



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL
BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU
POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS”**

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

Autor:
Farah Constante Ariel Josue

TutorD:
Arévalo Granda Johanna Valentina

LATACUNGA – ECUADOR Febrero 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Farah Constante Ariel Josue, con cédula de ciudadanía No. 1727649210, declaro ser autor del presente Proyecto de Investigación “**CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS**”, siendo la Ingeniera MSc. Johanna Valentina Arévalo Granda, Tutora 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, 21 de febrero de 2025


Ariel Josué Farah Constante
C.C.: 1727649210
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 **FARAH CONSTANTE ARIEL JOSUE**, identificado con cédula de ciudadanía **1727649210** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, 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. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “ **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA *Trichoderma* AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALOAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL DE BIOCONTROL SOBRE DOS PATÓGENOS**”, 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: Abril 2021 - Agosto 2021

Finalización de la carrera: Octubre 2024 – Marzo 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 12 Diciembre 2024

Tutor: Ing. Johanna Valentina Arévalo Granda, Mg.

Tema: “**CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS**”

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 21 días del mes de febrero del 2025.



Ariel Josue Farah Constante

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL

INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS” de Farah Constante Ariel Josue, 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, 21 de febrero del 2025



Ing. Johanna Valentina Arévalo Granda, MSc.

C.C: 1715849582


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: Farah Constante Ariel Josue , con el título del Proyecto de Investigación: **“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS”** 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, 21 de febrero del 2025



Ing. Jorge Fabián Troya Sarsoza, Ph.D.

CC: 0501645568

LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, MSc.

C.C: 1002749800

LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

C.C: 0501148837

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, en primer lugar, a Dios, por guiarme en mi camino y permitirme alcanzar mis metas y logros durante mi vida universitaria. A mis padres, Elva Constante y Cesar Farah, quienes han sido mi pilar fundamental y apoyo emocional durante mi formación profesional. Sus consejos diarios han sido invaluable.

También quiero manifestar mi profundo agradecimiento a la Ing. Valentia Arévalo, y la Ing. Tannya Llanos, por su paciencia y apoyo incondicional. La confianza que me brindaron y sus palabras motivadoras fueron esenciales para no rendirme y alcanzar mis objetivos.

A mis abuelitos, Piedad Chavez y Marcelo Constante, por su incondicional apoyo a lo largo de mi formación.

A mi querida Karla, quien, con sus palabras de aliento diarias, me animaba a no rendirme y a continuar con mi meta de culminar la investigación.

Ariel Josue Farah Constante

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a mi madre Elva Constante, con sus palabras de motivación y de aliento diario, que me decía no te rindas "mijito" ya estas a poco de cumplir tu profesión me ayudaron a continuar con mi meta, a mi padre Cesar Farah, con sus consejos de cada día me impulsaron a seguir adelante y con su frase dale "campeón tu si puedes" y poder acabar con logro académico, a mis hermanas Antonella y Daniela que me decían "pepe" no te rindas dale hasta el último, a mis abuelitos Piedad y Marcelo que me daban palabras de aliento sus palabras me ayudaron a no darme por vencido y poder culminar con la investigación.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, por brindarme la oportunidad de formar parte de esta prestigiosa institución y contribuir a mi desarrollo profesional.

A la ingeniera Valentina Arévalo por sus enseñanzas, paciencia y apoyo crucial para la culminación exitosa de esta investigación. Sus palabras de motivación y aliento han sido fundamentales para alcanzar esta meta.

A querida Karla en especial que fue fundamental en cada día de mi carrera, y que me brindó un apoyo constante en cada etapa de la investigación.

Ariel Josue Farah Constante

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS”

Autor:
Farah Constante Ariel Josue

RESUMEN

La presente investigación se ejecutó en el Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía, teniendo como objetivo la caracterización de *Trichoderma asperellum* como biocontrolador de *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, estos hongos fitopatógenos son responsables de pérdidas agrícolas en Ecuador de entre el 10% y el 30% de la producción total, afectando cultivos de alto valor económico. Se recolectaron siete muestras de suelo de la zona de investigación, utilizando un método de muestreo en zigzag con puntos separados a 10 metros de distancia. Se realizó el aislamiento en medio de cultivo PDA, observándose que *Trichoderma asperellum* presentó un crecimiento progresivo: al día 2, donde apenas era visible; al día 3, comenzó a desarrollar estructuras blancas; al día 5, se expandió densamente con micelio compacto; y al día 7, mostró un crecimiento máximo con esporulación verde característica. Además, se hizo la caracterización morfológica de dos patógenos *Fusarium sp* y *Oidium sp*. Para la identificación molecular, se realizó la extracción de ADN mediante un protocolo basado en PCR, utilizando los primers ITS1 e ITS4, amplificando fragmentos de 600 pb, que luego fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100V por 30 minutos. La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop One, obteniendo relaciones de pureza 260/280 y 260/230 óptimas en todas las muestras. Los resultados de secuenciación mediante BLASTn mostraron un 100% de identidad y 100% de query cover para *Trichoderma asperellum*, mientras que los patógenos fueron identificados como *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum* y *Oidium sp*. En las pruebas de antagonismo in vitro, *Trichoderma asperellum* inhibió significativamente el crecimiento de los patógenos, con un porcentaje de inhibición del 69.98% frente a *F.esequeti* y del 64% frente a *F.gramanearum* y clasificado clasificando a *Trichoderma* en grado 2 de antagonista cada escala de Bell(1984).Se determinó además que no existe diferencia significativa entre ambas. Se concluyó que *Trichoderma asperellum* posee un alto potencial como antagonista, y se recomienda realizar ensayos en campo para validar su efectividad en condiciones reales de cultivo y su posible implementación en programas de manejo integrado de plagas, optimizando su aplicación en sistemas agrícolas sustentables.

Palabras clave: Suelo, Molecular, ADN, PCR y Antagonismo.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “CHARACTERIZATION OF THE ISOLATED *Trichoderma* STRAIN FROM “LA BANDA” NEIGHBORHOOD, ALÓAG PARISH, MEJÍA CANTON AND ITS INHIBITORY POTENTIAL AGAINST TWO PATHOGENS”

Author:
Farah Constante Ariel Josue

ABSTRACT

This research was conducted in the “La Banda” neighborhood, Alóag Parish, Mejía Canton, with the objective of characterizing *Trichoderma asperellum* as a biocontrol agent against *Fusarium equiseti* and *Fusarium graminearum*. These phytopathogenic fungi are responsible for agricultural losses in Ecuador ranging from 10% to 30% of total production, affecting crops of high economic value. Seven soil samples were collected from the study area using a zigzag sampling method with points separated by 10 meters. The isolation was performed on PDA culture medium, where *Trichoderma asperellum* exhibited progressive growth: on day 2, it was barely visible; on day 3, it began developing white structures; by day 5, it had expanded densely with compact mycelium; and on day 7, it reached maximum growth with characteristic green sporulation, due to incubation at 27°C with 80–90% relative humidity. For molecular identification, DNA extraction was performed using a PCR-based protocol with ITS1 and ITS4 primers, amplifying 600 bp fragments. These fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis at 100V for 30 minutes. DNA quantification was conducted with a NanoDrop One spectrophotometer, obtaining optimal 260/280 and 260/230 purity ratios. Sequencing results using BLASTn showed 100% identity and 100% query cover for *Trichoderma asperellum*, while the pathogens were identified as *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, and *Oidium* sp. In vitro antagonism tests revealed that *Trichoderma asperellum* significantly inhibited the growth of the pathogens, with the inhibition percentage calculated using Jaramillo's formula (2014) and classified according to Ezziyyani's scale (2005), achieving an invasion level of 50% to 100% of the pathogen's surface. It was concluded that *Trichoderma asperellum* has high potential as a biocontrol agent. Field trials are recommended to validate its effectiveness under real crop conditions and its possible implementation in integrated pest management programs, optimizing its application in sustainable agricultural systems.

Keywords: Soil, Molecular, DNA, PCR and Antagonism.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i	
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
ÍNDICE DE FIGURAS	xv	
1. INFORMACIÓN GENERAL	1	
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2	
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3	
3.1. Beneficiarios directos	3	
3.2. Beneficiarios indirectos	3	
4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3	
5. OBJETIVOS	5	
5.1. Objetivo General	5	
5.2. Objetivos Específicos	5	
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5	
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	7	
7.1. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma sp.</i>	7	

7.2.	Generalidades de <i>Trichoderma sp.</i>	8
7.3.	Importancia agrícola del género <i>Trichoderma sp.</i>	9
7.4.	<i>Trichoderma sp.</i> como controlador biológico	9
7.5.	Hábitat del hongo <i>Trichoderma sp.</i>	9
7.6.	Características del hongo <i>Trichoderma sp.</i>	10
7.6.1.	Características Macroscópicas y Microscópicas	10
7.7.	Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> a nivel de laboratorio	11
7.8.	Mecanismo de acción del hongo <i>Trichoderma sp.</i>	11
7.9.	Plagas controladas por el hongo <i>Trichoderma sp.</i>	11
7.10.	<i>Fusarium sp.</i>	12
7.11.	Especies del género <i>Fusarium spp.</i>	13
7.15.	Identificación molecular de Hongos.	15
8.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS	16
8.1.	Hipótesis Nula	16
8.2.	Hipótesis Alternativa	16
9.	METODOLOGÍA	16
9.1.	Tipos de investigación	16
9.1.1.	Investigación bibliográfica/documental	16
9.1.2.	Investigación Descriptiva	17
9.1.3.	Investigación Experimental	17
9.2.	Métodos de investigación	17
9.2.1.	Cualitativo	17
9.2.2.	Cuantitativa	17
9.3.	Ubicación de la investigación	17
9.4.	Recolección de muestras	18
9.5.	Materiales y reactivos	18
9.5.1.	Materiales.	18

9.5.2.	Reactivos	19
9.6.	Equipos utilizados para realizar la investigación	20
9.7.	Preparación de materiales	20
9.8.	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> a partir de muestras de suelo	21
9.8.1.	Diluciones seriadas de muestras de suelo	21
9.8.2.	Obtención de cultivos puros.	21
9.9.	Extracción de ADN de hongos	21
9.10.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
9.11.	Análisis Bioinformático	23
9.11.	Pruebas de capacidad antagónica	23
9.12.	Análisis Estadístico	24
10.	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	24
10.1.	Muestreo de suelo para el aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i>	24
10.2.	Identificación Morfológica de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos hongos patógenos	24
10.2.1.	Observación macroscópica	24
10.2.2.	Observación microscópica	28
10.2.3.	Identificación morfológica	30
10.3.	Identificación Molecular de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos patógenos	32
10.3.1.	Extracción de ADN y Cuantificación	32
10.3.2.	Amplificación de la región ITS por PCR	33
10.3.3.	Análisis bioinformático para la identificación de especies	33
10.4.	Evaluación del Potencial Inhibitorio de <i>Trichoderma asperellum</i>	36
10.4.2.	Análisis estadístico	38
11.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS	39
11.2	Efecto ambiental	39
12.	PRESUPUESTO	39
15.	ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades a realizar en la investigación.	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica del <i>Trichoderma</i> sp.	8
Tabla 3. Equipos de laboratorio utilizados en la investigación.	20
Tabla 4: Tabla de la capacidad antagonista del biocontrol, respecto al patógeno	24
Tabla 5: Características morfológicas de <i>Trichoderma</i> sp. vistas a través del microscopio	30
Tabla 6: Características morfológicas de <i>Oidium</i> sp. vistas a través del microscopio.....	31
Tabla 7: Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp. vistas a través del microscopio	32
Tabla 8: Presupuesto de reactivación y purificación de las cepas	39
Tabla 9: Presupuesto de extracción de ADN.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi	18
Figura 2. Barrio la Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía.	18 Figura
3: <i>Crecimiento radial de (Trichoderma sp.), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo.</i>	25
Figura 4: Crecimiento radial de (Oidium sp.), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo.	26
Figura 5: Crecimiento radial de (Fusarium sp.), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo.	27
Figura 6: Visualización de Trichoderma sp en el microscopio.	29
Figura 7: Visualización de Oidium sp en el microscopio	29
Figura 8: Visualización de Fusarium sp., en el microscopio	30
Figura 9: Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One ^c	32
Figura 10: Electroforesis de PCR de las muestras M1, M2 y M3	33
Figura 11: Electroferograma M1.	34
Figura 12: Listas de organismos y la similaridad con las secuencias consenso de M1 por secuenciación de gen ITS.	34 Figura
13: Electroferograma M2.	35
Figura 14: Listas de organismos y la similaridad con las secuencias consenso de M2 por secuenciación de gen ITS.	35 Figura
15: Electroferograma M2.	36
Figura 16: Listas de organismos y la similaridad con las secuencias consenso de M2 por secuenciación de gen ITS.	36

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Trichoderma*. AISLADA DEL BARRIO LA BANDA PARROQUIA ALÓAG DEL CANTÓN MEJÍA Y SU POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE DOS PATÓGENOS”

Fecha de inicio:

Octubre 2024

Fecha de Finalización:

Marzo 2025

Lugar de ejecución:

Universidad Técnica de Cotopaxi, en las instalaciones 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

Proyecto de investigación vinculado:

Producción de bioinsumos y biocontroladores como alternativa para la producción agrícola de alimentos sanos, saludables y sin contaminantes

Equipo de Trabajo:

Investigador: Ariel Josue Farah Constante

Tutor: Ing. Johanna Valentina Arévalo Granda, Mg.

