



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA
NATIVA (*Beauveria spp*) 2023-2024”.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo

Autor:
Farez Toapanta Erick Dennis

Tutor:
Chancusig Espín Edwin Marcelo

LATACUNGA – ECUADOR

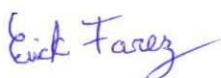
Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Farez Toapanta Erick Dennis, con cédula de ciudadanía No. 1727977694, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (*BEAUVERIA SPP*) 2023-2024**”, siendo el Ingeniero Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg. Ph.D. Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 15 de Agosto del 2024



Erick Dennis Farez Toapanta

CC: 172797769-4

ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **FAREZ TOAPANTA ERICK DENNIS**, identificado con cédula de ciudadanía N° **172797769-4** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (BEAUFERIA SPP) 2023-2024”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019 – Marzo 2020

Finalización de la carrera: Abril 2024 – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de Febrero del 2024

Tutor: Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

Tema: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (BEAUFERIA SPP) 2023-2024”**

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA

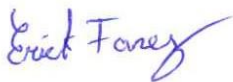
Podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 15 días del mes de Agosto del 2024.



Erick Dennis Farez Toapanta
EL CEDENTE

Dra. Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad del Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (*Beauveria spp*) 2023-2024”, de Erick Dennis Farez Toapanta, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 15 de Agosto del 2024



Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg. Ph.D.

CC: 050114883-7


DOCENTE TUTOR

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN


En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Farez Toapanta Erick Dennis con el título de Proyecto de Investigación: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (*Beauveria spp*) 2023-2024”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 15 de Agosto del 2024



Ing. Diana Toapanta Gallegos, Mg.
C.C. 100274980-0
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Eliana Granja Guerra, Mg.
C.C. 171812630-1
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Alexandra Tapia Borja, Mg.
CC: 050266175-4
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

A mi Dios por guiarme en mi camino ante todo por mi meta y logró lo que he soñado durante toda mi vida, a mis padres Patricia Toapanta, Richar Farez que han sido un apoyo emocional durante la formación personal y profesional por sus consejos durante toda mi vida.

También quiero expresar mi fraterno agradecimiento al Ing. Mg. Ph.D Edwin Chancusig y la Ing. Tannya Llanos por su paciencia y colaboración también como no agradecer a la Ing. Mg. Valentina Arévalo por su apoyo incondicional, la confianza que me brindó y sus palabras motivadoras que han hecho hincapié para no desmayar y llegar a cumplir mis metas propuestas.

A mi tía Farina Farez y a mis abuelitos Segundo Farez y Ines Quinga por el apoyo incondicional durante mi formación.

Farez Toapanta Erick Dennis

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a mis padres queridos Patricia Elizabeth Toapanta Cerna y Richar Damian Farez Quinga por su amor que tuvieron a mi humilde persona, por ser mi apoyo, sus palabras de aliento que me dieron fuerza.

A mi hermana Gennesis Dayana Farez Toapanta por apoyarme y darme fuerza, con su cariño y amor que me tuvo gracias a ella por estar a mi lado.

Farez Toapanta Erick Dennis

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (*Beauveria spp*) 2023-2024”.

AUTOR:
Farez Toapanta Erick Dennis

RESUMEN

El presente trabajo de investigación realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente una cepa nativa de *Beauveria spp*, Se aplicó un enfoque bibliográfico con un diseño descriptivo. La metodología fue de carácter cualitativo y la técnica de recolección de datos bioinformáticos, fue *in silico*. Para la reactivación de las cepas se utilizaron métodos de multiplicación como bisturí, palillos y asa de siembra. Entre los resultados, se determinó que el bisturí resultó ser muy eficiente para obtener el aislamiento de *Beauveria spp*, ya que mostró mayor esterilidad y se logró inhibir la contaminación de las cajas Petri por bacterias. Además, se identificó las características macroscópicas de *Beauveria spp*. y se logró reconocer diversas estructuras morfológicas incluyendo hifas, conidióforos y conidios. También, se realizó la extracción manual de ADN del hongo, lo cual conllevó a optimizar el protocolo y adecuarlo a las condiciones del laboratorio. Asimismo, se estandarizó el protocolo para la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del genoma del hongo y se verificó el tamaño del fragmento mediante electroforesis horizontal. Las muestras amplificadas fueron secuenciadas utilizando la secuenciación Sanger, a través de la empresa IDGEN. Se realizó el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas utilizando el software Geneious Prime v2024.0.7, y se comparó la secuencia consenso frente a las reportadas en el NCBI (National Center for Biotchnology Information) a través del pipeline de BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). La identificación molecular determinó que el hongo correspondía a *Trichoderma hamatum*. Se dejó establecidas las bases de los protocolos de extracción manual de ADN de hongos, de amplificación por PCR de la región ITS y de análisis bioinformático. En conclusión, es vital identificar el género y especie de los hongos con los que se trabaja en el laboratorio con el objetivo de determinar la diversidad de los microorganismos y su potencial en la utilización de los mismos como controladores biológicos de plagas agrícolas; y de este modo promover prácticas, sostenibles y amigables con el ambiente en el manejo de cultivos y ecosistemas.

Palabras clave: *Beauveria spp*, hongo, ADN, microorganismos, morfológico, *Trichoderma hamatum*.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE NATIVE STRAIN (*Beauveria spp*) 2023-2024”.

Author:
Farez Toapanta Erick Dennis

ABSTRACT

The objective of this research work was to morphologically and molecularly identify a native strain of *Beauveria spp*, from the Microbiology Laboratory of the Technical University of Cotopaxi. To reactivate the strains, multiplication methods such as scalpel, toothpicks and seeding loop were used. It was determined that the scalpel turned out to be the most efficient to obtain the isolation of *Beauveria spp*, since they showed greater sterility and managed to inhibit the contamination of the Petri dishes by bacteria. The macroscopic characteristics of *Beauveria spp*. Thus, it was possible to identify various morphological structures including hyphae, conidiophores and conidia. Subsequently, the manual extraction of DNA from the fungus was carried out, optimizing a protocol obtained from bibliographic sources and adapting it to the conditions found in the Microbiology laboratory of the Agronomy major. The protocol for PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the fungal genome was standardized and the size of the fragment was verified by horizontal electrophoresis. Next, the amplified samples were sequenced using Sanger sequencing, through the IDGEN Company. Finally, the bioinformatic analysis of the sequences obtained was carried out using the Geneious Prime v2024.0.7 software, and the comparison of the consensus sequence against those reported in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) was carried out through the BLASTn application (Basic local alignment search tool). Through molecular identification, it was determined that the fungus corresponded to *Trichoderma hamatum*. The bases of the protocols for manual extraction of fungal DNA, PCR amplification of the ITS region and bioinformatic analysis were established. It is necessary to carry out the molecular identification of fungi in the laboratory since this way we can know their genus and specific species for which it will contribute significantly to the characterization of microorganisms for the effective application as biological controllers of agricultural pests, thus promoting sustainable and friendly practices. With the environment in the management of crops and ecosystems.

Keywords: *Beauveria spp*, Fungus, DNA, microorganisms, molecular, morphological, Sanger, *Trichoderma hamatum*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
INDICE DE IMAGENES.....	xiv
1. INFORMACION GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1 Beneficiarios Directos	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
5. OBJETIVOS:.....	5
5.1 General	5
5.2 Específicos.....	5
6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	6
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
7.1 Clasificación taxonómica <i>Beauveria spp.</i>	7
7.2 <i>Beauveria spp.</i>	7
7.3 Donde se encuentra el hongo <i>Beauveria spp.</i>	8

7.4 Plagas controladas por el hongo <i>Beauveria</i> spp	8
7.5 Características del hongo <i>Beauveria</i> spp	9
7.6 Temperatura de crecimiento de <i>Beauveria</i> spp	9
7.7 Mecanismos de acción del hongo <i>Beauveria</i> spp	10
7.8 Microorganismos Benéficos.	10
7.9 Impacto de los Microorganismos Benéficos en el suelo.	11
7.10 Influencia de la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo.....	11
7.11 Utilización de los Microorganismos Benéficos en el suelo.....	12
7.12 Actividades que desempeñan los Microorganismos Benéficos en el suelo.....	13
8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS.....	14
8.1 Pregunta Científica	14
9. METODOLOGÍA.....	15
9.1 Tipos de investigación	15
9.1.1 Investigación bibliográfica	15
9.2 Métodos de investigación	15
9.2.1 Cualitativo	15
9.3 Ubicación de la investigación.....	15
9.4 Materiales y reactivos.	16
9.5 Equipos utilizados para realizar la investigación	16
9.6 Métodos de multiplicación	17
9.7 Antibiótico (Megacilina)	19
9.8 Protocolo estandarizado de extracción de ADN.....	19
9.9 Cuantificación de ADN	20
9.10 PCR para la amplificación de regiones ITS.....	20
9.11 Secuenciación y Análisis Bioinformático.....	21
10. ANALISIS Y DICUSION DE RESULTADOS.....	21
10.1 Observación macroscópica de <i>Beauveria</i> spp.	21
10.2 Observación microscópica.....	24

