



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL DE BIOCONTROL
PARA (*Botrytis spp*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del
Título de Ingeniera Agrónoma

Autora:
Chuchuca Chacha Juli Dayana

Tutora:
Toapanta Gallegos Diana Elizabeth

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Chuchuca Chacha Juli Dayana, con cédula de ciudadanía No. 1753649936, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: **“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR PARA (*Botrytis spp.*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”**, siendo la Ingeniera Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, MSc., 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, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 20 de febrero del 2025

Juli Dayana Chuchuca Chacha
CC: 1753649936
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 **CHUCHUCA CHACHA JULI DAYANA**, identificada con cédula de ciudadanía **1753649936** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA 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 **“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL DE BIOCONTROL PARA (*Botrytis spp*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2020 - Marzo 2021

Finalización de la carrera: Octubre 2024 – Marzo 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, MSc.

Tema: **“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL DE BIOCONTROL PARA (*Botrytis spp*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”**

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, **LA 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 **LA 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 **LA 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 **LA 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 **LA 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 20 días del mes de febrero del 2025.

Juli Dayana Chuchuca Chacha

LA CEDENTE

Dra. Idalia Eleonora Pacheco, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR PARA (*Botrytis spp.*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”, de Chuchuca Chacha Juli Dayana, 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, 20 de febrero del 2025

Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, MSc.

CC: 1002749800

DOCENTE TUTORA

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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, la postulante: Chuchuca Chacha Juli Dayana, con el título del Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR PARA (*Botrytis spp.*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”**, 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 realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 20 de febrero del 2025

Lector 1 (presidente)
Ing. Guadalupe de las Mercedes López
Castillo, Mg.
CC: 1801902907

Lector 2
Ing. Mercy Lucila Ilbay, Ph.D.
CC: 0604147900

Lector 3
Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.
CC: 0502409725

AGRADECIMIENTO

A mis amados padres, Rodolfo Chuchuca y Etelvina Chacha, cuyo amor incondicional ha sido el motor que me impulsa a no rendirme. Gracias por cada sacrificio silencioso, por cada noche de desvelo preocupándose por mi bienestar, por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba. Me han enseñado con su ejemplo que el esfuerzo y la perseverancia son la clave para alcanzar los sueños, y este logro también es suyo.

A mi hermana, Andrea mi compañera de vida por estar siempre a mi lado con una palabra de aliento, un abrazo en los días difíciles y una sonrisa en los momentos de alegría. Su amor y apoyo han sido un refugio en este viaje, y su presencia me ha recordado que nunca estoy sola.

A la Ing. Diana Toapanta MSc. y a la Ing. Valentina Arévalo, por su invaluable guía, paciencia y dedicación. Sus enseñanzas no solo han enriquecido mi conocimiento, sino que han dejado una huella en mi formación y en mi corazón. Gracias por inspirarme con su pasión y compromiso, por cada consejo y por confiar en mi capacidad.

A mis docentes, quienes con su esfuerzo y vocación han sido faros en mi camino académico, compartiendo no solo conocimientos, sino también valores y principios que se quedarán conmigo toda la vida.

Juli Dayana Chuchuca Chacha

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios, por ser mi guía brindándome sabiduría, fe y perseverancia para afrontar los desafíos. A mis padres, Rodolfo Chuchuca y Etelvina Chacha por su amor incondicional, sacrificio y apoyo inquebrantable por ser la fuente de mis fuerzas y mi mayor inspiración. A mis hermanos, Andrea y Anthony por su cariño, compañía y palabras de aliento en los momentos difíciles, su presencia ha sido un gran apoyo en este proceso. A mis amigos, por su compañía y por ser un pilar de motivación en este recorrido. Con todo mi corazón les dedico este triunfo.