Área de Conocimiento:

Agricultura – Agricultura - Silvicultura y Pesca.

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 genética para el desarrollo humano y social.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Trichoderma sp., es un hongo antagonista que es partícipe de la lucha contra enfermedades que afectan a cultivos agrícolas de valor económico significativo. Además, este microorganismo es efectivo para su uso como un mecanismo de control biológico, ya que tiene la capacidad de frenar el crecimiento de hongos fitopatógenos (Sánchez-García, 2017).

Fusarium sp., impacta a una gran diversidad de cultivos agrícolas, provocando enfermedades devastadoras y considerables de las pérdidas que son entre el 10% y el 30% de la producción. En Ecuador, *Fusarium sp.*, tiene una importancia especial debido a su influencia en cultivos de relevancia económica, además este hongo puede sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo, incluyendo la marchitez vascular y la pudrición radicular que puede llevar a una disminución significativa en la calidad y cantidad (Forero-Reyes, 2017).

Oidium sp., es un hongo perteneciente al orden de los Erysiphales, que se manifiesta como un polvo blanco o cenizo en las hojas, tallos y flores de las plantas afectadas, provocando disminuciones en el rendimiento y calidad de los cultivos. En Ecuador, el porcentaje de pérdidas en los cultivos por el oídio puede fluctuar significativamente, con la pérdida del 30% de la producción total (De Estadística Y Censos, s.f.).

El estudio de la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra dos patógenos agrícolas específicos contribuirá significativamente al desarrollo de estrategias sostenibles de manejo de plagas, reduciendo la dependencia de pesticidas químicos y promoviendo prácticas agrícolas más ecológicas (Harman, 2004). Por lo que la presente investigación se enfoca en proporcionar información sobre las características morfológicas y moleculares de *Trichoderma sp.*, con el objetivo de utilizarlo como un eficiente biocontrolador de los dos patógenos. La característica de esta cepa específica permitirá una identificación y una comprensión más profunda de su potencial. Se espera que este estudio sirva como un punto de partida para futuras investigaciones de la Universidad y pueda ser aplicada en estudios que se relacione a la biodiversidad microbiana del suelo, la biotecnología agrícola y la ecología, así como entender la capacidad antagonista de *Trichoderma sp.* frente a *Fusarium sp.* y *Oidium sp.* (Gonzalez Basso, 2024).

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Beneficiarios directos

Los beneficiarios directos de la investigación es la Universidad Técnica de Cotopaxi y los estudiantes de carrera de Ingeniería Agronómica a través de la investigación y con la práctica, la realización de trabajos similares para ser aprovechados desde el punto de vista académico y/o investigativo.

3.2. Beneficiarios indirectos

Los beneficiarios indirectos serán todos los agricultores del cantón Mejía, quienes podrán aprovechar los beneficios de uso del hongo como biocontrolador contra enfermedades en los cultivos.

4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El uso de agentes biológicos como *Trichoderma sp.* para el control de patógenos vegetales ha cobrado importancia en la agricultura sostenible debido a sus múltiples beneficios, como la reducción del uso de pesticidas químicos y la mejora de la salud del suelo (García-Núñez et al., 2017). Sin embargo, la eficacia de las cepas de *Trichoderma sp.*, puede variar significativamente en función de su origen geográfico y las condiciones ambientales específicas de cada región. En este contexto, la identificación y caracterización de cepas locales de *Trichoderma* es crucial para maximizar su potencial de biocontrol en cultivos regionales.

A pesar de esto, no se ha realizado un estudio detallado que permita el aislamiento y la caracterización molecular de estas cepas locales. La falta de conocimiento específico sobre las características y el potencial de control de la cepa autóctona de *Trichoderma sp.*, limita la adopción de prácticas de biocontrol en la región (España, 2015). Lo que ha conducido a que se utilicen ampliamente fertilizantes y fungicidas de procedencia química los cuales afectan al ecosistema (Mayo et al., 2015).

En estudios previos, se ha logrado aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* en diferentes regiones del Ecuador, demostrando su potencial como biocontroladores y promotores de crecimiento vegetal. Sin embargo, es crucial realizar investigaciones específicas en el barrio La Banda para identificar cepas locales de *Trichoderma* y evaluar su capacidad antagonista contra

Fusarium y *Oidium* (Santos, 2011); debido a que, en el sector, el cultivo predominante es el cultivo de papa, seguido de cultivos de claveles y hortalizas, es decir, cultivos a los que ataca los patógenos mencionados.

Este estudio propone la caracterización de una cepa de *Trichoderma sp.* del barrio La Banda, así como la evaluación de su potencial de inhibitorio sobre dos patógenos relevantes para los cultivos locales. Al caracterizar la cepa y probar su efectividad, se espera proporcionar una base científica que respalde el uso de *Trichoderma sp.*, como agente de biocontrol en Alóag. Los resultados podrían tener implicaciones más amplias para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas en otras regiones con condiciones agroecológicas similares (Galarza, 2011). Además, se aportará conocimiento sobre el uso de microorganismos beneficiosos como inoculantes para biofertilizantes y biocontroladores (Mayo et al., 2015), los cuales podrían ser comercializados como mejoradores del suelo y/o promotores del crecimiento, características claves para que un agente de control biológico (BCA) basado en *Trichoderma sp.*, actúe como antagonista en el control biológico de patógenos (Mesa Vanegas, 2020).

Fusarium sp., puede ser estudiado para comprender mejor su mecanismo de patogenicidad y evaluar la eficacia de diferentes métodos de control biológico, Sin embargo, uno de los desafíos principales es reproducir las condiciones ambientales y de suelo que favorecen el desarrollo del hongo en el campo, lo que puede limitar la aplicabilidad de los resultados obtenidos en laboratorio a situaciones reales de cultivo (Bohórquez Parra, 2010).

El oídio es una inquietud importante debido a su potencial para infectar una extensa gama de cultivos y provocar pérdidas económicas significativas. Esta patología hongosa, originada por hongos pertenecientes al orden Erysiphales, se presenta como un polvo blanco o cenizo en las hojas, tallos y flores de las plantas, disminuyendo la fotosíntesis y el desarrollo de las plantas afectadas. En Ecuador, las pérdidas en las cosechas a causa del oídio pueden variar entre el 10% y el 30% de la producción total, en función de las condiciones meteorológicas y las estrategias de gestión aplicadas (INEC, 2025).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar la cepa de *Trichoderma* del barrio La Banda, parroquia Alóag del cantón Mejía, para la evaluación de su potencial inhibitorio sobre dos patógenos, durante el periodo Octubre 2024 – Febrero 2025.

5.2. Objetivos Específicos

- Aislar cepas de *Trichoderma sp.* a partir de muestras de suelo presentes en el Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía.
- Identificar de manera morfológica y molecular cepas de *Trichoderma sp.* aisladas de los suelos del Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía; y de dos cepas de hongos patogénicos conservadas en el laboratorio.
- Evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma sp.* frente a dos hongos patogénicos, a nivel in vitro.

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

Tabla 1. Actividades a realizar en la investigación.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1	ACTIVIDADES	METODOLOGÍA	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Aislar cepas de <i>Trichoderma sp.</i> a partir de muestras de suelo presentes en el Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía.	Recolección de muestras de suelo del bosque ubicado en el barrio La Banda, cantón Mejía. Preparación de diluciones de muestras de suelo para el aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i>	Se recolecta 7 muestras de suelo a una distancia de 10 m de cada punto. Realizar diluciones seriadas de las muestras para la identificación de <i>Trichoderma sp.</i>	Fotografías. Cultivos aislados de <i>Trichoderma sp.</i>

	Aislamiento y purificación del cultivo de aislados puros de <i>Trichoderma sp.</i>		
OBJETIVO ESPECÍFICO 2	ACTIVIDADES	METODOLOGIA	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Identificar de manera morfológica y molecular cepas de <i>Trichoderma sp.</i> aisladas de los suelos del Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía; y de dos cepas de hongos patogénicos conservadas en el laboratorio.	Identificación basada en características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los microorganismos de interés. Reconocimiento de estructuras de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos hongos patogénicos a través del uso del microscopio. Extracción de ADN de las cepas de <i>Trichoderma sp.</i> aisladas y de dos hongos patogénicos. Amplificación de regiones ITS del ADN mediante PCR. Secuenciación y	Identificación preliminar basada en características morfológicas y de crecimiento. Reconocimiento de estructuras de <i>Trichoderma sp.</i> , y de dos hongos patógenos, en el microscopio. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del segmento ITS de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos hongos patogénicos.	Fotografías. Cultivos puros de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos hongos patogénicos. ADN aislado de <i>Trichoderma sp.</i> y de dos hongos patogénicos. Productos de PCR de la región ITS amplificados. Secuencias crudas, electroferogramas y secuencias consenso de los productos amplificados.

	análisis		
	bioinformáticos para la determinación de especies de hongos.		
OBJETIVO ESPECÍFICO 3	ACTIVIDADES	METODOLOGIA	MEDIOS DE VERIFICACIÓN

<p>Evaluar la capacidad antagónica de <i>Trichoderma sp.</i> frente a dos hongos patogénicos, a nivel in vitro.</p>	<p>Diseño de experimentos de confrontación en placa entre <i>Trichoderma sp.</i> y hongos patógenos.</p> <p>Medición de parámetros de inhibición, como el diámetro de la zona de crecimiento e inhibición.</p>	<p>Determinación del PICR.</p> <p>Evaluación del grado de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma sp.</i> frente a los patógenos.</p>	<p>Esquema del diseño experimental.</p> <p>Tabla de datos del crecimiento diario del biocontrolador y del patógeno.</p> <p>Cálculos del porcentaje de inhibición.</p> <p>Pruebas estadísticas utilizando la herramienta Infostat.</p>
---	--	---	---

Elaborado por: (Farah, 2024).

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Clasificación taxonómica de *Trichoderma sp.*

El género *Trichoderma sp.*, es un grupo de hongos ampliamente distribuido en diferentes ecosistemas, conocido por su importancia en el control biológico de patógenos vegetales y su capacidad para promover el crecimiento de las plantas. Estos hongos pertenecen al Reino Fungi, destacándose por su rápida colonización de sustratos y producción de metabolitos secundarios, como enzimas hidrolíticas y compuestos antifúngicos. Además, su uso en biotecnología y en la agricultura sostenible, lo convierte en un organismo de gran interés (Druzhinina, 2011).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del *Trichoderma sp.*

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

Elaborado por: (Farah, 2025).

7.2. Generalidades de *Trichoderma sp.*

Trichoderma sp., es un género de hongos filamentosos perteneciente al filo *Ascomycota*, conocido por su capacidad de colonizar diversos sustratos y adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales. Estos hongos son comunes en suelos, madera en descomposición y otros materiales orgánicos, donde actúan como saprófitos o micoparásitos. Su versatilidad ecológica y capacidad para producir compuestos bioactivos han hecho de *Trichoderma sp.*, un organismo modelo en la biotecnología agrícola (Harman et al., 2004).

Desde un punto de vista biológico, *Trichoderma sp.*, se caracteriza por su rápido crecimiento y producción de esporas conidiales de color verde, que son distintivas de su género. Estas especies son conocidas por su capacidad de micoparasitismo, que les permite atacar y destruir hongos fitopatógenos mediante la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios, convirtiéndolo en un aliado esencial en la lucha contra enfermedades de las plantas causadas por hongos (Schuster & Schmoll, 2010).

Además, *Trichoderma sp.*, desempeña un papel importante en la promoción del crecimiento vegetal. Estos hongos interactúan con las raíces de las plantas, mejorando la absorción de nutrientes y estimulando respuestas de defensa sistémica. También producen hormonas vegetales y compuestos volátiles que favorecen el desarrollo de las plantas, lo que amplía su potencial como biofertilizantes y agentes de biocontrol (Contreras-Cornejo et al., 2014).

La importancia de *Trichoderma sp.* en la biotecnología no se limita a la agricultura. Estos hongos son utilizados en la producción de enzimas industriales, como celulasas y quitinasas, que tienen aplicaciones en industrias como la alimentaria, textil y energética. Su capacidad para degradar materia orgánica y participar en procesos de biorremediación subraya su relevancia como herramienta biotecnológica multifuncional (Druzhinina et al., 2011).

