



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

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

Autor:

Tenelema Tenelema Cristian Fabricio

Tutor:

Chancusig Espín Edwin Marcelo

LATACUNGA - ECUADOR

Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Tenelema Tenelema, Cristian Fabricio con cédula de ciudadanía No 1804353744, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (*Trichoderma spp*) 2023-2024”**, siendo el Ingeniero Mg. Ph.D Edwin Marcelo Chancusig Espín, tutor del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 15 de agosto del 2024



Cristian Fabricio Tenelema Tenelema
CC: 1804353744
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 **TENELEMA TENELEMA CRISTIAN FABRICIO**, identificado con cédula de ciudadanía **1804353744**, de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigsilema, 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 “**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (*Trichoderma spp*) 2023-2024**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019 - Marzo 2020

Finalización de la carrera: Abril 2024 - Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 28 de noviembre del 2023.

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

Tema: **IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (*Trichoderma spp*) 2023-2024**”

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

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

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

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

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

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

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

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

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

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

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

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



Cristian Fabricio Tenelema Tenelema

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigsilema.

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (TRICHODERMA SPP), 2023-2024, de Tenelema Tenelema Cristian Fabricio, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 15 de agosto del 2024



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

CC: 0501148837

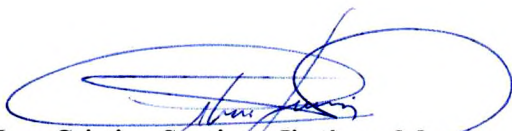
DOCENTE TUTOR

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: Tenelema Tenelema Cristian Fabricio, con el título de Proyecto de Investigación: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (*Trichoderma spp*) 2023-2024”**. ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

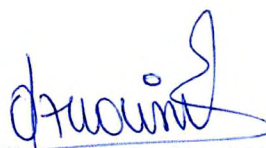
Latacunga, 15 de agosto del 2024



Ing. Cristian Santiago Jiménez, Mg.

CC: 050194626-3

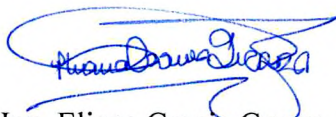
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.

CC: 050240972-5

LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Eliana Granja Guerra, Mg

CC: 171812630-1

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios en toda esta trayectoria y haber cumplido este sueño anhelado toda mi vida. A mi madre María Narciza por ser mi catedral quien seco mis lágrimas y a mi padre Juan Manuel por su temple de hierro que me heredo ya que fueron pilar fundamental en mi viaje estudiantil, así también a mi hermana Anabel Estefanía y mi pequeña sobrina Brittany quienes fueron parte de mí y fueron un apoyo emocional en mi formación profesional.

Agradecerte noble institución Universidad Técnica de Cotopaxi quien me abrió sus puertas y me han enseñado valores y principios y sobre todo ser un hombre de bien. Además, agradecerte maestro y amigo Ingeniero Edwin Chancusig Espín PhD, por tu comprensión y paciencia y enseñarme el camino de la investigación, gratitud eterna maestro por apoyarme en este camino como estudiante que ha llegado a su fin, Inge Tannia Llanos Proaño me brindaste tu confianza y colaboración y palabras motivadoras a no ceder y desmayar y llegar a cumplir mi meta.

Diosito me los bendiga siempre me llevo en mi corazón un cariño incondicional y el deber cumplido.

Cristian F. Tenelema.

DEDICATORIA

Este trabajo de grado es mi más sincera ofrenda. Queridos padres, Juan Manuel y María Narciza su confianza y apoyo han sido fundamentales no solo en mi desarrollo profesional, sino también en mi crecimiento como persona íntegra. A mis amigos de aula, Samuel y Edison, les agradezco profundamente por su apoyo constante, su amistad, las risas compartidas y el ánimo inquebrantable para seguir adelante. Agradezco de corazón a mi hermana Estefanía y a mi pequeña sobrina Brittany por su compañía y apoyo incondicional para no rendirme y conseguir mi sueño de niño.

Mi vida universitaria culmina y agradezco a mis maestros y maestras por la paciencia y por sobre todo la dicha de formarme como profesional y por sobre todo una persona de bien.

Gracias a todos y que Dios nos bendiga siempre.

Cristian F. Tenelema.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE UNA CEPA NATIVA DE (*TRICHODERMA SPP*), 2023-2024”.

Autor:

Tenelema Tenelema Cristian Fabricio

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar las características por medio de una caracterización morfológica y también la determinación de la especie y género a base de un análisis molecular de una cepa nativa de *Trichoderma spp.*, almacenadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi de la carrera de agronomía. Para ello, se utilizaron técnicas de multiplicación siguiendo los debidos protocolos pertinentes como el uso de bisturí y barra de inoculación. Se demostró que el uso del bisturí resulto ser el más eficaz para obtener *Trichoderma spp.*, además se utilizó un antibiótico como la Gentamicina, esta aplicación mostró una baja contaminación y mayor esterilidad en las cepas purificadas de hongo. En los resultados de las cajas purificadas de *Trichoderma spp.*, las estructuras morfológicas mostraron la presencia de las siguientes características como micelio, hifas, conidios, conidióforos. Más adelante las cepas seleccionadas por grado de purificación se enviaron al laboratorio de BIOHACK UIO, ubicado en Quito para el análisis de identificación molecular. Los resultados siguientes obtenidos indicaron la presencia de un 100% de una sola cepa de hongo donde la especie y género analizada, fue identificada como *Trichoderma asperellum*.

Por lo tanto, este tema de investigación ayudará a entender en profundidad la caracterización de *Trichoderma asperellum*, lo que facilitará su uso eficaz en el control biológico de plagas y enfermedades agrícolas y forestales, promoviendo prácticas sostenibles y ha largo tiempo con la biosfera en el manejo responsable y agroecológico de sistemas agrícolas.

Palabras claves: *Trichoderma spp*, Purificación, Gentamicina Identificación molecular, microbiología, caracterización morfológica, biosfera.

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES**

TITLE: “MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF A NATIVE STRAIN OF (TRICHODERMA SPP), 2023-2024”.

Author:

Tenelema Tenelema Cristian Fabricio

ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the characteristics through morphological characterization and to identify the species and genus based on a molecular analysis of a native strain of *Trichoderma spp.*, stored in the microbiology laboratory of the Agronomy Department at the Technical University of Cotopaxi. To achieve this, multiplication techniques were employed, following appropriate protocols, including the use of a scalpel and inoculation loop. It was demonstrated that the use of the scalpel was the most effective method for obtaining *Trichoderma spp.* Additionally, an antibiotic such as Gentamicin was used, and this application showed low contamination and higher sterility in the purified fungal strains. In the results from the purified *Trichoderma spp.* plates, the morphological structures displayed the presence of characteristics such as mycelium, hyphae, conidia, and conidiophores. Subsequently, the strains selected based on their degree of purification were sent to the BIOHACK UIO laboratory, located in Quito, for molecular identification analysis. The results obtained indicated the presence of a single fungal strain, where the species and genus were identified as *Trichoderma asperellum*. Therefore, this research will contribute to a deeper understanding of the characterization of *Trichoderma asperellum*, facilitating its effective use in the biological control of agricultural and forestry pests and diseases, promoting sustainable practices and long-term harmony with the biosphere in the responsible and agroecological management of agricultural systems.

Keywords: *Trichoderma spp.*, Purification, Gentamicin Molecular identification, microbiology, morphological characterization, biosphere

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	3
4.1. Beneficiarios directos.....	3
4.1. Beneficiarios indirectos.....	3
5. PROBLEMÁTICA.....	3
6. OBJETIVOS.....	5
6.1. General.....	5
6.2. Específicos.....	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	6
8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
8.1. Generalidades del género <i>Trichoderma</i> spp.....	7
8.2. Importancia agrícola del género <i>Trichoderma</i> spp.....	7
8.3. <i>Trichoderma</i> spp como controlador biológico.....	7
8.4. Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> spp.....	8
8.5. Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.....	9
8.6. Características Macroscópicas:.....	12
8.7. Características Microscópicas:.....	13
8.8. Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
8.9. Método de identificación molecular.....	14
9. PREGUNTA CIENTÍFICA.....	17
10. METODOLOGÍA.....	17
10.1. Parte 1: Búsqueda bibliográfica.....	17

10.2.	Descriptivo	17
10.2.1.	Ubicación de la experimentación.....	17
10.2.2.	Materiales y equipos	18
10.2.3.	Material biológico.....	18
10.2.4.	Equipos de laboratorio	18
10.2.5.	Insumos de laboratorio.....	19
10.2.6.	Material general	19
10.3.	Manejo específico del experimento.....	19
10.3.1.	Métodos de multiplicación.....	19
10.3.2.	Activación del <i>Trichoderma</i> spp, nativo en cajas Petri.....	20
10.3.3.	Aplicación de Antibiótico	21
10.3.4.	Obtención de <i>Trichoderma</i> spp. Nativo	21
10.3.5.	Extracción de ADN de la muestra para realizar la identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp y protocolo.....	22
11.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
11.1.	Interpretación morfológica, de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
11.1.1.	Observación macroscópica de la cepa de <i>Trichoderma</i> , spp.	23
11.1.2.	Uso de antibiótico.	25
11.1.3.	Observación microscópica de la cepa <i>Trichoderma</i> spp.....	26
11.1.4.	Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.....	26
11.2.	Interpretación análisis molecular.	32
11.3.	Extracción de ADN de la muestra.....	32
11.4.	Amplificación de ADN	33
11.5.	Secuencias Forward y Reverse.....	33
11.6.	Lecturas procesadas	34
11.7.	Tabla de costos	35
12.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)	36
12.1.	Impacto social	36
12.2.	Impacto ambiental	36
12.3.	Impacto económico	37
13.	CONCLUSIONES.....	38
14.	RECOMENDACIONES	38
15.	BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de tareas en relación a los componentes.....	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp	9
Tabla 3. Equipos de Laboratorio.	26
Tabla 4. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> spp, revisión en microscopio.	28
Tabla 5. Costos del proyecto de investigación.	35

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Laboratorio de agronomía Universidad Técnica de Cotopaxi.....	18
Imagen 2. <i>Observación macroscópica de la cepa de Trichoderma, spp</i>	23
Imagen 3. Comparación de cepas contaminadas y puras de <i>Trichoderma</i> spp.	25
Imagen 4. Observación de las partes de <i>Trichoderma</i> spp, en microscopio.	27
Imagen 5. <i>Visualización de (Trichoderma, spp), en el microscopio</i>	30

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título

“Identificación morfológica y molecular de una cepa nativa de (*Trichoderma spp*) 2023-2024”.