Juli Dayana Chuchuca Chacha

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR PARA (*Botrytis spp.*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”

Autora:
Chuchuca Chacha Juli Dayana

RESUMEN

La producción de rosas para exportación es una de las principales actividades agrícolas en el Ecuador, en el 2024 se registró un ingreso de aproximadamente 1 015 954 debido a esta actividad. Sin embargo, este cultivo se ve afectado por el hongo fitopatógeno *Botrytis spp.*, que puede llegar a provocar pérdidas en producción de hasta el 30%, lo que resalta la necesidad de innovar estrategias de control para este problema. En este contexto, la presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi, campus Salache, con el objetivo de evaluar hongos con potencial biocontrolador de *Botrytis spp.* en condiciones de laboratorio. Para el desarrollo del estudio se recolectaron 14 muestras de material vegetal en 2 localidades de Cotopaxi (Salache y Toacazo), a partir de estas se obtuvieron 14 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales se seleccionaron 6 para las pruebas de antagonismo, considerando su desarrollo micelial en cultivo in vitro. El potencial biocontrolador de los hongos seleccionados se evaluó con pruebas antagonicas mediante la técnica de cultivos duales, los resultados indicaron que de los 6 hongos endófitos evaluados 3 presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) altos en este caso: *Neurospora crassa*, con un 79,3 %, seguida por *Trichoderma asperellum*, con un 75 %, mientras que *Anulohypoxylon spp.* presentó un 32,3 % en condiciones in vitro. Adicionalmente, se evaluó la resistencia las conidias a la radiación solar de los 3 hongos endófitos con potencial de biocontrol, determinándose que *Neurospora crassa* y *Trichoderma asperellum* lograron un 100 % de germinación tras dos horas de exposición solar. La identificación morfológica se realizó mediante el análisis de estructuras como: micelio, hifas, conidióforos y conidias. Posteriormente, la identificación molecular permitió confirmar que los 3 hongos endófitos con potencial de biocontrol se trataban de *Neurospora crassa*, *Trichoderma asperellum* y *Anulohypoxylon spp.*, esta se llevó a cabo mediante la amplificación de las regiones espaciadoras del transcrito interno (ITS).

Palabras clave: *Botrytis spp.*, PICR, biocontrolador, *Neurospora crassa*, *Trichoderma asperellum*, *Anulohypoxylon spp.*, ITS.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: "EVALUATION OF FUNGI WITH BIOCONTROL POTENTIAL AGAINST (*Botrytis spp.*) UNDER LABORATORY CONDITIONS AT THE TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI 2024-2025"

Author:
Chuchuca Chacha Juli Dayana

ABSTRACT

The production of roses for export is one of the main agricultural activities in Ecuador; in 2024, an income of approximately 1 015 954 was recorded due to this activity. However, this crop is affected by the phytopathogenic fungus *Botrytis spp.*, which can cause production losses of up to 30%, which highlights the need to innovate control strategies for this problem. In this context, the present research was carried out in the Microbiology Laboratory of the Technical University of Cotopaxi, Salache Campus, with the objective of evaluating fungi with biocontrol potential for *Botrytis spp.* in laboratory conditions. To carry out the study, 14 samples of plant material were collected in 2 locations in Cotopaxi (Salache and Toacazo). From these, 14 isolates of endophytic fungi were obtained, of which 6 were selected for antagonism tests, considering their mycelial development in *in vitro* culture. The biocontrol potential of the selected fungi was evaluated through antagonistic assays using the dual culture technique. The results indicated that out of the six endophytic fungi tested, three exhibited high percentages of radial growth inhibition (PICR): *Neurospora crassa*, with 79.3%, followed by *Trichoderma asperellum* with 75%, while *Anulohypoxylon spp.* showed 32.3% under *in vitro* conditions. Additionally, the resistance of conidia to solar radiation was assessed for the three endophytic fungi with biocontrol potential, determining that *Neurospora crassa* and *Trichoderma asperellum* achieved 100% germination after two hours of solar exposure. Morphological identification was performed by analyzing structures such as mycelium, hyphae, conidiophores, and conidia. Subsequently, molecular identification confirmed that the three endophytic fungi with biocontrol potential were *Neurospora crassa*, *Trichoderma asperellum*, and *Anulohypoxylon spp.*, which was carried out through the amplification of the internal transcribed spacer (ITS) regions.

