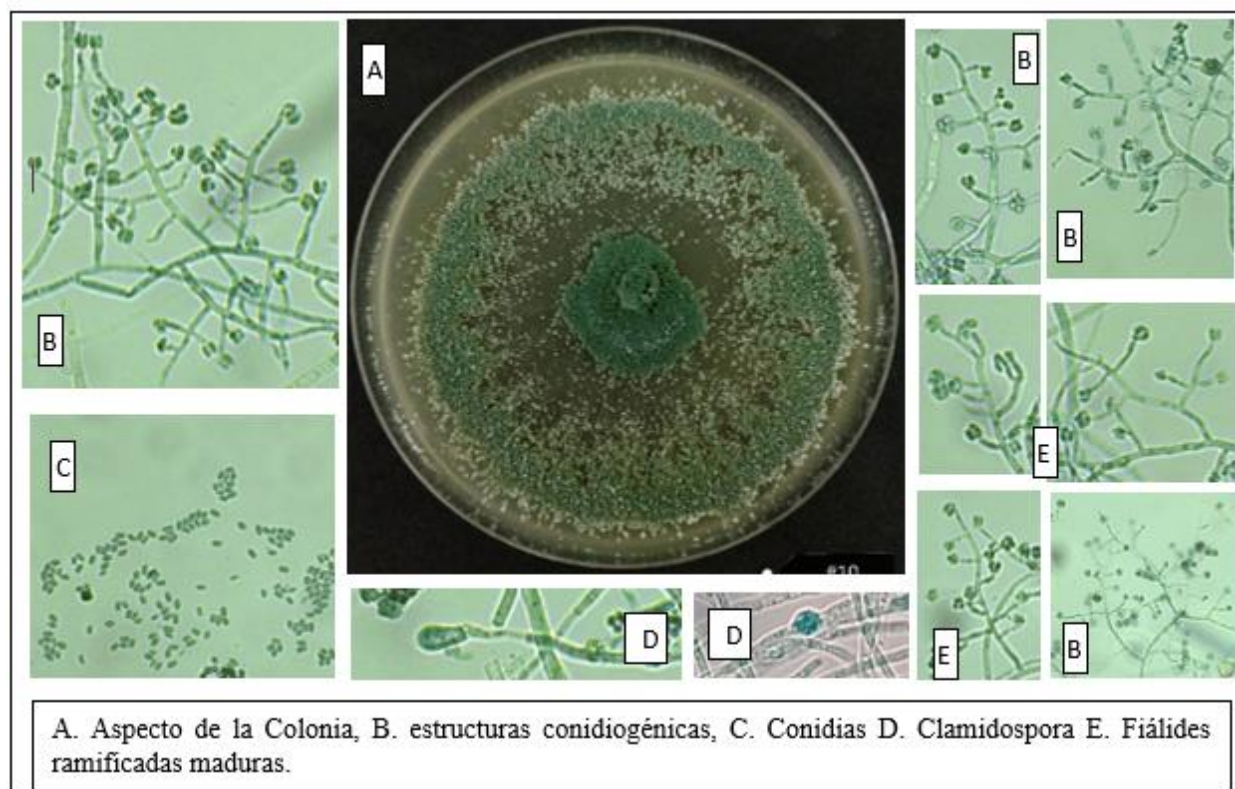
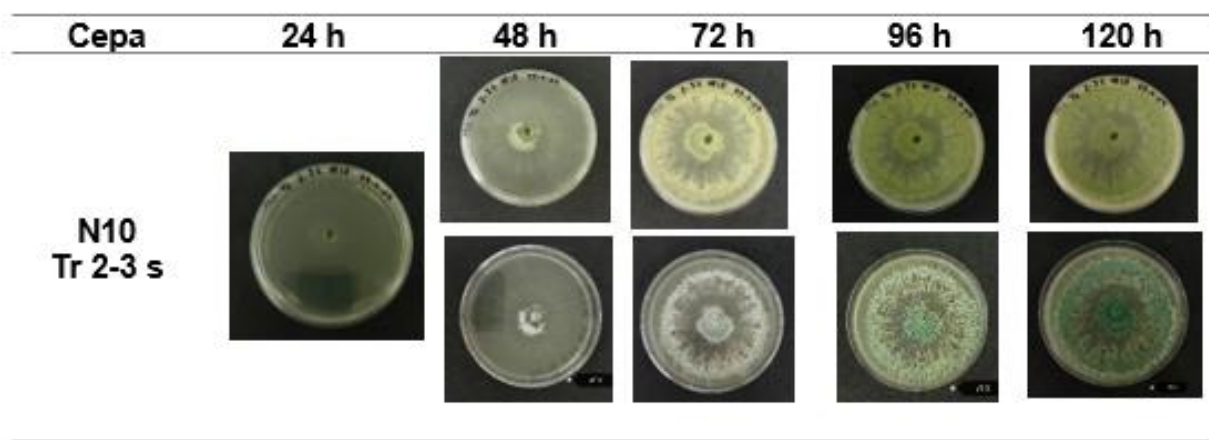


Figura 17

*Desarrollo morfológico de la cepa N 10 (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N10 (*Trichoderma* sp.)

Las características de esta cepa son la típicas de *Trichoderma* , sin embargo la forma de crecimiento de su colonia la hace distintiva ante las demás cepas de este estudio con características similares. Presenta un crecimiento radial de forma irregular y difuso, con micelio aéreo abundante en dos zonas verdes intensas (#28462B) y otra zona con baja esporulación, pulverulenta y dispersa con una pigmentación verde grisácea (#496441). A partir del tercer día de incubación el reverso de la colonia fue adquiriendo una coloración verde opaco (#797B46). Su crecimiento es rápido, cubriendo la placa con agar en 3 días.

Los conidióforos se muestran ramificados y la estructura conidiogénica se presenta en forma de racimo. Las fiálides se presentan solitarias con la forma típica. Los conidios se muestran elipsoides y lisos con un tamaño promedio de $1.84 \pm 0.07 \times 1.14 \pm 0.07 \mu\text{m}$ en relación largo por ancho. Además, se observan clamidosporas.

Cepa N 11 (*Trichoderma* sp.)

Figura 18

*Morfología macro y microscópica de la cepa N 11 (*Trichoderma* sp.)*

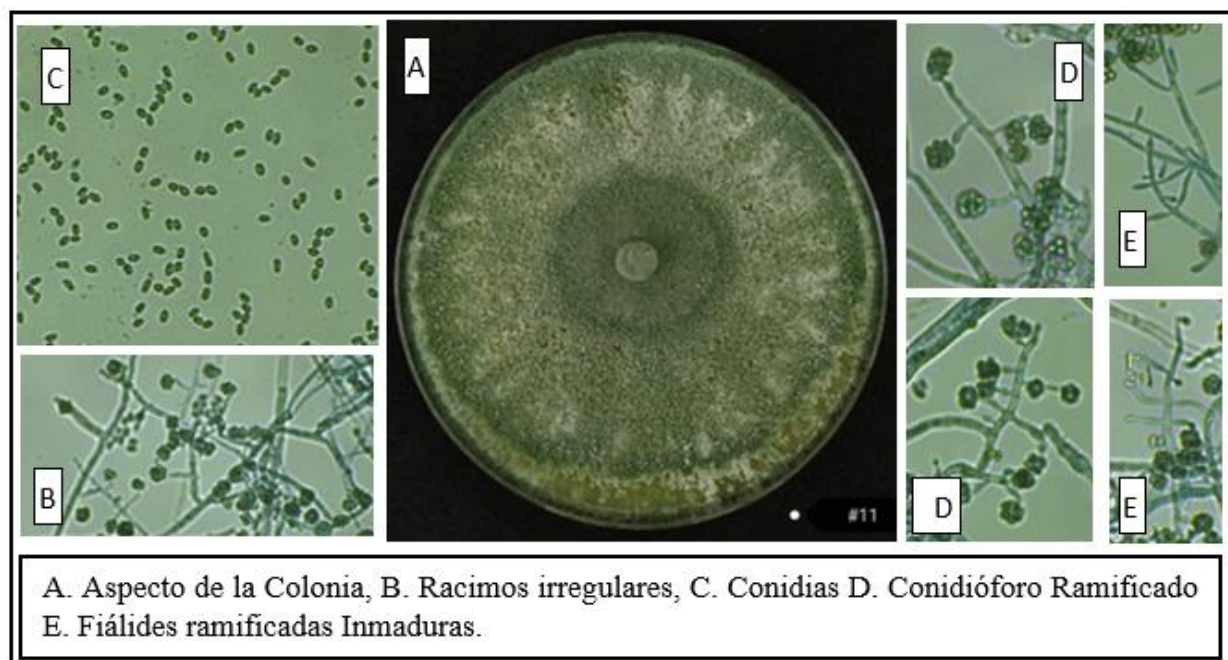
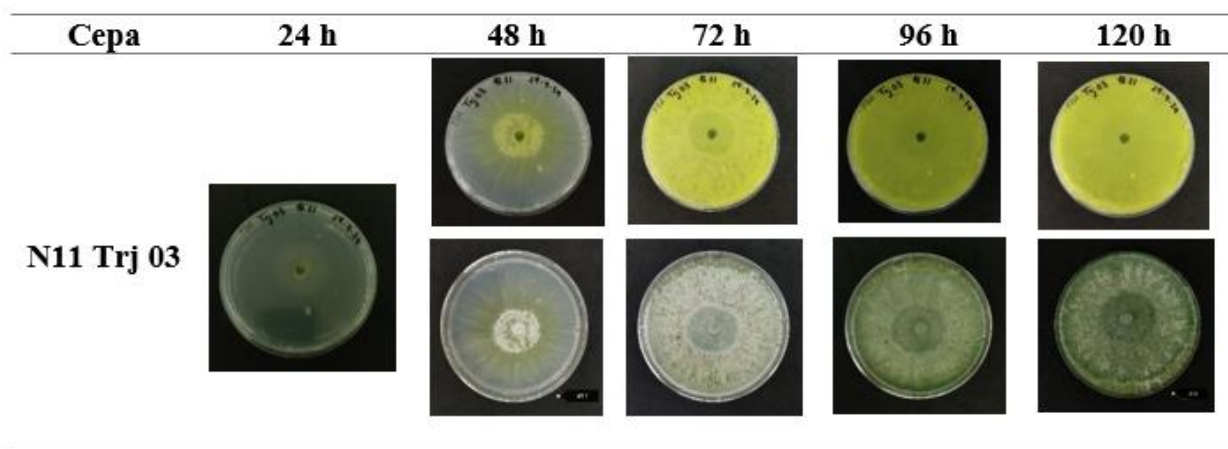


Figura 19

*Desarrollo morfológico de la cepa N 11 (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N 11 (*Trichoderma* sp.)

La colonia presenta un patrón de crecimiento expansivo y circular, con dos zonas bien marcadas con el color verde ceniza (#505D3E) y con ligeras variaciones de un verde más claro (#6E7750), que colonizan rápidamente el medio de cultivo al segundo día de incubación. Su superficie exhibe una textura con un abundante micelio aéreo, granuloso y desmenuzable, con un aspecto granular y ligeramente pulverulento. El reverso de la colonia es una de sus características más destacables, con una coloración amarillosa vibrante (#C5C94D).

Los conidióforos se muestran una ramificados, hialinos y crecen en forma de racimo originando fiálides simples con cabezas compuestas por un grupo de conidias con forma elipsoidal y lisas, con dimensiones promedio de $2.03 \pm 0.13 \times 1.26 \pm 0.09 \mu\text{m}$, en relación largo por ancho. Se observó la presencia de clamidosporas.

Cepa N 12 (*Trichoderma* sp.)