Fecha de inicio:

Octubre 2023.

Fecha de finalización:

Agosto 2024.

Lugar de ejecución:

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

Facultad que auspicia:

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Carrera de Agronomía

Equipo de Trabajo:

Tutor: Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg. PhD.

Autor: Cristian Fabricio Tenelema Tenelema

Lector 1: Ing. Cristian Santiago Jiménez Jácome, Mg.

Lector 2: Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg

Lector 3: Ing. Eliana Granja Guerra, Mg.

Coordinador del proyecto:

Nombre/s: Tenelema Tenelema Cristian Fabricio.

Teléfonos: 0996490356

Correo Electrónico: cristian.tenelema3744@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura, Silvicultura y Pesca – Agronomía.

Línea de investigación:

Desarrollo y Seguridad Alimentaria.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Producción Agrícola sostenible.

Línea de vinculación:

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y gestión para el desarrollo humano y social.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación se centra en la recopilación, análisis e interpretación de información sobre las características morfológicas y moleculares de cepas nativas de *Trichoderma* spp. que se encuentran en el Laboratorio de Microbiología de la carrera de Agronomía.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La presente investigación se enfoca en proporcionar información sobre las características morfológicas y genéticas de *Trichoderma* spp, con el objetivo de utilizarlo como un eficiente método biológico en el control de enfermedades agrícolas. Se espera que este estudio sirva como punto de partida para futuras investigaciones en la Universidad y pueda ser aplicado en estudios relacionados con la biodiversidad microbiana del suelo, la biotecnología agrícola y la ecología de los ecosistemas agrícolas. Así mismo, la comprensión de sus mecanismos de acción como biocontrolador podría abrir nuevas líneas de investigación en el desarrollo de productos biotecnológicos para el manejo integrado de plagas y enfermedades en la agricultura.

Trichoderma spp., 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 et al., 2017).

Por otra parte, *Trichoderma* spp., posee la capacidad de inhibir el crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas de microorganismos patógenos (Mesa Vanegas et al., 2020).

Por otra parte el potencial de este hongo antagonista también funciona como promotor de crecimiento vegetal, biomasa, rendimiento y calidad (Donoso et al., 2008; Mesa Vanegas et al., 2020).

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

4.1. Beneficiarios directos

Los beneficiarios directos de la investigación están acreditados para la comunidad educativa de la Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), pues al determinar cepas nativas con una excelente viabilidad para el control de plagas y enfermedades, pueden realizar estudios a profundidad y obtener un producto que tenga un control amigable y sostenible con el medio ambiente para el beneficio de productores agrícolas.

4.1. Beneficiarios indirectos

Todos los agricultores que se encuentran a nivel de país debido a que este hongo benéfico, puede contribuir a una mejor asimilación de nutrientes, así como el fortalecimiento del sistema inmune de la planta.

5. PROBLEMÁTICA

Los sistemas agrícolas en los últimos años han suscitado dificultades ligadas a problemas fitosanitarios, en la gestión de enfermedades de las plantas, se enfrentan diversos desafíos que requieren una atención urgente. Uno de los principales problemas es la creciente resistencia de los patógenos a los fungicidas químicos tradicionales, lo que dificulta su eficacia a largo plazo.

Hoy en la actualidad identificar y diferenciar las especies de *Trichoderma* spp, es crucial, pero la similitud morfológica complica la identificación visual. Se emplean métodos combinados de análisis morfológico y molecular para resolverlo. Sin embargo, en nuestro país no se han estudiado marcadores moleculares específicos para las especies de *Trichoderma* spp, en la agricultura.

La necesidad de disminuir el uso de fertilizantes y fungicidas de procedencia química en la agricultura es cada vez más urgente para preservar el ecosistema y fomentar una agricultura más sostenible. Actualmente, se está promoviendo el uso de microorganismos beneficiosos como inoculantes para biofertilización y biocontrol (Mayo et al., 2015)

Es evidente que los agentes de control biológico (BCA) que utilizan *Trichoderma spp.* son viables desde el punto de vista comercial, dado que hay numerosos productos disponibles en el mercado. Sin embargo, muchos de estos productos, son BCA de tipo "desconocido". La mayoría de ellos se comercializa como mejoradores del suelo y/o promotores del crecimiento. Prácticamente todos los BCA basados en *Trichoderma spp.* disponibles cumplen con estas funciones. Estas características son clave para su éxito como antagonista en el control biológico de patógenos. La contaminación del suelo y del agua a pesar de que el uso de agroquímicos es constante para el control de plagas y enfermedades su uso continuo ha generado problemas en el ámbito ambiental, humano y animal, sobre todo el daño al recurso suelo, pues de este yacen microorganismos con características potenciales para suplir el consumo de productos sintéticos (Mesa Vanegas et al., 2020).

En la actualidad, los hongos del género *Trichoderma spp.* se comercializan en forma de biopesticidas, biofertilizantes y productos que estimulan el crecimiento y la resistencia natural de las plantas. Su eficacia se debe a su capacidad para proteger las plantas, fomentar el crecimiento vegetativo y limitar la presencia de patógenos, además de funcionar como aditivos del sustrato (inoculantes) que mejoran la absorción de nutrientes. Las esporas vivas de estos hongos, que son el componente activo, se incorporan en diversas formulaciones, tanto tradicionales como novedosas, que se aplican como soluciones para rociar sobre hojas, semillas y plantas jóvenes, así como en tratamientos post-poda en el sustrato para siembra o trasplante, y en riegos o remojos (Andrzejak & Janowska, 2022).

En el ámbito agrícola actual, es fundamental profundizar en la comprensión y caracterización de hongos con potencial biocontrolador de enfermedades vegetales y que al mismo tiempo son capaces de promover el crecimiento de las plantas, así como de mejorar la calidad del suelo. Dentro de este grupo, se encuentran las cepas nativas de *Trichoderma spp.* (Hernández et al., 2019); el cual se ha usado para combatir enfermedades como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria sp.*, *Botrytis cinérea*, *Sclerotium rolfsii*, *Phythium sp.* (Umaña-Castro et al., 2018).

No obstante, para emplear estas cepas en prácticas agrícolas, se deben identificar sus características morfológicas y moleculares específicas. Así, será posible seleccionar las cepas más adecuadas conforme su variabilidad genética y su adaptación local.

Es por esto que identificar cepas nativas de la zona, es sumamente importante para contribuir al manejo agronómico de los cultivos con el uso de productos biológicos tales como

Trichoderma spp, como un controlador bio amigable y a su vez para limitar el uso de productos comerciales químicos los cuales debemos limitar el uso por su alto costo y también por grado de contaminación, por lo cual la relevancia de identificar los mejores ejemplares de hongos antagonicos es considerado un avance en el uso y manejo de tales agentes controladores de enfermedades que tienen una acción poli funcional para la agricultura.

6. OBJETIVOS

6.1.General

- Identificar morfológica y molecularmente una cepa nativa de *Trichoderma spp*, aisladas en el laboratorio de la carrera de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi 2023-2024

6.2.Específicos

- Determinar las principales características morfológicas del *Trichoderma spp*, nativo.
- Identificar molecularmente *Trichoderma spp*, nativo.
- Elaborar una tabla de costos del presente proyecto de investigación en laboratorio.

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

Tabla 1. *Actividades de tareas en relación a los componentes.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACTIVIDADES (TAREAS)	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Determinar las principales características morfológicas del <i>Trichoderma</i> spp, nativo.	1. Observación macroscópica de <i>Trichoderma</i> spp en agar PDA durante 6 días. 2. Observación microscópica de la cepa <i>Trichoderma</i> spp después de incubación a 26 °C durante 6 días.	- Descripción detallada del crecimiento y desarrollo de <i>Trichoderma</i> spp en agar PDA durante 6 días. - Identificación de las estructuras morfológicas bajo el microscopio.	Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.
Identificar molecularmente <i>Trichoderma</i> spp, nativo.	1. Extracción de ADN de la muestra de <i>Trichoderma</i> spp cultivada en medio sólido. 2. Amplificación de la región ITS....	- Obtención de secuencias genéticas de <i>Trichoderma</i> spp . - Comparación de secuencias con bases de datos.	Identificación molecular de <i>Trichoderma asperellum</i>
Elaborar una tabla de costos del presente proyecto de investigación en laboratorio.	1. Recopilación de todos los materiales y equipos utilizados en el proyecto. 2. Determinación del costo unitario y total de cada elemento. 3. Suma total de los costos.	- Tabla detallada que incluya todos los materiales, equipos y costos asociados al proyecto. - Cálculo preciso del gasto total del proyecto.	Comparación de los costos calculados con los recibos y registros de compra.

8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

8.1.Generalidades del género *Trichoderma* spp

Es utilizado en la agricultura de acuerdo a sus mecanismos de control biológico, a su vez establece una relación directa con las raíces de las plantas, a las cuales modifica su morfología y procesos fisiológicos haciéndola más defensiva al ataque de patógenos que habitan en la rizosfera (Rivera-Méndez et al., 2021).

Es un hongo utilizado como biocontrolador de hongos fitopatógenos debido a sus características múltiples positivas, como su mecanismo de acción, la antibiosis, el micro parasitismo, producción de metabolitos secundarios (Hernández-Melchor et al., 2019). El potencial enzimático que posee este hongo, secreta más de 70 metabolitos los cuales detienen los procesos infecciosos de los patógenos y a su vez son usada como sustancia estimuladora para los procesos biológicos de las plantas (Quevedo, 2022).

8.2.Importancia agrícola del género *Trichoderma* spp

El uso de productos menos tóxicos ha sido una alternativa de control para hacerle frente al uso de pesticidas los cuales han tenido efectos perjudiciales para el ecosistema natural lo que implica la eliminación de microorganismos benéficos, aumento de plagas y enfermedades agrícolas y presencia de residuos tóxicos en los alimentos (Bae et al., 2011; Medrado et al., 2022).

El género *Trichoderma* está presente en ecosistemas terrestres como suelos agrícolas o bosques, poseen una alta adaptabilidad y crecen de manera saprofita interactuando con plantas y animales; A su vez este género está asociado a la rizósfera de plantas de tal manera que promueven su desarrollo y crecimiento mediante la producción y liberación de giberelinas, auxinas y ácidos orgánicos, los cuales disminuyen el ph al suelo y permiten la absorción de nutrientes como fosfatos, hierro magnesio y manganeso, siendo importantes para el metabolismo vegetal de las plantas (Hernández-Melchor et al., 2019).