Keywords: *Botrytis spp.*, PICR, biocontrol agent, *Neurospora crassa*, *Trichoderma asperellum*, *Anulohypoxylon spp.*, ITS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDO	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
1.INFORMACION DEL PROYECTO.....	1
2.JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3.BENEFICIARIOS.....	2
3.1. Beneficiarios directos	2
3.2. Beneficiarios indirectos	2
4.PROBLEMÁTICA.....	2
5.OBJETIVOS.....	3
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
6.ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	4
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA TEÓRICA	6
7.1. Familia de las rosáceas.....	6
7.2 Cultivo de rosa	8
7.2.1 Descripción botánica.....	8
7.2.2 Ciclo fenológico del cultivo	9
7.2.2.1 Brotación.....	9
7.2.2.2 Crecimiento vegetativo	9
7.2.2.3 Formación del botón floral	9
7.2.2.4 Desarrollo del botón floral.....	9

7.2.4 Plagas.....	9
7.2.4.1 Áfidos (<i>Macrosiphum rosae</i>)	9
7.2.4.2 Araña Roja (<i>Tetranychus urticae</i>).....	10
7.2.4.3 Trips (<i>Frankliniella occidentalis</i>)	10
7.2.5 Enfermedades producidas por bacterias	10
7.2.5.1 Agalla de la corona	10
7.2.5.2 Marchitez bacteriana	10
7.2.5.3 Pudrición blanda	10
7.2.6 Enfermedades producidas por nemátodos	10
7.2.6.1 Nemátodos de los nudos de las raíces	10
7.2.6.2 Nemátodos foliares	11
7.2.7 Enfermedades producidas por hongos.....	11
7.2.7.1 Moho gris	11
7.2.7.2 Mancha negra	11
7.2.7.3 Mildiu polvoriento	11
7.2.7.4 Roya.....	11
7.3 Generalidades de <i>Botrytis</i> spp	12
7.3.1 Caracterización morfológica.....	12
7.3.1.1 Morfología macroscópica.....	12
7.3.1.2 Morfología microscópica	12
7.3.3 Ciclo biológico	13
7.3.4 Síntomas	14
7.3.5 Signos	14
7.3.6 Control biológico.....	14
7.3.6.1 Uso de microorganismos biocontroladores.....	14
7.3.6.2 Mecanismo de acción de los microorganismos biocontroladores.....	15
7.3.6.2.1 Competencia por espacio y nutrientes	15
7.3.6.2.2 Mico parasitismo.....	15
7.3.6.2.3 Antibiosis.....	15
7.4 Reacción en cadena polimerasas (PCR).....	15
7.5 Espaciador del transcrito interno (ITS1 E ITS4).....	16
7.6 Método de secuenciación por Sanger.....	16
7.7 Análisis bioinformático en NCBI	16

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS.....	16
8.1 Hipótesis afirmativa.....	16
8.2 Hipótesis nula.....	16
9. METODOLOGIA	17
9.1 Tipos de investigación	17
9.1.1 Cualitativa	17
9.1.2 Cuantitativa	17
9.2 Tipo de método.....	17
9.2.1 Experimental	17
9.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	18
9.3.1 Observación directa	18
9.3.2 Comparativa	18
9.4 Localización.....	18
9.5 Origen y aislamiento de hongos	18
9.5.1 Colecta de material vegetal (Fase de campo).....	18
9.5.2 Aislamiento de cepas nativas (Fase de laboratorio).....	19
9.5.3 Purificación de hongos.....	20
9.5.3.1 Técnica dilución en placa	20
9.6 Selección de cepas con capacidad antagónica (Primer ensayo)	21
9.6.1 Pruebas antagónicas.....	21
9.6.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial	22
9.6.3 Análisis estadístico	23
9.6.3.1 Factor en estudio.....	23
9.6.3.2 Variable o parámetro	23
9.6.3.3 Tratamientos	23
9.7 Viabilidad de conidios de las cepas con capacidad antagónica (Segundo ensayo)..	24
9.7.1 Conteo de conidios	24
9.7.2 Prueba de viabilidad de conidios	24
9.7.3 Análisis estadístico	25
9.7.3.2 Factor en estudio.....	25
9.7.3.3 Variable o parámetro	26
9.7.3.4 Tratamientos	26