10.4	Identificación molecular.....	25
10.4.1.	Extracción de ADN y Cuantificación.....	25
10.4.2.	Amplificación de la región ITS por PCR	26
10.4.3.	Análisis Bioinformático.....	27
10.5	Presupuesto del proyecto	29
11.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)	32
11.1	Impacto social.....	32
11.2	Impacto ambiental	32
11.3	Impacto económico.....	32
12.	CONCLUSIONES.....	32
13.	RECOMENDACIONES	33
14.	REFERENCIAS	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividades a realizar en la investigación.....	6
Tabla 2: Clasificación taxonómica del <i>Beauveria</i> spp.	7
Tabla 3: Plagas de importancia económica controladas con el hongo <i>Beauveria</i> spp.....	8
Tabla 4: Materiales y reactivos utilizados para realizar la investigación.....	16
Tabla 5: Equipos Utilizados.	16
Tabla 6: Características morfológicas de <i>Beauveria</i> spp vistas a través del microscopio.	23
Tabla 7: Equipos de laboratorio.	24
Tabla 8: Costos del proyecto de investigación.....	29

INDICE DE IMAGENES

Imagen 1: Cultivos del hongo <i>Beauveria</i> spp.	9
Imagen 2: Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi	15
Imagen 3: Fórmula para la preparación del medio de cultivo (PDA)	18
Imagen 4: Crecimiento radial de (<i>Beauveria</i> spp), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo	22
Imagen 5: Visualización de <i>Beauveria</i> spp en el microscopio.	25
Imagen 6: Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One ^c	26
Imagen 7: Electroforesis de PCR de las muestras Bau1 y Bau2	27
Imagen 8: Electroferograma Bau1_ITS1, Bau1_ITS4.....	28
Imagen 9: Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso Bau1 y Bau2 por secuenciación del gen ITS	28

1. INFORMACION GENERAL

Título del Proyecto:

“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA (*Beauveria spp*) 2023-2024”

Fecha de inicio: Octubre 2023

Fecha de finalización: Agosto 2024

Lugar de ejecución: Universidad Técnica de Cotopaxi, en las instalaciones de laboratorio de la carrera de Agronomía.

Facultad que auspicia: Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de Agronomía

Equipo de Trabajo:

- **Tutor:** Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, PhD.
- **Investigador 1:** Farez Toapanta Erick Dennis.

Coordinador del Proyecto: Erick Dennis Farez Toapanta.

Teléfonos: 0961625832

Correo electrónico: erick.farez7694@utc.edu.ec

Área de Conocimiento: Agricultura, silvicultura y pesca- Agronomía

Línea de investigación: Desarrollo y Seguridad alimentaria

Sub líneas de investigación de la Carrera: Producción Agrícola Sostenible.

Línea de vinculación de la carrera: Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y gestión para el desarrollo humano y social.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El uso de insecticidas puede causar graves impactos en la salud humana y en el medio ambiente. A nivel de salud, los insecticidas pueden provocar efectos agudos como náuseas y dificultad respiratoria, así como efectos crónicos como cáncer y trastornos neurológicos tras exposiciones prolongadas. En el medio ambiente, estos químicos no solo matan a plagas, sino también a insectos beneficiosos como abejas, lo que puede afectar la polinización y la salud de los ecosistemas. Además, pueden contaminar el suelo y el agua, y contribuir al desarrollo de resistencia en las plagas, haciendo que los tratamientos sean menos efectivos con el tiempo (Cepeda-Siller et al., 2018).

Los problemas asociados con el uso de insecticidas incluyen el DDT, que se ha vinculado con el riesgo de cáncer y una persistencia ambiental significativa. La atrazina, por otro lado, puede contaminar las fuentes de agua, afectando la calidad de estos recursos. Además, los neonicotinoides han demostrado reducir las poblaciones de polinizadores, lo que impacta negativamente en la biodiversidad y la salud de los ecosistemas. Estos problemas subrayan la necesidad de buscar alternativas más seguras y sostenibles para el control de plagas. Para mitigar estos daños, es esencial aplicar insecticidas de manera racional, considerar métodos alternativos de control, usar equipos de protección personal y seguir regulaciones que promuevan prácticas agrícolas sostenibles (Basulto et al., 2022).

Este enfoque también permite combinarlo con otros métodos de control, como el manejo integrado de plagas y prácticas culturales, lo que puede aumentar su eficacia y reducir los riesgos relacionados con la resistencia de las plagas. Aunque la adopción inicial de estos métodos puede resultar en costos adicionales, a largo plazo, los beneficios en términos de preservación del medio ambiente, la salud humana y la sostenibilidad agrícola compensan con creces estas inversiones iniciales (Basulto et al., 2022).

Ecuador es un país caracterizado por su mega biodiversidad y una agricultura variada, la búsqueda de biocontroladores nativos como *Beauveria* spp. Se alinea perfectamente con los principios de la agroecología y el manejo agroecológico. Este proyecto de investigación tiene como objetivo proporcionar una alternativa efectiva y viable para el control de plagas, respetando los equilibrios naturales y promoviendo la seguridad alimentaria y el bienestar de

los agricultores locales. En última instancia, este estudio aspira a contribuir a la construcción de un sistema agrícola en Ecuador que sea más resiliente, sostenible y equitativo (Aguilera et al., 2020) .

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1 Beneficiarios Directos

"La Universidad Técnica de Cotopaxi, a través de su carrera de Ingeniería Agronómica, colabora estrechamente con los estudiantes de esta disciplina".

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La mayoría de las enfermedades de plantas generalmente se controlan con fungicidas químicos, los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y fruto. Las consecuencias negativas sobre la salud, la contaminación del ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia, ha generado la búsqueda de alternativas de reemplazo con la incorporación de agentes biológicos (Aguilera et al., 2020).

Los insecticidas pueden causar graves problemas de salud, como intoxicación aguda y enfermedades crónicas como cáncer, y también tienen efectos negativos en el medio ambiente. Afectan no solo a plagas, sino también a insectos benéficos como abejas, esenciales para la polinización, y pueden contaminar suelos y aguas. Ejemplos problemáticos incluyen el paracuat, un herbicida muy tóxico, y el clorpirifós, que puede dañar la salud neurológica y contaminar aguas subterráneas. Para reducir estos impactos, es importante usar insecticidas de manera responsable y considerar métodos de control alternativos y sostenibles (Tapia-Goné et al., 2008).

Tenemos que tomar en cuenta que es muy necesario que los fungicidas en el control fitosanitario es fundamental desarrollar tecnologías que fomente de forma fácil, económica y efectiva obtener productos que conlleven microorganismos, con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Beauveria spp.*, podemos decir que se puede dar en diferentes medios y de nutrientes; para multiplicar varias veces en condiciones in vitro tiene la capacidad de cultivarse sobre distintas medios de bajo costo (Cepeda-Siller et al., 2018).

Los hongos antagónicos tienen características que especifica bien sus posibilidades de biocontroladores, posee un gran recurso patogénico y capacidad de producir epífitas; sin embargo, se sabe que su producción comercial e industrial presenta algunos inconvenientes como el desconocimiento de sustratos alternativos eficientes, infraestructura y equipo mínimo necesario; situación que ha limitado su desarrollo y utilización a mayor escala. Se ha utilizado diferentes métodos para reproducir a *Beauveria ssp*; sin embargo, se sabe que representa un costo elevado (Aguilera et al., 2020).

5. OBJETIVOS:

5.1 General

Identificar morfológica y molecularmente una cepa nativa de *Beauveria* spp. preservada en el Laboratorio de la Carrera de Agronomía durante el periodo 2023-2024.

5.2 Específicos

- Reactivar las cepas nativas de *Beauveria* spp. del laboratorio de la carrera de Agronomía.
- Identificar morfológica y molecularmente de la cepa nativa de *Beauveria* spp.
- Detallar los costos del proyecto de investigación.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1: Actividades a realizar en la investigación

Objetivos Específicos	Actividad (tarea)	Responsable	Medio de verificación
<ul style="list-style-type: none"> Reactivar las cepas nativas de <i>Beauveria spp.</i> el laboratorio de la carrera de Agronomía 	<ul style="list-style-type: none"> Multiplicar y purificar cepas de <i>Beauveria spp.</i> Métodos de multiplicación como bisturí, palillos y asa de siembra. 	Erick Dennis Farez Toapanta	<ul style="list-style-type: none"> Imágenes Caja Petri
<ul style="list-style-type: none"> Identificar morfológica y molecularmente de la cepa nativa de <i>Beauveria spp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Observar las características macroscópicas y microscópicas de los hongos. Estandarizar un protocolo de extracción de ADN según las condiciones que se encuentra el laboratorio de la Carrera de Ingeniería Agrónoma. Estandarizar la amplificación por PCR de regiones ITS de hongos. Secuenciar el ADN de la cepas de hongos del laboratorio a través de la empresa IDgen. Realizar el análisis bioinformático. 	Erick Dennis Farez Toapanta	<ul style="list-style-type: none"> Imágenes Micro Tubos

• Detallar los costos del proyecto de investigación.	• Elaborar tablas de presupuestos de investigación.	Erick Dennis Farez Toapanta	• Tablas de Excel.
--	---	--------------------------------	--------------------

Elaborado por: (Farez Erick, 2024).

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Clasificación taxonómica *Beauveria spp.*

El hongo *Beauveria spp.* Es un tipo de hongo entomopatógeno incompleto que pertenece a la división Ascomycota, la clase Sordariomycetes, el orden Hypocreales y la familia Clavicipitaceae. Se destaca por su capacidad de reproducirse de manera asexual y por su habilidad para atacar a una amplia variedad de especies de insectos (Tapia-Goné et al., 2008).