Figura 20

*Morfología macro y microscópica de la cepa N 12 (*Trichoderma* sp.)*

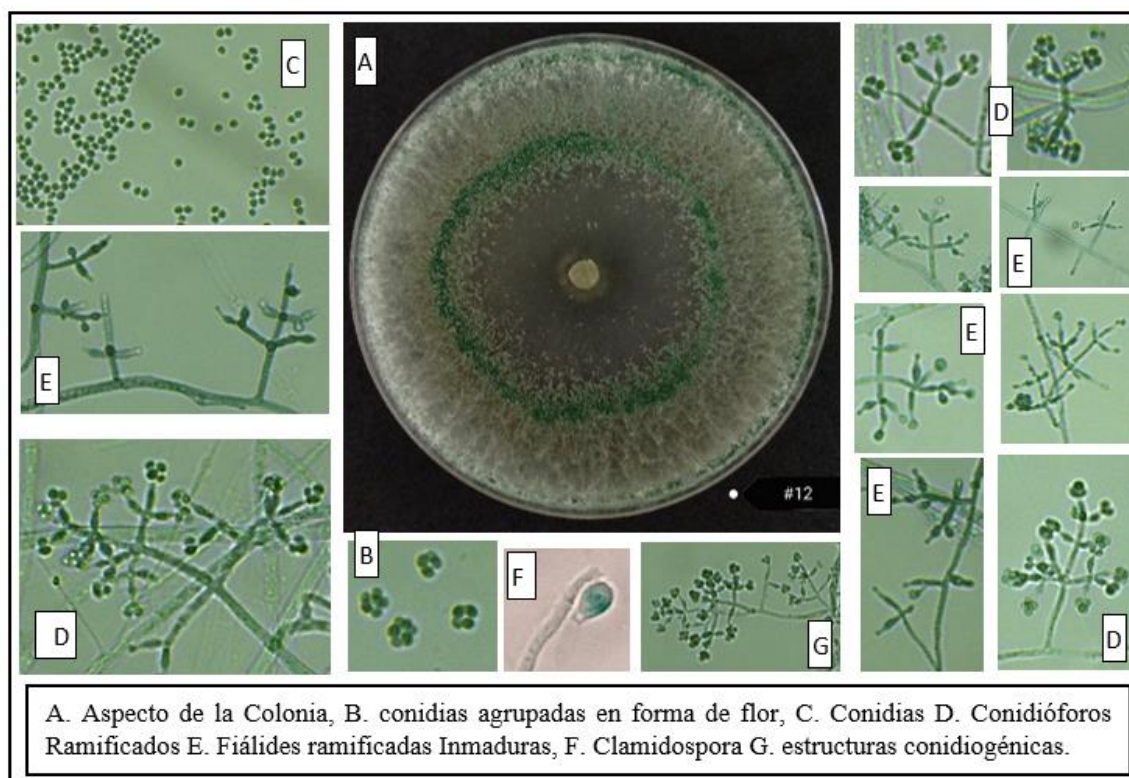
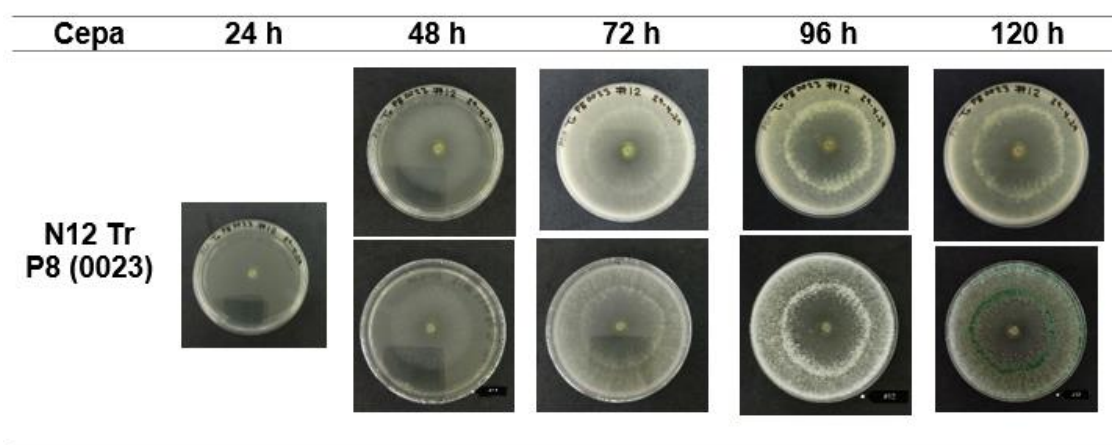


Figura 21

*Desarrollo morfológico de la cepa N 12 (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N12 (*Trichoderma* sp.)

La colonia exhibe un crecimiento radial e irregular, con una zonificación concéntrica característica. El borde de la colonia presenta un micelio aéreo abundante, de textura algodonosa o hiloza de color blanco, que se torna progresivamente menos densa hacia el centro. El anillo concéntrico se presenta un poco difuso, pero con una coloración verde oscuro intenso (#2C4C31), que rodea un núcleo central con menor densidad de micelio aéreo, casi traslúcido (#616B53). Esta cepa mantuvo una coloración blanca hasta el cuarto día de incubación y su crecimiento es rápido llenando la placa al tercer día. El reverso de la colonia mantuvo con una coloración blanca opaca (#B3B08D).

Las estructuras conidiogénicas se muestran en forma de tirso, con conidióforos ramificados y fiálides típicas, hialinas, que en su estado maduro se aglomeran en la punta en grupos de pocas conidias, para luego dispersarse. El diámetro promedio de las conidias es de $2.61 \pm 0.10 \mu\text{m}$ y lucen globosas y lisas. Además la formación de clamidosporas fue evidente.

Cepa N 13 (*Trichoderma* sp.)

Figura 22

*Morfología macro y microscópica de la Cepa N 13 (*Trichoderma* sp.)*

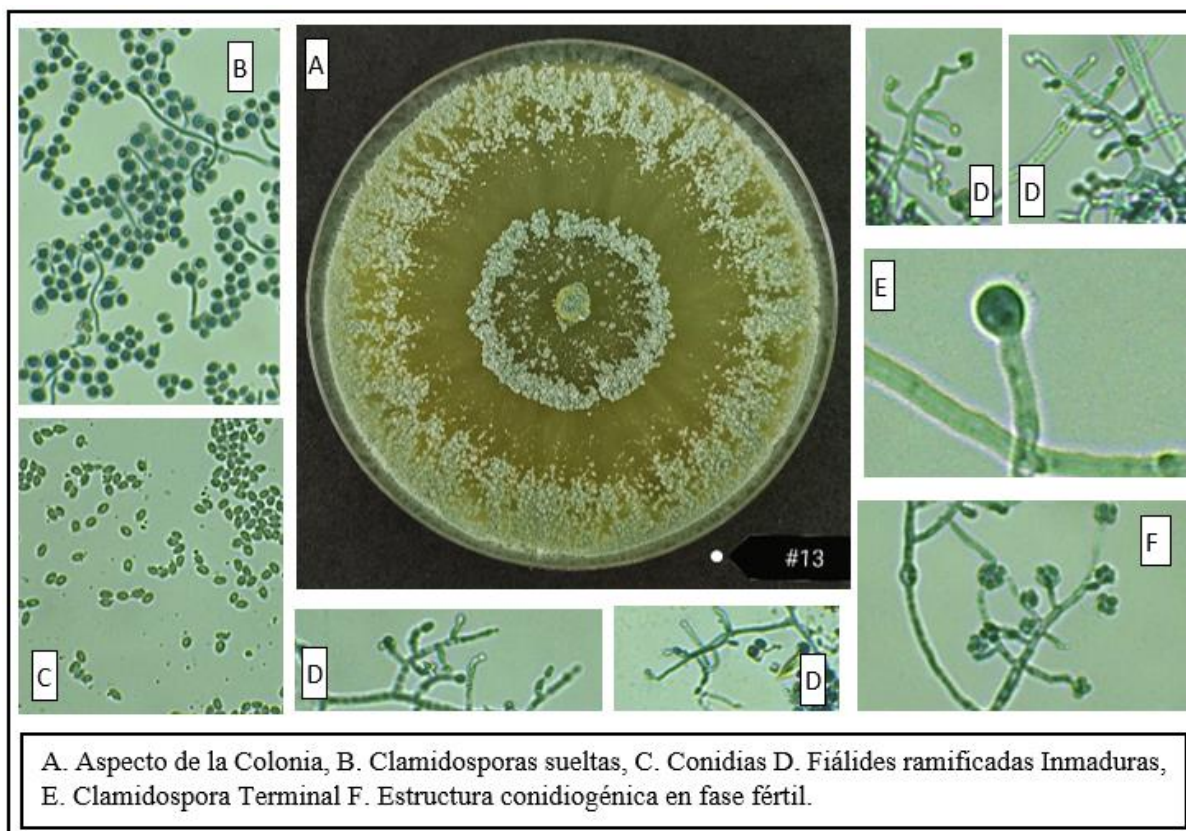
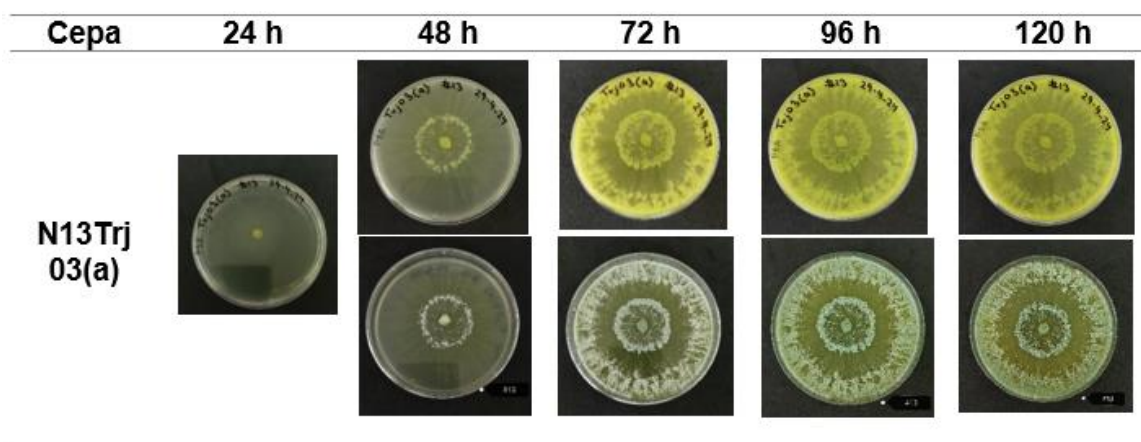


Figura 23

*Desarrollo morfológico de la Cepa N 13 (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N 13 (*Trichoderma* sp.)

La colonia exhibe un crecimiento rápido, radial y una marcada zonificación concéntrica. El borde se presenta con abundante micelio aéreo, de textura pulverulenta con una pigmentación verde pastel (#9BAD85), que contrasta con una zona interna de aspecto menos densa, con micelio submerso, seguido de un anillo concéntrico bien definido de espesor delgado que se degrada en menor densidad hacia el punto de inoculación inicial. El reverso de la colonia mostró una pigmentación verde amarillosa intensa (#AEAF3E).

Las estructuras conidiogénicas crecen en forma de racimo, con conidióforos ramificados y fiálides solitarias que sostienen pocos conidios de forma elipsoidal y lisos, de tamaño promedio de $1.99 \pm 0.15 \times 1.25 \pm 0.07 \mu\text{m}$, en relación largo por ancho; también se evidenció la presencia de clamidosporas.

Cepa N 15 (*Trichoderma* sp.)

Figura 24

*Morfología macro y microscópica de la Cepa N 15 (*Trichoderma* sp.)*

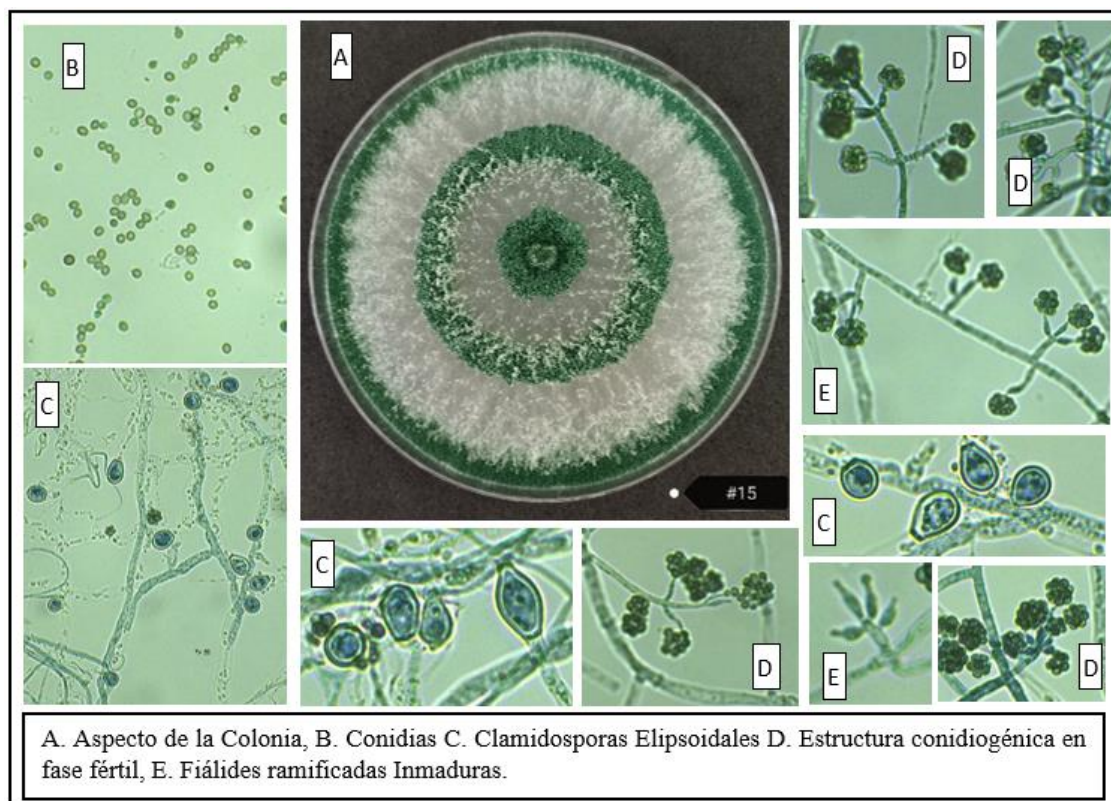
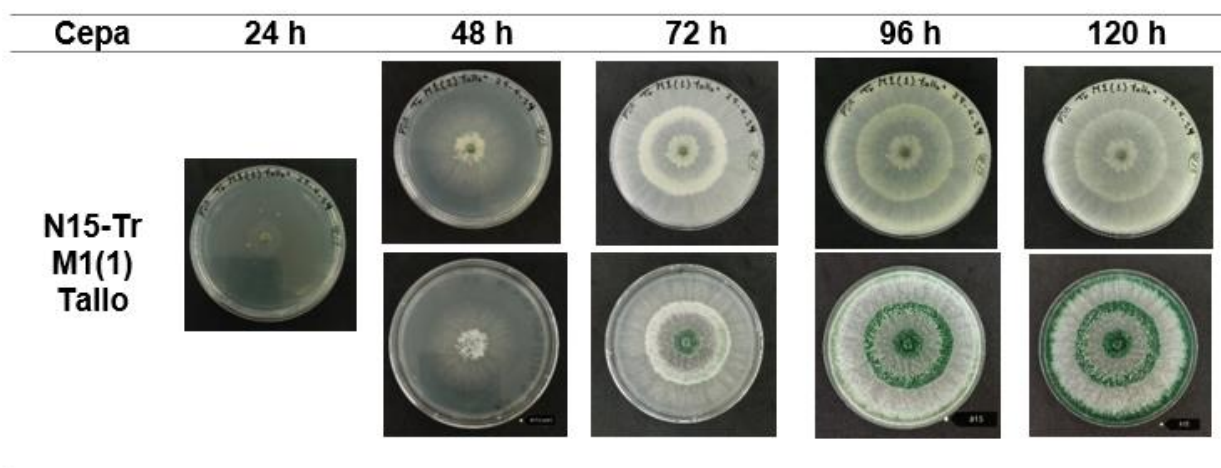


Figura 25

*Desarrollo morfológico de la cepa N 15 (*Trichoderma* sp.)*



Cepa N15 (*Trichoderma* sp.)