8.3.*Trichoderma* spp como controlador biológico

Las especies de *Trichoderma* son empleadas como controladores biológicos, en ensayos de confrontación directa han demostrado su eficacia contra patógenos. Especies como *T. arundinaceum* y *T. brevicompactum*, demuestra su potencial contra *M. faseolina*, destacando el aislamiento de cepa de suelos nativo como alternativa biológica (Cubilla-Ríos et al., 2019).

Estudios sobre *Trichoderma*, en laboratorio han demostrado que las especies de *T. asperellum*, *viride*, *harzianum* son eficientes para el control de fitopatógenos, siendo alternativas biológicas importantes. (Andrade-Hoyos et al., 2019). Según (Mayo et al., 2015), en su estudio los aislados de *Trichoderma* inhibieron el desarrollo de *Rhizoctonia solani* en condiciones *in vitro*, en cuanto a condiciones *in vivo* en plantas de frejol tratadas con una cepa específica *T. harzianum* en presencia del patógeno, mostro un efecto positivo ante la resistencia.

En un estudio para verificar la eficiencia de la especie *Trichoderma spp.*, sobre plantas de soja y tomate mostro efectos positivos contra hongos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Sclerotium cepivorum*, afirmando que el uso de *Trichoderma* es sumamente importante para la experimentación *in vivo* e *in situ*. Con el uso del producto comercial Ecotrich® empleado como controlador biológico del cual aislaron a *T. harzianum*, el cual es considerado como un agente de protección eficaz a diversos patógenos vegetales, usado en la aplicación foliar, edáfica y tratamientos de semillas (Medrado et al., 2022). *T. harzianum* es un género estudiado a profundidad para la producción de la celulosa. De acuerdo a Zapata-Narváez & Gómez-Marroquín, (2022), el uso de bioplaguicidas como Tricotec® a base de *T. koningiopsis* y *T. asperellum*, muestran efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de ajo.

En otro estudio según Zapata-Narváez & Gómez-Marroquín, (2022), *Sclerotium cepivorum*, es causante de la pudrición blanda en cultivos de ajo, para este caso la aplicación de biocontroladores ya sea de forma individual o en mezclas, reduce la mortalidad del patógeno. Por otra parte de acuerdo a Rivera-Méndez et al. (2021), en su estudio demuestra que *T. asperellum*, tiene efecto positivo para reducir la incidencia en campo para *S. cepivorum* y *S. terrestris*, mejorando la calidad de la cosecha del cultivo de cebolla. *T. asperellum*, presenta evidencias de activación de la defensa sistémica contra *S. cepivorum*, en base al análisis de genes marcadores de defensa (Rivera-Méndez et al., 2021).

8.4. Taxonomía del género *Trichoderma spp*

El género *Trichoderma* es descrito por primera vez en 1994 por Persoon, considerado un hongo saprofito perteneciente a la división Ascomycota que habita en el suelo, están distribuidas en zonas que contengan materia orgánica o desechos vegetales (Sánchez-García et al., 2017; Quevedo, 2022).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Trichoderma spp*

División	Myxomicotina
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales
Familia	Monilaceae
Género	Trichoderma
Especie	T. harzianum, T. hamatum, T. viride, etc

Elaborado por: (Lasluisa, 2023).

8.5. Identificación morfológica de *Trichoderma spp*

De acuerdo a Savín et al. (2021) realizaron la caracterización morfológica de especies de *Trichoderma spp*, aisladas en lo que por medio de un microscopio compuesto (Labomed LX 400) se visualizaron hifas, fiálides agrupadas en forma globulares, y conidios elipsoides.

Para la identificación de especies de *Trichoderma*, han sido empleados varias técnicas, entre esas se basa en las características morfológicas, en el caso del estudio descrito por Leiva-Mora et al. (2023), describe a cepas aisladas de *Trichoderma* por medio del tamaño de la estructura de las hifas, conidios y fiáles. En la actualidad es empleada la secuenciación del rRNA, por el cual permite una precisión idónea al momento de identificar las especies (Sánchez-García et al., 2017).

Para llevar a cabo la multiplicación del hongo, se empleó un bisturí debidamente esterilizado para hacer un corte cuadrado en el hongo. Este fragmento fue cuidadosamente transferido a una nueva caja Petri que contenía 7,8 gramos de medio nutritivo preparado específicamente para este propósito. Gracias a este procedimiento, se facilitó la formación de nuevas colonias del hongo, lo que a su vez permitió purificar la cepa y realizar un análisis molecular detallado en el laboratorio. Este método no solo asegura la obtención de muestras puras, sino que también mejora la precisión de los estudios posteriores sobre la cepa (Troya & Vaca, 2014).

La siembra se realiza con un asa que se introduce en el cultivo a inocular y luego se extiende sobre la superficie del bisel en un patrón en zigzag, especialmente para bacterias. En el caso de los hongos, el procedimiento es similar, es decir, si el cultivo es líquido, se desliza el asa sobre el agar. Ahora bien, en el caso de que se disponga de un aislamiento puro, se deja que el hongo

esporule y luego se coloca un pequeño fragmento o porción del hongo sobre el bisel (Jamauca Lopez, 2023).

Mosquera et al. (2020) dentro de su investigación mencionan que el uso de Gentamicina, dentro de la purificación de una cepa bacteriana, promueve que sobreviva una única especie, dejando sin efecto la reproducción celular de otros organismos. En la investigación realizada, se corroboró este hecho debido a que como se observa en la imagen, se evitó que se contamine la muestra de *Trichoderma* spp con la aplicación del antibiótico.

Según los estudios de (Acurio Vásquez, Ramiro Daniel; España Imbaquingo, 2017), las colonias exhibieron un crecimiento acelerado (5-8 cm), y el micelio cubrió el medio de cultivo en 5 días a 26°C en Agar papadextrosa. Al principio, las colonias presentaron pústulas blancas y algodonosas, las cuales posteriormente se compactaron y esporularon, cambiando a un color verde y una textura granulosa. Se observaron conidióforos ramificados alrededor de las pústulas. Aunque los aislados no emitieron el olor característico a coco, la parte inferior de las colonias mostró una coloración marrón-amarillenta, atribuible a la producción de cristales amarillos. Así mismo, Los conidióforos mostraron ramas laterales dispuestas en pares, formando un ángulo de 90° con respecto al eje principal del conidióforo. Las fíalides tenían una forma alargada, más anchas en el centro y con un cuello largo y hialino. Se observaron fíalides tanto individuales como en grupos de 2 a 3. Las conidias eran ovoides o a veces globosas, de color verde claro y con bordes lisos. Se encontraban agrupadas en las fíalides, formando racimos globosos con una disposición de umbelas claramente definida.

Por otra parte, la interacción entre temperatura y desarrollo de *Trichoderma* son dependientes de la especie y el aislamiento específico. Por ejemplo, *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* pueden tolerar temperaturas de 40 a 41°C, mientras que *T. koningii* y *T. hamatum* soportan hasta 35°C, y *T. viride* y *T. polysporum* hasta 31°C. De igual manera, *T. harzianum* puede crecer a temperaturas de hasta 38°C, con una temperatura adecuada de 20°C para algunos aislamientos a pesar de que varía entre 25 y 30°C. No obstante, a 30°C, la actividad antagónica de *T. harzianum* se reduce, lo que demuestra que la temperatura ideal para el crecimiento no siempre coincide con la temperatura óptima para la actividad antagónica, y por tanto, existe relación entre aislamiento, antagonismo y temperatura (Martínez et al., 2013).

Se ha podido observar una gran cantidad de formación de colonias de *Trichoderma* spp, en las 5 cajas Petri purificadas con Gentamicina, en la tercera fase de multiplicación, en el laboratorio de agronomía. Según Germán et al. (2020) se aislaron y purificaron cepas de hongos

evidenciando que las mejores cepas son aquellas que toman en color propio del hongo y se expanden en todo el medio de cultivo, en el presente estudio se evidenció esta característica, por lo que se concuerda con los autores.

Las estructuras morfológicas de este género, presentan hifas hialinas de paredes lisas, conidióforos simples no ramificados pero con fiálides terminales en forma de cilindro, los conidios son ovoides en racimos con tonalidad verde-amarillento, las cuales se producen solas y se acumulan en los extremos de cada fiálide para formar una cabeza con forma circular-globosa (Espinoza Castro et al., 2023).

Según Mayo et al. (2015), los aislados de *Trichoderma* se identificaron por medio de la esporulación, mostrando una inhibición superior a 40%, por medio de la secuenciación identificaron a *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. gamsii* y *T. citrinoviride*. En otro estudio según Sánchez-García et al. (2017), para la identificación de cepas de *Trichoderma*, usaron técnicas moleculares de amplificación por PCR de ADN, por medio de este proceso identificaron 6 cepas con identificación dominante de la especie *T. harzianum* sobre *T. asoerellum*, el sustrato del muestreo fue proveniente de una parcela con frejol y maíz (Sánchez-García et al., 2017).

La identificación de la *Trichoderma spp* se lleva a cabo observando rasgos específicos, tanto visibles como bajo el microscopio, con el fin de diferenciar las diversas especies dentro de este género. Las características macroscópicas y microscópicas dividen este proceso (Manjur & Afiya, 2010).

Las observaciones del hongo *Trichoderma spp.*, destaca su morfología, por lo que se evidenció que su estructura presento hifas hialinas de paredes lisas, conidióforos simples no ramificados pero con fiálides terminales en forma de cilindro, los conidios son ovoides en racimos con tonalidad verde, las cuales se producen solas y se acumulan en los extremos de cada fiálide para formar una cabeza con forma circular-globosa, acorde a lo manifestado por Espinoza Castro et al. (2023).

Dado el nivel de adaptabilidad alto, *Trichoderma* puede propagarse a otros medios de cultivo. Ahora bien, las características morfológicas de las colonias, como los anillos concéntricos y la pigmentación del micelio, tienen una variación según la especie y el medio. Por otra parte, al inferior de las colonias se muestran colores tenues como el beige, amarillo, ámbar o verde amarillento (Marchuk Larrea et al., 2024).

Después de tres días de crecimiento, todas las colonias tomaron el color característico de *Trichoderma* spp, siendo verde-amarillento toda la caja Petri, por lo que ha alcanzado su punto de maduración. De acuerdo con Manjur y Afuya (2010), la apariencia de *Trichoderma* spp, dentro de un medio de cultivo es algodonosa o lanosa con aspecto aterciopelado, lo que la caracteriza. A su vez, Leiva-Mora et al. (2023) menciona que los conidios de *Trichoderma* spp, son ovoides en racimos con tonalidad verde-amarillento.