Tabla 2: Clasificación taxonómica del *Beauveria spp.*

Taxonomía	
Reino.....	Fungí
División.....	Ascomycota
Clase.....	Sordariomycetes
Orden.....	Hypocreales
Familia.....	Clavicipitaceae
Subfamilia.....	Tillandsioideae
Género.....	<i>Beauveria.</i>

Nota: **Recuperado de (Almudena, 2022).**

7.2 *Beauveria spp.*

Beauveria spp. es un hongo de amplia distribución natural, se localiza con facilidad en diversos ambientes, incluyendo suelos, rastrojos de cultivos, estiércol, así como en plantas e insectos. Este microorganismo fue uno de los cinco primeros en ser empleados para el control biológico y se destaca por su prevalencia a nivel mundial (Wang et al., 2021).

Beauveria es un género de hongos entomopatógenos que se utilizan en la agricultura como agentes de control biológico para combatir plagas de insectos. Estos hongos parasitan a los

insectos y los matan, ofreciendo una forma natural y sostenible de control de plagas (Merchan Flores, 2022).

Algunas especies de *Beauveria*, como *Beauveria bassiana*, se utilizan en la producción comercial de bioinsecticidas y biofungicidas para proteger los cultivos de insectos y enfermedades fúngicas. Estos productos son seguros para el medio ambiente, los cultivos y los seres humanos, ya que no contienen productos químicos nocivos (Merchan Flores, 2022).

Beauveria spp es una herramienta útil en la agricultura orgánica y sostenible, ya que ayuda a reducir la dependencia de los pesticidas químicos y promueve la salud ambiental. Es importante seguir las recomendaciones de uso y aplicación para maximizar su eficacia y minimizar los impactos no deseados en la biodiversidad (Zúñiga-Castro & Quirós-Cedeño, 2021).

7.3 Donde se encuentra el hongo *Beauveria spp*

Beauveria spp es un hongo que se encuentra comúnmente en la naturaleza y está ampliamente distribuido en suelos, rastrojos de cultivos, estiércol, así como en plantas e insectos. Este microorganismo es uno de los cinco agentes microbianos utilizados para el control biológico, y es reconocido por su prevalencia a nivel mundial (Cepeda-Siller et al., 2018).

7.4 Plagas controladas por el hongo *Beauveria spp*

Beauveria spp tiene la capacidad de parasitar a más de 300 especies de insectos pertenecientes a diferentes órdenes. Los insectos que son afectados por este hongo muestran una cubierta completa de micelio sobre sus cuerpos después de la muerte. Inicialmente, el micelio es de color blanco, pero adquiere una tonalidad amarilla cuando el hongo comienza a esporular (Aguilera et al., 2020).

Tabla 3: Plagas de importancia economía controladas con el hongo *Beauveria spp*.

Cultivo	Plaga	Hongos entomopatógenos
Tomate	Trips	<i>Beauveria spp.</i>
Pimientos	Chinches de cama	<i>Beauveria spp.</i>
Rosas	Escarabajos	<i>Beauveria spp.</i>

Nota. **Recuperado de (Aguilera et al., 2020)**

7.5 Características del hongo *Beauveria spp*

Las colonias de *Beauveria spp* se adhieren completamente al medio de cultivo y adoptan una forma redonda, exhibiendo una estructura micelial blanca y esporulada (Almudena, 2022).

Los conidióforos muestran una ramificación irregular, con aproximadamente 2-3 ramas por septo, y tienen una longitud que oscila entre 4-14 μm , con un diámetro de 1.5-2.5 μm (Tapia-Goné et al., 2008).

Las fialides, por su parte, se presenta de forma redonda un ensanchamiento en el ápice, midiendo entre 6-13 μm de longitud y 2-4 μm de diámetro (Almudena, 2022).

Los conidios, generalmente uninucleados, tienen una longitud que varía entre 3-9 μm y un diámetro de 1.5-3.5 μm (Almudena, 2022).

Se conoce que presenta la temperatura y la humedad son elementos clave en el proceso de infección y reproducción del hongo cuando se han expuesto a agentes externos. En un ambiente controlado de laboratorio, los conidios del hongo pueden comenzar a germinar aproximadamente después de 12 horas, siempre que la temperatura se encuentre entre 20 y 30°C y la humedad relativa sea superior al 90% (Almudena, 2022).

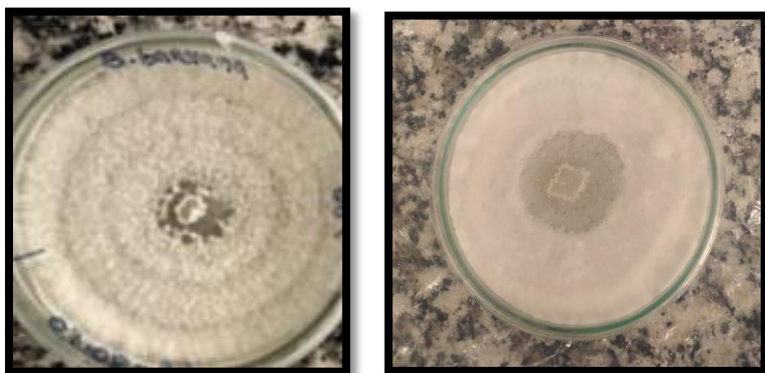


Imagen 1: Cultivos del hongo *Beauveria spp*.

Fuente: (Farez Erick, 2024)

7.6 Temperatura de crecimiento de *Beauveria spp*

La temperatura óptima para el crecimiento y la actividad de *Beauveria spp* varía según la especie y las condiciones específicas del medio ambiente. Sin embargo, en general, *Beauveria spp* prospera en temperaturas moderadas y cálidas (Wang et al., 2021).

En condiciones de laboratorio y en aplicaciones de control biológico, se ha observado que *Beauveria spp* suele crecer bien en una temperatura entre aproximadamente 20°C y 30°C. Dentro de este rango, la mayoría de las especies de *Beauveria spp* pueden germinar, colonizar y esporular eficientemente (DANNON et al., 2020).

Se debe tomar muy en cuenta que las diferentes cepas de *Beauveria spp* pueden tener preferencias ligeramente diferentes en cuanto a la temperatura óptima de crecimiento. Además, factores como la humedad relativa y la disponibilidad de nutrientes también influyen en la capacidad del hongo para crecer y prosperar. el tejido del insecto, colonizando totalmente el cuerpo del insecto (Almudena, 2022).

7.7 Mecanismos de acción del hongo *Beauveria spp*

Este hongo tiene la capacidad de infectar a insectos y otros artrópodos, causando su muerte a través de la invasión de sus tejidos y la liberación de toxinas. Una vez que el huésped ha sido infectado, el hongo se reproduce y se dispersa a otros individuos de la misma especie. El entomopatógeno se ha utilizado de manera efectiva como biocontrolador de plagas en la agricultura, ya que ataca selectivamente a ciertos insectos sin afectar a otros organismos no objetivo (Sun et al., 2023).

El proceso comienza cuando una espora se adhiere a la cutícula del insecto, generando un tubo germinativo y un apresorio que facilita la penetración en el insecto. Para la penetración, se emplean dos mecanismos: uno físico, que rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula, y otro químico, que implica la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas), causando la descomposición del tejido en el sitio de penetración (Sun et al., 2023).

7.8 Microorganismos Benéficos.

Los microorganismos beneficiosos son organismos pequeños presentes en el suelo que

tienen efectos positivos en los ecosistemas agrícolas y en la salud del suelo. Estos microorganismos, como bacterias y hongos, contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno, la prevención de enfermedades del suelo y el favorecimiento del crecimiento de las plantas. *Beauveria*, un hongo que afecta a los insectos de manera negativa, puede ser beneficioso al controlar las poblaciones de plagas que perjudican las cosechas (DANNON et al., 2020).

Además, *Beauveria spp.* puede colaborar con otros microorganismos beneficiosos al descomponer los restos de insectos muertos, liberando nutrientes en el suelo que son utilizados por las plantas. Sin embargo, es importante considerar las interacciones complejas entre *Beauveria spp.* y otros microorganismos beneficiosos, así como su influencia en la dinámica del suelo y la salud del ecosistema agrícola (Tofiño Rivera et al., 2018).

Los microorganismos beneficiosos, como *Beauveria*, pueden ser una valiosa herramienta para promover la sostenibilidad en la agricultura al ofrecer alternativas naturales para el control de plagas y mejorar la fertilidad del suelo. La presencia de *Beauveria* puede reducir la necesidad de pesticidas químicos, fomentando prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente a largo plazo. Además, la interacción entre *Beauveria* y otros microorganismos benéficos en el suelo puede incrementar la diversidad microbiana y favorecer una mayor estabilidad del ecosistema. En conjunto, la presencia y la interacción de estos microorganismos benéficos, incluido *Beauveria*, pueden tener un impacto positivo en la productividad agrícola y la salud del suelo, contribuyendo a mantener sistemas agrícolas más resilientes y equilibrados (Aguilera et al., 2020).

7.9 Impacto de los Microorganismos Benéficos en el suelo.

Los microorganismos beneficiosos en el suelo son fundamentales para la salud del suelo y la productividad agrícola. Se conoce que su función principal es descomponer, liberación de nutrientes esenciales, fijación de nitrógeno atmosférico, control de enfermedades del suelo y mejora de la estructura del suelo. Su actividad favorece la fertilidad del suelo, presenta una disponibilidad en plantas y la sostenibilidad a largo plazo de la agricultura, lo que contribuye al desarrollo de sistemas agrícolas resilientes y saludables (Wang et al., 2021).