9.8 Identificación morfológica y molecular de los hongos con capacidad antagónica (Tercer ensayo).....	26
9.8.1 Identificación morfológica	26
9.8.1.1 Observación macroscópica y microscópica	26
9.8.2 Identificación molecular.....	27
9.8.2.1 Extracción de ADN.....	27
9.8.2.2 Amplificación de la región ITS (PCR)	28
9.8.2.3 Secuenciación y análisis bioinformático.....	29
10. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
10.1 Selección de cepas con capacidad antagónica (Primer ensayo)	29
10.1.1 Análisis estadístico.....	29
10.2 Viabilidad de conidias de las cepas con capacidad antagónica (Segundo ensayo) 30	
10.2.1 Análisis estadístico.....	30
10.3 Identificación morfológica y molecular de los hongos con capacidad antagónica (Tercer ensayo)	33
10.3.1 Observación macroscópica y microscópica	33
10.3.2 Identificación de molecular	35
10.3.2.1 Extracción de ADN y cuantificación	35
10.3.2.2 Amplificación de la región ITS (PCR)	36
10.3.2.3 Secuenciación y análisis Bioinformático	37
11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS).....	38
11.1 Impacto social	38
11.2 Impacto ambiental	38
11.3 Impacto económico.....	38
12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
12.1 Conclusiones	38
12.2 Recomendaciones	39
13. BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.	4
Tabla 2: Taxonomía de: Mora silvestre, Capulí, Durazno, Manzana, Margycarpus.	7
Tabla 3: Taxonomía de la Rosa app.	8
Tabla 4: Taxonomía Botrytis spp.	11
Tabla 5. Origen de aislamientos de cepas nativas pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.	19
Tabla 6. Codificación de cepas seleccionadas para realizar pruebas de antagonismo.	21
Tabla 7. Esquema de ADEVA (Primer ensayo).	23
Tabla 8. Tratamientos y su respectiva codificación.	23
Tabla 9. Concentración final de conidios en dosis a $\times 10^8$ (conidias/ml).	24
Tabla 10. Esquema de ADEVA (Segundo ensayo).	25
Tabla 11. Tratamientos con su respectiva codificación.	26
Tabla 12. Preparación master MIX para PCR.	28
Tabla 13. Procedimiento de amplificación de PCR.	29
Tabla 14. ANOVA para la variable Porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR) a los 6 días.	30
Tabla 15. ANOVA porcentaje de germinación de conidias a los 6 días.	31
Tabla 16. Identificación morfológica de hongos con potencial antagónico.	34
Tabla 17. Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One ^c	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aislamiento de <i>Botrytis</i> spp. observado a 20X con microscopio OLYMPUS, mostrando hifas septadas, conidióforos ramificados y conidios ovoides característicos del género.	13
Figura 2. Esquema que muestra el ciclo biológico de <i>Botrytis</i> spp desde la invasión al hospedero.	13
Figura 3. Fotografías de los aislamientos purificados: 1 (MF), 2 (MT), 3 (CaH), 4 (LH), 5 (MH), 6 (MaT), 7 (CaT), 8 (MoT), 9 (LF), 10 (RH), 11 (MoH), 12 (CaF), 13 (DH), 14 (DF).....	20
Figura 4. Cepas seleccionadas para pruebas de antagonismo.	21
Figura 5. Esquema, técnica de cultivo dual.	22
Figura 6. Cultivo de discos con pétalos tratados, en (PDA) Potato Dextrosa Agar.....	25
Figura 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR) evaluado a los 6 días.....	31
Figura 8. Porcentaje de germinación de conidia, evaluados a los 6 días, factor A (Hongos).....	32
Figura 9. Porcentaje germinación de conidias evaluados a los 6 días, factor B (tiempo de exposición solar).....	33
Figura 10. Porcentaje de germinación de conidias evaluados a los 6 días, interacción de factores (A*B)	33
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa muestras de ADN total (RH, MaF y LF).	36
Figura 12, Electroforesis de PCR de las muestras M1 (RH), M2 (MaT) y M3 (LF).....	37

1. INFORMACION DEL PROYECTO

Título del Proyecto:

“EVALUACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR PARA (*Botrytis spp.*) EN CONDICIONES LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2024-2025”

Fecha de inicio:

Abril 2024

Fecha de finalización:

Enero de 2025

Lugar de ejecución:

Universidad Técnica de Cotopaxi

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Carrera de Agronomía.

Proyecto de investigación vinculado:

Metabolitos secundarios en defensa de las plantas contra enfermedades y plagas.

Equipo de Trabajo:

Tutora: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, MSc.

Lector 1: Ing. Guadalupe de las Mercedes López Castillo, Mg.

Lector 2: Ing. Mercy Lucila Ilbay, Ph.D.

Lector 3: Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.