8.6. Características Macroscópicas:

- **Textura del Micelio:** El micelio de *Trichoderma* spp., visible a simple vista, puede presentar una variedad de texturas en los medios de cultivo, que van desde una apariencia algodonosa o lanosa hasta un aspecto aterciopelado. Esta textura puede ser un indicador útil para distinguir entre diferentes especies dentro del género *Trichoderma* y también puede variar en función de las condiciones de cultivo, como la humedad y la temperatura.
- **Anillos Concéntricos:** producen anillos concéntricos en su medio de crecimiento. El desarrollo radial del micelio forma estos anillos de diferentes tamaños y tonos, que pueden ayudar a identificar especies.
- **Color de las Conidias:** Los órganos reproductivos asexuales de *Trichoderma* spp., conidia, son translúcidos, verdes, amarillos o naranjos. Las especies de *Trichoderma* y las variables ambientales como la luz y la temperatura tienen influencia en su tono.

8.7. Características Microscópicas:

- Fialides: Según, (Aroca et al., 2004) la mayoría de las fialides son individuales, con forma de matraz, presentando una base más o menos cilíndrica y estrechándose de manera abrupta hacia el extremo. Sus dimensiones oscilan entre $6-14 \times 2,5-3,0 \mu\text{m}$. Las fialides son células especializadas que se encuentran en la punta de los conidióforos y son responsables de la producción de conidias en *Trichoderma spp.* Estas células suelen ser más largas que anchas y pueden tener una disposición irregular. Las fialides son cruciales para la reproducción asexual del hongo y pueden ser un punto de referencia importante para la identificación taxonómica.
- Hifas septadas: *Trichoderma spp.* hae septas. Estas hifas delgadas y ramificadas crean una red de todas las direcciones. Leiva-Mora et al. (2023) dicen que *Trichoderma spp.* hyphas son distintas.
- Color y textura: Las hifas de *Trichoderma spp.* pueden ser translúcidas o algo verdes o amarillentas, dependiendo de la especie y las circunstancias de crecimiento (Espinoza Castro et al., 2023).
- Conidiophoros/conidia: *Trichoderma spp.* conidiophores generan conidia 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 (Manjur & Afiya, 2010).
- Conidioforos en forma de pincel: Conidiophores 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 et al. 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 (Manjur & Afiya, 2010)..
- Interacción con otras estructuras: En condiciones naturales, *Trichoderma spp.* puede exhibir interacciones con otras estructuras, como la formación de esporas de resistencia,

como clamidosporas, o la producción de estructuras especializadas para la colonización de tejidos vegetales (Espinoza Castro et al., 2023).

8.8. Identificación molecular de *Trichoderma spp*

Las técnicas moleculares han sido de suma importancia en los últimos años, de acuerdo a su confiabilidad y precisión entre una o varias cepas de la filogenia del género de *Trichoderma spp*, ha sido analizado por secuencias de los espaciadores transcritos del ADN ribosomal (ITS1-ITS2) (Valiente & Pavone, 2013). Entre ellas una técnica usada para la detección de microorganismos se usa la detección de ácidos nucleicos por medio de la PCR o más conocida como la reacción en cadena de la polimerasa. Consiste en amplificar muestras de ADN por repeticiones de la reacción de elongación en base a los cebadores específicos, y la enzima Taq polimerasa, en condiciones idóneas (Soto Muñoz, 2014).

8.9. Método de identificación molecular

El desarrollo del meta código de barras de ADN representa un avance transformador en el campo de la microbiología, permitiendo una identificación y caracterización detallada y eficiente del microbiota presente en diversas fuentes, tanto ambientales como clínicas. Esta técnica, basada en la amplificación de genes marcadores específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ciclo de los amplicones resultantes, ha facilitado enormemente el estudio de comunidades microbianas complejas, superando varias limitaciones de los métodos tradicionales de cultivo (Kredics et al., (2019).

Matas et al.. (2022) dentro de su investigación para caracterizar una nueva especie de *Trichoderma spp*, basado en características morfológicas y moleculares cultivaron hongos en agar PDA, y realizaron la caracterización molecular por medio de la extracción de ADN en la cual se aplicó espectrofotometría y la secuencia resultante se comparó con las secuencias del banco de datos GeoBank, con lo que determinaron que la especie nativa pertenece a *Trichoderma asperellum*. Es así que se concuerda con los resultados obtenidos por los autores, debido a que las muestras fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo y la secuenciación se comparó con bases de datos internacionales, por lo que este tipo de protocolo es válido para establecer género y especie de este tipo de hongo.

El desarrollo del meta código de barras de ADN representa un avance transformador en el campo de la microbiología, permitiendo una identificación y caracterización detallada y eficiente del microbiota presente en diversas fuentes, tanto ambientales como clínicas. Esta

técnica, basada en la amplificación de genes marcadores específicos a través de la reacción cíclica de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de los amplicones resultantes, ha facilitado enormemente el estudio de comunidades microbianas complejas, superando varias limitaciones de los métodos tradicionales de cultivo, teniendo los siguientes elementos (Kredics et al., 2019):

- **Fundamentos del Meta código de Barras de ADN:** El proceso comienza con la selección de un segmento de ADN objetivo conocido como marcador genético, que debe ser lo suficientemente conservado para estar presente en todos los miembros de un grupo taxonómico, pero también lo suficientemente variable para distinguir entre especies o incluso cepas. El gen 16S rRNA, por ejemplo, es comúnmente utilizado para bacterias debido a estas propiedades, mientras que la región ITS (espaciador transcrito internamente) se utiliza para hongos.
- **Amplificación y Secuenciación:** Mediante PCR, se amplifican múltiples copias de estos marcadores genéticos específicos a partir de una muestra ambiental o clínica, que luego se secuencian utilizando tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). Estas tecnologías permiten la secuenciación de millones de fragmentos de ADN simultáneamente, generando una cantidad masiva de datos que reflejan la diversidad de la microbiota presente en la muestra.
- **Análisis de Datos y Caracterización de la Microbiota:** Caracterización de microbiota y análisis de datos. Se comparan los datos de secuencia con bases de datos genómicas para identificar especies o taxones de muestras. El estudio aborda la composición y abundancia del microbiota. Identificar y cuantificar microorganismos sin pre-cultivar es útil para estudiar comunidades microbianas complejas y detectar bacterias difíciles de cultivar o no descubiertas.

Los enfoques basados en secuenciación han revolucionado el estudio del microbiota, permitiendo una detección rápida y precisa de microbios de comunidades de múltiples especies sin la necesidad de cultivos y aislamientos de laboratorio que consumen mucho tiempo. Como resultado, la metabarcodificación de ADN proporciona perfiles taxonómicos completos con mayor resolución filogenética. La secuenciación de amplicones utiliza PCR con pares de cebadores para amplificar marcadores de ADN específicos entre especies. Para lograr una amplia cobertura de especies, los marcadores deben estar flanqueados por sitios de unión de cebadores conservados y al mismo tiempo ser lo suficientemente variables para diferenciar entre taxones (Ohta et al., (2023).

Para la identificación de especies de hongos, el objetivo común es la región espaciadora transcrita interna (ITS) ubicada entre los genes de ARNr de la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU). La región ITS consta de dos loci, ITS1 e ITS2, separados por el gen 5.8S rRNA. Se puede seleccionar una o ambas subregiones para la secuenciación a fin de identificar la taxonomía de una muestra. La región ITS no codificante tiene una tasa de mutación más rápida que las regiones codificantes de ARNr SSU y LSU, lo que resulta en variaciones de secuencia acumuladas que ayudan a discriminar diferentes taxones (Ohta et al., 2023).

Los marcadores de ADN tanto bacterianos como fúngicos están presentes en múltiples copias del genoma, lo que los hace técnicamente ventajosos para la secuenciación de amplicones. Las regiones dentro del operón de ARNr son fácilmente objetivo de la amplificación por PCR, incluso con pequeñas cantidades de ADN molde. Por lo tanto, los metacódigos de barras de ADN dirigidos a operones de ARNr se han empleado ampliamente como método estandarizado para la identificación microbiana (Ohta et al., (2023).

9. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Se puede determinar la especie de la cepa nativa de *Trichoderma spp*, aislada en la Universidad Técnica de Cotopaxi, a través del análisis morfológico y molecular?

10. METODOLOGÍA

10.1. Parte 1: Búsqueda bibliográfica

La elaboración de este estudio se basó, en la revisión bibliográfica, los documentos se obtuvieron por medio de bases de datos y repositorios, de acuerdo a la temática basada en análisis morfológico y molecular de *Trichoderma spp*, por lo cual se busca describir las principales características del hongo siguiendo manuales de descripción de estructuras y formas de hongo, así también la identificación a base de un análisis del género y especie para lo cual se seleccionaron los artículos entre el periodo 2018-2023 así también a base de toda esta información se realizara la discusión de resultados. Se buscará los artículos científicos que aportaron resultados sobre la identificación morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, como controlador biológico, se detallara en forma exacta las principales características por medio de una información seleccionada para facilitar la comprensión lectora y sea de fácil acceso para futuras investigaciones.

10.2. Descriptivo

La verificación y observación detallado de las características físicas del hongo, como su morfología, y su composición genética y molecular, es esencial. Esto incluye la identificación y descripción de la forma, tamaño, color y estructuras del hongo, así como la determinación de su identidad genética y, posiblemente, su variabilidad genética a nivel molecular. La presente investigación es netamente de laboratorio en base a la reactivación de *Trichoderma spp.* nativo de acuerdo a su caracterización molecular por medio de PCR y análisis bioinformático.

10.2.1. Ubicación de la experimentación

El análisis de campo de la presente investigación se ejecutó en el laboratorio de la UTC, campus Salache, el cual está en el perímetro rural cantón Latacunga, además, se ubica al suroeste de la cabecera cantonal, al lado de E35 en el km 7,53 vía Salache a 2,870 msnm

Imagen 1. Laboratorio de agronomía Universidad Técnica de Cotopaxi.



Fuente: (Google Earth pro, 2024).

10.2.2. Materiales y equipos

A continuación, se dará a conocer a detalle los materiales y equipos que se utilizaron en la presente investigación.