7.10 Influencia de la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo.

La biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo ejerce una influencia significativa en la salud y la fertilidad del ecosistema del suelo. Esta diversidad microbiana contribuye a múltiples funciones ecológicas, descompone la materia, la fijación de nitrógeno, la producción de enzimas y la supresión de enfermedades del suelo (Davila Tafur, 2018).

Cuanta mayor sea la diversidad de microorganismos beneficiosos, mayor será la capacidad del suelo para mantener su estructura y funcionamiento, posee una mayor resistencia a enfermedades y una mayor capacidad para tolerar condiciones ambientales adversas (Galindo Soracá & Pulido, 2019).

Además, la biodiversidad de microorganismos en el suelo contribuye a la estabilidad del ecosistema y al mantenimiento de la productividad agrícola a largo plazo al proporcionar servicios ecosistémicos esenciales para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y la biodiversidad global del suelo. En resumen, la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo es fundamental y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y ecológicos (Davila Tafur, 2018).

7.11 Utilización de los Microorganismos Benéficos en el suelo.

- **Promoción de la salud del suelo:** Los microorganismos beneficiosos contribuyen al suelo y mejorar su estructura, fertilidad y capacidad para sostener la vida vegetal (Castro López et al., 2019).
- **Fertilización natural:** Los microorganismos benéficos desintegran la materia orgánica, liberando nutrientes esenciales que las plantas necesitan para crecer y desarrollarse (Castro López et al., 2019).
- **Control de enfermedades:** los microorganismos poseen la capacidad de suprimir patógenos del suelo, reduciendo la incidencia de enfermedades en las plantas (Ramírez, 2019).
- **Reducción de la dependencia de químicos:** La utilización de microorganismos beneficiosos permite a los agricultores reducir su utilización de fertilizantes,

promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente (Merchan Flores, 2022).

- **Mejora del rendimiento de los cultivos:** Los microorganismos benéficos, como los hongos micorrízicos, pueden aumentar el rendimiento de los cultivos al facilitar la absorción de nutrientes y mejorar la resistencia (Aguilera et al., 2020).
- **Conservación de la biodiversidad del suelo:** La diversidad de hongos beneficiosos en el suelo contribuye a la biodiversidad del ecosistema y a su estabilidad a largo plazo (Zúñiga-Castro & Quirós-Cedeño, 2021).

7.12 Actividades que desempeñan los Microorganismos Benéficos en el suelo

- **Descomposición de materia orgánica:** *Beauveria spp.* puede contribuir a la desintegración de materia orgánica al descomponer los restos de insectos muertos en el suelo, dando nutrientes a todo tipo de plantas (Merchan Flores, 2022).
- **Fijación de nitrógeno:** Aunque *Beauveria spp.* no fija directamente nitrógeno, al controlar las poblaciones de insectos, reduce la materia orgánica que los insectos consumen, lo que puede liberar nitrógeno en la tierra a través de la descomposición (DANNON et al., 2020).
- **Síntesis de vitaminas y hormonas:** Se ha demostrado que *Beauveria spp.* promueve el crecimiento y los beneficios de las plantas al inducir respuestas hormonales y aumentar la producción de metabolitos secundarios que benefician a las plantas (Ramírez, 2019).
- **Producción de enzimas:** *Beauveria spp.* produce una variedad de enzimas que le permiten descomponer la cutícula de los insectos y colonizarlos (Davila Tafur, 2018).
- **Control de plagas:** *Beauveria spp.* es conocido por su capacidad para manejar poblaciones de plaga. Al infectar y matar a estos insectos, ayuda a regular las poblaciones y protege las plantas de daños significativos, lo que contribuye a la salud general del ecosistema agrícola (Sun et al., 2023).

- **Promoción de la biodiversidad:** Al interactuar con otros microorganismos en el suelo y con el entorno de las plantas, *Beauveria spp.* puede promover la diversidad. Su presencia y actividad en el suelo pueden crear un ambiente favorable para una variedad de organismos beneficiosos, lo que contribuye a un ecosistema agrícola más equilibrado y resiliente (Sun et al., 2023).
- **Estímulo del crecimiento de las raíces:** Se ha observado que *Beauveria spp.* promueve el crecimiento de las raíces de las plantas al establecer una relación simbiótica con ellas. Esta asociación puede aumentar la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes del suelo, mejorando su salud y su resistencia a condiciones adversas (Wang et al., 2021).
- **Reducción del uso de pesticidas:** Al proporcionar un método de control de insectos, *Beauveria spp.* puede reducir la necesidad de pesticidas químicos en la agricultura. Esto tiene como beneficio a la salud humana al disminuir la exposición a productos químicos nocivos y promover prácticas agrícolas más sostenibles (Sun et al., 2023).

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS

8.1 Pregunta Científica

“¿Cuáles fueron los beneficios al realizar un análisis molecular en el laboratorio de la carrera de Ingeniera Agrónoma de la Universidad técnica de Cotopaxi en el periodo 2023-2024?”

9. METODOLOGÍA

9.1 Tipos de investigación

9.1.1 Investigación bibliográfica

Este proceso implica la búsqueda y recopilación de información bibliográfica disponible, incluyendo artículos científicos, libros, tesis y documentos relacionados con el tema de los agentes biocontroladores. Se lleva a cabo un análisis exhaustivo de esta información, resaltando los aspectos más relevantes y pertinentes para la elaboración del documento del proyecto de investigación. Este enfoque permite la construcción de nuevos conocimientos y aporta al desarrollo de la investigación en cuestión.

9.2 Métodos de investigación

9.2.1 Cualitativo

La observación detallada de las características físicas del hongo (morfológicas), así como el análisis de su composición genética y molecular. Esto implica identificar y describir aspectos como la forma, el tamaño, el color y las estructuras del hongo, así como determinar su identidad genética y posiblemente su variabilidad genética (molecular).

9.3 Ubicación de la investigación

La presente investigación se realizó en la Universidad Técnica de Cotopaxi campus Salache, está dentro del perímetro rural cantón Latacunga, ubicada al suroeste de la cabecera cantonal, junto a la E35 en el km 7,53 vía Salache a 2,870 msnm su temperatura media es de 13,6°C



Imagen 2: Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi

Fuente: Google maps

9.4 Materiales y reactivos.

Los materiales y reactivos utilizados para la presente investigación se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: *Materiales y reactivos utilizados para realizar la investigación*

Materiales	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Cajas Petri (40 unidades) Asa de siembra metálica (1 unidad) • Estuche de disección (1 unidad) • Hisopos (200 unidades) • Palillos (30 unidades) • Papel absorbente (3 unidad) • Papel aluminio (4 rollos) • Mechero (1 unidad) • Jeringuilla de 10 ml (4 unidades) • Cámara de flujo (1 unidad) • Agua destilada (5 litros) • Guantes quirúrgicos (50 unidades) • Papel film (30 metros) • Puntas de micropipeta(100-200ul) • Microtubos (2ml-1.5ml) • Perlas de vidrio (3 unidades) • Para fina (1 rollo) • Alcohol (70%) 	<ul style="list-style-type: none"> • PDA • Alcohol al 96% (15 litros) • Agua destilada (5 litros) • Cloro (10 litros) • Buffer de extracción (500ul) • Tris HCL(100Mm) • EDTA (20Mm) • CTAB (25%) • NaCl (1.4M, pH=8) • β-mercaptoetanol (2ul) • Cloroformo (500ul) • Etanol (70%-96%) • Acetato de Sodio (3M) • Agua ultra pura (50ul) • DreamTaq 2X (12,5ul/Rx) • Primer ITS1 (2,5ul/Rx) • Primer ITS4 (2,5ul/Rx) • Agarosa (0,75g) • Buffer Juice (50ul) TAE 1X • Syber Safe (1,75ul)

Elaborado por: (Farez Erick, 2024)

9.5 Equipos utilizados para realizar la investigación

Los equipos utilizados para la presente investigación se detallan en la tabla 5.

Tabla 5: *Equipos Utilizados.*

Equipos del laboratorio	Marca	Modelo	Cantidad
Autoclave	TUTTNAVER	2540M	1
Incubadora	REBELK	RI-50	1
Cámara de flujo laminar	BIOBASE	BBS-DDS. CN BBS-H1300	1
Balanza	HOCHOICE	HC500	1
Microondas	GENERAL ELECTRIC	JES710wk	1
Centrifuga	HERMLE	Z160M	1
Vórtex	SCIENTIFIC	2DIGITAL	1
Termo bloque	BOECO GERMANY	DBI-100	1
Fuente de poder	ENDURO	3000V	1
Computadora	SAMGSUNG	S19b300	1

Espectrómetro	LADNET	1365CBS	1
Termociclador	BOECO	100-110V,50-60Hz	1
Micropipeta	BOECO	9610220-9619220	2
Transiluminador			1

Elaborado por: (Farez Erick ,2024)

9.6 Métodos de multiplicación

Se emplearon técnicas estándar para cultivar, identificar y estudiar hongos. Inicialmente, se cultivaron en medios de cultivo PDA con el objetivo de obtener colonias individuales. Posteriormente, se realizó un análisis tanto microscópico como macroscópico de las colonias. La siembra en medios selectivos facilitó el aislamiento y la distinción de las diferentes especies fúngicas. Las incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 26°C, y se realizaron pruebas moleculares para asegurar una identificación precisa. Estas técnicas permitieron un estudio detallado del hongo en cuestión (Akter et al., 2023).