7.3. Importancia agrícola del género *Trichoderma sp.*

La importancia agrícola del género *Trichoderma sp.*, radica en su habilidad para funcionar como agente de biocontrol. Estos hongos resultan efectivos en la gestión de enfermedades provocadas por patógenos vegetales, pues emplean procesos como la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la generación de metabolitos intermedios. Por otro lado,

Trichoderma sp., impulsa el desarrollo vegetal a través de la generación de compuestos que potencian la salud y el crecimiento de las plantas.

La utilización de *Trichoderma sp.*, en la agricultura sustentable representa una opción eficiente y respetuosa con el medio ambiente para disminuir la utilización de pesticidas químicos. Estos hongos pueden ser utilizados a través del riego o la pulverización directa en la base de las plantas, lo que simplifica su propagación y eficacia en la gestión de enfermedades (HernándezMelchor, 2019).

7.4. *Trichoderma sp.* como controlador biológico

Trichoderma sp., se reconoce ampliamente como un controlador biológico eficiente en la agricultura. Este hongo opera a través de diversos procesos, tales como el micoparasitismo, en el que *Trichoderma sp.*, ataca y se alimenta de los hongos fitopatógenos, y la generación de metabolitos secundarios que frenan el desarrollo de otros microorganismos. Adicionalmente, *Trichoderma sp.*, potencia la salud vegetal al impulsar su desarrollo y resistencia a las enfermedades (Hernández-Melchor, 2019).

La aplicación de *Trichoderma sp.*, como biocontrol representa una opción ecológica y sostenible frente a los pesticidas químicos. Su uso puede llevarse a cabo a través de riego o pulverización directa en las plantas, lo que simplifica su dispersión y eficacia en la gestión de enfermedades. No solo potencia la salud de las cosechas, sino que también favorece la preservación del medio ambiente al disminuir la necesidad de sustancias químicas (Martínez-Canto, 2022).

7.5. Hábitat del hongo *Trichoderma sp.*

Trichoderma sp. es un género cosmopolita de hongos que se encuentra en una amplia variedad de hábitats, particularmente en suelos ricos en materia orgánica. Se localizan comúnmente en suelos agrícolas, bosques, madera en descomposición y residuos vegetales, donde actúan como descomponedores primarios y contribuyen al reciclaje de nutrientes. Estos hongos prosperan en ambientes con altos niveles de humedad y un pH neutro o ligeramente ácido, lo que favorece su crecimiento y desarrollo (Harman et al., 2004).

7.6. Características del hongo *Trichoderma sp.*

- **Morfología:** *Trichoderma sp.* presenta un micelio filamentosos y conidios que pueden ser de color verde, amarillo o blanco. Los conidios son esféricos u elipsoidales y se forman en mechones compactos o sueltos.

- **Reproducción:** Este hongo se reproduce asexualmente mediante conidios y puede adaptarse a diversas condiciones ambientales, incluyendo temperaturas extremas y diferentes niveles de pH. (Lifeder, s,f).
- **Simbiontes de Plantas:** Algunas especies de *Trichoderma sp.*, son simbiontes mutualistas de plantas, colonizando la rizosfera y promoviendo el crecimiento vegetal. (Lifeder, s,f).
- **Biocontrol:** *Trichoderma sp.* es conocido por su capacidad para controlar patógenos vegetales mediante la producción de enzimas y metabolitos antifúngicos que inhiben el crecimiento de otros hongos fitopatógenos. (Lifeder, s,f)
- **Adaptabilidad:** Este hongo tiene una gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, lo que le permite proliferar en suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos. (Lifeder, s,f).

7.6.1. Características Macroscópicas y Microscópicas

- **Color y textura:** Las hifas de *Trichoderma sp.*, pueden ser translúcidas o algo verdes o amarillentas, dependiendo de la especie y las circunstancias de crecimiento (Espinoza Castro, 2023).
- **Conidióforos:** Los conidióforos de *Trichoderma spp.* generan conidias microscópicamente, estas tienen una forma alargada y muestran una pared celular gruesa; no obstante, las especies varían. Por otra parte, la propagación de hongos ambientales requiere conidio para la dispersión de los esporos, estos conidióforos se originan de las hifas, además poseen estructuras simples o de ramificación están ordenadas en el micelio. Los conidios esféricos o elípticos pueden formar cadenas a lo largo de los conidióforos (Afiya, 2010).
- **Conidióforos en forma de pincel:** Los conidióforos llevan conidios que se ramifican del micelio y varían en complejidad y tamaño entre las especies de *Trichoderma*. Se conoce que la forma conífora que poseen contribuyen a distinguir las especies de *Trichoderma* y afectar la capacidad del hongo para colonizar sustratos y competir con otros microorganismos en el suelo (Leiva-Mora, 2023).
- **Micelio denso y crecimiento agresivo:** En general, *Trichoderma spp.* es conocido por su rápido crecimiento y su capacidad para formar micelio denso en sustratos adecuados. Esto puede observarse como un tapiz filamentosos sobre la superficie del medio de cultivo (Afiya, 2010).

7.7. Crecimiento de *Trichoderma sp.* a nivel de laboratorio

El hongo *Trichoderma sp.*, tiene una temperatura óptima de crecimiento que varía entre 25°C y 28°C. En este rango de temperatura, *Trichoderma sp.*, puede crecer rápidamente y producir una abundante cantidad de esporas. Sin embargo, su crecimiento puede verse afectado a temperaturas más altas o más bajas, además tiene que tener una humedad entre 80-90% para el crecimiento del hongo (Fernández Gamarra, 2017).

7.8. Mecanismo de acción del hongo *Trichoderma sp.*

El hongo *Trichoderma sp.*, utiliza varios mecanismos de acción para controlar hongos fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran el micoparasitismo, donde *Trichoderma sp.*, ataca y destruye directamente a otros hongos; la antibiosis, donde produce sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos; y la competencia por nutrientes, donde compete con otros hongos por los recursos disponibles en el suelo. Además, *Trichoderma sp.*, puede inducir resistencia en las plantas, ayudándolas a defenderse mejor contra patógenos (Infante, 2009).

7.9. Plagas controladas por el hongo *Trichoderma sp.*

El hongo *Trichoderma sp.*, es conocido por su capacidad para atacar y controlar diversas plagas y patógenos en los cultivos (Hernández-Melchor, 2019). Algunas de las plagas más comunes que *Trichoderma* puede controlar incluyen:

- ***Fusarium spp.***: Es un género de hongos que causa enfermedades en raíces y tallos de plantas. *Fusarium* es un género de hongos filamentosos que se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. Muchas de sus especies son saprófitas, lo que significa que se alimentan de materia orgánica en descomposición. Sin embargo, algunas especies de *Fusarium* son patógenas y pueden causar enfermedades en plantas, animales e incluso en humanos. Estas enfermedades incluyen la fusariosis en humanos y diversas enfermedades en cultivos agrícolas, como el marchitamiento vascular en plantas. (Martínez, 2009).
- ***Oidium spp.***: Es un hongo que afecta a las plantas, provocado un polvillo en las hojas, tallos y flores. *Oidium*, también conocido como mildiú polvoriento, es una enfermedad

criptogámica causada por varios géneros de hongos ectoparásitos de la familia Erysiphaceae. Estos hongos atacan principalmente las hojas y tallos jóvenes de las plantas, formando una capa blanca o grisácea de micelio y conidios en la superficie¹. Uno de los ejemplos más conocidos es el *Oidium de la vid*, causado por las especies *Erysiphe necator* y *Uncinula necator* (Ecured, 2017.)

- ***Rhizoctonia solani***: Es un patógeno que provoca enfermedades como la podredumbre blanca en una variedad de cultivos.
- ***Phytophthora spp.***: Un género de oomicetos que causa enfermedades graves como la tizne de la papa y la marchitez de raíces.
- ***Botrytis cinerea***: Es el agente causante de la podredumbre gris en una amplia gama de cultivos, incluyendo frutas y verduras.

7.10. *Fusarium sp.*

Fusarium es un género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. En las plantas, *Fusarium* es conocido por causar enfermedades como el marchitamiento vascular, que afecta a una gran variedad de cultivos, incluyendo flores, hortalizas y gramíneas. Las esporas de *Fusarium* son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies también producen micotoxinas que pueden ser tóxicas para humanos y animales si entran en la cadena alimentaria. La capacidad de *Fusarium* para sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo lo convierte en un desafío constante para los agricultores (re poblacionautoctona, 2017)

El marchitamiento vascular causado por *Fusarium sp.* es una enfermedad que se presenta en climas cálidos, siendo más común en suelos ácidos y arenosos. Este patógeno se transmite principalmente a través del suelo contaminado, donde puede sobrevivir hasta diez años. La temperatura óptima para su desarrollo es de 28 °C, aunque puede crecer en un rango que va desde los 17-20 °C hasta un máximo de 34 °C (Bohórquez Parra, 2010).

Cuando las condiciones del suelo son ideales para el patógeno, pero la temperatura del aire es inferior a la óptima, se puede observar que el hongo se propaga por la parte inferior del tallo, sin que las plantas presenten inmediatamente síntomas visibles. Los factores que favorecen el desarrollo del marchitamiento incluyen temperaturas del suelo y del aire alrededor de 28 °C, una humedad adecuada del suelo, plantas previamente condicionadas con bajo contenido de nitrógeno y fósforo, pero ricas en potasio, un pH del suelo bajo, días cortos y poca intensidad luminosa (oidium, 2025).

Este hongo pertenece al grupo de los Deuteromicetos (imperfectos) y es responsable del marchitamiento vascular en diversos vegetales y flores. Los casos de esta enfermedad provocados por este género son atribuidos a la especie *Fusarium oxysporum*. Diferentes huéspedes son atacados por distintas formas especiales y/o especies de este hongo, siendo *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.* y *Fusarium dianthi* los agentes etiológicos que causan el marchitamiento en las flores (Macías Moncayo, 2019).

7.11. Especies del género *Fusarium spp.*

Dentro del género *Fusarium*, encontramos especies que presentan formas de reproducción sexual bien conocidas, como es el caso de *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se ha identificado una fase sexual. Esta situación complica la clasificación, ya que, tradicionalmente, las formas sexuales de una especie han sido agrupadas de manera distinta y bajo un nombre diferente a las que carecen de reproducción sexual. Se han asociado diversos teleomorfos con las especies de *Fusarium*; la mayoría pertenecen a los Hypocreales, dentro de la clase Ascomycetes. En particular, tres teleomorfos están relacionados con los anamorfos del género *Fusarium*: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. De estos, *Gibberella* es el género más comúnmente vinculado a la mayoría de las especies de *Fusarium*, incluyendo patógenos de plantas como *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies que forman parte del complejo *G. fujikuroi*. Por otro lado, el género *Haematonectria* incluye a *H. haematococca* (*F. solani*), un patógeno cosmopolita de gran relevancia económica que afecta a cultivos como porotos, cítricos, soja, maní, pimienta, papa y calabaza, entre otros (Leslie & Summerell, 2006).

7.12. Características Morfológicas de *Fusarium spp.*

El crecimiento de cultivos monospóricos en condiciones adecuadas permite observar tres tipos de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Algunas especies generan los tres tipos, mientras que otras no.

Los macroconidios son cruciales para la caracterización, no solo de la especie, sino también del género *Fusarium*. Su forma y tamaño varían según la especie y pueden formarse en estructuras especializadas llamadas esporodoquios, así como en monofiálides, polifiálides y el micelio aéreo. Para ciertas especies, esta característica es relativamente constante y estable, aunque debe usarse con precaución como criterio taxonómico. La presencia de una célula basal en forma de pie en los macroconidios se considera típica del género *Fusarium*, aunque varios géneros de *Coelomycetes* también pueden presentarla.

En cuanto a los microconidios, su presencia o ausencia es un rasgo fundamental en la taxonomía de *Fusarium spp.* Si están presentes, se consideran diversas características como su forma, modo de formación y disposición, ya sea solitarios, en falsas cabezas, en cabezas o en cadenas. Estos microconidios se originan en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides, pero no en el esporodoquio, y pueden observarse de manera aislada, en masas o en cadenas.

Por otro lado, las clamidosporas también constituyen una característica esencial para la clasificación de *Fusarium spp.* Su presencia puede manifestarse de forma solitaria, en pares, en grupos o en cadenas, y su pared puede ser gruesa, rugosa o lisa. Estas esporas son fundamentales para la supervivencia ante condiciones adversas, asegurando así la propagación y continuidad del hongo (Watt, 2015).

Finalmente, los conidióforos son estructuras que albergan los microconidios. Tienen un papel taxonómico primordial y, dependiendo de la especie, pueden encontrarse en monofiálides o, en algunos casos, en una combinación de monofiálides y polifiálides con una producción reducida de microconidios (Leslie & Summerell, 2006).