10.2.3. Material biológico

El material biológico empleado en la investigación realizada se obtuvo del aislamiento realizado por Chacha (2022) en el cual recopiló el material de *Trichoderma* spp. Nativo.

10.2.4. Equipos de laboratorio

- Microscopio
- Autoclave
- Balanza digital
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Asa microbiológica
- Bisturí
- Lámpara de alcohol

- Porta y cubre objetos
- Pinzas
- Vasos de precipitación.
- Frascos para autoclave
- Micro pipetas

10.2.5. Insumos de laboratorio

- Cepas de hongos benéficos
- Agar PDA gr
- Alcohol al 96 % ml
- Agua destilada
- Azul de metileno

10.2.6. Material general

- Mandil
- Cofias
- Mascarillas
- Guantes de látex
- Papel absorbente 50 x 50
- Cinta parafilm
- Jeringuilla ml
- Papel aluminio
- Cajas Petri

10.3. Manejo específico del experimento

El proyecto de investigación se inicia reactivando el *Trichoderma spp*, que se encontraba en el laboratorio de la UTC.

10.3.1. Métodos de multiplicación.

Para la multiplicación, se utilizó un bisturí esterilizado para realizar un corte cuadrado en el hongo, el cual se transfirió a otra caja Petri con una cantidad de 7,8 g de medio nutritivo. Este método permitió generar nuevas colonias del hongo y purificar la cepa para su análisis molecular en laboratorio (Troya & Vaca, 2014).

Además, se empleó una varilla de inoculación o aza de siembra fogueado y esterilizado para tomar las estructuras del hongo de la placa madre de Petri y luego transferirlo a una nueva caja Petri con medio nutritivo. Este procedimiento tenía como objetivo obtener nuevas colonias del hongo y purificar la cepa para su posterior análisis en laboratorio se desliza el asa sobre el agar. Si se dispone de un aislamiento puro, se deja que el hongo esporule y luego se coloca un pequeño fragmento o porción del hongo sobre el bisel (Jamauca Lopez, 2023).

Por último, el investigador utilizó un tercer método que se trata de una multiplicación con hisopo esterilizado para raspar el hongo de la placa madre de Petri y posteriormente transferirlo a otra caja Petri con medio de cultivo. El propósito de esta práctica fue levantar nuevas colonias del hongo y purificar la cepa para su posterior cultivo y análisis experimental.

10.3.2. Activación del *Trichoderma spp*, nativo en cajas Petri.

1. Se van a preparar 10 cajas Petri de vidrio, donde se procedió a pesar una cantidad de PDA (Papa Dextrosa Agar) con una cantidad de 7,8 gr para cantidad de agua destilada de 200 ml.
2. Se procede a colocar en un envase de vidrio de 400 ml la mezcla de PDA con el agua destilada el cual se lo agita para obtener una mezcla homogénea a continuación las 10 cajas Petri de vidrio se las cubre con papel aluminio para esterilizar en la autoclave por 35 minutos y 120 °C v 1 atmosfera de presión transcurrido el tiempo se los deja enfriar las cajas Petri y también el medio de cultivo.
3. También se utilizó alcohol al 96% realizando la limpieza higiénica y de agentes contaminantes de la cámara de flujo laminar para su posterior uso.
4. Verificamos que las cajas Petri y el medio de cultivo PDA estén frías las trasladamos a la cámara de flujo laminar, también colocamos papel Parafilm aza microbiológica, bisturí.
5. Se colocó una cantidad promedio de PDA en cada caja Petri, el cual dejamos reposar hasta que se solidifique.
6. Se hizo pequeños cortes de (0,5 x 0,5 cm), utilizando una hoja de bisturí en la caja madre de *Trichoderma spp*, nativo y después colocamos en cada caja Petri sembrando cada una de ellas.
7. Luego sellamos cada caja Petri con papel Parafilm para que estos no se contaminen y a lo cual los llevamos a la incubadora con una temperatura de 27 grados centígrados y una humedad de 50% ambiente.

8. En el transcurso de 4 a 5 días volvemos a realizar nuevas cajas Petri hasta obtener *Trichoderma spp*, nativo purificado.

10.3.3. Aplicación de Antibiótico

El uso adecuado de antibióticos en el cultivo de hongos benéficos, es crucial para garantizar la pureza de las cepas y la precisión en los análisis subsecuentes, dado que inhibe el crecimiento de bacterias contaminantes sin afectar el desarrollo del hongo, permitiendo así la obtención de cultivos puros, bloqueando la síntesis de proteínas en las bacterias, lo que impide su reproducción y garantiza que sólo el hongo beneficioso prospere en el medio de cultivo (Devi et al., 2023).

Después de la esterilización, se puso gentamicina al medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una concentración de 50 µg/mL, esto con el propósito de asegurarse de la eliminación de cualquier contaminante residual, el medio de cultivo fue repartido en viales de vidrio y re-sterilizado en una autoclave después de haber sido preparado y enfriado. Anteriormente desinfectadas con 96% de alcohol, las muestras de *Trichoderma spp*. se inocularon en bandejas de Petri que contenían el medio de cultivo que contenía Gentamicina en una cámara de flujo laminar. Los platos de Petri fueron sellados con papel parafilm para evitar la contaminación externa e incubados a 27°C con un 50% de humedad durante cinco días. La eficacia de la gentamicina en la purificación de las cepas se confirmó posteriormente mediante una observación microscópica que confirmó la ausencia de contaminantes bacterianos.

10.3.4. Obtención de *Trichoderma spp*. Nativo

1. Se empezó verificando la calidad de *Trichoderma spp*, nativo en cada una de las cajas Petri y se hace una observación microscópica con el uso de un cubre y porta objetos y una cantidad de azul metileno en el cual observamos la cantidad de desarrollo de nuestro hongo benéfico.
2. Procedemos a seleccionar las mejores cajas en las cuales el *Trichoderma spp*, nativo esté ocupando todo el espacio de la caja Petri para su posterior análisis y determinación de género y variedad mediante el proceso de extracción PCR y conteo molecular masivo.

10.3.5. Extracción de ADN de la muestra para realizar la identificación molecular de *Trichoderma* spp y protocolo.

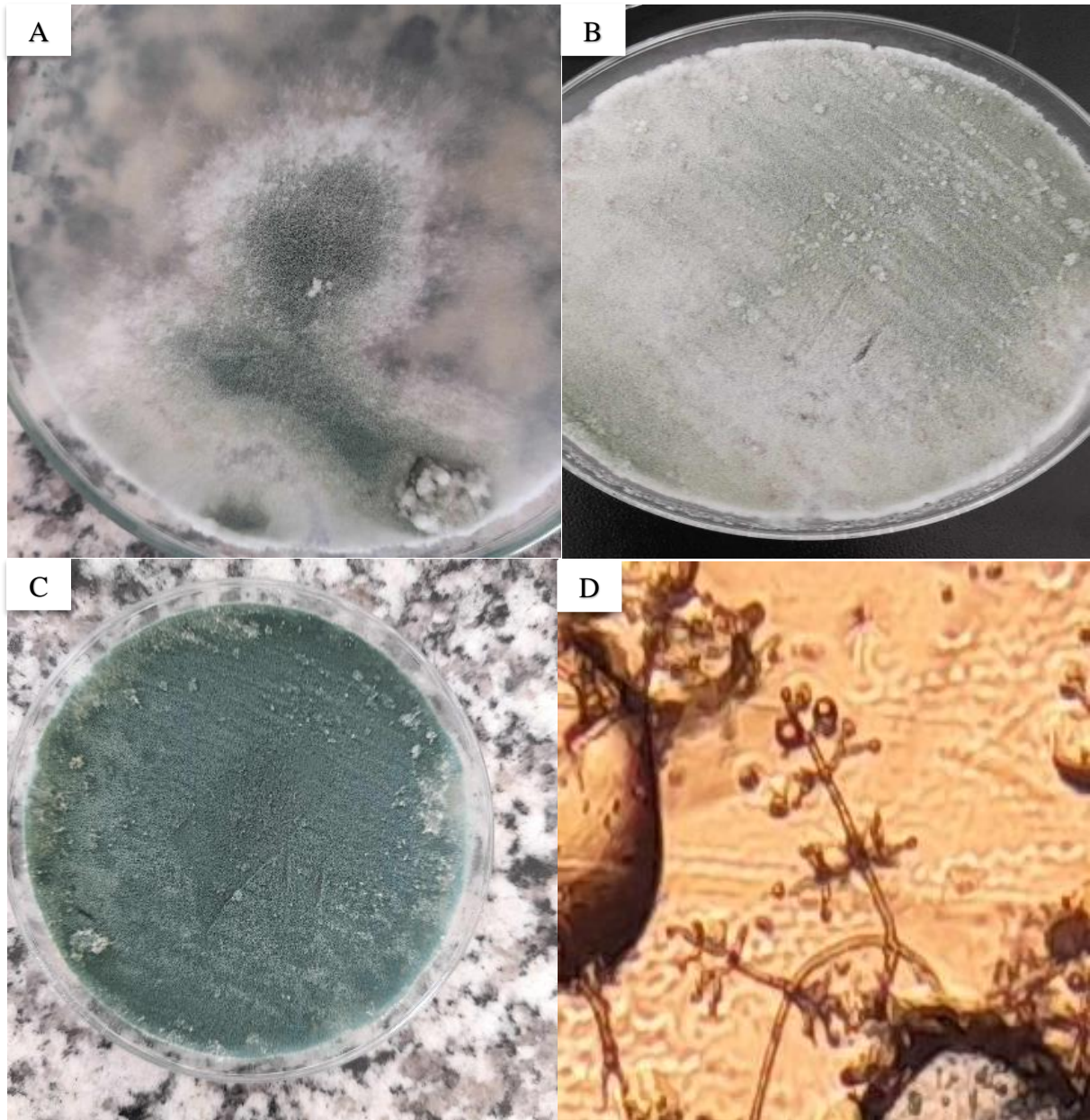
Para realizar el análisis correctamente, es importante asegurarse de que el hongo benéfico no tenga más de 5 días desde su siembra. Esto se debe a que el hongo no debe encontrarse en proceso de esporulación, ya que esta condición puede obstaculizar o demorar la extracción de PCR y el análisis molecular masivo. Estas cajas Petri seleccionadas fueron trasladadas al laboratorio de BIOHACK UOI, donde se realizó la identificación molecular por meta genómica donde se determinará la especie de *Trichoderma* spp, el cual se encuentra en el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía en la UTC.

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1. Interpretación morfológica, de *Trichoderma* spp.