- **Método de Transferencia con Bisturí o Inoculación por Corte**

Para la multiplicación de hongos en cajas de Petri utilizando un bisturí, primero se prepararon todos los materiales y equipos en condiciones estériles, incluyendo el bisturí y las cajas de Petri. Se seleccionó una colonia de hongo saludable, se cortó un fragmento con el bisturí estéril y se transfirió al medio de cultivo PDA, manteniendo la esterilidad para evitar contaminación. Se incubó bajo condiciones de 26°C de temperatura y de 70% a 100% humedad relativa. Posteriormente, se observó el crecimiento del hongo y se realizaron análisis adicionales según sea necesario. Este procedimiento aseguró la propagación eficaz y controlada del cultivo de hongos para su estudio (Davila Tafur, 2018).

- **Método de Inoculación con Palillo o Técnica de Inoculación con Palillo**

En la recolección de cepas obtenidas en la Universidad Técnica de Cotopaxi, se utilizaron palillos estériles para recoger muestras de hongos, que luego se transfirieron al medio de cultivo en las placas. Este procedimiento permitió aumentar la cantidad de colonias formadas, facilitando la purificación de las mismas. Cuantas más colonias se obtuvieron, mejor fue la calidad del resultado para el análisis molecular (Tapia-Goné et al., 2008).

- **Método de Siembra con Asa de Inoculación o Inoculación por Asa**

Las asas de siembra (a veces llamadas microestriadores o varillas de inoculación) se utilizaron como dispositivos de mano para inocular medios de crecimiento de placas o tubos con microorganismos como bacterias o levaduras antes de la incubación, la multiplicación y el crecimiento (Aguilera et al., 2020).

Reactivación de *Beauveria spp.*

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi con todas las medidas de bioseguridad y con los equipos con los que cuenta el laboratorio, para el aislamiento de los hongos se realizó con la técnica del rayado (Sarabia & Roo, 2014).

Para la reactivación se preparó en 200 ml de agua destilada con 7,8 g de (PDA) para 10 cajas Petri. Las asas de siembra y pinzas se colocaron en el autoclave con un tiempo de 40 minutos a una temperatura 26 °C. Para la esterilización y preparación del medio, los materiales fueron retirados del autoclave. Se desinfectó la cámara de flujo laminar donde se trabajó con las muestras y todos los materiales necesarios como: mechero con alcohol 96%, cajas Petri de 60×15 mm, alcohol al 96% en un vaso de precipitación para la desinfección de asas de siembra y pinzas, para el aislamiento (Sun et al., 2023).

Se obtuvieron muestras de los hongos aislados mediante el uso de un asa, se colocó sobre portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos. Luego, se colocaron los portaobjetos en el microscopio y se visualizó a través del lente objetivo (20x/0.40Ph1.). La finalidad fue observar estructuras que se formaron durante el crecimiento del hongo en el medio de cultivo (Akter et al., 2023).

$$\frac{1000 \text{ ml} - - - - 39 \text{ g}}{200 - - - - X} = X = \frac{200 * 39}{1000} = 7,8 \text{ g}$$

Imagen 3: Fórmula para la preparación del medio de cultivo (PDA)

Se colocaron en cada caja Petri 20 ml de medio (PDA), se esperó dos minutos para que el medio se enfríe. Se utilizaron varias técnicas de multiplicación como es con hisopos, palillos y asa de siembra luego de haber multiplicado, se rotularon las cajas con la fecha, número de

muestra, nombre del responsable, el medio de cultivo que se utilizó fue sellado con papel film y llevado a incubación a 26 °C durante los 7 días (Akter et al., 2023).

Se obtuvieron imágenes de las muestras de *Beauveria spp.* recolectadas en el laboratorio para su visualización bajo el microscopio (Ramírez, 2019).

9.7 Antibiótico (Megacilina)

La aplicación del antibiótico inhibe el desarrollo, crecimiento y reproducción de bacterias que afectan a la propagación de las colonias formadoras de hongos. Para un análisis molecular se necesita una obtención pura del hongo. Se utilizó antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo del Hongo y para obtener un cultivo puro (Sun et al., 2023).

9.8 Protocolo estandarizado de extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir del crecimiento de hongos en medio PDA, se tomaron aproximadamente 50-100 mg de micelio y se colocaron en un microtubo de 2 mL. Se añadieron tres perlas de vidrio, 500 µL de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM, EDTA 20 mM, CTAB 2.5% w/v, NaCl 1.4 M, pH 8) y 2 µL de β-mercaptoetanol al microtubo. Se realizó una disrupción mecánica vigorosa utilizando un vórtex durante 1 minuto para lograr una adecuada maceración del micelio. El microtubo se incubó en un termobloque a 60°C durante 30 minutos, invirtiendo los tubos generosamente en intervalos de 10 minutos. Se añadió 500 µL de cloroformo frío al microtubo y se homogenizó con vórtex. Se dejó reposar la mezcla durante 2 minutos y se centrifugó a 14,200 rpm durante 8 minutos para la separación de fases.

A continuación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL y se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3M y 300 µL de etanol al 70% para precipitar el ADN. La mezcla se dejó reposar durante 2 horas a -20°C. Tras 2 horas, se centrifugó a 14,200 rpm durante 17 minutos para obtener el pellet de ADN en el fondo del tubo, y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó utilizando 200 µL de etanol al 70% con una micropipeta. Se homogenizó por pipeteo y se centrifugó a 14,200 rpm durante 2 minutos. Este lavado se repitió con etanol al 70% y luego con etanol al 96%.

Finalmente, el pellet se dejó secar bajo flujo de aire en la cabina durante 30 minutos, hasta que ya no se observaron gotas de etanol en el tubo. El pellet se resuspendió en 50 µL de agua ultra

pura. La solución se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se almacenó a -20°C.

Para verificar la integridad del ADN extraído del hongo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel al 1% (p/v), disolviendo 0.5 g de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X, y se incorporó 1,75µL de Syber Safe para la tinción de los ácidos nucleicos.

Una vez solidificado, el gel se colocó en la cámara de electroforesis con los pocillos orientados hacia el polo negativo, y se llenó la cámara con buffer TAE 1X. Se cargó un marcador de peso molecular de 1kb en el primer pocillo, en los siguientes pocillos se añadieron 5 µL de muestra de ADN Bau1 mezclada con 1µL de Blue Juice, 5µL de muestra de ADN Bau2 mezclada con 1µL de Blue Juice. La electroforesis se llevó a cabo a 110 V durante 30 minutos.

9.9 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One[®]. Para realizar la medición, se seleccionó la función predeterminada para cuantificación en micro volumen en la pantalla del instrumento. Se utilizó agua ultra pura como blanco para calibrar el equipo y se limpiaron los dos pedestales (superior e inferior) con un paño anti-pelusas antes y después de cada medición. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente antes del análisis. Se colocaron 2 µL de cada muestra en la superficie del lector, y luego se bajó el pedestal para iniciar la lectura automática del dispositivo. El equipo midió la concentración de ácidos nucleicos a 230nm, 260nm y 280nm. Se evaluó la pureza mediante la relación 260/280 y 260/230.

9.10 PCR para la amplificación de regiones ITS

Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron 4 microtubos con ADN de la muestra Bau1, ADN de la muestra Bau2, control positivo y control negativo, se utilizó la enzima DreamTaq[™]. El volumen final de amplificación fue de 25µL que contenía 12,5µL de DreamTaq 2X, 2,5µL de cada Primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) 10µM; 2,5µL de agua ultra pura y 5µL de ADN de cada muestra a concentración de 10ng/µL. La amplificación se realizó en el termociclador convencional Boeco TC-TE, utilizando el perfil térmico que incluyó 3 minutos de denaturación a 95 °C, seguido de un ciclaje de Denaturación a 95°C por 30 segundos; Annealing a 55°C por

30 segundo y Extensión a 72°C por 1 minuto por 35 ciclos; una extensión final a 72 °C por 5 minutos, y un tiempo indefinido de reposo a 4°C.

Para verificar el tamaño de la región ITS (600bp) amplificada del hongo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), disolviendo 0.75 g de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X, y se incorporó 1,75µL de Syber Safe.

Una vez solidificado el gel, se lo colocó en la cámara de electroforesis con los pocillos orientados hacia el polo negativo, y se llenó la cámara con buffer TAE 1X. Se cargó un marcador de peso molecular de 100bp en el primer pocillo, en los siguientes pocillos se añadieron 5 µL de control negativo, 5uL de muestra Bau1, 5uL muestra Bau2 y 5uL de Control Positivo. La electroforesis se llevó a cabo a 110 V durante 30 minutos.

9.11 Secuenciación y Análisis Bioinformático

Se envió a secuenciar los productos de amplificación de la región ITS a la empresa IDgen para realizar la secuenciación usando la técnica de Sanger. Los resultados se recibieron en formato FASTA junto con los electroferogramas correspondientes. Para la identificación molecular, se cargaron los datos de las secuencias crudas en el software Geneious Prime v2024.0.7, se eliminaron las secuencias de baja calidad, se realizó el alineamiento de novo con las secuencias ITS1 e ITS4 de cada muestra, se revisó el alineamiento y se obtuvo la secuencia consenso.

Se comparó la secuencia consenso frente a todas las secuencias reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) a través de la ejecución del BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). Se identificó el microorganismo al que pertenecía la región de ITS amplificada. Se trabajó por duplicado para corroborar los resultados.