7.13. Generalidades del *Oidium spp.*

El género *Oidium*, perteneciente a la clase Ascomycota, es responsable de enfermedades en plantas que se conocen como oidiosis. Estas infecciones se manifiestan a través de un recubrimiento blanco y polvoriento sobre hojas, tallos y flores. *Oidium* se desarrolla en condiciones de temperatura moderada y elevada humedad relativa. Para controlar esta enfermedad, es fundamental implementar prácticas culturales, como la rotación de cultivos, así como el uso de fungicidas.

Las esporas de *Oidium* se dispersan principalmente mediante el viento y tienen la capacidad de infectar plantas bajo diversas condiciones de temperatura y humedad. Aunque no requieren agua en estado líquido para su desarrollo, un ambiente cálido y húmedo favorece su crecimiento. Los síntomas característicos de la infección incluyen manchas blancas y harinosas que pueden extenderse y cubrir extensas áreas de la planta.

El manejo de *Oidium* puede incluir tanto el uso de fungicidas químicos como métodos de biocontrol. Si bien los fungicidas químicos son efectivos, su aplicación debe ser cuidadosamente gestionada para evitar la resistencia y minimizar el impacto en el medio

ambiente. Los métodos de biocontrol, que implican el uso de antagonistas naturales, representan una alternativa sostenible y eficaz.

Oidium es una enfermedad significativa que afecta a una amplia variedad de cultivos y plantas ornamentales. Su control eficaz requiere una combinación de prácticas culturales, tratamientos químicos y métodos de biocontrol para reducir su impacto y prevenir su propagación (oidium, 2025).

7.14. Características Morfológicas de *Oidium spp.*

El micelio del *Oidium spp.* tiene un color blanco y una textura similar al algodón, formando una capa sobre las hojas, tallos y flores de las plantas afectadas. Este micelio crece en la parte externa de la planta, capturando nutrientes y perjudicando la fotosíntesis (Smith, 2020).

Las ascosporas son el método principal a través del cual se dispersa el hongo. Tienen una forma de conos o cadenas y son liberadas por estructuras especializadas conocidas como ascas. Pueden ser transportadas por el aire, ayudando a que la enfermedad se propague a nuevas plantas (Jones et al, 2018).

Los conidióforos son estructuras delgadas y elongadas que surgen del micelio y liberan conidios. Estas estructuras permiten que el hongo se disemine rápidamente, ya que los conidios son esporas asexuales que pueden infectar directamente otras partes de la planta o plantas vecinas (García, 2017).

Los conidios son esporas asexuales que tienen una función vital en la diseminación del *Oidium spp.* Estas esporas se liberan en grandes cantidades y son capaces de sobrevivir en condiciones difíciles, lo que permite una infección continua de las plantas (Miller & Brown, 2019).

7.15. Identificación molecular de Hongos.

Las técnicas moleculares han sido de suma importancia en los últimos años, debido a la confiabilidad y precisión entre varias cepas de la filogenia del género de *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* y *Oidium sp.* se analiza su posible especie mediante las secuencias de los espaciadores de los transcritos internos del ADN ribosomal (ITS) (Valiente, 2013). Una técnica usada para la identificación de microorganismos es la detección de ácidos nucleicos por medio de la PCR o más conocida como la reacción en cadena de la polimerasa. Consiste en amplificar regiones de ADN por repeticiones cíclicas de la reacción de elongación en base a los

cebadores específicos y mediado por la enzima Taq polimerasa, en condiciones estandarizadas (Soto Muñoz, 2014).

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS

8.1. Hipótesis Nula

El hongo *Trichoderma sp.*, aislado del suelo del Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía no presenta un potencial inhibitorio sobre dos hongos patogénicos conservados a nivel de laboratorio.

8.2. Hipótesis Alternativa

El hongo *Trichoderma sp.*, aislado del suelo del Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía presenta un potencial inhibitorio sobre dos hongos patogénicos conservados a nivel de laboratorio.

9. METODOLOGÍA

9.1 Tipos de investigación

9.1.1 Investigación bibliográfica/documental

Este procedimiento conlleva la exploración y recolección de datos bibliográficos disponibles, que incluyen artículos de investigación, libros, tesis y documentos vinculados con el asunto de los agentes biocontroladores. Se realiza un estudio detallado de estos datos, destacando los elementos más significativos y pertinentes para la creación del documento del proyecto de investigación. Este método facilita la creación de nuevos saberes y contribuye al progreso de la investigación correspondiente.

9.1.2 Investigación Descriptiva

Es importante verificar y examinar minuciosamente las propiedades físicas del hongo, tales como su morfología y estructura molecular. Esto abarca el reconocimiento y caracterización de la forma, tamaño, color y estructuras del hongo. Este estudio es estrictamente de laboratorio, fundamentado en la reactivación de *Trichoderma sp.* nativo según su descripción molecular a través de la PCR y el análisis bioinformático.

9.1.3 Investigación Experimental

Método utilizado para provocar o manipular la variable que se quieren estudiar, por lo tanto, se va a verificar por datos estadísticos de su potencial de biocontrolador en dos patógenos, se puede definirse de tipo experimental.

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).

9.2.2 Cuantitativa

Debido a los análisis estadísticos, se puede describir la cuantificación del porcentaje de control biológico sobre dos patógenos. Este análisis permite medir de manera precisa la efectividad del agente biocontrolador.

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.



Figura 1. Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi

Fuente: Google maps

9.4. Recolección de muestras

Para la recolección de muestras de suelo en el bosque, se siguió un método sistemático que incluyó la obtención de siete muestras en diferentes partes del bosque. Se utilizó el método de recolección en zigzag para asegurar una representación adecuada de las diversas áreas del bosque. Las muestras obtenidas fueron cuidadosamente colocadas en bolsas Ziploc, cada una con su respectiva identificación para facilitar el análisis posterior.

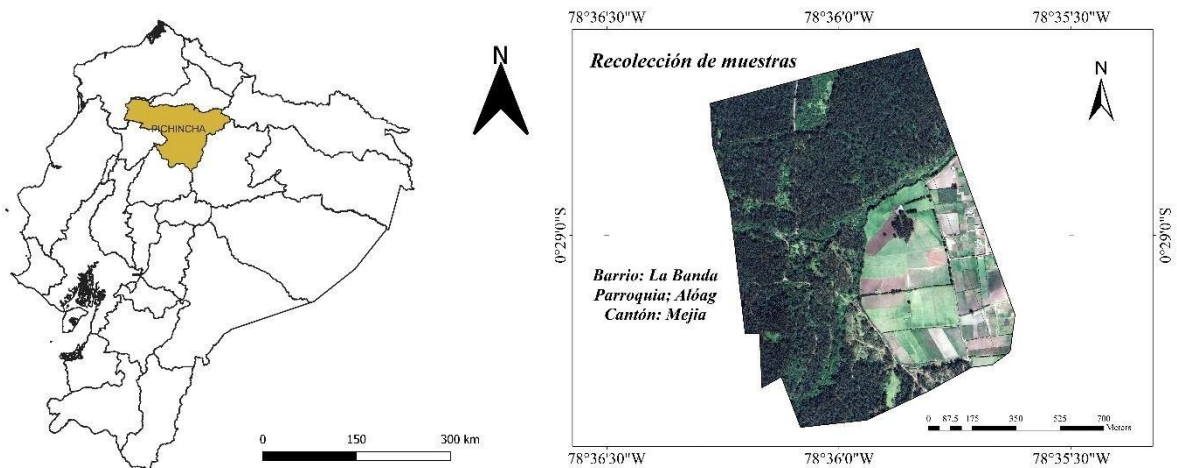


Figura 2. Barrio la Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía.

9.5. Materiales y reactivos

9.5.1 Materiales.

- Cajas Petri (50 unidades)
- Asa de siembra metálica (1 unidad)
- Estuche de disección (1 unidad)
- Papel absorbente (1 rollo)
- Papel aluminio (4 rollos)
- Mechero (1 unidad)
- Jeringuilla de 10ml (4 unidad)
- Agua destilada (5 litros)
- Guantes quirúrgicos (100 unidades)
- Papel film (30 metros)
- Puntas de micropipeta (100-200 μ L)

- Microtubos (1.5 mL)
- Microtubos (0.2 mL)
- Perlas de vidrio (10 unidades)
- Parafilm (1 rollo)
- Alcohol (70%)
- Tubos de ensayo

9.5.2 Reactivos

- PDA
- Alcohol al 96% (10 litros)
- Agua destilada (5 litros)
- Buffer de extracción (500 μ L)
- B-mercaptanol (2 μ L)
- Cloroformo (500 μ L)
- Etanol (70%-96%)
- Acetato de Sodio (3M)
- Agua ultra pura (50 μ L)
- Dream Taq 2X (12.5 μ L/Rx)
- Primer ITS1 (2.5 μ L/Rx)
- Primer ITS4 (2.5 μ L/Rx)
- Agarosa (0.75g)
- Buffer Juice (50 μ L)
- Syber Safe (1.75 μ L)

9.6 Equipos utilizados para realizar la investigación

Tabla 3. Equipos de laboratorio utilizados en la investigación.

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
Microscopio	OLYMPUS	CX31RBSFA	1
Centrífuga	HERMLE	Z160M	1

Vórtex	VORTEXGENEIE2	SI-A236	1
Termobloque	BOECO	DBI-100	1
Microondas	GENERAL ELECTRIC	JES710WK	1
Fuente de poder y cámara de electroforesis	ENDURO	E0303	1
Transiluminador	ENDURO GDS	ENDURO GDS	1
Termociclador	BOECO	TC-TE	1
Congelador -20°C	SO-LOW		1
Espectrofotómetro	THERMO SCIENTIFIC	NANODROP 2000	1
Micropipetas	BOECO	M-200 µL	1
Computadora	SAMSUNG	S19A10N	1

Elaborado por: (Farah,2024)

9.7. Preparación de materiales

Se preparó 200 mL de agar PDA (Agar Papa Dextrosa) para calcular la cantidad de agar se utilizó la siguiente fórmula tomando un volumen de 20mL aproximadamente por caja Petri:

$$x = \frac{200mL * 39g}{1000mL} = 7.8g$$

Se pesó 7,8g de Agar PDA y se colocó 200mL de agua destilada, se homogenizó y se llevó al autoclave. Además, se esterilizaron asas de siembra, pinzas y cajas Petri a 120°C por un tiempo de 40 minutos. Se retiraron los materiales de la autoclave, y se esperó hasta que se enfríen. Se desinfectó la cámara de flujo laminar con etanol al 70% y se colocaron todos los materiales necesarios como: mechero con alcohol 96%, cajas Petri de 90×15 mm. Después de la esterilización, se añadió el antibiótico Cloranfenicol al medio de cultivo PDA a una concentración final de 0.05 mg/L, con el propósito de asegurar la eliminación de cualquier microorganismo. Finalmente, el medio de cultivo fue repartido en las cajas Petri.

9.8 Aislamiento de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo

9.8.1 Diluciones seriadas de muestras de suelo

Las muestras de suelo se trasladaron al laboratorio, después se procedió a realizar diluciones seriadas, para esto, se tomó 10g de cada muestra de suelo y se colocó en 90mL de agua destilada

estéril para formar la primera dilución (10^{-1}). A partir de la primera dilución, se tomó 1mL de la dilución 10^{-1} y colocó en 9mL de agua destilada, formando la dilución 10^{-2} , se repitió el proceso hasta la dilución 10^{-3} . Posteriormente, se tomó 600 μ L de la dilución 10^{-3} y se sembró por extensión en agar PDA (Agar Papa Dextrosa). La siembra se realizó por triplicado por cada muestra. Se incubó a 27°C por 7 días (Arana, 2019).

9.8.2 Obtención de cultivos puros.

Se seleccionaron las cajas con posible presencia de *Trichoderma sp.* Se realizó una tinción simple con azul de metileno a aquellos hongos que presentaron posibles características macroscópicas similares a *Trichoderma sp.* Los hongos que presentaron estructuras microscópicas similares a las de *Trichoderma sp.* se aislaron en cajas Petri con agar PDA. Para esto, se utilizó un bisturí esterilizado para realizar un corte cuadrado en el hongo, el cual se transfirió a otra caja Petri con agar PDA. Este método permitió purificar la cepa para su análisis molecular en laboratorio (Troya, 2014).

Se trabajó con dos hongos patógenos que se encontraban aislados en el laboratorio. Para su reactivación, del primer hongo se tomó una muestra del micelio y se lo transfirió a la caja Petri con agar PDA. El segundo hongo se aisló a partir de muestras de tallo de clavel que se encontraban conservadas en el laboratorio. Las cajas Petri fueron incubadas durante 7 días a una temperatura de 27°C.