Esta cepa es muy llamativa a simple vista, se distingue de las demás por ser aislada de las muestras de tallo de plátano utilizado en este estudio. La colonia muestra un rápido crecimiento, micelio aéreo abundante y un patrón radial, con una zonificación concéntrica pronunciada, evidenciando tres anillos principales. Estos anillos presentan una pigmentación verde intensa (#1C3D24) y una textura pulverulenta. El primer anillo circunda el punto de inoculación, seguido de un segundo anillo de mayor tamaño. El borde de la colonia está delimitado por el tercer anillo, que contrasta con las otras zonas de la colonia las cuales presentan un micelio aéreo distinto, más algodonoso, con una coloración casi blanca (#D2D7C8) parecida al color del reverso de la colonia que mantuvo una coloración muy clara (#C5C8B1) durante todo el período de incubación.

Las estructuras conidiogénicas se presentan en forma de cima simple en su fase juvenil y en su fase madura se presentan con forma de tirso. Los conidióforos lucen ramificados y las fiálides en forma de ampollas con un cuello estrecho y una base más ancha, estas sostienen en su punta un grupo de conidios con forma globosa, con un diámetro promedio de $3.88 \pm 0.34 \mu\text{m}$.

Una característica distintiva de esta cepa fue la abundante formación de clamidosporas tanto globosas con diámetro promedio de $11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$, así como de forma irregular de gran tamaño, con dimensiones promedio de $16.01 \pm 2.75 \times 10.88 \pm 1.48 \mu\text{m}$., el doble del tamaño promedio de otras cepas analizadas.

Descripción generalizada de las 15 cepas

Las colonias muestran un crecimiento radial que se extiende rápidamente colonizando por completo la placa de Petri en un período de 3 o 4 días. Inicialmente, en un inicio el micelio se presenta con una coloración blanca y va adquiriendo gradualmente a una coloración verdosa, que varía dependiendo de la cepa. Esta coloración verde es un indicativa de la producción de conidios en la etapa fértil del hongo. Por lo general el aspecto de las cepas analizadas es granuloso o pulverulento y el micelio aéreo es variado, mayormente abundante y otras veces moderado. Las colonias crecen formando zonas o anillos con poca esporulación y otras zonas de gran grosor con abundante esporulación, algunas colonias varían entre coloraciones de blanco grisáceo con verde o verde en su totalidad después del tercer día de incubación. El reverso de las colonias presenta una coloración verde blanquizca o casi amarillenta.

Las estructuras conidiogénicas observadas crecen muy similarmente a las inflorescencias en las plantas, algunas con forma de racimo y otras con forma de tirso. Las fiálides sostienen conidias en sus puntas y se presentan solitarias o agrupadas de 3-4 verticilos sobre los conidióforos ramificados. La ramificación de los conidióforos varía dependiendo de la etapa de desarrollo en que se encuentren las estructuras, al segundo día de incubación ya se pueden observar al microscopio, pero con una sola ramificación y sin conidias en las puntas de las fiálides, indicando que aún están en formación, desde el tercer día se van notando entre 3 a 5 o más ramificaciones con gran cantidad de conidias indicando su periodo fértil. Los conidios se presentan de forma elipsoidal o globosos, pero lisos y sin ornamentaciones. Las clamidosporas estuvieron presentes en todas las muestras variando su tamaño y forma dependiendo de la muestra.

Tabla 2

Cuadro Comparativo de las características morfológicas y morfométricas de las cepas de Trichoderma spp.

Características Morfológicas de <i>Trichoderma</i> spp.				
S/N	Clamidosporas (Diámetro)	Forma de los conidios	Tamaño de los conidios (largo y ancho para elipsoides / diámetro para globosas)	Tamaño de las fiálides (largo)
1. Trj Pae	-----	Elipsoidal	$2.00 \pm 0.14 \times 1.16 \pm 0.07 \mu\text{m}$	7.06 ± 1.07
2. Trj-PC86	6.39 ± 0.78	Globosas	$2.73 \pm 0.23 \mu\text{m}$	7.04 ± 1.65
3. Trj 1	8.20 ± 1.13	Globosas	$3.66 \pm 1.17 \mu\text{m}$	8.27 ± 0.81
4. Tr PH-V 0019	-----	Globosas	$2.76 \pm 0.12 \mu\text{m}$	5.52 ± 1.39
5. Trj 01	-----	Elipsoidal	$2.12 \pm 0.15 \times 1.06 \pm 0.09 \mu\text{m}$	7.55 ± 1.18
6. Trj 02	-----	Elipsoidal	$2.16 \pm 0.11 \times 1.16 \pm 0.09 \mu\text{m}$	-----
7. Tj 04	$4.64 \pm 0.53 \mu\text{m}$	Elipsoidal	$2.05 \pm 0.17 \times 1.19 \pm 0.06 \mu\text{m}$	-----
8. Trd 2-2	$5.37 \pm 0.46 \mu\text{m}$	Elipsoidal	$2.07 \pm 0.13 \times 1.29 \pm 0.11 \mu\text{m}$	7.30 ± 0.85
9. Trj 05	-----	Elipsoidal	$1.92 \pm 0.13 \times 1.2 \pm 0.07 \mu\text{m}$	8.37 ± 1.94
10. Trj 2-3s	-----	Elipsoidal	$1.84 \pm 0.07 \times 1.14 \pm 0.07 \mu\text{m}$	7.74 ± 1.27
11. Trj 03	-----	Elipsoidal	$2.03 \pm 0.13 \times 1.26 \pm 0.09 \mu\text{m}$	7.08 ± 1.35
12. Tr P8 0023	-----	Globosas	$2.61 \pm 0.10 \mu\text{m}$	6.45 ± 0.93
13. Trj 03(a)	$5.87 \pm 0.43 \mu\text{m}$	Elipsoidal	$1.99 \pm 0.15 \times 1.25 \pm 0.07 \mu\text{m}$	-----
14. Trj 05 1-2	-----	Elipsoidal	$1.91 \pm 0.11 \times 1.25 \pm 0.09 \mu\text{m}$	6.23 ± 0.80
15. TrM1 (1)Tallo	$11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$	Globosas	$3.88 \pm 0.34 \mu\text{m}$	7.00 ± 0.47

Con el fin de garantizar la calidad de los datos presentados, se optó por excluir las mediciones de aquellas estructuras donde su observación no fue clara, consistente o se presentaban en pequeñas cantidades, para evitar incertidumbres en el análisis de los resultados.

Tabla 3

Caracterización morfométrica de las estructuras conidiogénicas de Trichoderma spp.

Variabilidad en las dimensiones de las estructuras conidiogénicas de <i>Trichoderma</i> spp.			
Estructura	Dimensión (μm)	Promedio ± DE (μm)	Rango (μm) tamaño min y máx.
Esporas elipsoidales	Largo y ancho	$2.01 \pm 0.1 \times 1.2 \pm 0.07$	$1.84 - 2.16 \times 1.06 - 1.29$
Esporas globosas	Diámetro	3.13 ± 0.59	$2.61 - 3.88$
Clamidosporas	Diámetro	7.07 ± 2.67	$4.64 - 11.94$
Fiálides	Largo	7.13 ± 0.82	$5.52 - 8.37$

Se llevó a cabo un análisis morfométrico detallado de las estructuras conidiogénicas de las cepas de *Trichoderma* evaluadas. Las mediciones se centraron en el diámetro para los conidios globosos, longitud y ancho para los conidios elipsoides, clamidosporas y fiálides. Los conidios globosos presentaron un diámetro promedio de 3.13 μm , mientras que los elipsoides mostraron dimensiones promedio de 2.01 x 1.2 μm . Las clamidosporas alcanzaron un diámetro promedio de 7.07 μm y las fiálides 7.13 μm de largo; sin embargo, cabe señalar que hubo gran variabilidad en el tamaño de las clamidosporas y de las fiálides según la etapa de desarrollo del hongo.

Tabla 4

Crecimiento radial micelial de las cepas de Trichoderma spp. en cultivo in vitro durante 72 horas

Crecimiento Micelial diario de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.					
N1 Tr.	Hora	N2 Tr.	Hora	N3 Tr.	Hora
0,7 cm	24 h	0,6 cm	24 h	0,5 cm	24 h
3,4 cm	48 h	2,6 cm	48 h	2,2 cm	48 h
4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h
N4 Tr.	Hora	N5 Tr.	Hora	N6 Tr.	Hora
0,7 cm	24 h	1,3 cm	24 h	1,3 cm	24 h
2,4 cm	48 h	3,9 cm	48 h	3,8 cm	48 h
4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h
N7 Tr.	Hora	N8 Tr.	Hora	N9 Tr.	Hora
1,4 cm	24 h	1,6 cm	24 h	1,4 cm	24 h
4,0 cm	48 h	4,0 cm	48 h	3,9 cm	48 h
4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h
N10 Tr.	Hora	N11 Tr.	Hora	N 12 Tr.	Hora
0,9 cm	24 h	1,4 cm	24 h	0,6 cm	24 h
3,5 cm	48 h	4,0 cm	48 h	2,6 cm	48 h
4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h
N13 Tr.	Hora	N14 Tr.	Hora	N15 Tr.	Hora
1,6 cm	24 h	1,4 cm	24 h	0,9 cm	24 h
4,0 cm	48 h	4,0 cm	48 h	2,4 cm	48 h
4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h	4,0 cm	72 h

Tabla 5

Tasa de crecimiento micelial (TCM) de cepas de Trichoderma spp. clasificadas como de baja velocidad de crecimiento. GRUPO A: evaluadas entre las 24 y 72 horas

S/N	Aislado	TCM (cm/hora)	TCM (cm/día)
1	Trj Pae	0,06875 cm/h	1,65 cm/día
2	Trj-PC86	0,07083 cm/h	1,7 cm/día
3	Trj 1	0,07291 cm/h	1,75 cm/día
4	Tr PH-V 0019	0,06875 cm/h	1,65 cm/día
10	Trj 2-3 s	0,06458 cm/h	1,55 cm/día
12	Tr P8 0023	0,07083 cm/h	1,7 cm/día
15	Tr M1 (1)Tallo	0,06458 cm/h	1,55 cm/día
Promedio de TCM del grupo A: 1,6 cm/día			

Tabla 6

Tasa de crecimiento micelial (TCM) de cepas de Trichoderma spp. clasificadas como de alta velocidad de crecimiento GRUPO B: evaluadas entre las 24 y 48 horas

S/N	Aislado	TCM (cm/hora)	TCM (cm/día)
5	Trj 01	0,10833 cm/h	2,6 cm/día
6	Trj 02	0,10416 cm/h	2,5 cm/día
7	Tj 04	0,10833 cm/h	2,6 cm/día
8	Trd 2-2	0,1 cm/h	2,4 cm/día
9	Trj 05	0,10416 cm/h	2,5 cm/día
11	Trj 03	0,10833 cm/h	2,6 cm/día
13	Trj 03(a)	0,1 cm/h	2,4 cm/día
14	Trj 05 1-2	0,10833 cm/h	2,6 cm/día
Promedio de TCM del grupo B: 2,5 cm/día			

Los resultados muestran que las colonias alcanzaron el diámetro máximo de 4 cm entre las 48 y las 72 horas, llenando completamente la placa Petri de 8.5 cm. La tasa de crecimiento promedio del grupo A, fue de 1,6 cm/día y del grupo B, fue de: 2,5 cm/día. Estos resultados nos dan una idea general de la velocidad promedio de crecimiento de cada una de las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