Coordinadora del Proyecto:

Nombre: Juli Dayana Chuchuca Chacha

Teléfonos: 0990348608

Correo electrónico: juli.chuchuca9936@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura - Agricultura, Silvicultura y Pesca - Producción Agropecuaria

1.1 Línea de investigación

a. Desarrollo soberanía y seguridad alimentaria

1.2 Línea 1

a. Producción agrícola sostenible

1.3 Línea de vinculación

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

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La *Botrytis spp.* conocida también como podredumbre gris, es un fitopatógeno que crea problemas en varios cultivos hortícolas, entre unos de estos se encuentra el de las rosas, teniendo un mayor impacto en el área de poscosecha, ataca principalmente tallo y pétalos (Amaya, 2021).

En el manejo químico convencional se ven reflejados problemas relacionados con la resistencia a dicho patógeno, el impacto negativo ambiental, al igual que los riesgos para la salud humana (Palomino & Ccoa, 2022). Por ello, se plantea la necesidad de buscar alternativas sostenibles y amigables con el ambiente, como es el uso de hongos con potencial de biocontrol o antagonistas. Los mismos que pueden ofrecer ventajas significativas como la reducción del uso de agroquímicos y conservar la calidad de las flores en el proceso de poscosecha.

3. BENEFICIARIOS

3.1. Beneficiarios directos

Los beneficiarios directos de este proyecto son los 320 estudiantes de la carrera de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ya que los resultados obtenidos de la investigación, pueden ser tomados como referencia para futuras investigaciones que planteen estrategias innovadoras para el manejo de *Botrytis spp.*, en un enfoque más sostenible y eficiente que responda a las demandas del sector agrícola y ornamental.

3.2. Beneficiarios indirectos

Los beneficiarios indirectos, son los investigadores, los 449 productores a pequeña y gran escala de rosas (Chavarro, 2021), quienes podrían utilizar los resultados obtenidos como nuevas herramientas y enfoques para el desarrollo de estudios relacionados con el control biológico de patógenos a partir de microorganismos.

4. PROBLEMÁTICA

La floricultura es una actividad agrícola de alto valor económico que se posiciona como un pilar fundamental en varios países. A nivel mundial, la demanda de flores frescas ha mostrado un crecimiento constante debido a su importancia en eventos sociales, decoración y la industria cosmética. Países como Colombia, Kenia y Ecuador lideran la producción de flores de alta calidad, siendo los principales exportadores hacia mercados como Estados Unidos, Europa y Asia. Dentro de este sector, las rosas destacan por su participación significativa, representando más del 50 % de las exportaciones de flores cortadas (Castro-Acosta et al., 2024).

Ecuador, en el 2024 alcanzó un volumen de exportación que supera las 200 toneladas generando ingresos de aproximadamente 1 015 954 (BCE, 2025). Sin embargo, la incidencia de *Botrytis spp.* genera pérdidas económicas ya que afecta principalmente las flores y los tallos (Gómez, 2014).

Según indica Chavarro (2021), en Cotopaxi existen 449 productores de rosas, tanto a pequeña como a gran escala. Sin embargo, estos se han visto afectados por la presencia del patógeno *Botrytis spp.* Un caso representativo del impacto de este problema es la finca Continex, la cual destina 62 hectáreas exclusivamente al cultivo de rosas y reporta pérdidas de hasta el 30 % de su producción en la etapa de poscosecha debido a *Botrytis spp.* Para mitigar estas pérdidas, la finca recurre al uso intensivo de fungicidas químicos, con una inversión anual aproximada de 95 000 dólares, lo que permite evitar pérdidas que podrían superar los 85 700 dólares (Amaya, 2021). No obstante, el uso de fungicidas presenta varios inconvenientes, como su alto costo económico, la generación de residuos químicos que afectan el ambiente y la salud de los trabajadores, así como el desarrollo de resistencia en los patógenos, lo que reduce la eficacia de los tratamientos con el tiempo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar hongos con potencial biocontrolador para *Botrytis spp.* en condiciones de laboratorio.

5.2. Objetivos específicos

- Seleccionar aislamientos con capacidad antagónica para *Botrytis spp.* in vitro.

- Evaluar la efectividad de conidios de los aislamientos seleccionados con mayor capacidad antagónica in vitro.
- Caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos con mayor efectividad de antagonismo de *Botrytis* spp. in vitro.

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

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.