9.9. Extracción de ADN de hongos

A partir del crecimiento de hongos puros en medio PDA, se tomó aproximadamente 50-100 mg de micelio y se colocó en un microtubo de 2 mL que contenía 200 μ L de PBS, se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm. Se añadieron tres perlas de vidrio, 500 μ L de buffer de extracción (Tris HCl 100 Mm, EDTA 20 mM, CTAB 2,5% w/v, NaCl 1.4 M, pH 8) y 2 μ L de β mercaptoetanol. Se realizó disrupción mecánica usando un vórtex durante 30 segundos para lograr una mejor maceración. Se incubó en un termobloque a 60°C por 30 minutos, invirtiendo los tubos en lapsos de 10 minutos. Se añadió 500 μ L de cloroformo frío y se homogenizó con vórtex. Se dejó reposar por 2 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 8 minutos con el objetivo de separar la solución en fases. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 mL y se agregó un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 μ L de acetato de sodio 3M y 300 μ L de etanol 70%, para lograr la precipitación del ADN. Se dejó reposar durante 2 horas a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm por 17 minutos, obteniendo al fondo del tubo el pellet que contenía el ADN, se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados utilizando 500 μ L de etanol al 70% y un

tercer lavado con 500 μL de etanol al 96%. Se dejó secar las muestras con el flujo de aire de la cámara por un tiempo de 30 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 μL de agua ultrapura. Se llevó a incubación por 30 minutos a 37°C. El ADN fue almacenado a 20°C (Flores, 2021).

Se preparó un gel de agarosa al 1% y se realizó una corrida electroforética a 100 V durante 30 minutos con el objetivo de visualizar la calidad del ADN.

El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop2000c. Se obtuvo la concentración de cada muestra en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y los ratios 260/230 y 260/280.

9.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron 5 microtubos con ADN de la muestra M1 (*Trichoderma sp.*), ADN de la muestra M2 (*Oidium*), ADN de la muestra M3 (*Fusarium*), control positivo y control negativo, se utilizó la enzima Dream Green Taq (Thermo Scientific, 2016). Un volumen final de 25 μL que contenía 12.5 μL de Dream Green Taq 2X, se colocó 2.5 μL de cada Primer ITS e ITS4, 2.5 μL de agua ultra pura y 5 μL de ADN de cada muestra o control. La amplificación se realizó en el termociclador Boeco TC-TE, utilizando el perfil térmico que incluyó 3 minutos de desnaturalización a 95°C por un ciclo, seguido de una desaturación a 95°C por 30 segundos, Annealing a 55°C por 30 segundos y Extensión a 72°C por 1 minuto por 35 ciclos; una extensión final de 72°C por 5 minutos y tiempo indefinido de reposo a 4°C (White, 1990).

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% (p/v), disolviendo 0,75 g de agarosa en 50 ml de TAE, se incorporó 1.75 μL SYBR Safe. 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 TAE. Se cargó un marcador de peso molecular de 100 bp en el primer pocillo, en los siguientes pocillos se añadieron 5 μL de control negativo, 5 μL de la muestra M1 (*Trichoderma sp.*), 5 μL de la muestra M2 (*Oidium*), 5 μL de la muestra M3 (*Fusarium*), 5 μL del control positivo. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 minutos.

9.11. Análisis Bioinformático

Los productos de amplificación de la región ITS fueron enviados a la compañía IDgen para su secuenciación mediante el método de Sanger. Los resultados fueron obtenidos en formato. ab1. Para la identificación molecular, se cargaron los datos de las secuencias en el software Geneious

Prime, se eliminaron las secuencias de baja calidad, se realizó al alineamiento de novo de las secuencias obtenidas con 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 ITS amplificada de cada hongo. Se identificó el porcentaje de identidad y el query cover.

9.11. Pruebas de capacidad antagónica

Se realizó las pruebas de capacidad antagónica para poder medir la efectividad de *Trichoderma sp.* frente a dos patógenos. Se estableció un diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos y cinco repeticiones. El primer tratamiento enfrentó a *Trichoderma sp.* y *Oidium sp.*, en el segundo tratamiento se ensayó a *Trichoderma sp.* y *Fusarium sp.*

Se tomaron discos de micelio de 9mm de diámetro del antagonista y del patógeno, se colocaron en ambos extremos a 1cm del borde de las cajas Petri que contienen medio de PDA con cloranfenicol, separados 5,5 cm uno al otro, se incubó a 27°C durante 7 días. Se prepararon también un control negativo sin micelio del antagonista y del patógeno, un control positivo de *Trichoderma sp.*, y *Oidium sp.*, o *Trichoderma* y *Fusarium*, de manera individual.

Para evaluar la capacidad antagónica de la cepa *Trichoderma sp.*, frente a los patógenos se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula propuesta por Jaramillo (2014) a los 7 días de incubación:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde el R1 es la medida del crecimiento radial del antagonista y R2 es la medición del crecimiento radial de los patógenos.

Así mismo, se utilizó la escala antagonista propuesta por Bell (1982), con el fin de determinar el grado de la prueba antagónica a nivel in vitro de *Trichoderma sp.*, contra los patógenos.

Grado	Capacidad antagónica (Antagonista - Patógeno)
1	<i>Trichoderma</i> sobrepasó completamente al patógeno y cubrió toda la superficie del medio.
2	<i>Trichoderma</i> sobrepasó al menos dos tercios de la superficie del medio.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizaron cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio.
4	El patógeno colonizó al menos dos tercios de la superficie del medio y pareció resistir la invasión de <i>Trichoderma</i> .

5	El patógeno sobrepasó completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupó toda la superficie del medio
---	---

Tabla 4: Tabla de la capacidad antagonista del biocontrol, respecto al patógeno (Ezziyani, 2005; Bell, 1982).

9.12. Análisis Estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA) y se aplicó la prueba de Tukey para determinar si *Trichoderma sp.* tiene un potencial inhibitorio frente a cada patógeno, con un nivel de confianza del 95%. La prueba se realizó en el software InfoStat.

10. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

10.1. Muestreo de suelo para el aislamiento de *Trichoderma sp.*

Se colectaron muestras de suelo de 7 zonas del bosque del Barrio La Banda. Se utilizó el método de zigzag, las muestras se llevaron al laboratorio para el aislamiento y multiplicación de *Trichoderma*, la muestra 5 fue la que presentó *Trichoderma sp.*

10.2. Identificación Morfológica de *Trichoderma sp.* y de dos hongos patógenos

10.2.1. Observación macroscópica

Trichoderma sp.

En la figura 3 se puede observar el crecimiento macroscópico del hongo *Trichoderma sp.* durante los 7 días, incubados a una temperatura de 27°C.

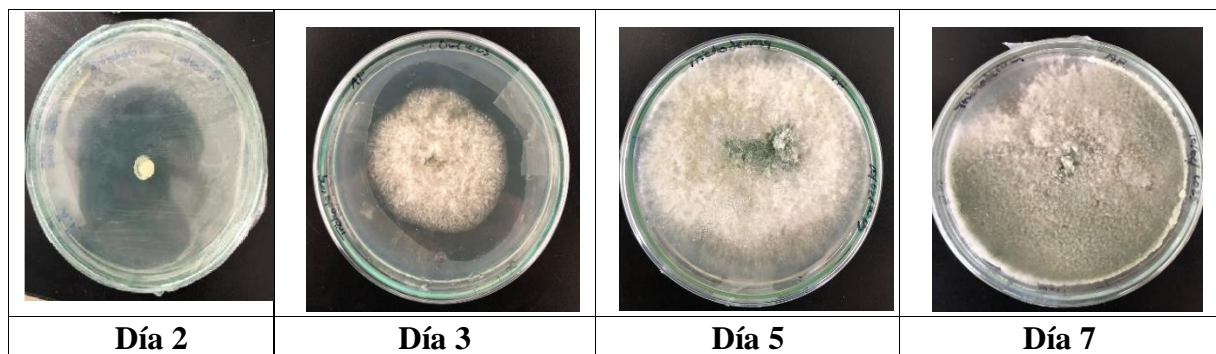


Figura 3: Crecimiento radial de (*Trichoderma sp.*), en medio de cultivo PDA durante 7 días de desarrollo.

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

Crecimiento del hongo al 2 día:

Trichoderma sp., sembrado en caja Petri con agar PDA; apenas fue visible a simple vista.

Crecimiento del hongo al 3 día:

Se comenzó a observar estructuras de color blanco verdoso en el agar, lo que indicó que el micelio de *Trichoderma sp.* estaba proliferando.

Crecimiento del hongo al 5 día:

Las colonias de *Trichoderma sp.*, en la caja Petri crecieron y se expandieron. Presentaron un aspecto más denso y compacto. El crecimiento de *Trichoderma sp.*, en caja Petri continuó, las colonias se extendieron aún más y se pudo observar pequeñas estructuras reproductivas como conidios o esporas.

Crecimiento del hongo 7 día:

Las colonias de *Trichoderma sp.*, en la caja Petri alcanzaron su máximo crecimiento, cubrimiento gran parte del agar y mostrando una apariencia característica de crecimiento en hifas. El crecimiento de *Trichoderma sp.*, en la caja Petri se mantuvo estable, las colonias comenzaron a mostrar cambios de color o textura lo que indicó el inicio de la producción de esporas maduras.

Se mantuvieron las condiciones adecuadas de humedad, temperatura y nutrientes para favorecer el crecimiento *Trichoderma sp.*, en la caja Petri y observar su desarrollo día a día.

(Merino Peñafiel, 2017).

Oidium sp.

En la figura 4 se puede observar el crecimiento macroscópico del hongo *Oidium sp.* durante los 7 días, incubados a una temperatura de 27°C.

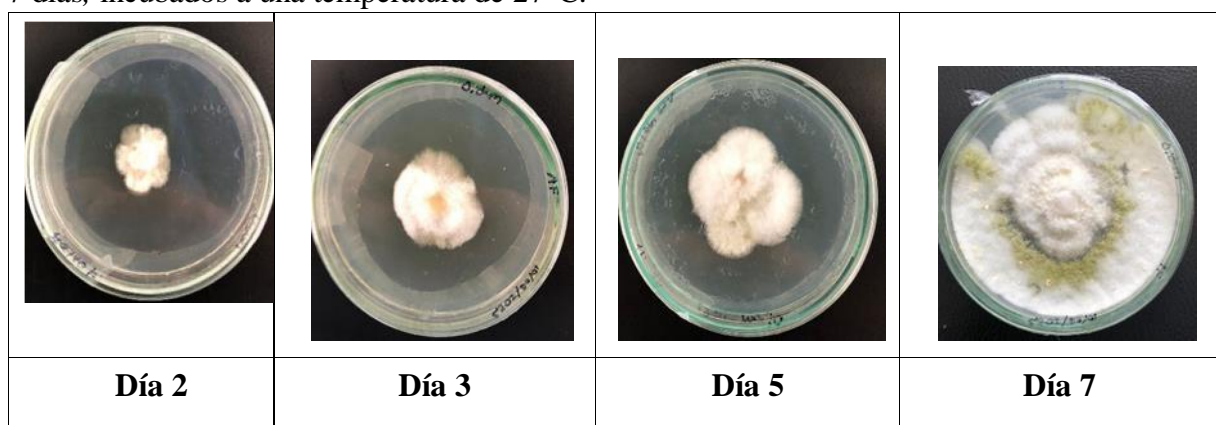


Figura 4: Crecimiento radial de (*Oidium sp.*), en medio de cultivo PDA durante 7 días de desarrollo.

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

Crecimiento del hongo al 2 día:

Oidium sp., sembrado en caja Petri en agar PDA; apenas fue visible a simple vista.

Crecimiento del hongo al 3 día:

Se comenzó a observar estructuras de color blanco en el agar, lo que indicó que el micelio de *Oidium sp.* estaba proliferando.

Crecimiento del hongo al 5 día:

Las colonias de *Oidium sp.*, en la caja Petri crecieron y se extendieron. Presentaron un aspecto más denso y compacto. El crecimiento de *Oidium sp.*, en la caja Petri continuó, las colonias se extendieron aún más y se pudo observar pequeñas estructuras reproductivas como esporas.

Crecimiento del hongo 7 día:

Las colonias de *Oidium sp.*, en la caja Petri alcanzaron su máximo crecimiento, cubrimiento gran parte del agar y mostrando una apariencia característica de crecimiento en hifas. El crecimiento de *Oidium sp.*, en la caja Petri se manifestó estable, las colonias comenzaron a mostrar cambios de color o textura lo que indicó el inicio de la producción de esporas maduras.

Se observó que las colonias de *Oidium sp.* en el medio de cultivo PDA mostraron características distintas a medida que crecían. Al principio, las colonias eran pequeñas, exhibiendo un color blanco a anaranjado y tenían una textura parecida al algodón, con hifas que se extendían hacia los alrededores. Con el tiempo, las colonias se fueron expandiendo, cubriendo gran parte del medio y presentando un crecimiento más denso con una textura más suave.

Cuando las colonias alcanzaron su tamaño máximo, empezaron a cambiar de color, pasando de blanco a anaranjado claro, mostraron matices amarillentos en la base de la placa de Petri. Asimismo, la textura se volvió más áspera y adquirió una apariencia más granulada. Estos cambios indicaron que la producción de esporas maduras podría estar en proceso, lo cual es típico de *Oidium sp.* en condiciones de cultivo (Burbano, 2024).