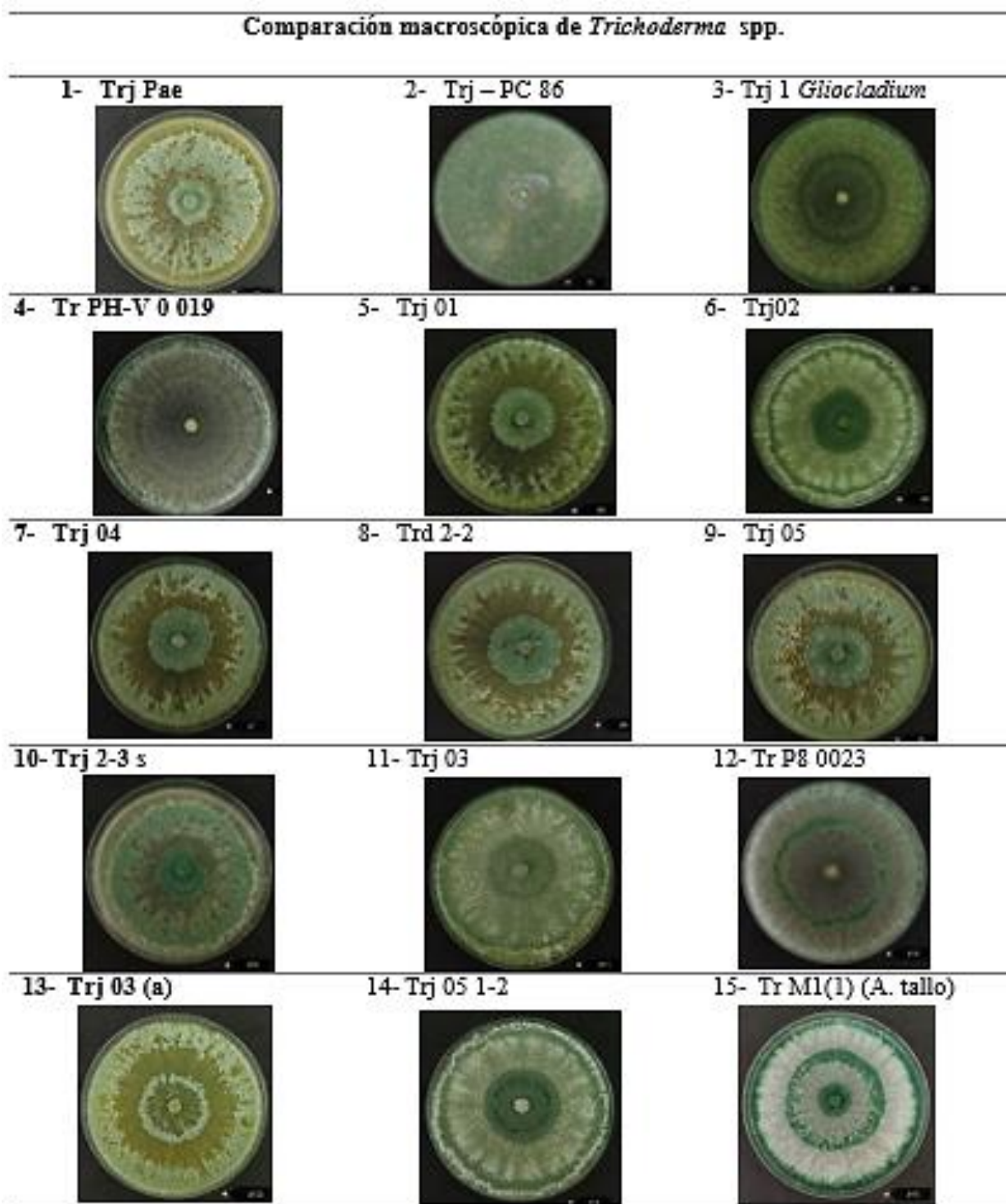
Tabla 7

Caracterización Morfológica de los aislados de Trichoderma spp. basada en características coloniales y estructuras reproductivas

S/N	Aislado	Color de colonia: Verde (Código)	Color del reverso de la colonia	Textura de la colonia	Forma de crecimiento de las estructuras conidiogénicas	Forma de los conidios	Formación de clamidosporas (presente/ausente)
1	Trj Pae	#9DAA8A	#C5C971	Granuloso/pulverulento	Racimo	Elipsoidal	Presentes
2	Trj-PC86	#677C60	#ABAD90	Arrugado/granuloso	Tirso	Globosas	Presentes
3	Trj 1	#394725 y #273219	#7D7F6A	Hiloza/vellosa	Cima simple	Globosas	Presentes
4	Tr PH-V 0019	#3D4B35 y #83896A	Traslúcida	Pulverulenta	Tirso	Globosas	Presentes
5	Trj 01	#4D643C	#8C9546	Algodonosa y granulada	Racimo	Elipsoidal	Presentes
6	Trj 02	#253E1C	#9AA662	Pulverulenta	Racimo	Elipsoidal	Presentes
7	Tj 04	#60714F	#747733	Algodonosa/granulada	Racimo	Elipsoidal	Presentes
8	Trd 2-2	#50694A	#8E9147	Algodonosa/granulada	Racimo	Elipsoidal	Presentes
9	Trj 05	#4A5C3E	#8A8E43	Algodonosa/granulada	Racimo	Elipsoidal	Presentes
10	Trj 2-3s	#28462B	#797B46	Pulverulenta	Racimo	Elipsoidal	Presentes
11	Trj 03	#607142	#C5C94D	Granulosa	Racimo	Elipsoidal	Presentes
12	Tr P8 0023	#2C4C31	#B3B08D	Algodonosa/hiloza	Tirso	Globosas	Presentes
13	Trj 03(a)	#9BAD85	#AEAF3E	Pulverulenta	Racimo	Elipsoidal	Presentes
14	Trj 05 1-2	#3C5234	#B4BC6B	Pulverulenta	Racimo	Elipsoidal	Presentes
15	Tr M1 (1)Tallo	#1C3D24	#D2D7C8	Pulverulenta/granulosa	Tirso	Globosas	Presentes

Figura 26

Morfología colonial de 15 aislados de *Trichoderma* spp. en cultivo in vitro al quinto día de incubación



Al evaluar el crecimiento macroscópico de las 15 cepas de *Trichoderma*, se determinó que todas las colonias presentaron un crecimiento radial, pero con ciertas diferencias en cuanto a su morfología. En cuanto a la pigmentación, se construyó una Carta de colores verdosos (Figura 43), mediante el uso de una aplicación de análisis de imágenes, que refleja de manera precisa los tonos observados experimentalmente, variando entre el verde claro y el verde oscuro, con algunas tonalidades de verdes más amarillentas o blanquecinas. En términos de textura, la mayoría de las colonias exhibieron una superficie algodonosa, vellosa o pulverulenta, pero con diferencias en cuanto al desarrollo de anillos concéntricos o la densidad del micelio aéreo.

Aislamiento e Identificación Morfológica de *Fusarium* sp.

A partir de tejido vegetal de tallo de plátano con síntomas de fusariosis, se realizaron aislamientos en medio PDA. Siguiendo el protocolo de Agrios (1995) para la desinfección y aislamiento de hongos fitopatógenos, se seleccionaron las colonias con características morfológicas compatibles con *Fusarium*.

Figura 27

Sintomatología necrótica en tallo de plátano



A. Trozos de tejido interno de tallo de plátano. B. Tejidos internos viscoso y podrido. C. Infección más avanzada con manchas marrones en el interior del tallo, indicativas de una necrosis de los tejidos.

Figura 28

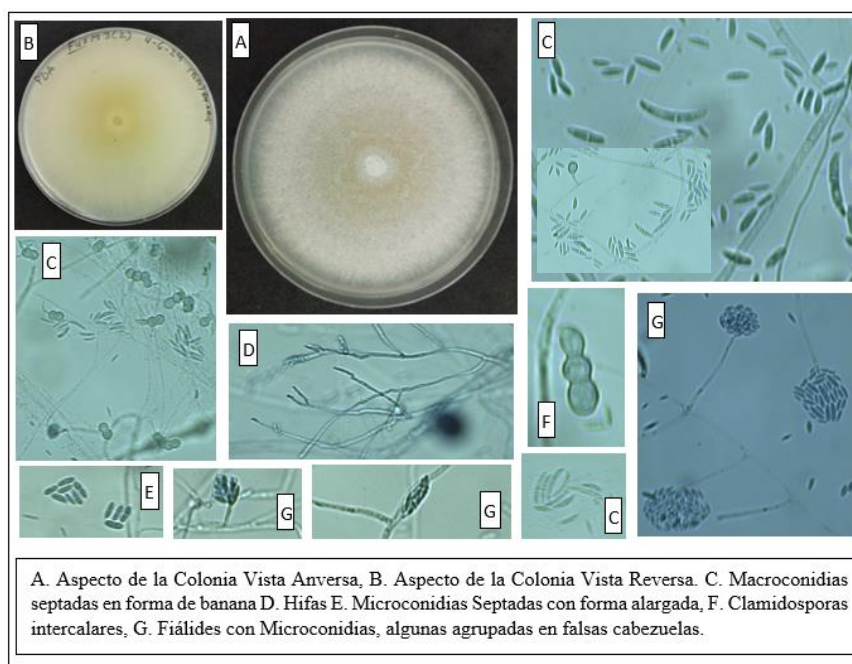
Aislamiento de Fusarium en medio de cultivo PDA



Cepa experimental de *Fusarium* sp.

Figura 29

Morfología macro y microscópica de la Cepa de Fusarium sp.



La colonia de *Fusarium* sp. presentó un crecimiento radial, cubriendo la placa de Petri en su totalidad hasta el día 8 de incubación. El micelio aéreo era abundante, crece de manera uniforme y circular a partir del punto de inoculación, con zonas concéntricas con diferencias muy tenues o difusas, su coloración es blanca levemente cremosa, su textura es algodonosa y el reverso de la colonia se presentó de color blanco más amarilloso.

Microscópicamente, exhibe una abundante producción de microconidias y macroconidias curvadas, fusiformes, en forma de hoz o en forma de banana, mientras que las microconidias eran unicelulares. Se observó gran abundancia de clamidosporas, muchas de ellas agregadas en tríadas.

La observación microscópica reveló la presencia de macroconidias en forma de banana, confirmando la identidad de género *Fusarium* sp., según lo indican autores como (Wang & Zabel, 1990; Fothergill et al., 1997).

Evaluación de la Actividad Antagonista

Para el experimento antagonista se eligió una sola cepa de *Fusarium* sp. en contra de las 14 cepas de *Trichoderma* spp. y la cepa de *Gliocladium*, que se evaluaron durante aproximadamente una semana. El cálculo de inhibición se realizó el séptimo día para las 15 cepas en antagonismo.

Figura 30

Crecimiento micelial progresivo de la cepa de control de Fusarium sp. durante diez días de incubación

**Figura 31**

Desarrollo Radial de Fusarium sp.

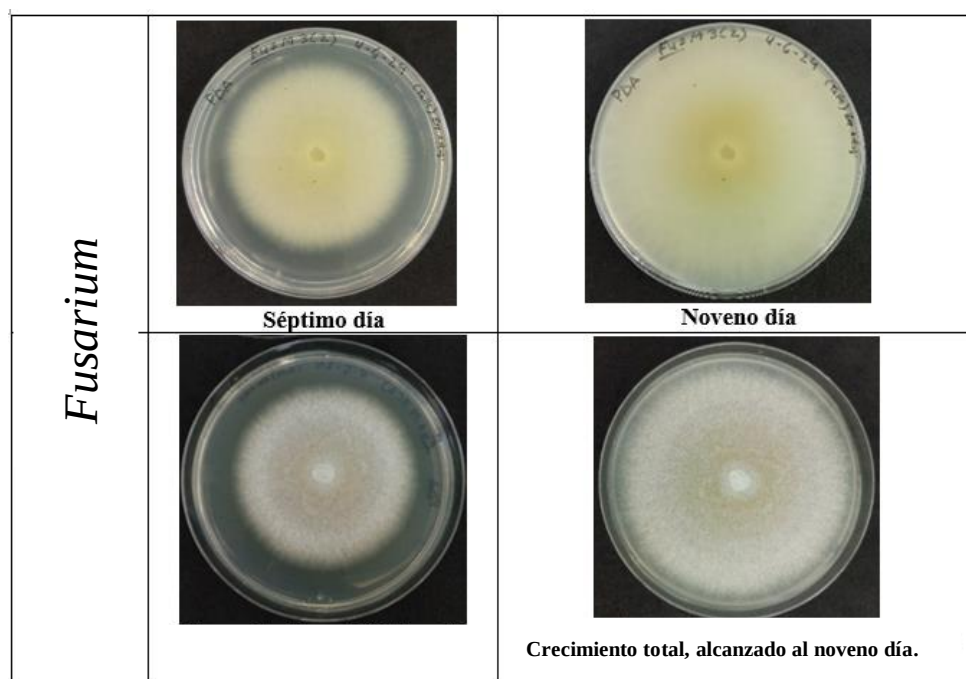


Figura 32

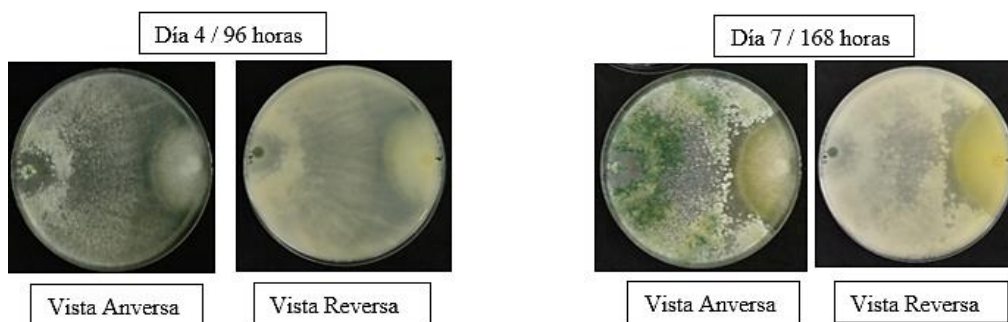
Cepa N1 contra la cepa de Fusarium experimental



La Cepa N1 tuvo su primera interacción con *Fusarium* a las 72 horas de incubación, en donde el patógeno creó una barrera física dejando entre ellas una pequeña zona de inhibición, en respuesta al rápido cercamiento por parte de *Trichoderma*, esta barrera se mantuvo hasta el quinto día de incubación en donde *Trichoderma* logró hacer contacto directo con el patógeno. Para el séptimo día la cepa N1 estableció una inhibición de un (70%) contra la cepa experimental. Con el pasó de los días, esta colonia permaneció igual, sin adquirir coloraciones nuevas y sin crecer por encima de *Fusarium sp.* El mecanismo de acción predominante fue la competencia por espacio y nutrientes. Cabe destacar que aunque estas lograron hacer contacto directo hasta el quinto día, *Fusarium sp.* no pudo crecer más a partir del tercer día y la pequeña zona de inhibición fue ocupada por *Trichoderma* días posteriores, pero sin crecer por encima de *Fusarium sp.* Esta acción de crecimiento superior de *Trichoderma* en la zona de inhibición se repite constantemente en las demás cepas en antagonismo.