11.1.1. Observación macroscópica de la cepa de *Trichoderma*, spp.

Imagen 2. Observación macroscópica de la cepa de *Trichoderma*, spp.



Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024).

Imagen 2.- Estructuras macroscópicas y microscópicas *Trichoderma* spp. A) Micelio a los 2 días de conservación, formación de anillos. B) Formación de conidióforos. C) Crecimiento en el medio. D) Presenta una ramificación piramidal con sus partes características.

Desarrollo por días.**Crecimiento del hongo día 2.**

Basándome en los estudios de morfología por Espinoza Castro et al. (2023), ratifico que la cepa de *Trichoderma spp*, presenta crecimiento radial con presencia de micelio, e hifas hialinas

Crecimiento del hongo día 3.

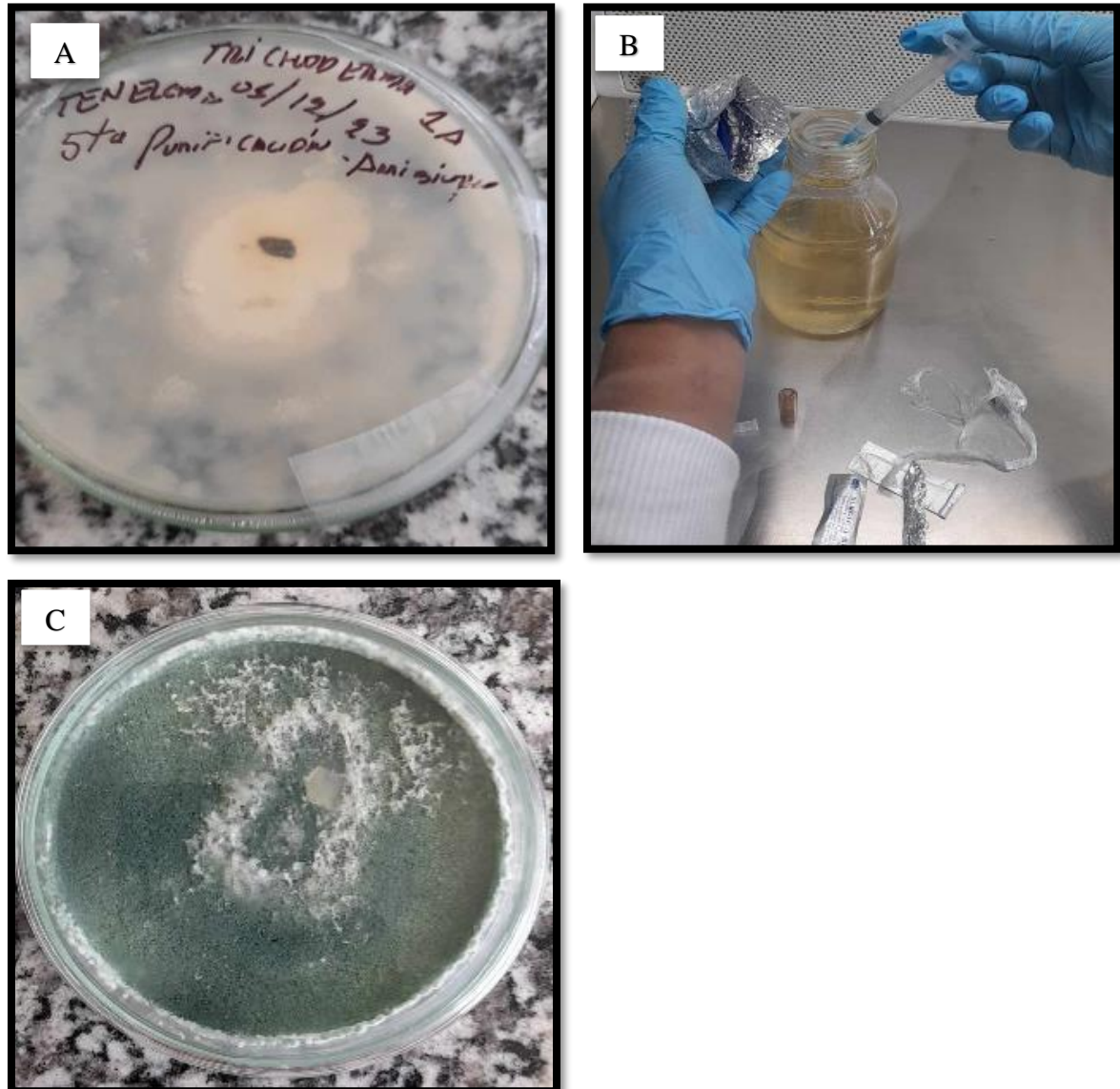
Según los estudios de (Marchuk Larrea et al., 2024). Ratifico que mi hongo creció y se adaptó a medio de cultivo sólido PDA., mostrando características morfológicas como un anillo concéntrico y la pigmentación del micelio, varían según la especie y el medio también se observó un estado incoloro o verde amarillento.

Crecimiento del hongo día 6.

La temperatura utilizada en la *Trichoderma spp*, donde ratifico que la cepa en aislamiento específico puede tolerar temperaturas hasta 25°C 30°C, Esto indico que la temperatura ideal para el crecimiento no siempre coincide con la temperatura óptima para la actividad antagónica, y que existe relación entre aislamiento, antagonismo y temperatura ratificando (Martínez et al., 2013). Posterior a los seis días de crecimiento, todas las colonias tomaron su color verdoso con fialides desarrolladas con conidios, esto, debido al proceso de esporulación (Afuya, 2010).

11.1.2. Uso de antibiótico.

Imagen 3. Comparación de cepas contaminadas y puras de *Trichoderma spp.*



Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024).

Cepas de *Trichoderma spp* para purificación y multiplicación, A) *Trichoderma spp*, contaminado con bacterias. B) Uso de Gentamicina (antibiótico), en el medio de cultivo. C) *Trichoderma spp*, purificado sin presencia contaminación.

Basándome en el estudio de Mosquera et al. (2020) aplique el antibiótico ya mencionado y ratifico que se controló la presencia de bacterias con la incorporación de (Gentamicina) con dosis de 1ml por 200 ml de PDA. Esto proceso de purificación es necesario para el análisis de laboratorio ya que se necesita una cepa pura y con un tiempo de 2 a 3 días para la extracción de ADN.

11.1.3. Observación microscópica de la cepa *Trichoderma spp.*

Para el siguiente proceso de observación e identificación del hongo que se cultivó en el laboratorio de la UTC en fecha de (10/01/2024), este se incubó por 6 días a una temperatura de 26 °C.

Tabla 3. *Equipos de Laboratorio.*

Equipo	Marca	Modelo	Cantidad
Microscopio	OLYMPUS	CX31RBSFA	1

Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024).

Aplicando el siguiente proceso del hongo de *Trichoderma spp.*, aislado y con el uso de una varilla de inoculación se hizo un raspado dentro de la caja Petri que seleccionamos y con el cual contaminamos un portaobjeto y le colocamos azul de metileno y cubrimos con un cubreobjetos, el cual se colocó en el microscopio utilizando un lente objetivo de (20x/0.40Ph1), donde observamos y analizamos la estructura y su formación de crecimiento en la caja Petri.

De acuerdo al estudio de, Carreño y Sánchez (2020), así como Martínez (2020) ratifico que la Gentamicina permitió obtener un hongo purificado, donde se observó bajo microscopio la estructura morfológica propios de esta especie. A su vez, demuestro que la aplicación de antibiótico inhibió la formación de bacterias, donde se desarrolló solo la cepa del *Trichoderma spp.*, a purificar, como indica Mosquera et al. (2020), por lo que se concuerda con los autores.

11.1.4. Identificación morfológica de *Trichoderma spp.*

En la siguiente imagen se observa las principales estructuras de *Trichoderma spp.*, avistados en el microscopio.




Imagen 4. Observación de las partes de *Trichoderma spp*, en microscopio.



Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024).

En la Tabla 3, se observa la descripción morfológica de las partes de *Trichoderma spp*, así como la imagen microscópica. En esta caracterización se evidenció la presencia de Fiálide, Conidios y Conidióforos.

Tabla 4. Caracterización morfológica de *Trichoderma* spp, revisión en microscopio.

Partes Trichoderma spp.	Descripción morfológica	Imagen microscópica
Fiálide	<p>Morfología: Pequeñas estructuras cilíndricas o globulares.</p> <p>Dimensiones: Longitud de aproximadamente 5-10 micrómetros.</p> <p>Características: Pueden estar solas o formar racimos en los conidióforos.</p>	
Conidios	<p>Morfología: Son de forma ovalada se los puede comparar con un huevo.</p> <p>Dimensiones: de 2-4 micrómetros.</p> <p>Características: Producidas en grandes cantidades en conidióforos además son responsables de la dispersión de esporas.</p>	
Conidióforo	<p>Morfología: Filamentos alargados y delgados.</p> <p>Dimensiones: Longitud variable dependiendo de la especie, típicamente entre 10-100 micrómetros.</p> <p>Características: Sostiene las fiálides y los conidios, proporcionando una estructura para la formación y liberación de esporas.</p>	

Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024)