10. ANALISIS Y DICUSION DE RESULTADOS

10.1 Observación macroscópica de *Beauveria spp.*

Observación macroscópica durante los 7 días de crecimiento del hongo *Beauveria spp* con una temperatura de 26°C en la incubadora.

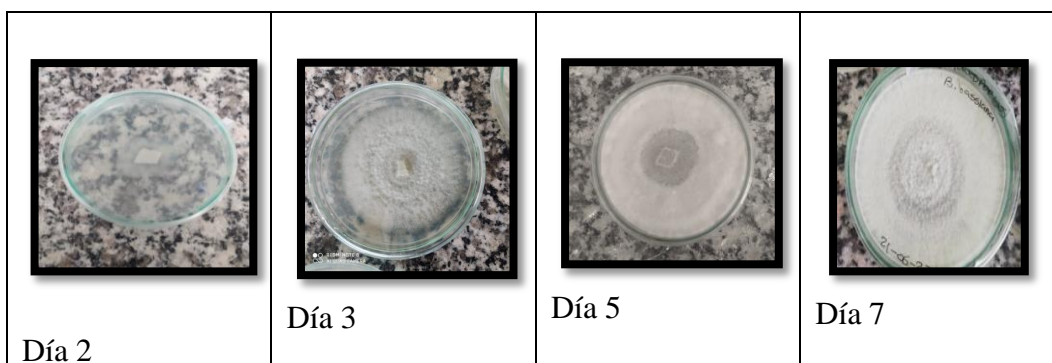


Imagen 4: Crecimiento radial de (*Beauveria spp*), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo

Elaborado por: (Farez Erick,2024)

Crecimiento del hongo al 2 día:

Beauveria sembradas en el agar PDA, apenas visibles a simple vista.

Crecimiento del hongo al 3 día:

Comienzan a observarse pequeñas colonias de *Beauveria* de color blanco o gris claro en el agar PDA.

Crecimiento del hongo al 5 día:

Las colonias de *Beauveria* en la caja Petri crecieron y se expandieron, presentando un aspecto más denso y compacto. El crecimiento de *Beauveria* en el agar PDA continuó. Las colonias se expandieron aún más y se pudo observar pequeñas estructuras reproductivas como conidios o esporas.

Crecimiento del hongo al 7 día:

Las colonias de *Beauveria* en la caja Petri alcanzaron su máximo crecimiento, cubriendo gran parte del agar y mostrando una apariencia característica de hifas. El crecimiento se mantuvo estable, y se observó que las colonias empezaron a cambiar de color y textura, indicando que estaba comenzando la producción de esporas maduras.


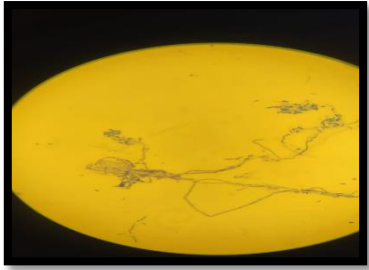
Es importante recordar mantener las condiciones adecuadas del 70-100% humedad relativa, 26°C temperatura para favorecer el crecimiento de *Beauveria spp* en la caja Petri y observar su desarrollo día a día.

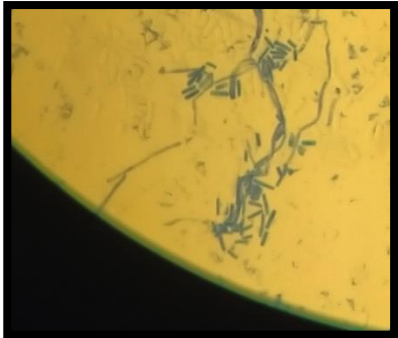
Se observó que las colonias de *Beauveria spp*. en medio de cultivo PDA presentaron una

aparición distintiva a medida que crecieron. Al principio, las colonias eran pequeñas y de color blanco a gris, con una textura algodonosa y un crecimiento en hifas que se extendían hacia fuera. Con el tiempo, las colonias se expandieron para cubrir gran parte del agar, mostrando un crecimiento denso y una textura más aterciopelada.

A medida que las colonias alcanzaron su máximo crecimiento, empezaron a cambiar de color, adquiriendo tonalidades que variaban de blanco a beige e incluso a tonos como amarillento en la base de la caja Petri. La textura también se volvió más rugosa y con una apariencia más granular. Estos cambios indicaron que la producción de esporas maduras estaba en proceso, lo cual es típico para *Beauveria spp.* en condiciones de cultivo.

Tabla 6: Características morfológicas de *Beauveria spp* vistas a través del microscopio.

Partes	Descripción	Fotografía
Micelio	Se observó en el medio de cultivo PDA, una red densa de hifas blancas a gris claro, que se extendía de manera radial desde el punto de inoculación. Las hifas tenían una textura algodonosa y aterciopelada, y con el tiempo, el micelio adquirió tonalidades más oscuras y una textura rugosa a medida que se desarrollaba y comenzaba la producción de esporas.	
Conidióforos	Los conidióforos pueden tener una longitud que va desde 50 hasta 200 micrómetros, y un diámetro de alrededor de 2 a 5 micrómetros, nuevamente dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento. En la imagen se observó conidióforos individuales ampliamente ramificados. Células conidios génicos (fiálides) formando una capa densa (himenio).	

Conidios	Los conidios típicamente tienen una longitud que oscila entre 5 y 10 micrómetros, y un diámetro de 2 a 5 micrómetros. Estas medidas también pueden variar según la especie y las condiciones ambientales. Se observó conidios aceptados, cilíndricos a elipsoidales formando cadenas; adheridas lateralmente.	
----------	---	--

Elaborado por: (Farez Erick ,2024)

10.2 Observación microscópica

Para la identificación del hongo que fue cultivado y aislado en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se mantuvo en incubación durante un periodo de 7 días a una temperatura de 26°C.

Tabla 7: Equipos de laboratorio.

Equipo	Marca	Modelo	Cantidad
• Microscopio	OLYMPUS	CX31RBSFA	1

Elaborado por: (Farez Erick ,2024).

En el microscopio, se pudo observar que *Beauveria* es un hongo entomopatógeno con una apariencia filamentosa. Sus hifas son delgadas y ramificadas, formando una red de filamentos que se extienden por el sustrato de crecimiento. También se pueden observar esporas de forma ovalada o alargada, que son las estructuras reproductivas del hongo. En general, *Beauveria* presenta una apariencia similar a otros hongos filamentosos, pero su capacidad para infectar insectos lo distingue de otros géneros fúngicos. Ya que tiene estructuras como micelio, conidióforos y conidios (Ibarra, 2022).

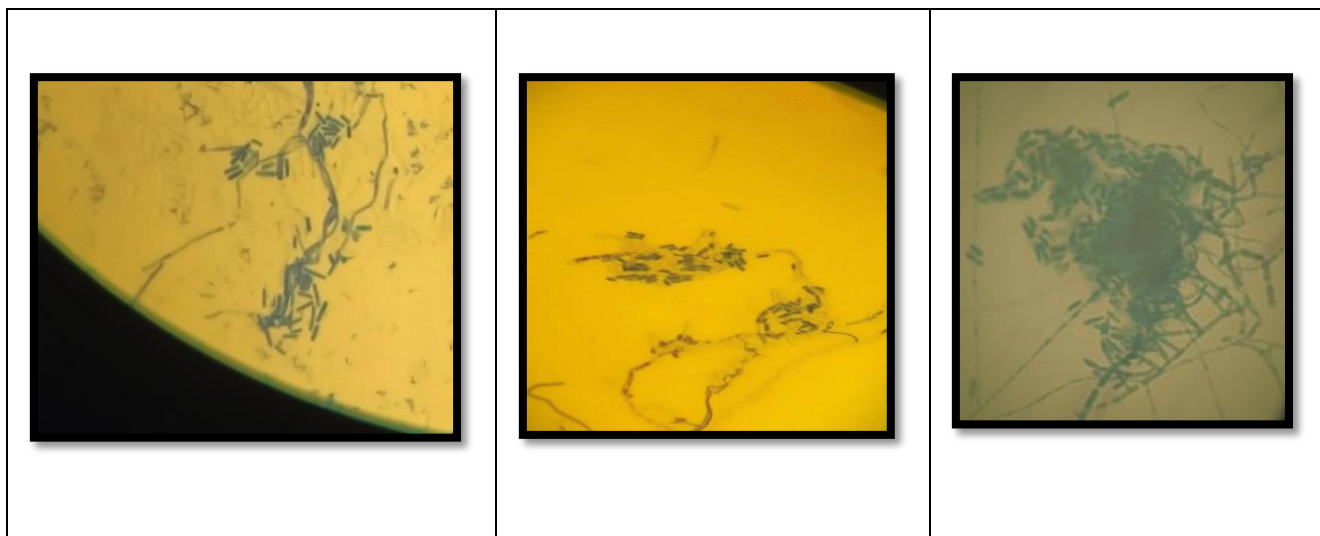


Imagen 5: Visualización de *Beauveria spp* en el microscopio.

Elaborado por: (Farez Erick ,2024).