Figura 33

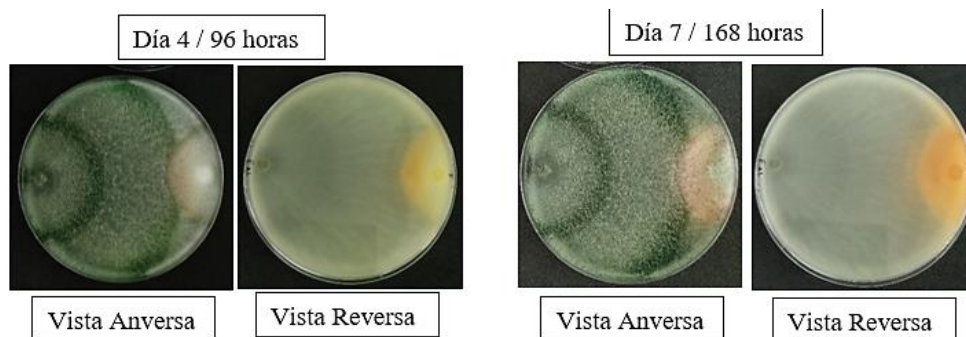
Cepa N2 contra la cepa de Fusarium experimental



La cepa N2 alcanzó el contacto directo con el patógeno hasta el cuarto día de incubación y para el séptimo día estableció una inhibición de un (67 %) a la cepa experimental. Con el pasó de los días, esta colonia permaneció igual, sin adquirir coloraciones nuevas y sin crecer por encima de *Fusarium* sp. El mecanismo de acción predominante fue la competencia por espacio.

Figura 34

Cepa N3 contra la cepa de Fusarium experimental

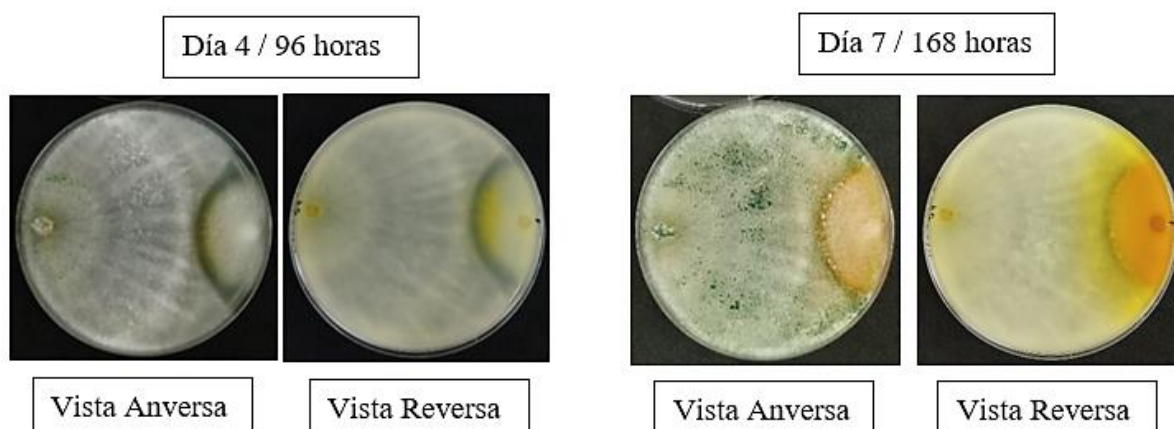


La cepa de *Gliocladium* alcanzó una capacidad de inhibición contra *Fusarium* de un 64%, diferenciándose notablemente del resto de las cepas analizadas por la observación de múltiples mecanismos de acción, como la competencia por nutrientes y el fuerte parasitismo (donde el *Gliocladium* prácticamente cubrió por completo al *Fusarium*), adicionalmente, producto de esta inhibición se observó un pigmento de color naranja intenso o rojizo en la zona de interacción.

Fusarium, en respuesta a esta parasitación creció ligeramente demás con 0,3 cm adicionales a la medición que se tuvo en el momento en que las cepas hicieron contacto directo.

Figura 35

Cepa N4 contra la cepa de Fusarium experimental



La cepa N4 al igual que la cepa de *Gliocladium* también alcanzó una capacidad de inhibición contra *Fusarium* de un 64 %, observando los mecanismos de acción, de competencia por nutrientes y parasitismo, a la vez creciendo por encima del *Fusarium*, produciendo un pigmento amarillo mostaza vibrante en la zona de interacción.

Figura 36

Cepa N5, N7, N8 Y N9 contra la cepa de Fusarium experimental

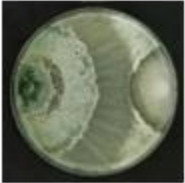
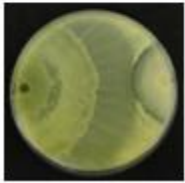
Porcentaje de inhibición	Día 4 / 96 horas		Día 7 / 168 horas	
	Vista Anversa	Vista Reversa	Vista Anversa	Vista Reversa
N5 70 %				
N7 67 %				
N8 67 %				
N9 70 %				

Mecanismo de acción observado: Competencia por nutrientes.

Las cuatro cepas de *Trichoderma* mostraron un alto nivel de antagonismo frente a *Fusarium* sp., con porcentajes de inhibición que variaron ligeramente entre el 67 % y el 70 %. Esta pequeña variación sugiere que aunque existen ligeras diferencias en la capacidad antagonica, las cepas comparten un mecanismo de acción común siendo este la competencia por espacio y nutrientes.

Figura 37

Conjunto de cepas N6 y N14 contra la cepa de Fusarium experimental

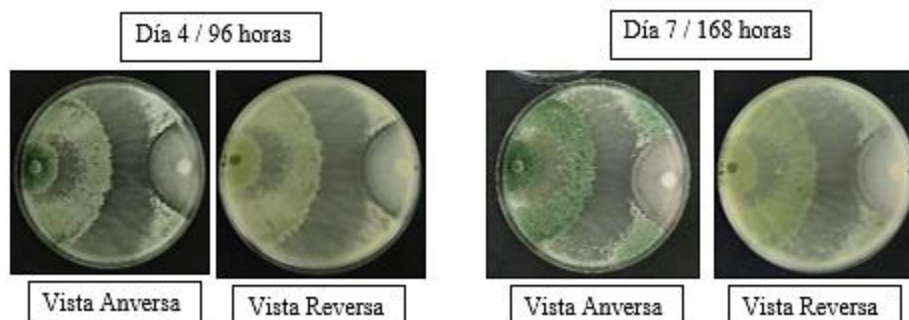
Porcentaje de inhibición	Día 4 / 96 horas		Día 7 / 168 horas	
	Vista Anversa	Vista Reversa	Vista Anversa	Vista Reversa
N6 67%				
N14 67%				

Mecanismo de acción observado: Competencia por nutrientes.

Estas cepas de *Trichoderma* evaluadas también comparten el mismo mecanismo de acción, de competencia por nutrientes y espacio, sin diferencias fenotípicas en su interacción. Con el pasó de los días, estas colonias permanecieron igual, sin adquirir coloraciones nuevas producto de la interacción y sin crecer por encima de *Fusarium sp.*. Al igual que el resto de las cepas el cálculo final de inhibición se realizó al séptimo día, dando como resultado un 67 % de porcentaje de inhibición para ambas cepas.

Figura 38

Cepa N 10 contra la cepa de Fusarium experimental

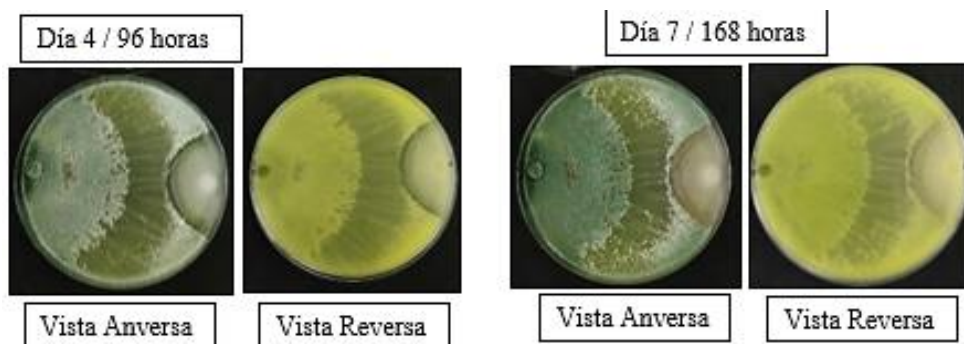


Al igual que otras cepas, la N10 tuvo su primera interacción a las 72 horas de incubación, en donde *Fusarium* forma una pequeña zona de inhibición. Esta barrera se mantuvo hasta el día posterior (96 h) de incubación, alcanzando entonces el contacto directo.

La cepa N 10 alcanzó el contacto directo con el patógeno hasta el cuarto día de incubación, y para el séptimo día estableció una inhibición de un (64%) a la cepa experimental. Con el pasó de los días, las colonias mantuvieron sus coloraciones iniciales en su etapa fértil, solo notando un mayor crecimiento de esporulación en ambas cepas, pero sin crecer por encima de *Fusarium* sp.. El mecanismo de acción predominante fue la competencia por espacio y nutrientes.

Figura 39

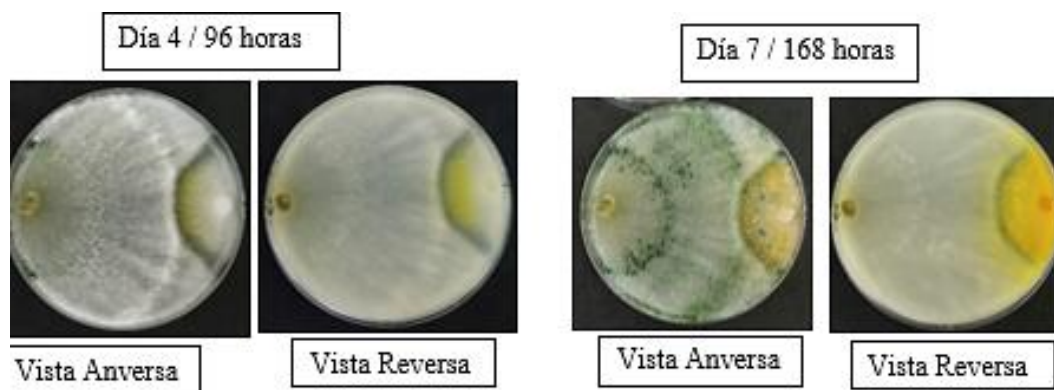
Cepa N 11 contra la cepa de Fusarium experimental



De forma similar a otros aislados, la cepa N11 manifestó su primera interacción a las 72 horas de cultivo, momento en que *Fusarium* desarrolló una pequeña barrera a su alrededor. Esta barrera se conservó hasta el día siguiente, cuando finalmente se produjo el contacto directo entre ambos microorganismos. Al llegar al séptimo día, había logrado inhibir el crecimiento de la cepa de *Fusarium* en un 70%. A medida que avanzaba el tiempo, las colonias de ambas cepas mantuvieron sus colores característicos de la fase reproductiva, destacando únicamente un incremento en la esporulación de ambas partes, pero sin que *Trichoderma* sobrecreciera por encima de *Fusarium* sp. El mecanismo de acción principal observado fue la competencia por nutrientes y espacio.