OBJETIVO 1	ACTIVIDADES	METODOLOGÍA	RESULTADO
Seleccionar aislamientos con actividad antagónica para <i>Botrytis</i> spp. in vitro.	Captura de cepas nativas en PDA.	<ul style="list-style-type: none"> • Recolección de material vegetal. • Limpieza del material vegetal. • Siembra del material vegetal en PDA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento de 14 cepas nativas con potencial de biocontrol. • Aislamiento de <i>Botrytis</i> spp. • Fotografías
	Selección cepas nativas para pruebas antagónicas.	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicación y purificación cepas obtenidas. • Clasificación de cepas a partir de características como el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Selección de 6 cepas nativas con mejores características para bioensayos. • Fotografías.
	Implementación de bioensayo: DCA con 6 tratamientos (hongos seleccionados) y 5 repeticiones.	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de antagonismo con un total de 30 unidades experimentales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Un diseño experimental bien planificado y llevado a cabo de manera correcta lo que facilito la realización del análisis estadístico y la comprensión de los resultados obtenidos.
	Toma de datos	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno a los 6 	<ul style="list-style-type: none"> • Excel con datos tomados • Cuadros estadísticos

		días de incubación a 25 °C.	<ul style="list-style-type: none"> • Diagrama de barras • Fotografías
OBJETIVO 2	ACTIVIDADES	METODOLOGÍA	RESULTADO
Evaluar la viabilidad de conidios de los aislamientos seleccionados con mayor capacidad antagónica in vitro	Ajuste de dosis de conidios a $\times 10^8$.	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicación de cajas para obtener conidios. • Diluciones con agua destilada estéril. • Conteo de conidios de las diluciones con cámara de Neubauer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dosis ajustada a $\times 10^8$.
	Implementación de bioensayo: diseño completamente al azar con interacción de factores (a x b), con 3 tratamientos (hongos con mayor capacidad de biocontrol para <i>Botrytis spp</i> in vitro), 3 tiempos de exposición solar (0, 1 y 2 horas) y 5 repeticiones.	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de viabilidad de conidios con un total de 45 unidades experimentales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Un diseño experimental bien planificado y llevado a cabo de manera correcta lo que facilitó la realización del análisis estadístico y la comprensión de los resultados obtenidos.
	Toma de datos	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de germinación de conidios después de estar expuesto a condiciones ambientales adversas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Excel con datos tomados • Cuadros estadísticos • Diagrama de barras • Fotografías
OBJETIVO 3	ACTIVIDADES	METODOLOGÍA	RESULTADO
Caracterizar morfológica y molecularmente e aislamientos con mayor	Descripción morfológica de los hongos.	<ul style="list-style-type: none"> • Observación macroscópica y microscópica de los hongos estudiados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fotografías • Descripción de colonias y estructuras • Fotografías

capacidad de antagonismo de <i>Botrytis</i> spp. in vitro			
	Identificación molecular de los hongos.	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de ADN, adaptado a las condiciones específicas del laboratorio de la Carrera de Ingeniería Agronómica. • Amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 4 de los hongos mediante la técnica de PCR. • Secuenciación y cuantificación del ADN de las cepas de hongos en la empresa IDgen. • Se llevó a cabo el análisis bioinformático. 	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación a nivel de especie de los tres hongos. • Fotografías

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA TEÓRICA






7.1. Familia de las rosáceas

La familia Rosaceae es una de las familias más importantes dentro del orden Rosales, compuesta por aproximadamente 90 géneros y más de 3 000 especies de plantas distribuidas principalmente en regiones templadas del hemisferio norte (Rzedowski, 2021). Según indica, Romoleroux, (2017), en Ecuador se han identificado 11 géneros y 70 especies nativas, la mayoría de las cuales se encuentran en la región altoandina, a más de 2500 msnm.

Sus miembros incluyen hierbas, arbustos y árboles, caracterizados por hojas alternas, simples o compuestas, frecuentemente estipuladas con estructuras a modo de pequeñas hojas en la base del pecíolo (Zardini, 1993). Las flores son actinomorfas (simétricas radialmente), hermafroditas, generalmente con 5 sépalos y 5 pétalos libres, dispuestos en espiral o verticilos. El androceo está formado por numerosos estambres y el gineceo varía entre apocárpico (carpelos libres) o sincárpico (carpelos fusionados). Los frutos

incluyen tipos como drupas, aquenios, pomos, folículos y agregados (Rzedowski & Calderón, 2005). Algunas de las plantas de esta familia con las que se trabajaron durante la investigación se detallan a continuación en la (Tabla 2):

Tabla 2: Taxonomía de: *Mora silvestre*, *Capulí*, *Durazno*, *Manzana*, *Margycarpus*.