Fusarium sp.

En la figura 5 se puede observar el crecimiento macroscópico del hongo *Fusarium sp.* durante los 7 días, incubados a una temperatura de 27°C.

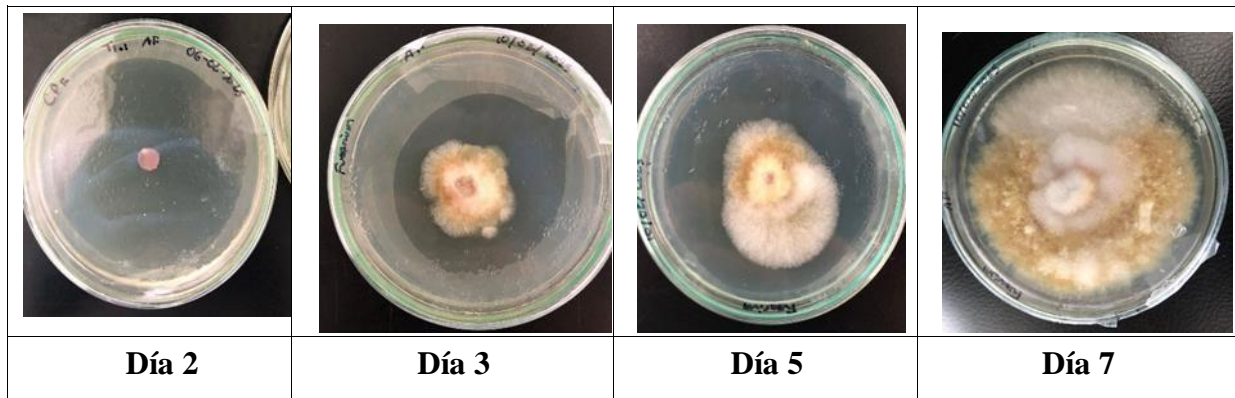


Figura 5: Crecimiento radial de (*Fusarium sp.*), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo.

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

Crecimiento del hongo al 2 día:

Fusarium sp., sembrado en caja Petri con agar PDA; apenas fue visible a simple vista.

Crecimiento del hongo al 3 día:

Se comenzó a observar pequeñas colonias de *Fusarium sp.*, en el agar, de color blanco en el borde y rosado oscuro en el centro.

Crecimiento del hongo al 5 día:

Las colonias de *Fusarium sp.*, en la caja Petri crecieron y se expandieron, presentaron un aspecto más denso y compacto. El crecimiento de *Fusarium sp.*, en la caja Petri continuó, las colonias se extendieron y se pudo observar pequeñas estructuras reproductivas como esporas.

Crecimiento del hongo 7 día:

Las colonias de *Fusarium sp.*, en la placa de cultivo lograron su desarrollo completo, ocupando la totalidad del medio y exhibiendo una forma típica de hifas. El desarrollo de *Fusarium sp.*, en la placa de cultivo se sostuvo de manera constante, y las colonias evidenciaron cambios en color o textura que señalen el comienzo de la formación de esporas maduras.

Se observó que las colonias de *Fusarium sp.* en el medio de cultivo PDA mostraron una expresión única a medida que se desarrollaban. Inicialmente, las colonias eran pequeñas y tenían un color blanco a gris, con una textura similar a algodón y un crecimiento en hifas que se extendían hacia afuera. Con el paso del tiempo, las colonias se expandieron, cubriendo gran parte del agar y exhibieron un crecimiento denso con una textura más suave y un color amarillo

intenso finalmente las hifas se tornaron a un rosado en el cultivo de 10 días. Cuando las colonias alcanzaron su tamaño máximo, comenzaron a cambiar de tonalidad, variando desde amarillo a rosado oscuro. Además, la textura se tornó más áspera y adquirió un aspecto más granuloso. Estos cambios sugirieron que la producción de esporas maduras estaba en marcha, lo que es característico de *Fusarium sp.* bajo condiciones de cultivo (Bohórquez Parra, 2010).

10.2.2. Observación microscópica

Para la identificación del hongo *Trichoderma sp.* que fue aislado del suelo y cultivado en el laboratorio y de los dos hongos patogénicos que se encontraban en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, y transcurridos 7 días de crecimiento a una temperatura de 26°C. Se realizó la tinción simple del micelio del hongo utilizando la técnica de la cinta adhesiva Scotch sobre una gota de azul de metileno. Luego, se colocaron los portaobjetos en el microscopio OLYMPIUS y se observaron las estructuras utilizando el lente objetivo (20x/0.40Ph1.), esto permitió analizar las estructuras que se forman durante su crecimiento en el medio de cultivo.

Trichoderma sp.

Al observar *Trichoderma sp.* bajo el microscopio, se pudo identificar sus características morfológicas distintivas. Este hongo presentó conidiosporas (esporas asexuales) que son de forma elíptica o globosa. Además, se pudieron observar hilos de micelio que formaban una red ramificada (Figura 6). La tinción con azul de metileno es comúnmente utilizada para mejorar la visualización de estas estructuras debido a su alta afinidad por los componentes de la pared celular fúngica (Salamanca, 2015).

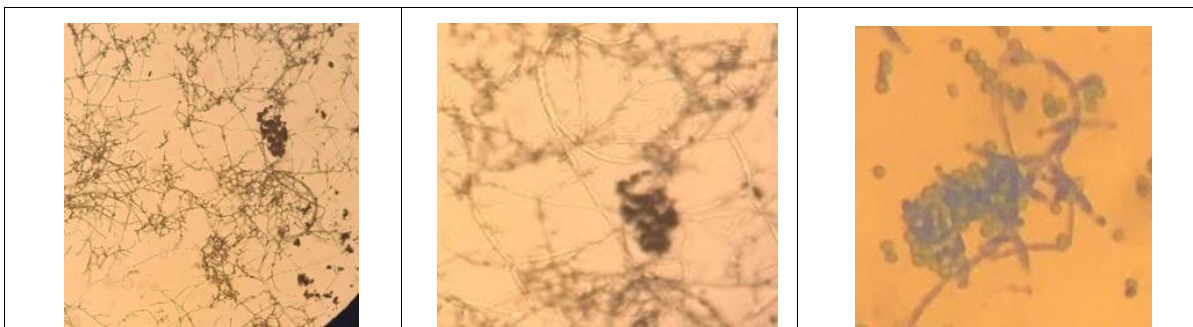


Figura 6: Visualización de *Trichoderma sp.* en el microscopio.

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

Oidium sp.

Al observar *Oidium sp.* bajo el microscopio, se pudo identificar sus características morfológicas distintivas. Este hongo presentó conidiosporas (esporas asexuales) que tuvieron forma de cadenas cortas que emergen directamente de los conidióforos. Además, se pudo observar hilos de micelio que forman una red ramificada (Figura 7).



Figura 7: Visualización de *Oidium sp.* en el microscopio

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

Fusarium sp.

Al observar *Fusarium sp.* bajo el microscopio, se pudo identificar sus características morfológicas distintivas. Este hongo presenta conidios (esporas asexuales) que tienen una forma alargada. Además, se pudo observar hilos de micelio que forman una red ramificada (Figura 8).

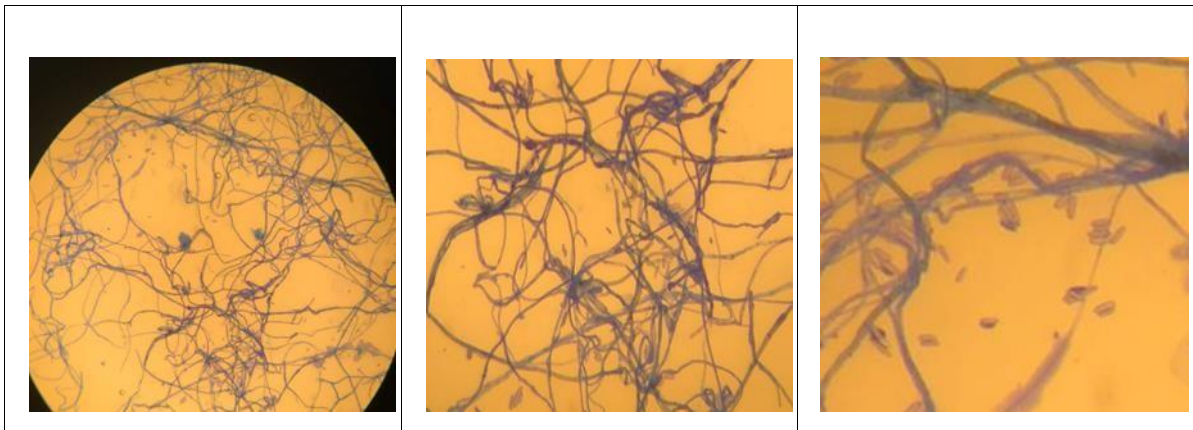


Figura 8: Visualización de *Fusarium sp.*, en el microscopio

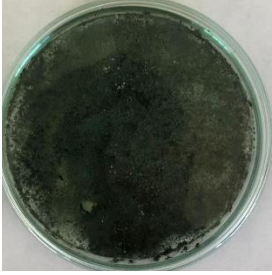
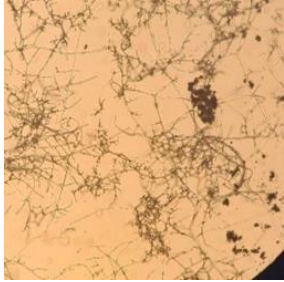

Elaborado por: (Farah Ariel, 2024)

10.2.3. Identificación morfológica

Trichoderma sp.

Este hongo entomopatógeno es ampliamente utilizado en agricultura para proteger los cultivos de plagas y enfermedades. Es un fungicida y bioestimulante que mejora la salud y productividad de las plantas (Briseno, 2024). Las características morfológicas de la *Trichoderma sp.* aislada del suelo se pueden apreciar en la Tabla 5.

Tabla 5: Características morfológicas de *Trichoderma sp.*



Partes	Descripción	Fotografía
<i>Micelio</i>	El diámetro de las hifas individuales del micelio puede variar entre 2 y 10 micrómetros, mientras que la longitud de las hifas puede extenderse desde unos pocos micrómetros hasta varios centímetros, dependiendo de las condiciones de crecimiento.	
<i>Conidióforos</i>	Los conidióforos son generalmente ramificados, con una terminación en forma peine o racimo, donde se agrupan las conidiosporas.	
<i>Conidias</i>	Las conidias típicamente tienen una longitud que oscila entre 3 y 5 micrómetros de diámetro.	

Elaborado por: (Farah Ariel, 2025)

Oidium sp.

Las características morfológicas del hongo patogénico *Oidium sp.* conservado en el Laboratorio se pueden apreciar en la Tabla 6.

Tabla 6: Características morfológicas de *Oidium sp.*

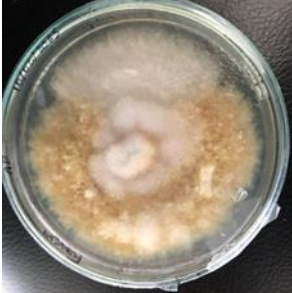
Partes	Descripción	Fotografía
<i>Micelio</i>	Se observa como una red de filamentos blancos y algodonoso que se extienden sobre el medio de cultivo.	
<i>Conidióforos y Conidias</i>	Los conidióforos son generalmente ramificados, con una terminación en forma cadenas cortas.	


Elaborado por: (Farah Ariel, 2025)

Fusarium sp.

Las características morfológicas del hongo patógeno *Fusarium sp.* conservado en el Laboratorio se pueden apreciar en la Tabla 7.

Tabla 7: Características morfológicas de *Fusarium sp.* vistas a través del microscopio

Partes	Descripción	Fotografía
<i>Micelio</i>	Se observa como una red de filamentos que puede variar en color desde blanco hasta tonos rosados o rojizos.	

<p><i>Conidióforos</i> y <i>Conidias</i></p>	<p>Se pudo observar hilos de micelio que forman una red ramificada</p> <p>Los conidios (esporas asexuales) presentaron una forma alargada</p>	
--	---	---

Elaborado por: (Farah Ariel, 2025)

10.3. Identificación Molecular de *Trichoderma sp.* y de dos patógenos

10.3.1 Extracción de ADN y Cuantificación

Para la extracción de ADN a partir del crecimiento de los hongos en medio de PDA, se siguió un protocolo basado en fuentes bibliográficas y adaptados a las condiciones del laboratorio de Microbiología de la carrera de Agronomía. Se obtuvo ADN de 3 muestras, M1 (*Trichoderma sp.*), M2 (*Oidium*) y M3 (*Fusarium*). La cuantificación de ADN extraído se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One. El equipo midió las concentraciones de ácidos nucleicos a 230nm, 260 nm y 280nm. Se evaluó la pureza mediante la relación 260/230 y 260/280 (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de Cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One.