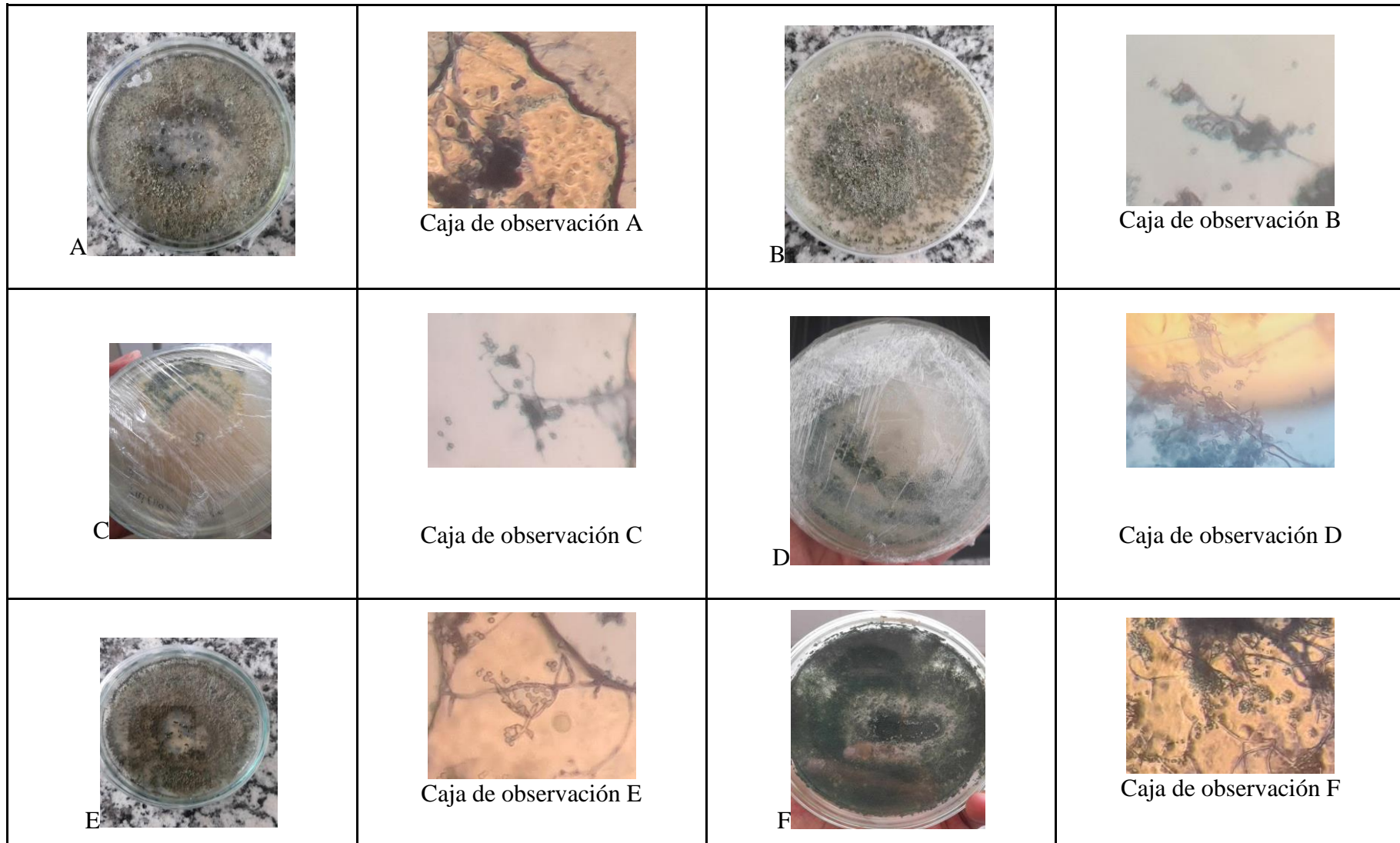
El resultado de la caracterización morfológica de *Trichoderma* spp, develó que las partes de esta son la fiálide, conidios y conidióforos.







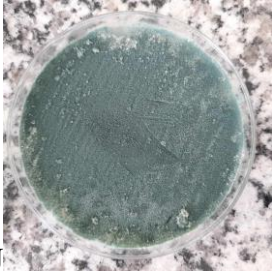
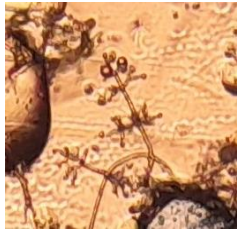
Es así que en el microscopio OLYMPUS - CX31RBSFA se observó lo siguiente:

- Fialides: Según,(Aroca et al., 2004) se visualizo fíalides individuales, con forma de matraz, presentaron una base más o menos cilíndrica y estrechándose de manera abrupta hacia el extremo.

- Hifas: *Trichoderma spp*, se ratifica la presencia de hifas septadas, divididas por tabiques llamados septos, son delgadas y ramificadas, y forman una red característica que se extiende en todas direcciones de acuerdo con Leiva-Mora et al. (2023) las hifas de *Trichoderma spp*, presentan la estructura separada.
- Color y textura: Las hifas que se visualizaron de *Trichoderma spp* son hialinas (transparentes) con ligero tinte verdoso o amarillento, son propias de esta especie y tienen características propias del hongo también se observó masas de micelio aéreo de textura algodonosa (Espinoza Castro et al., 2023).
- Conidióforos y conidios: Se observó que emergen de las hifas y sostienen los conidios, que son las esporas asexuales de *Trichoderma spp*. tiene una estructura ramificada, y ordenadas en el micelio y se observaron formas esféricas o elipsoidales, y se miraron en cadenas a lo largo de los conidióforosen concordancia con (Manjur & Afiya, 2010).
- Conidióforos en forma de pincel: Como su nombre lo menciona, son alargados y puntiagudos de un extremo, además tienen una cabeza cubierta de conidios y es muy común en ciertas especies del género (Leiva-Mora et al. 2023).
- Micelio denso y crecimiento agresivo: Tiene un crecimiento rápido y además forma micelio denso. A través del análisis se observó como un tapiz filamentoso sobre la superficie del medio de cultivo (Manjur & Afiya, 2010).

Imagen 5. Visualización de (*Trichoderma*, spp), en el microscopio.



 <p>G</p>	 <p>Caja de observación G</p>	 <p>H</p>	 <p>Caja de observación H</p>
 <p>I</p>	 <p>Caja de observación I</p>	 <p>J</p>	 <p>Caja de observación J</p>

Elaborado por: (Tenelema Cristian, 2024)

De acuerdo al estudio de Savín et al. (2021) se hizo una visualización general para ratificar la presencia de *trichoderma spp*, corroborando la presencia de características morfológica de la cepa cepa aislada donde con el uso de un microscopio compuesto del laboratorio de la UTC, (OLYMPUS CX31RBSFA), se encontraron hifas, fiálides agrupadas en forma globulares, y conidios elipsoides en forma de huevo, conidióforos en forma de pincel muy alargados y un micelio muy denso.

11.2. Interpretación análisis molecular.

Esta identificación a nivel de especie se realizó por medio de metagenómica de ampliaciones. De esta manera se logró amplificar la región centrada ITS ITS2, para ello se empleó los primers ITS86F: GTGAATCATCGAATCTTTGAA y ITS4R: TCCTCCGCTTATTGATATGC.

11.3. Extracción de ADN de la muestra

La extracción de ADN se llevó a cabo dentro del laboratorio Biohack Uio Community Lab en función a los protocolos del laboratorio, por lo que, se utilizó el kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System, que está diseñado para tejidos, así como células bacterianas y fúngicas, con un protocolo modificado para obtener el ADN total de la muestra tratada.

Luego de ello, se cuantificó el ADN por medio de un espectrofotómetro de microplacas UV/Vis con lo que, se evaluó los parámetros de calidad del ADN, A260/A280 nm y A260/A230 nm.

Los resultados que se obtuvieron dentro de este análisis mostraron que la relación que existe entre A260/A280 fue de 1,8 y la relación A260/A230 de 2, siendo esto indicadores que la concentración de ADN se encuentre dentro de los parámetros más adecuados para la realización del análisis molecular. Es así que los valores sugieren que existe una óptima concentración de ADN con el ARN y también una baja presencia de solventes empleados en la extracción del material genético. Estos valores son coincidentes con el estudio de Gavilanes et al. (2021), debido a que su estudio establece rangos óptimos de absorbancia para la evaluación de pureza de ADN.

Gavilanes et al. (2021), dentro de su estudio indican que la existencia de una relación superior a 1,6 es aceptable dentro de la pureza de ADN debido a que contaminantes están presentes únicamente en trazas como fenol y proteínas. A la par, los valores que superen 2,1 sugieren la existencia de ARN dentro de la muestra. Por ello la relación, de A260/A280 y A260/A230

fueron de 1,8 y 2, respectivamente, por lo que son óptimos, y un valor menor podría indicar presencia de polisacáridos, así como polifenoles.

Por todo lo antes mencionado, los resultados evaluados por medio de los parámetros de calidad, proporcionan la base sólida para la determinación de la pureza del ADN extraído. Siendo la evaluación de absorbancia un medio para establecer la presencia de contaminantes y garantizar que el ADN es adecuado para análisis posteriores.

11.4. Amplificación de ADN

Las cepas reactivadas de *Trichoderma spp*, que se encontraban almacenadas en el laboratorio de la Carrera de Agronomía fueron amplificadas por medio de secuencias internas transcritas (ITS) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con esto se amplificó regiones de los genes ribosomales, las secuencias son empleadas en los estudios taxonómicos siendo estas las que facilitan una caracterización basada en variaciones tanto de tamaño como de secuencia.

La secuenciación se realizó mediante la tecnología denominada Illumina, se obtuvo como resultado archivos FASTQ demultiplexados, los cuales fueron sometidos a tratamiento bioinformático mediante las librerías: dada2, biostrings y shortread, utilizadas en el programa R. Se utilizó el software cutadapt para la preparación de los datos (eliminación de los primers y todos sus match de las secuencias a analizar). ¡Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos UNITE! Especializada en taxonomía fúngica (disponible en: <https://doi.org/10.15156/BIO/2938067>)

11.5. Secuencias Forward y Reverse

OBSERVACIÓN: “_1” (Lecturas Forward) y “_2” (Lecturas Reverse). El gráfico de perfil de calidad es un mapa de calor con escala de grises de cada punto de calidad en una posición base. Las líneas con tonalidad verde demuestran el puntaje medio de calidad dentro cada posición y las líneas naranjas son los cuartiles de la distribución del puntaje. A su vez, la línea con tonalidad roja indica la proporción escalada de todas las lecturas extendidas hasta esa posición, siendo la calidad considerada si esta es mayor a 30 puntos.

De esta manera todas las lecturas fueron de buena calidad, con lo que la línea roja mostró que la parte importante de las lecturas se adaptaron a 250 NTS de longitud, lo que puede reflejar una longitud de la región ITS amplificada en unos de los taxones de la muestra.

Las lecturas se filtraron dentro de un error máximo de espera de dos ($\text{maxFE} = 2$), eliminando las quimeras, para luego realizar la formación de los Amplicon Sequence Variants (ASV's) para finalmente realizar la asignación taxonómica con un paquete de datos que se deriva de UNITE.

Las tasas de error mostradas para cada transición posible ($A \rightarrow C$, $A \rightarrow G, \dots$), indican con los puntos las tasas de error observada para cada puntuación de calidad. En este caso la línea negra indica tasas de error estimadas luego de la convergencia del algoritmo de Machine Learning. A su vez, la línea roja indica todas las tasas de error esperadas en función a la definición nominal del Q-score. De esta manera las tasas de error estimadas se ajustan a las tasas de observadas, y así estas tasas disminuyen al aumentar la calidad, siendo este resultado el esperado.