Taxonomía	Fotografía
Mora silvestre	
Reino: Plantae	
División: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Orden: Rosales	
Familia: Rosaceae	
Género: <i>Rubus</i>	
Capulí	
Reino: Plantae	
División: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Orden: Rosales	
Familia: Rosaceae	
Género: <i>Prunus</i>	
Durazno	
Reino: Plantae	
División: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Orden: Rosales	
Familia: Rosaceae	
Género: <i>Prunus</i>	
Manzana	
Reino: Plantae	
División: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Orden: Rosales	
Familia: Rosaceae	
Género: <i>Malus</i>	
Margycarpus	
Reino: Plantae	
División: Magnoliophyta	
Clase: Magnoliopsida	
Subclase: Rosidae	
Orden: Rosales	
Familia: Rosaceae	

Género: *Malus*

7.2 Cultivo de rosa


7.2.1 Descripción botánica

Hay más de 100 especies y miles de variedades cultivadas. Los rosales son plantas leñosas perennes. Según la especie o variedad, pueden crecer como arbustos compactos, trepadores o incluso pequeños árboles (Heussler, 1991). Tienen un sistema radicular pivotante con raíces secundarias extendidas, además son profundas y bien desarrolladas (Yong, 2004). Su tallo es leñoso, con espinas de distintos tamaños, que son modificaciones de la epidermis para protección, puede ser erecto o trepador, dependiendo de la variedad; su color varía de verde a marrón rojizo en las partes más jóvenes (Martinez, 2005).

Sus hojas son compuestas y alternas, con 3 a 7 folíolos, los mismos suelen ser de color verde oscuro brillante en la parte superior y más pálidos en la inferior, sus bordes son dentados y una textura coriácea o ligeramente rugosa (Ayala, 2010). Sus flores son variadas en tamaño, forma y color son completas, tienen todos los órganos florales, con un cáliz de 5 sépalos, una corola de múltiples pétalos, numerosos estambres y carpelos. Además, pueden ser simples o dobles (Gostinchar, 1954).

Tabla 3: *Taxonomía de la Rosa app.*

Taxonomía	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Género:	<i>Rosa</i>



7.2.2 Ciclo fenológico del cultivo

7.2.2.1 Brotación

Esta fase tiene una duración de entre 7-10 días. Inicia con la activación de las yemas latentes, después la brotación puede ser estimulada por podas o renovación del follaje y por último aparecen los primeros brotes verdes en las ramas. Necesitan de una temperatura óptima de 17-25 °C, además de una poda eficiente para eliminar tallos viejos. (Yong, 2004).

7.2.2.2 Crecimiento vegetativo

Esta etapa necesita entre 15-25 días para llevarse a cabo. Comienza con el crecimiento activo de los brotes y formación de hojas, después el tallo empieza a alargarse progresivamente y por últimos se desarrolla el sistema foliar, esencial para la fotosíntesis. Esta fase necesita de buena iluminación (mínimo 12 horas diarias), nutrición adecuada, especialmente nitrógeno y potasio al igual que una humedad relativa entre 70-85% (Yong, 2004).

7.2.2.3 Formación del botón floral

Esta etapa tiene una duración de entre 15-20 días. Aquí se reduce el crecimiento vegetativo y las plantas concentran energía en la formación del botón floral, además el tamaño y la calidad del botón dependen del manejo hídrico y nutricional. En esta etapa se debe realizar una aplicación balanceada de nutrientes como fósforo y calcio (Calvache, 2017).

7.2.2.4 Desarrollo del botón floral

Esta fase tiene una duración de 20-25 días. En el cual el botón aumenta de tamaño y se define su forma, además se observa la coloración inicial en las variedades pigmentadas. Por ultimo los pétalos se compactan dentro del botón, preparándose para la apertura. En esta etapa se deben evitar temperaturas extremas (<10 °C o >30 °C) para prevenir enfermedades como *Botrytis spp.* (Martinez, 2005).

7.2.4 Plagas

7.2.4.1 Áfidos (*Macrosiphum rosae*)

Son pequeños insectos de color verde, negro o amarillo que suelen agruparse en los brotes tiernos, tallos y capullos de las rosas. Se alimentan de la savia, debilitando la planta. Además, segregan una sustancia pegajosa que favorece la aparición de hongos como la fumagina (Martínez, 2005).