Muestra	Concentración	Radio 260/280	Radio 260/230
M1 (<i>Trichoderma sp.</i>)	7,1 ng/μL	1,98	0,73
M2 (<i>Oidium sp.</i>)	7,5 ng/μL	1,85	0,71
M3 (<i>Fusarium sp.</i>)	7,0 ng/μL	2,13	1,07

10.3.2. Amplificación de la región ITS por PCR

Para confirmar la calidad de los amplicones obtenidos se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5%. En el primer pocillo se cargó un marcador de peso molecular de 100 bp (ThermoScientific). Los siguientes pocillos se cargaron con 5 μL de control negativo, 5 μL de la muestra de M1 (*Trichoderma sp.*), 5 μL de la muestra M2 (*Oidium*), 5 μL de la muestra M3 (*Fusarium*) y 5 μL de control positivo, logrando así obtener los resultados que se observa en la Figura 9. Al revisar la migración de las bandas en el gel, junto a un marcador de peso molecular que contiene fragmentos de tamaño conocido, se notó que los fragmentos alcanzaron el tamaño esperado de 600pb.

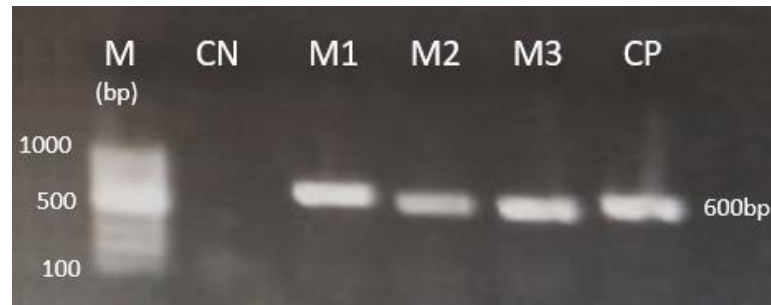


Figura 9: Resultado de la Electroforesis de fragmentos ITS amplificados por PCR. M: Marcador de peso molecular 100bp. CN: Control Negativo. M1: Muestra 1. M2: Muestra 2. M3: Muestra 3. CP: Control Positivo.

10.3.3. Análisis bioinformático para la identificación de especies

Para la identificación molecular, se cargaron las secuencias crudas en el software Genenious Prime v2025.00. Una vez eliminadas las secuencias de baja calidad se obtuvieron porcentajes de calidad de las muestras (%HQ) y el tamaño total de la secuencia consenso. El porcentaje de calidad de la muestra M1 fue del 95.1 % y presentó un tamaño de 508bp, la muestra M2 tubo un 100% de calidad y una extensión de 513bp y la muestra M3 tuvo una calidad de 100% y una longitud de 512bp (Figura 10).

<input checked="" type="checkbox"/>	Name ^	Description	Modified	% HQ	Sequence L...	Post-Trim Le...	% GC	# Sequences
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 2:43 PM	98.1%	483	-	56.9%	2
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 2 Report	-	18 Feb 2025 3:01 PM	-	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	2 documents Assembly 3	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:10 PM	95.1%	508	-	56.1%	2
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 3 consensus...	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:11 PM	95.1%	508	508	56.3%	-
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 3 Report	-	18 Feb 2025 3:04 PM	-	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 4	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:14 PM	99.6%	515	-	50.6%	2
<input checked="" type="checkbox"/>	2 documents Assembly 5	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:21 PM	100.0%	513	-	50.6%	2
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 5 consensus...	Assembly of 2 reads: M3_ITS4.ab1 (revers...	18 Feb 2025 3:21 PM	100.0%	513	513	49.5%	-
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 5 Report	-	18 Feb 2025 3:20 PM	-	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	2 documents Assembly 5 consensus sequence	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:37 PM	100.0%	512	-	50.0%	2
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 6 consensus...	2 reads from 2 documents assembled usin...	18 Feb 2025 3:37 PM	100.0%	512	512	49.0%	-
<input type="checkbox"/>	2 documents Assembly 6 Report	-	18 Feb 2025 3:33 PM	-	-	-	-	-

Figura 10: Valores de calidad y longitud de las secuencias consenso, correspondientes a las muestras M1, M2 y M3, respectivamente.

Tras obtener la secuencia consenso, se realizó un alineamiento pareado de la secuencia de la muestra frente a las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se identificó el nombre científico que muestra el mayor grado de identidad secuencia y se registró el porcentaje de identidad.

M1: *Trichoderma* sp.

Se identificó que la muestra M1 corresponde a la especie de *Trichoderma asperellum* con un porcentaje de identidad (Per Identity) del 100% y un porcentaje de cobertura (query cover) de 100% (Figura 11 y 12).

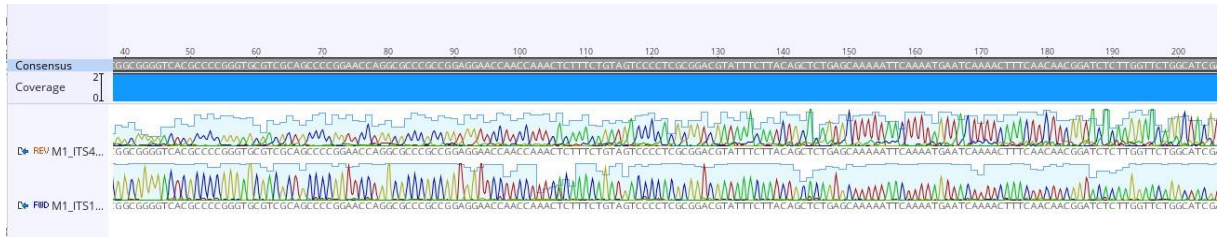


Figura 11: Electroferograma M1.

Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Valor E	Porcentaje de Identidad	Acc. Len	Adhesión
Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña de la cepa N-8-2 de <i>Trichoderma asperellum</i> . secuen...	<i>Trichoderma as...</i>	939	939	100%	0.0	100,00%	588	MK720048.1
Secuencia parcial del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña SD-5 de la cepa <i>Trichoderma a...</i>	<i>Trichoderma as...</i>	939	939	100%	0.0	100,00%	565	KY807766.1
Aislado de <i>Trichoderma asperellum</i> TGD-1. espaciador transcrito interno 1. secuencia parcial. gen de ...	<i>Trichoderma as...</i>	939	939	100%	0.0	100,00%	529	KX538809.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico de subunidad pequeña T2 (reverso) aislado de <i>Trichod...</i>	<i>Trichoderma as...</i>	939	939	100%	0.0	100,00%	603	MK928418.1

Figura 12: Resultado del alineamiento de la secuencia consenso del fragmento ITS de la muestra M1, frente a la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST.

Elaborado por:(Farah Ariel,2025).

M2: *Oidium sp.*

Se realizó el mismo procedimiento para la muestra M2, se eliminaron las secuencias de baja calidad y se obtuvo la secuencia consenso con un porcentaje de calidad (HQ) de 100% y una longitud de 513bp (Figura 13).

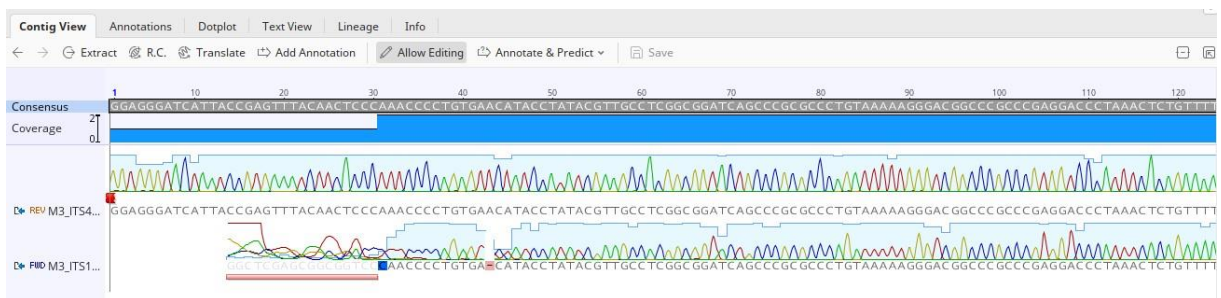


Figura 13: Electroferograma M2.

Se identificó que la muestra M2 corresponde a *Fusarium equiseti*, con un porcentaje de identidad de del 100% y un porcentaje de cobertura (query cover) del 100% (Figura 14).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium sp. strain F69 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium sp.	948	948	100%	0.0	100.00%	559	PP345878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium sp. strain 582PDA11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inte...	Fusarium sp.	948	948	100%	0.0	100.00%	518	MK376945.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium equiseti strain AUMC 15585 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Fusarium equiseti	948	948	100%	0.0	100.00%	527	OP694170.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium scirpi culture CBS:127329 strain CBS:127329 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: inte...	Fusarium scirpi	948	948	100%	0.0	100.00%	545	MH864524.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium sp. strain 4HPC4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium sp.	948	948	100%	0.0	100.00%	586	MK139986.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium equiseti internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri...	Fusarium equiseti	948	948	100%	0.0	100.00%	522	MT635296.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium equiseti isolate JL-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	Fusarium equiseti	948	948	100%	0.0	100.00%	544	OR342087.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium equiseti isolate N-1-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer...	Fusarium equiseti	948	948	100%	0.0	100.00%	585	MT560323.1

Figura 14: Listas de organismos y la similitud con las secuencias consenso de M2 por secuenciación de gen ITS.

Elaborado por:(Farah Ariel,2025).

Oidium sp., y *Fusarium equiseti*, muestran varias similitudes cuando se aíslan en el PDA. Macroscópicamente, ambas especies inicia su crecimiento con el micelio blanco algodonoso que se va expandiendo radialmente. A medida que pasa el tiempo se va desarrollando su textura aterciopelada y puede cambiar de color con un tono anaranjado. Este crecimiento rápido y su textura son característicamente comunes entre los ambos hongos (Herrera-Parra, 2017). En términos Macroscópicos, tanto como *Oidium sp.*, como *Fusarium equiseti* presentan un micelio, compuesto por hifas delgadas y alargadas. Las hifas en ambas especies son similares, con una textura blanca algodonosa que vuelve más pronunciada a medida que el hongo madura. Los conidióforos y conidio de ambos hongos son como cadenas alargadas (Masoodi, 2022). Finalmente, la formación de estructuras reproductivas en ambos patógenos es comparable. Ambos producen conidios o conidióforos y muestran una formación similar. A pesar de estas similitudes, para una diferenciación precisa entre las especies es importante realizar un análisis molecular como la secuenciación del ITS, ya que las características visuales pueden no ser suficiente para su identificación definitiva (PCR Protocols., 1989). Se obtuvo que la caracterización morfológica del primer hongo patógeno suponía que se trataba de *Oidium sp.*, sin embargo, las herramientas moleculares permitieron determinar con certeza que el hongo pertenecía a la especie *Fusarium equiseti*.

M3: *Fusarium sp.*

La secuencia consenso de la muestra M3 presentó un porcentaje de calidad (HQ) de 100% y una longitud de 512bp (Figura 15).

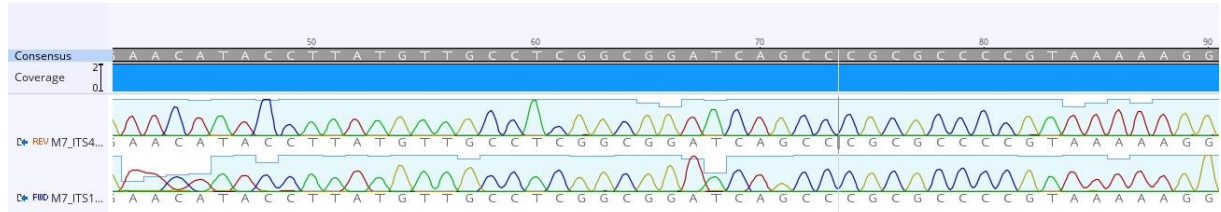


Figura 15: Electroferograma M3.

Se identificó que la muestra M3 corresponde a la especie de *Fusarium graminearum* con el porcentaje de identidad del 100% y un query cover de 100% (Figura 16).

<input checked="" type="checkbox"/>	Aislado de <i>Fusarium graminearum</i> _gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña NFG8_secuencia...	<i>Fusarium grami...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	550	OL824744.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia parcial del espaciador transcrito interno 1 de la cepa NIFoS_F14 de <i>Fusarium graminearu...</i>	<i>Fusarium grami...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	518	OR346117.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia parcial del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña NFG93 aislado de <i>Fusarium gr...</i>	<i>Fusarium grami...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	546	ON024853.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Aislado de <i>Fusarium graminearum</i> _gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña_muestra 55_secu...	<i>Fusarium grami...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	574	QQ438089.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Aislado de <i>Fusarium graminearum</i> _muestra 143_gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña_sec...	<i>Fusarium grami...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	561	QQ422542.1

Figura 16: Listas de organismos y la similaridad con las secuencias consenso de M3 por secuenciación de gen ITS.