Figura 40

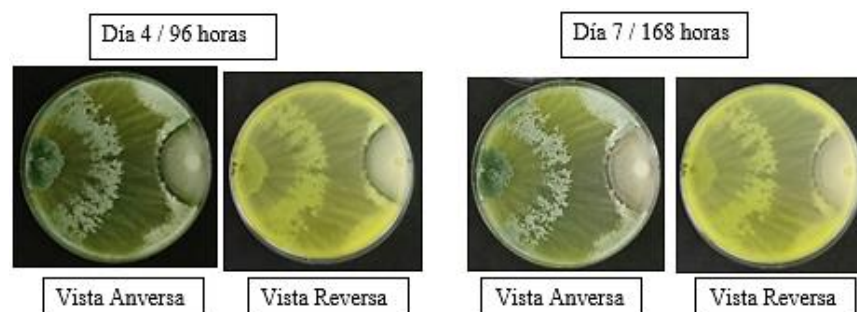
Cepa N 12 contra la cepa de Fusarium experimental



N12, tuvo su primera interacción a las 72 horas de incubación, en la cual *Fusarium* creó una amplia barrera de defensa, que persistió hasta las 96 horas (cuarto día), instante en que se estableció el contacto directo entre las colonias, curiosamente y como resultado del antagonismo, se originó una coloración amarillenta en la colonia de *Fusarium*, notándose más intensa a medida que pasaban los días. Para el séptimo día, demostró una capacidad de inhibición del 64%. La cepa N12 logró crecer por encima de *Fusarium* sp. y la estrategia antagónica predominante fue competencia por nutrientes y parasitismo.

Figura 41

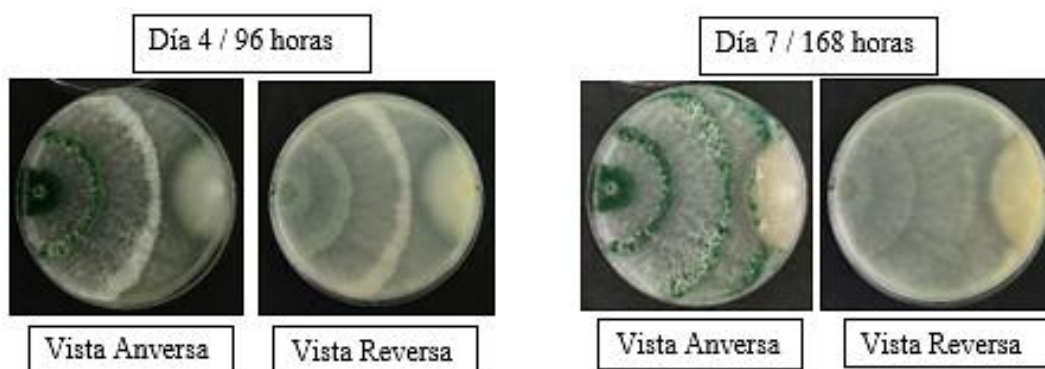
Cepa N 13 contra la cepa de Fusarium experimental



La cepa N13, tuvo su primera interacción a las 72 horas de incubación, en el cual *Fusarium* mostró una pequeña barrera de inhibición, que se mantuvo hasta las 96 horas (día 4), momento en que las colonias entraron en contacto directo. Para el séptimo día, había conseguido una inhibición del 70 % y ambas colonias conservaron sus coloraciones típicas de sus fases fértiles, aumentaron su grado de esporulación, pero sin invadir sus áreas. El mecanismo de antagonismo más evidente fue la competencia por espacio y nutrientes.

Figura 42

Cepa N15 contra la cepa de Fusarium experimental



La cepa N15, tal como otras interactuó inicialmente a las 72 horas de incubación, creando una barrera que se mantuvo hasta las 96 horas, instante en que se estableció el contacto directo. Para el séptimo día, demostró una capacidad de inhibición del 64% y logró crecer por encima de la cepa experimental, parasitando a *Fusarium* sp., pero sin nuevas coloraciones y observando a la vez el mecanismo de acción de competencia por nutrientes y espacio.

Discusión

Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica de las diversas cepas de *Trichoderma* revelaron características compartidas, típicas del género, así como una notable diversidad fenotípica entre las cepas analizadas. Este hallazgo evidencia una amplia variabilidad dentro de este importante grupo de hongos filamentosos.

Una característica común observada en todas las cepas evaluadas fue el rápido crecimiento, que permitió colonizar la totalidad de la placa de Petri en un período aproximado de tres días. Esta capacidad de crecimiento acelerado constituye un rasgo distintivo ampliamente reportado para el género *Trichoderma* y se relaciona directamente con su éxito como colonizador saprofítico y con su potencial como agente de biocontrol (Sánchez et al., 2019). En el caso de *Trichoderma* spp., el quinto día posterior a la inoculación resultó óptimo para la evaluación fenotípica del género. En este momento las colonias alcanzaron su madurez, lo que facilitó la observación y el registro de características como la morfología de la colonia –algodonosa, pulverulenta u otras–, la pigmentación, la esporulación, el color, la presencia de micelio aéreo, el color del reverso, la textura de la superficie, la producción de pigmentos y la formación de anillos concéntricos.

La principal forma de reproducción de *Trichoderma* corresponde a la producción de esporas. Este proceso se observó en todas las cepas durante su etapa de maduración. En esta fase se registraron cambios en la coloración del micelio, que pasó de un tono blanco inicial a diversas tonalidades de verde. Además, el micelio presentó una consistencia blanda y fácilmente deformable en todas las colonias. A pesar de estas similitudes generales, se identificaron diferencias marcadas entre las cepas, lo que sugiere una elevada diversidad o incluso la presencia de distintas especies dentro del grupo analizado. Entre estas diferencias destacaron los patrones

de crecimiento. Todas las cepas mostraron crecimiento radial o formación de anillos concéntricos con diferentes densidades. Sin embargo, los patrones presentaron variaciones. Algunas cepas evidenciaron crecimiento uniforme con esporulación irregular, con zonas densas y difusas o con un aspecto granuloso o pulverulento y bordes irregulares. En contraste, otras cepas presentaron una zonificación concéntrica más definida y una textura más algodonosa o hiloza. Estas diferencias en los patrones de crecimiento y en la textura del micelio aéreo constituyeron criterios útiles para la diferenciación preliminar de las cepas.

A nivel microscópico, la confirmación del género *Trichoderma* en las cepas estudiadas se evidenció durante la etapa fértil del hongo. En esta fase se observó la presencia de conidióforos ramificados que mostraron diferencias sutiles en los patrones de ramificación. Estos se clasificaron según su forma de manifestación (racimo, tirso o cima simple). También se identificaron fiálides y abundantes conidias de color verde. Una de las diferencias más notables se relacionó con la forma y el tamaño de los conidios, que se presentaron como elipsoidales y de menor tamaño o como globosos y de mayor tamaño en la mayoría de los casos. Durante las etapas iniciales del desarrollo fúngico, los conidióforos presentaron un número reducido de fiálides. No obstante, esta cantidad aumentó a medida que el organismo alcanzó la madurez. En la etapa reproductiva o fértil se observó una mayor ramificación de los conidióforos, lo que permitió soportar una mayor densidad de fiálides y una abundante producción de conidias. Además, se registró la presencia de numerosas clamidosporas en todas las cepas descritas, característica que representa un importante mecanismo de supervivencia. Estas diferencias métricas y morfológicas constituyeron parámetros clave en la taxonomía de *Trichoderma*.

Aunque las clamidosporas se presentaron en todas las cepas estudiadas, el tamaño que alcanzaron resultó particularmente llamativo. En este aspecto destacó la cepa N15 (Figura 24),

que mostró una abundante formación de clamidosporas de gran tamaño ($\varnothing 11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$). Estas estructuras se describieron como aproximadamente el doble del tamaño promedio observado en las demás cepas, lo que podría constituir un marcador distintivo importante para este aislamiento específico.

Este valor supera de forma significativa los rangos comúnmente citados en la literatura para el género *Trichoderma*. Revisiones taxonómicas y estudios morfológicos clásicos, como los de Kubicek y Harman (1998), Lewis y Papavizas (1984) y Bissett (1991), reportaron diámetros de clamidosporas que rara vez superan los 15 μm . Por ejemplo, en especies relevantes como *T. harzianum* se han registrado tamaños aproximados de 10-12.5 μm . La revisión bibliográfica realizada en el marco de este trabajo no permitió identificar reportes previos que documenten clamidosporas con formas irregulares con un diámetro promedio tan elevado como el observado en la cepa N15. Esta discrepancia resalta la singularidad de este aislado y sugiere que el presente estudio aporta una observación morfológica novedosa.

La variabilidad en la producción de clamidosporas entre los aislados de *Trichoderma* spp. resultó evidente, tanto en el conjunto total de cepas como entre grupos que presumiblemente pertenecen a la misma especie. Algunas cepas presentaron una producción escasa de clamidosporas, mientras que otras formaron estas estructuras de resistencia en gran abundancia, como ocurrió en el caso de la cepa N15, que además mostró dimensiones considerablemente mayores. Este fenómeno plantea la interrogante acerca de las causas de la marcada diferencia en la abundancia o escasez de clamidosporas entre aislados morfológicamente similares identificados preliminarmente como pertenecientes al género *Trichoderma*. De manera hipotética, esta variabilidad podría reflejar procesos de adaptación a las condiciones ambientales específicas de los nichos ecológicos de origen de las cepas en distintas regiones y tipos de suelo

de Panamá. Por ejemplo, cepas aisladas de suelos sometidos a estrés hídrico frecuente, con baja disponibilidad de nutrientes u otras condiciones adversas, podrían haber experimentado mayor presión selectiva. Esta situación favorecería una mayor inversión de recursos en la formación de clamidosporas por parte de *Trichoderma*. Este comportamiento podría constituir una estrategia adaptativa fijada genéticamente o una respuesta inducida por señales ambientales. En contraste, cepas procedentes de ambientes más estables y ricos en recursos, como suelos húmedos de bosque o rizosferas activas, podrían priorizar la asignación de recursos hacia el crecimiento micelial rápido y la esporulación asexual con el fin de favorecer la competencia y la dispersión, lo que reduciría comparativamente la necesidad o la tendencia a formar clamidosporas.

Análisis Morfológico del Patógeno *Fusarium* sp.

La identificación de este aislado se basó en la combinación de caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos. A nivel macroscópico, se observó un crecimiento radial constante, aunque notablemente más lento que el de las cepas de *Trichoderma*, puesto que requirió aproximadamente nueve días (Figura 30 y 31) para cubrir la placa de Petri. La colonia presentó crecimiento radial con abundante micelio aéreo de textura algodonosa. La coloración fue blanquecina-cremosa y mostró una leve zonación concéntrica difusa. A nivel microscópico, la identidad genérica del patógeno se confirmó mediante la observación de abundantes microconidias y macroconidias hialinas, curvadas, fusiformes o con forma de banana. Asimismo, se evidenció una tendencia a la agregación de clamidosporas en tríadas.

Antagonismo e Interacciones

Las cepas de *Trichoderma* presentaron un crecimiento más acelerado en comparación con la cepa experimental de *Fusarium*. La primera interacción por parte del patógeno ocurrió entre el

segundo y el tercer día de incubación en las 15 cepas evaluadas. En algunos casos se produjo contacto directo en ese intervalo, mientras que en otros el contacto se estableció hasta el cuarto día de incubación.

Mecanismos de Acción Observados

- **Análisis de los Resultados de las Interacciones Antagonistas**

Todas las cepas evaluadas alcanzaron interacción al tercer día de incubación y no se registró inhibición a distancia. En cambio, se observó inhibición por contacto directo, con evidencias de micoparasitismo y antibiosis por contacto. Para calcular el porcentaje antagonista se utilizaron los valores correspondientes al séptimo día, debido a que las mediciones previas no mostraron diferencias significativas entre las pruebas.

Los resultados de los ensayos de confrontación dual revelaron un patrón de interacción consistente entre las cepas de *Trichoderma* N1, N2, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N13 y N14 frente a un aislado experimental de *Fusarium*. En estos casos, el mecanismo de acción predominante correspondió a la competencia por espacio y nutrientes. El agente de biocontrol ocupó la mayor parte del espacio disponible debido a su mayor velocidad de crecimiento, lo que redujo los recursos necesarios para el desarrollo del patógeno. Esta rápida expansión micelial constituye una forma de competencia que limita directamente los recursos requeridos para el crecimiento y la proliferación de *Fusarium*. Este comportamiento se repitió en las demás cepas evaluadas en el estudio. No obstante, en estas cepas no se observaron evidencias de parasitismo ni producción de pigmentos adicionales en la zona de interacción entre las colonias.

En cuanto a la cepa N3, además de la competencia por espacio y nutrientes, en esta se observó parasitismo por parte de *Trichoderma*, lo que afectó al patógeno. La cepa N3 (*Gliocladium*) cubrió casi por completo al *Fusarium*. Asimismo, como resultado de esta

inhibición apareció un pigmento de color naranja intenso o rojizo en la zona de interacción. Este fenómeno indica que *Fusarium* respondió al estrés generado por la presencia y el ataque de *Trichoderma*. Esta pigmentación podría asociarse con la producción de metabolitos secundarios por parte de *Fusarium* como respuesta de defensa. También podría representar un signo de degradación de sus propias estructuras celulares causada por *Trichoderma* (Modrzewska et al., 2022).