11.6. Lecturas procesadas

Total, de lecturas	Lecturas que pasan el control de calidad	% de lecturas que pasan el control de calidad
369713	369713	100%

1. Asignación de Género:

Género	% presencia de lecturas
<i>Trichoderma</i>	100%

2. Asignación de Género y especie

Género/especie	% presencia de lecturas
<i>Trichoderma asperellum</i>	100%

Se concluye la presencia de una sola cepa purificada de género especie: *Trichoderma asperellum*.

De acuerdo a Matas et al.. (2022) En la investigación para identificar una nueva especie de *Trichoderma*, se cultivaron hongos en agar PDA y se caracterizó molecularmente mediante extracción de ADN y comparación de secuencias con GeoBank. Se identificó como

Trichoderma asperellum, confirmando la validez del protocolo de cultivo y secuenciación para determinar el género y especie del hongo.

11.7. Tabla de costos

Con la información recopilada, así como todos los insumos que se emplearon durante el proyecto de investigación, se establecieron la cantidad de materiales

Tabla 5. Costos del proyecto de investigación.

Descripción	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Materiales de laboratorio			
Cajas Petri de cristal	60	2,5	150
Equipo de disección	1	20	20
Guantes quirúrgicos	1	4,5	4,5
Medio de cultivo PDA	1	75	75
Mechero de alcohol	1	5	5
Papel absorbente	3	2,75	8,25
Papel film sellador	1	70	70
Alcohol al 96%	1	10	10
Alcohol al 70%	1	10	10
Tijera	1	1	1
Agua destilada	2	5	10
Papel aluminio	4	2,95	11,8
Asa o varilla de inoculación de cobre	2	20	40
Hisopos	1	2,5	2,5
Palillos	1	50	50
Plástico envolvente	1	5	5
Libreta	1	1,2	1,2
Laminas porta y cubre objetos	4	0,5	2
Hojas de bisturí estéril	10	0,5	5
Frasco graduado con rosca ISO de 500ml	4	10,4	41,6
Reactivos de laboratorio			
Azul de metileno	1	10	10
Equipos de Laboratorio			
Balanza digital	1	1	1
Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA	1	50	50
Microscopio trinocular CX31	1	200	200
Incubadora IN110	1	230	230
Autoclave semiautomática 2540-30 Litros	1	150	150

Camara de flujo laminar mini AURORA con base	1	240	240
Camara digital	1	20	20
Destilador de agua WATERWISE 9000	1	53,47	53,47
TOTAL			944,47

Alimentación y Transporte				
Actividades en laboratorio	Días	Ida	Regreso	Total
Reactivación, purificación y prelación de insumos y materiales	45	2	2	92
	Días	Desayuno	Almuerzo	
Alimentación	45	2,5	2,75	115,25
TOTAL				207,25

Análisis en Laboratorio			
Cepa de Hongo	Unidad	Precio	Total
<i>Trichoderma spp.</i>	1	125	125
TOTAL			125

Presupuesto y gasto final del proyecto	\$ 1276,72
---	-------------------

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

Los impactos que pueden ser generados en los diferentes ámbitos tanto sociales, como ambientales y económicos son los siguientes:

12.1. Impacto social

La cepa nativa de *Trichoderma spp.*, obtenida en el laboratorio de la carrera de Agronomía de la UTC, se clasificó como *Trichoderma asperellum*, por lo que este hongo puede ser empleado como una alternativa en el control de plagas, siendo el principal beneficio que no causa daños al ambiente y salud de la población.

12.2. Impacto ambiental

Los sistemas agrícolas presentan problemas fitosanitarios por lo que se emplean agroquímicos sin un control lo que ocasiona afecciones al ambiente y seres humanos. Este hecho se suscita ante el poco conocimiento de alternativas de agentes biológicos como los microorganismos

siendo estos bio controladores, por ello el uso de *Trichoderma asperellum*, es una alternativa para que no existan estas afecciones y se controlen los problemas relacionados con plagas.

12.3. Impacto económico

La utilización de *Trichoderma asperellum*, como un biocontrolador presenta una gran ventaja para los productores, debido a que el manejo de los cultivos estaría bajo condiciones orgánicas, con lo cual se presentan mayores oportunidades de comercializar sus productos en mercados orgánicos.

13. CONCLUSIONES

Se concluye que, si se pudo determinar las características morfológicas y si se identificó *Trichoderma spp*, nativa con las siguientes evidencias: pequeñas estructuras cilíndricas o globulares, conidios ovalados o en forma de huevo y conidióforos con filamentos alargados y delgados los cuales determinan la presencia de *Trichoderma spp*.

Mediante el análisis de laboratorio realizado en BIOHACK UIO Community con un total de 369713 lecturas que pasaron el control de calidad, se pudo identificar molecularmente que la cepa de hongo pertenece al Género y especie de *Trichoderma asperellum* y ratifico que el proceso funciono como se esperaba.

Se elaboró una tabla de costos del proyecto de investigación para reactivación y purificación así también para la identificación molecular en el laboratorio de (Biohack UIO Community Lab). En donde, se nota un presupuesto muy elevado el cual no puede ser costado por un agricultor pequeño ya que los presupuestos de estudio no son asequibles.

14. RECOMENDACIONES

Estandarizar el protocolo de purificación según el laboratorio que se utilice o el suelo donde se haga el estudio realizado en la presente investigación con lo cual se cuenta con una herramienta normada dentro del laboratorio para obtener cultivos de hongos libres de contaminación.

Realizar más investigaciones de campo utilizando el hongo *Trichoderma asperullum* que tenemos en el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía de la UTC.

Con base en los costos de proyecto, se recomienda que se investiguen métodos más económicos para la realización de la activación, purificación y análisis de identificación de *Trichoderma spp*, ya que con ello puede ser aplicado en estudios tanto locales como nacionales contribuyendo a mejorar el conocimiento de futuros profesionales y también en el campo agrícola.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Acurio Vásconez, Ramiro Daniel; España Imbaquingo, C. K. (2017). VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (*Lolium perenne*) Y TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens*). *La Granja. Revista de Ciencias de La Vida*, 25(1), 53–61.
<https://www.redalyc.org/journal/4760/476051824005/476051824005.pdf>
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. (2019). Antagonism of *Trichoderma* spp. vs fungi associated with wilting of chilli. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259–1272.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Andrzejak, R., & Janowska, B. (2022). *Trichoderma* spp. Improves Flowering, Quality, and Nutritional Status of Ornamental Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415662>
- Aroca, T. S., Piontelli, L. E., & Cruz, C. R. (2004). Case Report: *Trichoderma longibrachiatum* infections in a pediatric patient with peritoneal dialysis. *Boletín Micológico*, 19(4), 499–500. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2004.19.0.289>
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E., & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayan isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomia Mesoamericana*, 30(1), 63–77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Donoso, E., Lobos, G. A., & Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque*, 29(1), 52–57.
<https://doi.org/10.4067/s0717-92002008000100006>
- Espinoza Castro, M. F., Rivera Casignia, Á. M., Rivas Figueroa, F. J., & Leiva Mora, M. (2023). Identification and morphological characterization of fungi associated with damage in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in the province of Chimborazo, Ecuador. *Bionatura*, 8(3). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.14>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Agricultural and biotechnological importance, and fermentation systems for producing biomass and enzymes of industrial interest. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 35(1), 98–112.

- Jamauca Lopez, K. L. (2023). *Bioprospección de funciones promotoras de crecimiento vegetal de aislamientos ambientales de Trichoderma spp.*
<https://hdl.handle.net/10901/27017>
- Lasluisa, M. (2023). “Evaluación de tres concentraciones de *Trichoderma spp.*, nativo como promotor de crecimiento en tres especies hortícolas en el campus Salache – Eloy Alfaro – Latacunga – Cotopaxi 2023.” Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Leiva-Mora, M., Solis, N., Jiménez González, A., & Guerrero Cando, D. A. (2023). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Trichoderma* en la provincia de Tungurahua, Ecuador. *Bionatura*, 8(3), 1–5. <https://doi.org/10.21931/rb/2023.08.03.5>
- Marchuk Larrea, C. N., Benítez Rodas, G. A., Sandoval, W., Arrúa, P., Lopez, H., Guillermo, E., Quintana, S., Fernández, D., & Arrua, A. (2024). *Trichoderma* as biocontrol agent - in focus. *Revista de La Sociedad Científica Del Paraguay*, 29(1), 137–171.
<https://doi.org/10.32480/rscp.2024.29.1.137>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). Revista de protección vegetal. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1–11.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., & Casquero, P. A. (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma spp.* in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00685>
- Medrado, P. H. da S., Graf Junior, A. L., Dos Santos, G. C., Tolentino Júnior, J. B., & Itako, A. T. (2022). Efficiency of different strains of *Trichoderma* on the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium cepivorum*. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 44, 1–9. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v44i1.60072>
- Mesa Vanegas, A. M., Marín Pavas, D. A., & Calle Osorno, J. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma spp.* y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1–13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Quevedo, K. (2022). *Uso de Trichoderma spp. para el desarrollo y crecimiento de tres especies forestales en la parroquia Juan Montalvo del cantón Latacunga.*

- Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., & Alvarado-Marchena, L. (2021). Effect of *Setophoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum*, and *Trichoderma* spp. on in vitro onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield at the field. *European Journal of Plant Pathology*, *160*(1), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02220-z>
- Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., & Mora-Avilés, M. A. (2017). *Trichoderma* spp. native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phitopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. montcalm. *Agrociencia*, *51*(1), 63–79.
- Soto Muñoz, L. (2014). Implementación de técnicas moleculares para la detección y cuantificación del agente de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Departament de Tecnologia d' Aliments*, *c*, 224.
- Troya, C., & Vaca, L. (2014). PROTOCOLO PARA LA REPRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN LABORATORIOS ARTESANALES. *Ministerio de Agricultura y Ganadería, Acuacultura y Pesca*, 1–42. <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/MANUAL-labos-para-web.pdf>
- Umaña-Castro, J., Orozco-Cayasso, S., Umaña-Castro, R., & Molina-Bravo, R. (2018). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, *53*(1), 125. <https://doi.org/10.15359/rca.53-1.7>
- Valiente, M., & Pavone, D. (2013). Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* spp. Por método moleculares. *FARAUTE*, *8*(2), 1–9.
- Zapata-Narváez, Y. A., & Gómez-Marroquín, M. R. (2022). Control of *Sclerotium cepivorum* and growth promotion in garlic (*Allium sativum*) whit antagonist microorganisms. *Agronomia Mesoamericana*, *33*(2). <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.46462>