10.4 Identificación molecular.

10.4.1. Extracción de ADN y Cuantificación.

Para la extracción manual de ADN a partir del crecimiento de hongos en medio PDA, se optimizo un protocolo basado en fuentes bibliográficas y adaptadas a las condiciones del laboratorio de Microbiología de la carrera de Agronomía. Obteniendo 2 muestras Bau1 y Bau2 de dos diferentes medios PDA. Para verificar la integridad del ADN extraído, realicé una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 kb y muestras de ADN de Bau1 y Bau2, cargadas con Blue Juice. La electroforesis se llevó a cabo a 110 V durante 30 minutos, confirmando que era de buena calidad el ADN obtenido.

La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One^e. El equipo midió la concentración de ácidos nucleicos a 230nm, 260nm y 280nm. Se evaluó la pureza mediante la relación 260/280 y 260/230

Para evaluar la pureza del ADN, se utilizó el índice de absorbancia 260/280, con un rango ideal entre 1.8 y 2.0 para considerar una muestra como pura. Valores inferiores a este rango pueden indicar contaminación por fenol o proteínas, mientras que valores superiores a 2.0

podrían sugerir la presencia de ARN en la muestras. El espectrofotómetro arrojó resultados para las muestras Bau1 y Bau2 con relaciones 260/280 de 2.04 y 2.05, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango indicando que las muestras están adecuadamente purificadas. Por lo tanto, el ADN extraído de ambas muestras es adecuado para procedimientos posteriores de amplificación.

La absorbancia a 230 nm puede detectar contaminantes como sales caotrópicas o carbohidratos, por lo que la relación 260/230 debe estar entre 1.8 y 2.2 para considerar que la muestra está limpia. Un valor más bajo indica una mayor presencia de contaminantes, lo cual podría afectar la funcionalidad de la muestra. El espectrofotómetro arrojó resultados para las muestras Bau1 y Bau2 con relaciones 260/230 de 1.81 y 1.84, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango indicando que las muestras están adecuadamente purificadas. Por lo tanto, el ADN extraído de ambas muestras es adecuado para procedimientos posteriores de amplificación.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	B	franc	03-Jul-24 10:58 AM	-0.4	ng/μl	-0.009	-0.012	0.75	4.72	DNA
2	Bau1	franc	03-Jul-24 11:00 AM	56.2	ng/μl	1.125	0.552	2.04	1.81	DNA
3	Bau2	franc	03-Jul-24 11:02 AM	68.8	ng/μl	1.376	0.670	2.05	1.84	DNA

Imagen 6: Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One^c.

10.4.2. Amplificación de la región ITS por PCR

En el primer pocillo se cargó un marcador de peso molecular de 100 bp. Los siguientes pocillos se llenaron con 5 μL de control negativo, 5 μL de la muestra Bau1, 5 μL de la muestra Bau2 y 5 μL de control positivo, logrando así obtener los resultados que se observa en la imagen 7.

Con base en los resultados de la cuantificación del ADN genómico, se seleccionaron las muestras del hongo que tuvieron una excelente concentración y pureza según la relación 260/280 y 260/230. Las dos muestras elegidas a partir del protocolo optimizado, fueron amplificadas para las regiones ITS1 e ITS4. La calidad de los amplicones obtenidos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Al analizar la migración de las bandas en el

gel, junto con un marcador de peso molecular con fragmentos de tamaño conocido, se observó que los fragmentos alcanzaron el tamaño esperado, el cual fue de 600pb.



Imagen 7: Electroforesis de PCR de la muestras Bau1 y Bau2

10.4.3. Análisis Bioinformático

Para la identificación molecular, se cargaron los datos de las secuencias crudas en el software Geneious Prime v2024.0.7. Una vez eliminadas las secuencias de baja calidad se obtuvo un porcentaje de calidad de HQ de la muestra de Bau1 99.6% y de la muestra Bau2 un porcentaje de 97.3%. Finalmente, se obtuvo la secuencia consenso (Imagen 8).



Imagen 8: Electroferograma Bau1_ITS1, Bau1_ITS4

Elaborado por: (Farez Erick ,2024).

Se realizó un análisis BLAST de las secuencias obtenidas contra la base de datos pública del NCBI. Se identificó el nombre científico del microorganismo que muestra el mayor grado de identidad de secuencia y se registró el porcentaje de identidad.

Se identificó que la muestra Bau1 corresponden a la especie *Trichoderma hamatum* con porcentaje de identidad del 100% y un query cover de 100%.

Se realizó el mismo procedimiento para la muestra Bau2 y se obtuvo como resultado que también corresponde a la especie *Trichoderma hamatum* con porcentaje de identidad del 100% y un query cover de 100%.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trichoderma hamatum strain SB_PA02 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Trichoderma ha...	1042	1042	100%	0.0	100.00%	605	MT348552.1
Trichoderma hamatum isolate F4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space...	Trichoderma ha...	1042	1042	100%	0.0	100.00%	603	MT341773.1
Trichoderma pubescens isolate KoRL1047066 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans...	Trichoderma pub...	1042	1042	100%	0.0	100.00%	598	MN341304.1
Trichoderma sp. strain GH5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5...	Trichoderma sp.	1042	1042	100%	0.0	100.00%	611	MN602858.1
Trichoderma hamatum isolate y-02 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and...	Trichoderma ha...	1042	1042	100%	0.0	100.00%	578	MN264503.1

Imagen 9: Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso Bau1 y Bau2 por secuenciación del gen ITS

Elaborado por: (Farez Erick ,2024).

Beauveria spp. y *Trichoderma hamatum* muestran varias similitudes cuando se cultivan en medio PDA. Macroscópicamente, ambas especies inician el crecimiento con colonias pequeñas de color blanco o gris claro que se expanden radialmente. A medida que las colonias se desarrollan, adquieren una textura aterciopelada y pueden cambiar de color, mostrando tonos más oscuros. Este crecimiento rápido y la textura densa son características comunes entre ambos hongos (Merchan Flores, 2022).

En términos microscópicos, tanto *Beauveria spp.* como *Trichoderma hamatum* presentan un micelio denso, compuesto por hifas delgadas y ramificadas. La red de hifas en ambas especies es similar, con una textura algodonosa que se vuelve más pronunciada a medida que el hongo madura. Los conidióforos de ambos hongos son delgados y ramificados, y los conidios se forman en cadenas, aunque las características exactas de los conidios pueden variar (Castro López et al., 2019).

Finalmente, la formación de estructuras reproductivas en ambos hongos es comparable. Ambos producen conidios en conidióforos y muestran una disposición y formación similar de estos conidios. A pesar de estas similitudes, para una diferenciación precisa entre las especies, es crucial realizar un análisis molecular, como la secuenciación del gen ITS, ya que las características visuales pueden no ser suficientes para una identificación definitiva (*PCR Protocols*, 1989).

10.5 Presupuesto del proyecto

Tabla 8: Costos del proyecto de investigación.

PRESUPUESTO DE REACTIVACION Y PURIFICACION DE LAS SEPAS			
Materiales	Cantidad	Precio	Total
Cajas Petri plástico pequeños	120	\$0,40	\$48,00
Medio de cultivo (PDA).	1	\$90,00	\$90,00
Mechero de alcohol.	1	\$5,00	\$5,00
Papel absorbente.	3	\$2,75	\$8,25
Guantes quirúrgicos.	una caja	\$3,00	\$3,00
Para film.	una caja	\$70,00	\$70,00
Alcohol 70%	1	\$10,00	\$10,00
Alcohol 96%	1	\$10,00	\$10,00
Tijera	1	\$0,50	\$0,50

Marcador	1	\$1,00	\$1,00
Agua destilada	2 galones	\$5,00	\$5,00
Papel aluminio	2	\$2,75	\$2,75
Cajas Petri cristal grande	60	\$2,50	\$150,00
Refrigerador	1	\$300,00	\$300,00
Estuche de decisión	1	\$16,00	\$16,00
Asa de siembra	1	\$20,00	\$20,00
Hisopos	una caja	\$2,00	\$2,00
Palillos	una caja	\$0,35	\$0,35
Plástico film.	un rollo	\$5,00	\$5,00
		Total	\$746,85

PRESUPUESTO DE EXTRACCION DE ADN			
Materiales	Cantidad	Precio	Total
Micropipeta	2	\$88,38	\$176,76
Puntas de micro pipeta	2 cajas	\$6,33	\$12,66
Micro Tubos	20	\$0,14	\$2.80
Microondas	1	\$115,00	\$115,00
Centrifugadora	1	\$464,65	\$464,65
Vórtex	1	\$94,88	\$94,88
Termo bloque	1	\$182,00	\$182,00
Fuente de poder	1	\$100;00	\$100;00
Computadora	1	\$150,00	\$150,00
Espectrómetro	1	\$186.85	\$186.85
Termociclador	1	\$496.00	\$496.00
Blue Juice	1	\$120,00	\$120,00
Agarosa	1	\$24,95	\$24,95
Marcador de peso molecular de 100bp	1	\$81.46	\$81.46
Marcador de peso molecular de 1kb	1	\$162.00	\$162.00
Sybr Safe	1 frasco	\$123,00	\$123,00
Agua ultra pura	1000ml	\$10,68	\$10,68
TAE	1	\$25.00	\$25.00
Perlas de vidrio	40000pcs	\$21.09	\$21.09
Tris HCl	1000ml	\$33.80	\$33.80
EDTA	150ml	\$15.00	\$15.00
CTAB	500g	\$14.99	\$14.99
NaCl	1600mg	\$12.00	\$12.00
Beta - Mercaptoetanol	120mg	\$28.51	\$28.51
Cloroformo	1496 ml	\$10.57	\$10.57
Etanol absoluto grado biología molecular	1000 ml	\$37.50	\$37.50
Acetato de sodio	17.64 oz	\$22.95	\$22.95

Total	\$ 2,725.07
-------	-------------

PRESUPUESTO DE LA SECUENCIACIÓN SANGER DEL HONGO			
HONGO	UNIDAD	PRECIO	TOTAL
2 Muestras	2	\$20,50	\$41,00
		Total	\$41,00

Presupuesto total de la investigación	\$ 3,512.85
---------------------------------------	-------------

11.IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

Los impactos generados en los ámbitos, sociales, ambientales y económicos son los siguientes:

11.1 Impacto social

Las cepas madres de *Beauveria spp* que se disponía en el laboratorio de la carrera de agronomía, se confirmó que es *Beauveria spp* y puede ser utilizado como una alternativa para el control de la plaga, sin causar daños al medio ambiente y la salud humana

11.2 Impacto ambiental

El monocultivo causa grandes daños como la degradación de suelo por la quema de los residuos durante su cosecha, debido a plagas y enfermedades que presenta. Los químicos para el control de la plaga, causa problemas medioambientales, por ello se busca una alternativa de control biológico como el hongo *Beauveria spp* que no causa ningún daño y puede controlar dichas plagas sin ningún problema.