En las cepas N4 y N12 se observó un comportamiento muy similar al registrado en la cepa N3. En estos casos se identificaron los mecanismos de competencia por nutrientes y parasitismo, además de un crecimiento por encima de *Fusarium*. Sin embargo, el pigmento presente en la zona de interacción mostró un tono amarillo mostaza vibrante en la zona de inhibición. La cepa N15 también logró parasitar a *Fusarium* sp.; no obstante, su comportamiento resultó menos agresivo en comparación con las cepas descritas anteriormente y no produjo pigmentos en la zona de confrontación.

Aunque la pigmentación sugiere con fuerza la presencia de antibiosis, como lo indicaron Modrzewska et al. (2022), otros mecanismos podrían contribuir al fenómeno observado. Entre ellos destaca la competencia por nutrientes, lo que coincide con el espacio limitado disponible para *Fusarium* en el área de interacción.

Un hallazgo particularmente relevante en las interacciones antagónicas consistió en que las colonias de *Trichoderma* spp. expuestas directamente a *Fusarium* spp. presentaron una aceleración en su proceso de esporulación. Este fenómeno se evidenció mediante la aparición de la coloración verdosa desde el segundo día de confrontación, un desarrollo considerablemente más temprano en comparación con los cultivos puros de *Trichoderma*, en los cuales la pigmentación característica de la esporulación no resultó visible hasta el cuarto o quinto día. Esta

comparación evidencia la capacidad de *Trichoderma* para detectar y responder con rapidez a la presencia de otro hongo en su entorno inmediato.

La explicación de esta respuesta acelerada permite comprender mejor las estrategias de competencia y defensa empleadas por *Trichoderma*. Esta esporulación temprana constituye una estrategia de defensa rápida. Al producir esporas en un tiempo menor cerca del patógeno, *Trichoderma* incrementa su capacidad de dispersión y mejora su desempeño en los procesos de competencia, parasitismo y liberación de sustancias antifúngicas que antagonizan a *Fusarium*. Este comportamiento adquiere especial importancia en el suelo, donde la rapidez de respuesta resulta determinante para el control del patógeno. La capacidad de *Trichoderma* para invadir al patógeno sugiere una alta eficiencia en el uso de sus recursos y demuestra su rapidez en la colonización de sustratos (Modrzewska et al., 2022).

Investigaciones como las de Li et al. (2018) demostraron que *Trichoderma* responde a señales químicas producidas por *Fusarium*, lo que activa sus mecanismos de defensa. La capacidad de *Trichoderma* para detectar y responder a estas señales químicas varía entre diferentes especies e incluso entre cepas de una misma especie, lo que evidencia la existencia de mecanismos de reconocimiento y defensa altamente específicos.

La interacción entre *Trichoderma* y *Fusarium* constituye un fenómeno complejo que involucra múltiples mecanismos de acción. La aparición de pigmentos en la zona de interacción indica la activación de vías metabólicas específicas en *Trichoderma* como respuesta a la presencia de *Fusarium*. Este fenómeno sugiere un mecanismo de antibiosis mediante la secreción de compuestos antifúngicos, como lo reportaron Li et al. (2018). Estos datos resultan relevantes para el desarrollo de estrategias de control biológico más eficientes en el entorno competitivo del suelo.

La variabilidad observada en la producción de clamidosporas, incluso entre aislados morfológicamente similares, evidencia la alta capacidad adaptativa y la diversidad presentes en el género *Trichoderma*. Asimismo, sugiere que el origen geográfico y las condiciones edafoclimáticas del sitio de aislamiento pueden constituir indicadores relevantes de rasgos funcionales relacionados con la persistencia y la tolerancia al estrés de una cepa. Estos resultados adquieren importancia en los procesos de selección de agentes de biocontrol, puesto que una elevada capacidad para formar estructuras de resistencia, como las clamidosporas, puede representar un atributo deseable para asegurar la supervivencia y la eficacia de *Trichoderma* en condiciones de campo.

La evaluación *in vitro* de los quince aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp. reveló diversidad en los mecanismos de antagonismo predominantes. Cuatro de los quince aislados exhibieron una fuerte actividad micoparasítica sobre el micelio de *Fusarium*, asociada con la producción de pigmentos en la zona de interacción, lo que indica un ataque directo. En contraste, los once aislados restantes no mostraron signos visibles de micoparasitismo ni pigmentación bajo las condiciones estudiadas. Estos aislados presentaron únicamente un perfil antagónico dominado por la competencia espacial *in vitro*. No obstante, evidenciaron una elevada tasa de crecimiento micelial, rasgo deseable en la selección de agentes de biocontrol.

Estos resultados subrayan que, incluso en ausencia de mecanismos visualmente evidentes como el micoparasitismo, la rápida capacidad de colonización constituye por sí misma un mecanismo de biocontrol potente y efectivo mediante exclusión competitiva.

Este resultado demuestra que la ausencia de parasitismo visible *in vitro* no disminuye el potencial antagónico cuando la cepa posee una alta capacidad competitiva. Por lo tanto, la tasa de crecimiento micelial se confirma como un parámetro deseable en la selección de agentes de

biocontrol de *Trichoderma*, complementario a otros modos de acción para el manejo de fitopatógenos como *Fusarium*.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, las cepas pueden ser agrupadas en tres categorías de porcentaje de inhibición: 70% (N1, N5, N9, N11 y N13), 67% (N2, N6, N7, N8, y N14) y 64% (N3, N4, N10, N12, N15).

Las cepas con mayor actividad antagonista fueron N3 (Figura 37), N4 (Figura 38), N12 (Figura 43) y N15 (Figura 45). Un factor clave correspondió al micoparasitismo directo, observado visualmente en las cuatro cepas. Estas cepas crecieron sobre la colonia de *Fusarium* y establecieron interacción directa con sus hifas. Se observó una diferencia en el grado de agresividad: N3, N4 y N12 resultaron visiblemente más invasivas, ya que crecieron por encima del patógeno y, además, indujeron la producción de pigmentos en *Fusarium* como respuesta al estrés. En cambio, N15, aunque presentó comportamiento parasítico, mostró una interacción menos dominante. La ausencia de pigmentación en la interacción con N15, a pesar de su efectividad parasítica, resalta la diversidad de estrategias antagonistas entre cepas eficaces. Asimismo, la aceleración de la esporulación en las cepas de *Trichoderma* durante la confrontación directa con *Fusarium* se interpreta como una estrategia adaptativa que asegura la colonización y dispersión antes del agotamiento de los recursos del sustrato debido a la competencia (Druzhinina et al., 2005).

La combinación de todas las características morfológicas descritas en este estudio, junto con la consulta de claves taxonómicas especializadas y la revisión de la literatura científica, permite concluir con un alto grado de certeza que las cepas estudiadas pertenecen a los géneros asignados. Sin embargo, resulta importante reconocer que la caracterización morfológica, aunque fundamental, presenta limitaciones. La variabilidad intraespecífica y la similitud entre especies

cercanas pueden conducir a identificaciones ambiguas. Por esta razón, la integración de datos moleculares, como la secuenciación de regiones específicas del ADN, resulta crucial para confirmar la identidad taxonómica de estas cepas (Druzhinina et al., 2005). Investigaciones futuras podrían centrarse en ensayos moleculares o bioquímicos orientados a detectar metabolitos o actividad enzimática, así como en evaluaciones *in planta* que permitan comprender el espectro completo de su potencial biocontrolador frente a *Fusarium*.

En síntesis, este estudio caracterizó un conjunto de cepas de *Trichoderma*, con documentación tanto de rasgos comunes al género como de una diversidad morfológica significativa. Estos hallazgos establecen una base para futuras investigaciones moleculares y funcionales que permitan una identificación precisa y la exploración del potencial biotecnológico de estas cepas nativas.

Conclusiones

De acuerdo con lo señalado, se confirma la identidad genérica de dieciséis cepas, entre ellas *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. y *Fusarium* sp. El análisis morfológico de las 14 cepas de *Trichoderma* reveló variaciones significativas en sus características macro y microscópicas. Estas diferencias permitieron confirmar que la mayoría corresponde a entidades taxonómicamente distintas dentro del género. Además, el análisis microscópico de las clamidosporas aportó hallazgos relevantes. Aunque estas estructuras estuvieron presentes en todas las cepas estudiadas, la cepa N15 destacó por presentar un tamaño inusualmente grande, con un diámetro promedio de $11.94 \pm 1.14 \mu\text{m}$, como en formas irregulares con dimensiones de $16.01 \pm 2.75 \times 10.88 \pm 1.48 \mu\text{m}$.

La capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* se manifestó con una amplia variabilidad en los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium*. Estas diferencias indican que la efectividad no es uniforme y depende directamente de los mecanismos de acción específicos de cada cepa. Para ilustrar esta variabilidad, los resultados de los ensayos permitieron establecer diferentes grupos de cepas, clasificados según su porcentaje de inhibición.

Las cepas N3, N4, N12 y N15 se identificaron como las más prometedoras para el biocontrol de *Fusarium*. Aunque su porcentaje de inhibición común del 64 % no fue el más alto entre todas las cepas evaluadas, su notable agresividad visual y su capacidad para parasitar, colonizar y generar estrés en el micelio de *Fusarium* demuestran una mayor efectividad frente a otras cepas con porcentajes de inhibición superiores. Por lo tanto, los criterios cualitativos resultan tan relevantes como los datos cuantitativos en la selección de cepas con mayor potencial.

Los resultados confirman que la selección de la cepa adecuada constituye un factor crítico para el biocontrol efectivo. Incluso dentro de un mismo género existen diferencias significativas en la eficacia con la que cada cepa puede suprimir el crecimiento del patógeno.

Recomendaciones y Limitaciones

Recomendaciones

Con respecto a las sugerencias sobre los procedimientos metodológicos, durante la identificación microscópica se aconsejó registrar mediante imágenes las preparaciones antes de efectuar el sellado definitivo con esmalte de uñas, con el propósito de conservar una evidencia visual nítida de las estructuras de los hongos en su condición inicial y disminuir la probabilidad de deterioro durante el cierre de las láminas. La obtención de microimágenes contribuyó a respaldar la revisión posterior y la confrontación entre los ejemplares analizados.

Así, a partir de los hallazgos obtenidos en la investigación, se sugirió corroborar la capacidad de control biológico de las cepas N3, N4, N12 y N15 en contextos más próximos a las condiciones agrícolas. Con este objetivo, se planteó efectuar pruebas en planta para establecer su efectividad frente a *Fusarium* y, en una etapa posterior, implementar experimentos a nivel de campo que verificaran su factibilidad y desempeño en escenarios productivos reales, con la finalidad de avanzar hacia su formulación como biofungicida de uso comercial.

- Posibles efectos de los pigmentos de respuesta en procesos de supresión:
 - Creación de compuestos antifúngicos novedosos: las coloraciones sintetizadas por *Gliocladium* podrían emplearse como referencia para diseñar agentes antifúngicos naturales.
 - Comprensión de las relaciones entre microorganismos: el análisis de este fenómeno puede favorecer una interpretación más amplia de las dinámicas complejas que se establecen entre hongos en la rizosfera y en el suelo.
- Con el propósito de verificar planteamientos, resultaría pertinente desarrollar los siguientes estudios:

- Separación y descripción de los pigmentos: aislar y examinar las coloraciones para establecer su composición molecular y su efecto antifúngico.
- Pruebas de actividad enzimática: medir la actividad de enzimas en cultivos de *Trichoderma* o *Gliocladium*.
- Estudio genómico: detectar los genes asociados con la síntesis de pigmentos y enzimas.
- Pruebas de competencia por recursos nutritivos: analizar la habilidad de *Trichoderma* y *Gliocladium* para captar hierro y otros elementos nutritivos indispensables.
- Finalmente, las investigaciones posteriores deberían orientarse hacia los siguientes aspectos:
 - La determinación molecular de las cepas para relacionar los rasgos fenotípicos observados con especies específicas.
 - El análisis del vínculo entre los rasgos morfológicos particulares (por ejemplo, las clamidosporas de gran tamaño de la cepa N15) y su función ecológica o papel biológico específico.

Limitaciones

- Alcance estructural: la descripción de las cepas se fundamentó en características estructurales y patrones de desarrollo. Para lograr una determinación taxonómica concluyente y exacta, resulta necesario incorporar estudios de tipo molecular.
- Análisis en laboratorio: la capacidad antagonista se examinó bajo condiciones experimentales controladas (cultivo confrontado en placas de Petri). Este contexto experimental no reproduce la complejidad de ambientes naturales —como el suelo, las

interacciones con la planta o los factores climáticos, por lo que el desempeño de las cepas en campo puede presentar variaciones.

- Enfoque restringido a un fitopatógeno: la investigación se orientó hacia la relación con *Fusarium* sp. asociado al plátano. Por lo tanto, la acción de las cepas de *Trichoderma* frente a otros agentes patógenos o su influencia en distintas variedades de plátano permanece sin determinar.