Elaborado por:(Farah Ariel,2025).

10.4. Evaluación del Potencial Inhibitorio de *Trichoderma asperellum*.

10.4.1. Descripción del crecimiento

Se tomaron las medidas de crecimiento radial tanto en los controles de *Trichoderma asperellum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium graminearum*, y en de cada una de las repeticiones. Se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) en cada tratamiento (Tabla 9 y Tabla 10).

Tabla 9. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) del Tratamiento 1: *Trichoderma asperellum* vs *Fusarium equiseti* a los 7 días

Repetición	Crecimiento radial (cm)		PICR (%)	Grado de Antagonismo
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>		
CN	-	-		
R1	4,5	1,3	71,11	2
R2	4,2	1,3	69,05	2
R3	4	1,3	67,50	2
R4	4,5	1,3	71,11	2

R5	4,5	1,3	71,11	2
CP _T	4,4	-		
CP _{Fe}	-	3,2		

Tabla 10. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) del Tratamiento 2: *Trichoderma asperellum* vs *Fusarium graminearum* a los 7 días.

Repetición	Crecimiento radial (cm)		PICR (%)	Grado de Antagonismo
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>		
CN	-	-		
R1	4,6	1,2	73,91	2
R2	4	1,4	65,00	2
R3	4	1,4	65,00	2
R4	3,5	1,4	60,00	2
R5	3,9	1,6	58,97	2
CP _T	4	-		
CP _{Fg}	-	3,8		

El coeficiente de variación de los PICR para el Tratamiento 1 fue de 2,35% y para el tratamiento 2 fue de 9,16%. Se puede considerar que estos valores son aceptables y confiables ya que se encuentran por debajo del 15%.

De acuerdo a la escala antagonista de Bell (1982), que nos indica el grado de antagonismo de *Trichoderma sp.* frente a los patógenos a nivel in vitro, se puede decir que a los 7 días de incubación tanto el Tratamiento 1 como el Tratamiento 2 presentaron un grado 2 de antagonismo (Figura 17).

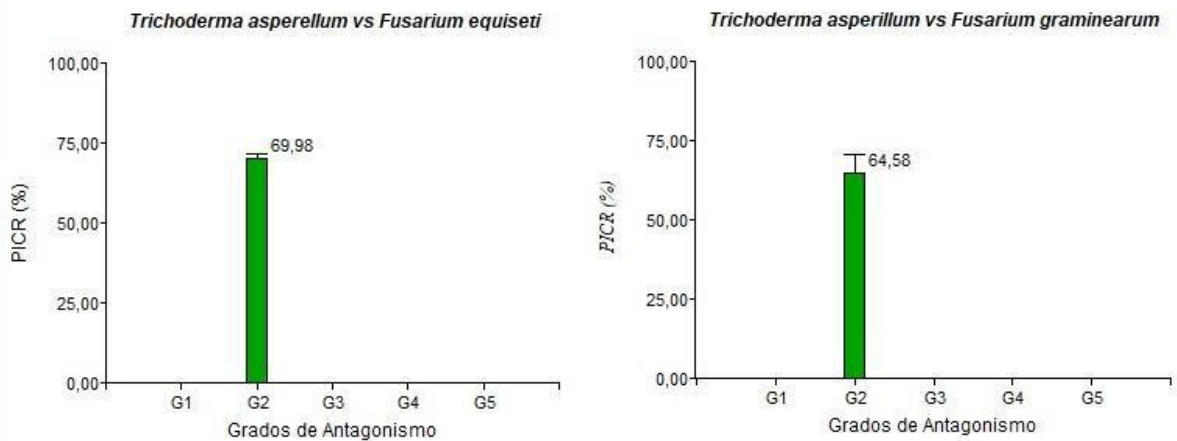


Figura 17. Capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium equiseti* y *Fusarium graminearum* a nivel *in vitro* a los 7 días.

10.4.2. Análisis estadístico

prueba de ANOVA para determinar si existe diferencia significativa entre los dos tratamientos presentó un valor p de 0,0847, al ser mayor al nivel de significancia ($p=0,05$) se determina que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la prueba ANOVA para el PICR de los dos tratamientos a los 7 días.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	p-valor
Modelo	1	72,90	3,87	0,0847
Tratamiento	1	72,90	3,87	0,0847
Erros	8	18,84		
Total	9			

La prueba de Tukey agrupo dentro del mismo grupo a los dos tratamientos *Trichoderma asperellum vs Fusarium equiseti* y *Trichoderma asperellum vs Fusarium graminearum* bajo un nivel de confianza del 95% (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la prueba Tukey para el PICR de los dos tratamientos a los 7 días.

Tratamientos	Medias	Repeticiones (n)	Grupo Tukey
Tratamiento 1	69,98	5	A
Tratamiento 2	64,58	5	A

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

Los efectos producidos en los sectores social, ambiental y económico son los siguientes:

11.1 Efecto social

Se identificó que la cepa *Trichoderma sp.* se encuentra en el sector de Alóag, de las cuales en el laboratorio de agronomía se realizó su aislamiento, la cual puede considerarse como una opción para el manejo de plagas, sin poner en riesgo la salud humana ni el medio ambiente.

11.2 Efecto ambiental

La práctica del monocultivo genera serios problemas, como la erosión del suelo ocasionada por la quema de residuos tras la cosecha, como consecuencia de las plagas y enfermedades que surgen. Además, los pesticidas utilizados para combatir plagas generan inconvenientes ecológicos, por lo que se busca una estrategia de control biológico, siendo *Trichoderma* un hongo que no presenta riesgos y puede combatir estas plagas de manera efectiva.

11.3 Efecto económico

El uso de *Trichoderma asperellum*, puede reducir la dependencia de fungicidas químicos costosos, mejorando la salud del cultivo y aumentando los rendimientos, lo cual resulta en beneficios económicos para los agricultores y fomenta prácticas agrícolas sostenibles.

12. PRESUPUESTO

Tabla 13: Presupuesto de reactivación y purificación de las cepas

PRESUPUESTO DE REACTIVACION Y PURIFICACION DE LAS CEPAS			
Materiales	Cantidad	Precio	Total
Medio de cultivo (PDA).	1	\$45,00	\$45,00
Mechero de alcohol.	1	\$5,00	\$5,00
Papel absorbente.	3	\$2,75	\$8,25
Guantes quirúrgicos.	1	\$3,00	\$3,00
Para film.	1	\$70,00	\$70,00
Alcohol 70%	4	\$10,00	\$40,00
Alcohol 96%	3	\$10,00	\$30,00
Tijera	1	\$0,50	\$0,50
Marcador	1	\$1,00	\$1,00
Agua destilada	3	\$5,00	\$15,00

Papel aluminio	2	\$2,75	\$5,50
Cajas Petri cristal grande	60	\$2,50	\$150,00
Estuche de decisión	1	\$16,00	\$16,00
Asa de siembra	1	\$20,00	\$20,00
Bisturí	1	\$10,00	\$10,00
Plástico film.	1	\$5,00	\$5,00
Total			\$424

Tabla 14: Presupuesto de Extracción de ADN.

Elaborado por: (Farah Ariel, 2025)

PRESUPUESTO DE SECUENCIACIÓN			
Descripción	Cantidad	Precio	Total
Muestras de amplicones ITS	3	\$20,50	\$61,50
Total			\$61,50

Elaborado por: (Farah Ariel, 2025)

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1. Conclusiones

- El crecimiento de *Trichoderma spp.* en los primeros días el desarrollo fue apenas visible, pero a partir del tercer día se observaron pequeñas colonias de color blanco verdoso. Para el quinto día, estas colonias se expandieron y adquirieron mayor densidad, mostrando estructuras reproductivas como conidios o esporas. Al séptimo día, *Trichoderma sp.* alcanza su máximo crecimiento, cubriendo gran parte del medio de cultivo y desarrollando características típicas de su fase madura, incluyendo cambios de color y textura.
- Las muestras aisladas de los suelos del Barrio La Banda, Parroquia Alóag, Cantón Mejía, presentan características distintivas a nivel macroscópico, microscópico de las cuales se identificó molecularmente que la cepa aislada pertenece a *Trichoderma asperellum* con un porcentaje de identidad del 100%. Las dos cepas de hongos patógenos conservadas en el laboratorio además se mostraron características morfológicas compatibles con el crecimiento de *Oidium sp* y *Fusarium sp.* Además, se caracterizó morfológicamente de los hongos patógenos y nos arrojó que se trataba de *Oidium sp.*, sin embargo, las

herramientas moleculares permitieron determinar con certeza que el hongo pertenecía a la especie

Fusarium equiseti. Y el segundo patógeno pertenece a *Fusarium graminearum*

- El estudio demostró que *Trichoderma asperellum* exhibe una notable capacidad antagonista frente a *Fusarium equiseti* y *Fusarium graminearum*, inhibiendo el crecimiento radial de estos patógenos en un grado significativo. Aunque los valores de PICR varían ligeramente entre las repeticiones, los coeficientes de variación bajos sugieren que los resultados son consistentes y confiables. La prueba ANOVA reveló que no hay diferencias significativas en la efectividad de *Trichoderma asperellum* entre los dos patógenos, lo cual fue respaldado por la prueba de Tukey.

13.2. Recomendaciones

- Se recomienda ser cuidadoso con el manejo del hongo agente de biocontrol y los patógenos para poder mantenerlos y conservarlos a nivel de laboratorio.
- Es aconsejable incluir *Trichoderma sp.* en las técnicas agrícolas de la zona para potenciar la calidad del suelo y reducir la proliferación de enfermedades causadas por hongos en las plantaciones.
- Se recomienda realizar más investigaciones de campo para analizar el rendimiento de *Trichoderma sp.*, en distintas circunstancias ambientales y en variados tipos de cultivos.
- Se recomienda continuar investigando el uso de *Trichoderma asperellum* como agente biocontrolador en condiciones de campo para validar su efectividad y determinar las dosis óptimas de aplicación.
- Promover el uso de *Trichoderma asperellum* podría reducir la dependencia de fungicidas químicos, mejorando tanto la salud de los cultivos como la economía de los agricultores.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Hernández-Melchor, D. J.-C. (2019). *Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. Obtenido de Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, 35(1), 98-105
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *El manual del laboratorio de Fusarium* | Wiley (en. Obtenido de <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p9780813819198>
- Macías Moncayo, M. (2019). *Determinación del agente causal de la enfermedad de*. Obtenido de <https://repositorio.uteq.edu.ec/items/10b7f843-39ad-4dae-a093-b89e6da96564>
- Martínez-Canto, O. J.-A.-S.-R. (2022). *Trichoderma spp. como agente de control biológico contra fitopatógenos en Solanum lycopersicum L. Avances en Investigación Agropecuaria, 26, 19-29.*
- oidium, F. (2025). *SlideShare; Slideshare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/yurihcalles/fitopatologia-oidium?form=MG0AV3>
- re poblacion autoctona. (s.f.). *fusarium*. Obtenido de <https://re poblacion autoctona.com/fusarium/?form=MG0AV3>
- Santos, E. (2011). *Aislamiento e identificación molecular de trichoderma spp*. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25239?form=MG0AV3>
- España, C. K. (2015). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma spp.* como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) en la hacienda La Alegría cantón Pedro Moncayo. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9365>.
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, A. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., & Aguilar-Ortigoza, C. J. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1), 58-68. Recuperado de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000100058.

- Galarza Romero, L. L. (2011). Aislamiento e identificación molecular de *Trichoderma* spp. Trabajo final para la obtención del título: Mgtr. en Biotecnología Agrícola. ESPOL. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25239>.
- Druzhinina, I. S., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 749–759.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma*: The hidden potential of the plant-growth-promoting fungus. *Plant Signaling & Behavior*, 9(1), e29717.
- Druzhinina, I. S., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 749–759.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma*: The hidden potential of the plant-growth-promoting fungus. *Plant Signaling & Behavior*, 9(1), e29717.
- Druzhinina, I. S., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 749–759.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98105. Recuperado de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071938902019000100098.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (s.f.). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de la Sociedad Cubana de Plantas Medicinales*, 28(1), 113-123. Recuperado de <https://www.scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>.

Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Recuperado de <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf>.

Fernández Gamarra, M. A., Maidana Ojeda, M., & Enciso Maldonado, G. A. (2017). Identificación molecular y tasa de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la Región Norte del Paraguay. *Investigaciones Agrarias*, 19(2), 127-132. Recuperado de https://www.scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S230506832017000200127.

Harman, G. E. (2006). *Trichoderma*: The Nature of Mycoparasitism and Its Practical Applications for the Biological Control of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 69-89. Recuperado de <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.44.070103.093801>.

United States Environmental Protection Agency. (1992). Fact Sheet for Streptomycin. Retrieved from https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-006306_1Sep-92.pdf

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 2-9.

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98105.