11.3 Impacto económico

El uso *Beauveria spp*, como posible controlador dará una gran ventaja a los agricultores, el manejo de los cultivos será completamente orgánico, el agricultor tendrá más oportunidad de comercio de productos orgánicos para la industria.

12.CONCLUSIONES

- Durante el estudio, se observó que las cajas multiplicadas con bisturí no mostraron presencia de Bacterias, por lo que comúnmente contaminan los cultivos. Esta observación sugiere que el método de multiplicación utilizando Bisturí se considerarse altamente estéril.
- A través del análisis de las características macroscópicas y microscópicas se determinó que el microorganismo investigado correspondía al hongo *Beauveria spp*.

- Se identificó de manera molecular que el hongo en investigación correspondía a *Trichoderma hamatum*.
- Los costos de reactivación, purificación, extracción de ADN, amplificación y secuenciación en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi fueron de \$3,512.85.

13.RECOMENDACIONES

- Se recomienda la implementación de protocolos rigurosos de esterilización y monitoreo para garantizar la integridad de las muestras de *Beauveria spp.* Esto implica el uso de técnicas y procedimientos estandarizados para la esterilización de equipos, medios de cultivo y áreas de trabajo, así como la realización de controles regulares para detectar posibles contaminaciones. Estos protocolos son fundamentales para mantener la pureza y la viabilidad de las muestras, lo que asegura la validez y la obtenidos en investigaciones y aplicaciones prácticas.
- Se recomienda establecer relaciones colaborativas con asociaciones especializadas en la identificación de hongos. Estas asociaciones pueden proporcionar asistencia experta para determinar el género y la especie de cualquier hongo obtenido. La colaboración con estas organizaciones puede implicar la participación en talleres, cursos de capacitación o la consulta directa con micólogos experimentados. Estas relaciones pueden ser invaluable para garantizar una identificación precisa y confiable de los hongos, lo que es crucial para la investigación científica, la gestión de plagas y otras aplicaciones relacionadas con la micología.
- Recomiendo realizar una identificación molecular complementaria además de la caracterización microscópica y macroscópica para una identificación más precisa y confiable de los hongos. Mientras que la caracterización microscópica y macroscópica proporciona información valiosa sobre las características morfológicas y de crecimiento del organismo, la identificación molecular, a través de técnicas como la secuenciación de regiones específicas del ADN (por ejemplo, ITS1 e ITS4), permite una clasificación taxonómica más exacta y objetiva. Este enfoque integrador asegura una identificación más robusta y detallada, minimizando

el riesgo de errores y mejorando la comprensión de las relaciones filogenéticas entre especies.

- Se sugiere explorar la viabilidad de ofrecer el hongo *Beauveria spp.* ya en sustrato como una alternativa más económica y accesible para agricultores y pequeñas comunidades agrícolas. Esto podría implicar el desarrollo de métodos de producción y distribución que permitan la entrega del hongo en un estado listo para usar, reduciendo así la necesidad de reactivación y purificación por parte del agricultor. Además, se podría considerar establecer colaboraciones con laboratorios locales o instituciones académicas para facilitar la producción y distribución del hongo ya en sustrato, lo que podría ayudar a reducir los costos asociados para los agricultores.

14. REFERENCIAS

- Aguilera, M. E., Mazón, M., Armijos, H. T., & Espinoza, D. V. (2020). IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE INSECTOS Y HONGOS BENÉFICOS ASOCIADOS A *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN PLANTAS TRASPATIO (*Citrus* spp. y *Murraya paniculata*) DEL CANTÓN CATAMAYO (LOJA - ECUADOR). *ECUADOR ES CALIDAD*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.36331/revista.v7i1.99>
- Akter, T., Mimma, A. A., Haque, Md. A., Hossain, Md. M., Ghosh, T. K., Zinan, N., Chowdhury, Md. Z. H., & Islam, S. M. N. (2023). Seed priming with *Beauveria bassiana* improves growth and salt stress response in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 213, 105427. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105427>
- Almudena. (2022, diciembre 15). *Beauveria bassiana*: Todo lo que necesitas saber. *Certis Belchim*. <https://certisbelchim.es/beauveria-bassiana-todo-lo-que-necesitas-saber/>
- Basulto, M. E. C., Sánchez, E. R., Cupul, W. C., Gómez, H. B., Ramírez, A. R., & Núñez, E. H. (2022). Potencial de hongos entomopatógenos para el manejo de la araña roja. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 26(Especial), 7-8. <https://doi.org/10.53897/RevAIA.22.26.13>
- Botero, C. E. G., Marín, P. M., & Machado, P. B. (s. f.). *CLAVES PARA EL ÉXITO DEL HONGO Beauveria bassiana COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO*.
- Castro López, M. A., Martínez Osorio, J. W., Castro López, M. A., & Martínez Osorio, J. W. (2019). COMPATIBILIDAD DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* CON *Chrysoperla externa* DEPREDADOR DE *Trialeurodes vaporariorum*. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 38-48. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000104>

- Cepeda-Siller, M., Garrido Cruz, F., Castro Narro, E., Sánchez Peña, S. R., Dávila Medina, M. D., Cepeda-Siller, M., Garrido Cruz, F., Castro Narro, E., Sánchez Peña, S. R., & Dávila Medina, M. D. (2018). Infección in vitro de cepas de *Beauveria* spp. Sobre *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923). *Acta universitaria*, 28(4), 25-30.
<https://doi.org/10.15174/au.2018.1714>
- DANNON, H. F., DANNON, A. E., DOURO-KPINDOU, O. K., ZINSOU, A. V., HOUNDETE, A. T., TOFFA-MEHINTO, J., ELEGBEDE, I. A. T. M., OLOU, B. D., & TAMÒ, M. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research*, 3(1), 24.
<https://doi.org/10.1186/s42397-020-00061-5>
- Davila Tafur, K. (2018). Control biológico del mazorquero del cacao (*Carmenta foraseminis*), utilizando dos cepas nativas de *Beauveria bassiana*, Región San Martín. *Repositorio - UNSM*. <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/3138>
- Galindo Soracá, A., & Pulido, M. (2019). UNIVERSIDAD DEL ZULIA REVISTA CIENTÍFICA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN. *Revista científica de veterinaria*, 28, 331-336.
- La fortaleza es la formación integral* / *Revista Líderes*. (s. f.). Recuperado 16 de agosto de 2024, de <https://www.revistalideres.ec/lideres/fortaleza-formacion-integral.html>
- Merchan Flores, W. Y. (2022). *Microbiana del suelo bananero: Identificación, selección, propagación y conservación de hongos benéficos*.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/18567>
- PCR Protocols*. (1989). <https://shop.elsevier.com/books/pcr-protocols/innis/978-0-12-372180-8>
- Ramírez, J. (2019). *Evaluación de cuatro cepas de Beauveria bassiana producidas en dos medios diferentes y su eficacia en el control sobre adultos de Cosmopolites sordidus*

(*Picudo negro del plátano*).

Sun, R., Hong, B., Reichelt, M., Luck, K., Mai, D. T., Jiang, X., Gershenzon, J., & Vassão, D.

G. (2023). Metabolism of plant-derived toxins from its insect host increases the success of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *The ISME Journal*, 17(10), 1693-1704. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01480-3>

Tapia-Goné, J., Ferrera-Cerrato, R., Varela-Fregoso, L., Rodríguez Ortiz, J. C., Lara Mireles,

J., Soria Colunga, J. C., Cuellar Torres, H., Tiscareño Iracheta, M. A., & Cisneros Almazán, R. (2008). Caracterización e identificación morfológica de hongos formadores de micorriza arbuscular, en cinco suelos salinos del estado de San Luis Potosí, México. *Revista mexicana de micología*, 26, 1-7.

Tofiño Rivera, A. P., Ortega Cuadros, M., Pedraza Claros, B., Perdomo Ayola, S. C., & Moya

Romero, D. C. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Revista argentina de microbiología*, 50(4), 426-430. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.005>

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana*

and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>

Zúñiga-Castro, K., & Quirós-Cedeño, G. (2021). Los hongos como elementos clave en la

productividad del suelo, la agricultura y el bienestar social. *Biocenosis*, 32(1), Article 1. <https://doi.org/10.22458/rb.v32i1.3548>