Perspectivas Futuras

- Estudio genético: efectuar la determinación genética de las cepas con mayor proyección para corroborar su especie y analizar si su capacidad de antagonismo se vincula con su linaje evolutivo.
- Pruebas en planta y en campo: desarrollar experimentos controlados en plantas vivas (por ejemplo, en condiciones de invernadero) para establecer la efectividad de las cepas seleccionadas en la protección del cultivo de plátano frente a la enfermedad. En una fase posterior, implementar evaluaciones a nivel de campo para verificar su factibilidad como productos biofungicidas de aplicación comercial.
- Investigaciones bioquímicas y genéticas del antagonismo: profundizar en los procesos mediante los cuales actúan las cepas. Este análisis puede contemplar la identificación y descripción de enzimas –como quitinasas y celulasas– y de metabolitos secundarios (por ejemplo, peptaiboles) sintetizados por *Trichoderma* que limitan el crecimiento de *Fusarium*.
- Extensión del rango de hospedadores: analizar la capacidad antagonista de las cepas frente a otros agentes patógenos del plátano y en diferentes especies vegetales con el

fin de determinar su amplitud funcional, lo que podría favorecer su utilización más amplia como organismo de control biológico.

Referencias

- Agrios, G (1995). *Fitopatología* (2 ed.). Limusa.
- Álvarez, V (2023). *Biocontrol de Fusarium oxysporum f. sp. cubense con especies de Trichoderma sp.: una revisión [Tesis de especialización]*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Bissett, J (1991). A revision of the genus *Trichoderma* spp., infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69(1), 2357-2372.
<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/b91-297>
- Caballero, A (2011). *Uso de hongos endofíticos de Trichoderma spp., para el biocontrol del Mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA) [Tesis de maestría]*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Cao, Z., Zhao, J., Liu, Y., Wang, S., Zheng, S., & Qin, W (2024). Diversity of *Trichoderma* species associated with green mold contaminating substrates of *Lentinula edodes* and their interaction. *Frontiers in Microbiology*, 14(1), 1-2.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1288585>
- Colquehuanca, G., & Blanco, M (2021). Importancia y beneficios del *Trichoderma* en la producción agrícola. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 5(2), 78-82.
<https://agrovet.umsa.bo/index.php/AGV/article/view/64>
- Cortés, F., Alvarado, G., & Sánchez, G (2024). *Trichoderma* spp., una alternativa para la agricultura sostenible: una revisión. *Colombiana de Biotecnología*, 25(2), 62-76.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v25n2.111384>

- Damodaran, T., Rajan, S., Manoharan, M., Gopal, R., Yadav, K., Kumar, S., . . . Jha, S (2020). Biological management of banana *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 using antagonistic fungal isolate CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*). *Frontiers in Microbiology*, 11(1), 595845-595846.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.595845>
- De Souza, G., Costa, D., Marques, S., Lobo, M., Martins, I., & Minaré, L (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9(3), 145-149.
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000300014>
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813-828. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>
- Esparza, L (2009). *Efectividad in vitro de cepas nativas de Trichoderma spp. en aislados de Phytophthora parasítica D. obtenidos de plantas de Jamaica [Tesis de maestría]*. Colegio de Postgraduados.
- Fothergill, A., Rinaldi, M., & Sutton, D (1998). *Guide to clinically significant fungi*. Williams & Wilkins.
- Fries, E (1825). *Systema Orbis Vegetabilis (in Latin)*. Typographia Academica.
- García, H., Martínez, Á., Hermosa, M., Monte, E., Aguilar, C., & González, C (2017). Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(1), 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>

- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., & Torres, E (2013). *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*. SENASA: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%83%C2%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- González, N., Iglesias, L., Flores, F., Rivera, A., & Luna, M (2022). Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 330-348. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2203-3>
- Harman, G (2024). Integrated Benefits to agriculture with *Trichoderma* and other endophytic or root-associated microbes. *Microorganisms*, 12(7), 1409-1410. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071409>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es
- Ismaila, A., Ahmad, K., Siddique, Y., Abdul, M., Kutawa, A., Abdullahi, A., . . . Abdullah, S (2023). *Fusarium* wilt of banana: current update and sustainable disease control using classical and essential oils approaches. *Horticultural Plant Journal*, 9(1), 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.02.004>
- Jang, S., Kwon, S., Lee, H., Jang, Y., Park, M., Lim, Y., . . . Kim, J (2018). New report of three unrecorded species in *Trichoderma* Harzianum Species Complex in Korea. *Mycobiology*, 46(3), 177-184. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1497792>
- Kubicek, C., & Harman, G (1998). *Trichoderma & Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics, vol. 1*. Taylor & Francis.

- Larone, D (1995). *Laboratory procedures. Medically important fungi: a guide to identification* (3 ed.). ASM Press.
- Lewis, J., & Papavizas, G (1984). Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(1), 1-7.
<https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/m84-001>
- Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., & Kang, S (2018). Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1), 2614-2615.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30455673/>
- López, S., & Castaño, J (2019). Integrated management of Panama disease *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen: a review. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2), e1240-e1241.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240>
- Marchuk, C., Benítez, G., Sandoval, W., Arrúa, P., López, H., Enciso, G., . . . Arrúa, A (2024). *Trichoderma* como agente de biocontrol-en foco. *Revista de la Sociedad Científica del Paraguay*, 29(1), 137-171. <https://doi.org/10.32480/rscp.2024.29.1.137>
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(1), 11-22.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- Martínez, G., Rey, J., Pargas, R., & Manzanilla, E (2020). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 259-276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>

- Medina, E., Carranza, O., Bermúdez, N., Urías, C., De Gracia, A., Rodas, R., . . . Villegas, N (2019). *Análisis de riesgo. Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropical (Foc R4T). Plaga cuarentenaria*. SENASA: <https://senasa.gob.hn/wp-content/uploads/2025/07/ARP-Fusarium-R4T.pdf>
- Mesa, A., Marín, A., & Calle, J (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 32-44.
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Michel, A., Hernández, J., Toledo, R., Sabino, J., & Romero, T (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora* parasitica y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de Jamaica. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 235-241.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.235>
- Modrzewska, M., Błaszczyk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., & Bryła, M (2022). *Trichoderma* versus *Fusarium*. Inhibition of pathogen growth and mycotoxin biosynthesis. *Molecules*, 27(23), 8146-8147.
<https://doi.org/10.3390/molecules27>
- Moller, C., Toti, L., Trujillo, M., Uetz, M., Dreyfuss, M., Sanglier, J., . . . Leuchter, C (1995). *Manual Biolead Project*. s/e.
- Ortuño, N., Miranda, C., & Claros, M (2013). Selecting strains of *Trichoderma* spp. generating secondary metabolites of interest for use as a growth promoter in plants grown. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(1), 16-32.
<https://doi.org/10.36610/j.jsab.2013.010100016>
- Parmar, H., Bodar, N., Lakhani, H., Patel, S., Umrana, V., & Hassan, M (2015). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during *in vitro* antagonism with *Sclerotium rolfsii*,

- the causal agent of stem rot of groundnut. *African Journal of Microbiology*, 9(6), 365-372. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7330>
- Ploetz, R (1994). Panama disease: return of the first banana menace. *International Journal of Pest Management*, 40(4), 326-336. <https://doi.org/10.1080/09670879409371908>
- Ramírez, D., Reyes, D., Domínguez, L., Orduño, N., Grifaldo, P., & Hernández, C (2022). Endofitismo de especies de *Trichoderma* y crecimiento radicular en dos variedades de banano *in vitro*. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8(1), e0081013-e0081014. <https://doi.org/10.30973/aap/2022.8.0081013>
- Rifai, M (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116(1), 1-56. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=57038>
- Rodríguez, A (2019). *Compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal sobre el hongo benéfico Trichoderma harzianum, controlador de Fusarium oxysporum en plantas de tomate (Solanum lycopersicum) [Trabajo de grado de pregrado]*. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Ruiz, M., Ornelas, J., Olivas, G., Acosta, C., Sepúlveda, D., Pérez, D., . . . Fernández, S (2018). Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(3), 444-456. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1804-5>
- Samuels, G (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>
- Samuels, G., Dodd, S., Lu, B., Petrini, O., Schroers, H., & Druzhinina, I (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56(1), 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>

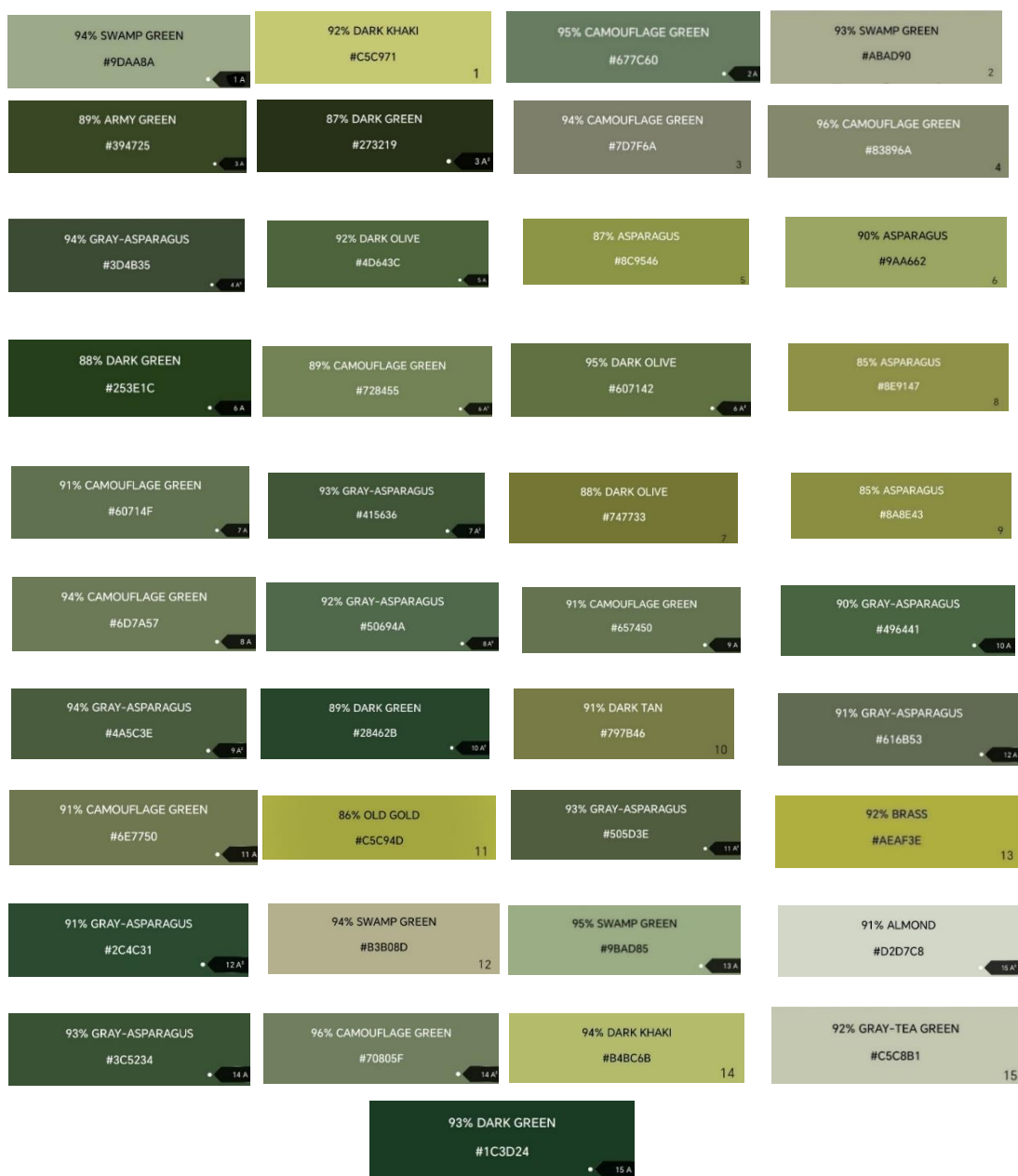
- Sánchez, A., Barrera, V., Reybet, G., & Sosa, M (2019). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre- y posemergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114(1), 61-70.
<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro/article/view/20202>
- Shrivastava, A., Gupta, A., & Jain, A (2015). *Trichoderma*: a biocontrol approaching for soil borne disease management. *IRJMST*, 6(10), 146-155.
https://www.academia.edu/27529019/TRICHODERMA_A_BIO_CONTROL_APPROACHING_FOR_SOIL_BORNE_DISEASE_MANAGEMENT
- Silva, G., & Páez, A (2021). Antagonismo *in vitro* de nueve hongos aislados del Caribe colombiano sobre *Phytophthora* sp. asociado a palma aceitera. *Ingeniería y Desarrollo*, 39(2), 205-220. <https://doi.org/10.14482/inde.39.2.579.546>
- Sinha, A., Singh, R., & Verma, A (2018). Bioefficacy of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium oxysporum* f. sp. capsici causing wilt disease in chilli. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 965-966.
<https://www.phytojournal.com/archives/2018/vol7issue5/PartQ/7-4-627-616.pdf>
- Smith, D., & Onions, A (1983). *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Mycological Institute.
- Thangavelu, R., & Gopi, M (2015). Combined application of native *Trichoderma* isolates possessing multiple functions for the control of *Fusarium* wilt disease in banana cv. Grand Naine. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10), 1147-1164.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1036727>
- Wang, C., & Zabel, R (1990). *Identification manual for fungi from utility poles in the eastern United States*. American Type Culture Collection.

Anexos

Anexo 1. Escala cromática para la caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Figura 43

Carta de Colores: códigos de tonalidades de verdes, utilizados en la caracterización de Trichoderma spp.



Anexo 2. Dibujo de las estructuras conidiogénicas del género *Trichoderma*

Figura 44

Secuencia del desarrollo de las estructuras conidiogénicas en Trichoderma sp.