7.2.4.2 Araña Roja (*Tetranychus urticae*)

Un ácaro diminuto, de color rojo o marrón, que se encuentra en el envés de las hojas. Es más problemático en climas cálidos y secos. Se alimenta de las células de las hojas, causando pequeñas manchas amarillas o plateadas. En infestaciones graves, las hojas pueden secarse y caer (Guerrero, 2015).

7.2.4.3 Trips (*Frankliniella occidentalis*)

Pequeños insectos alargados, de color amarillo o marrón, que atacan las flores y hojas. Los trips raspan la superficie de los tejidos para alimentarse, provocando manchas plateadas y deformaciones en los pétalos y hojas (Varón & Monje, 2018).

7.2.5 Enfermedades producidas por bacterias

7.2.5.1 Agalla de la corona

Enfermedad causada por *Agrobacterium tumefaciens*, esta bacteria penetra en las raíces o tallos a través de heridas lo que provoca el desarrollo de tumores (bultos) en las raíces y la base del tallo. Estos interfieren con el transporte de agua y nutrientes, debilitando la planta y reduciendo su vigor (Hope, 2016).

7.2.5.2 Marchitez bacteriana

Enfermedad causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, esta coloniza los vasos conductores de la planta, bloqueando el flujo de agua y nutrientes, lo que provoca marchitez progresiva y, eventualmente, la muerte de la planta (Ayala, 2010).

7.2.5.3 Pudrición blanda

Enfermedad causada por la bacteria *Erwinia spp*, esta descompone los tejidos, provocando pudrición húmeda y maloliente en flores, tallos o raíces, provocando el deterioro rápido de la planta de manera que puede extenderse a otras rosas si no se controla a tiempo (Hope, 2016).

7.2.6 Enfermedades producidas por nemátodos

7.2.6.1 Nemátodos de los nudos de las raíces

Con el nombre de *Meloidogyne spp*, estos nematodos microscópicos viven en el suelo y atacan las raíces de las plantas, formando nudos o agallas en ellas. Estas agallas dificultan la absorción de agua y nutrientes, debilitando la planta, lo que reduce el vigor y la producción de flores (Rocha, 2018).

7.2.6.2 Nemátodos foliares

Según indica, Rocha (2018) el *Aphelenchoides spp*, es un nemátodo que viven en el interior de las hojas y se mueven entre ellas a través de la humedad en la superficie. Comúnmente atacan las hojas, causando manchas y necrosis, lo que reduce la capacidad fotosintética de la planta.

7.2.7 Enfermedades producidas por hongos

7.2.7.1 Moho gris

Causado por *Botrytis cinerea*, este hongo ataca principalmente las flores y los brotes jóvenes, cubriéndolos con un moho gris. Es muy común en condiciones de alta humedad. Ocasiona manchas marrones en los pétalos y flores que se marchitan o no abren correctamente (Cabrera et al., 2006).

7.2.7.2 Mancha negra

Causada por *Diplocarpon rosae*, este es uno de los hongos foliares más comunes en rosas. Ataca las hojas, debilitando la planta al reducir su capacidad fotosintética, lo que provoca una defoliación prematura, disminuyendo el vigor de la planta y afectando la floración. Se presenta como manchas negras redondeadas en las hojas, con bordes amarillos (Ayala, 2010).

7.2.7.3 Mildiu polvoriento

Causado por *Podosphaera pannosa*, este hongo produce un polvo blanco en hojas, tallos y capullos, es muy visible y se propaga rápidamente. Afecta el crecimiento de brotes jóvenes, causando deformaciones y reduciendo la calidad de las flores (Yong, 2004).

7.2.7.4 Roya


Causado por *Phragmidium mucronatum*, este hongo forma pústulas de color naranja o amarillo en la parte inferior de las hojas, causando debilitamiento en la planta, esto reduce la capacidad fotosintética, provocando defoliación prematura (Panjón & Vintimilla, 2008).

7.3 Generalidades de *Botrytis spp*

Es un hongo fitopatógeno perteneciente a la familia Sclerotiniaceae y es conocido por causar una enfermedad llamada moho gris. Este hongo es uno de los patógenos más destructivos en una amplia gama de cultivos agrícolas y ornamentales, especialmente en condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas (Elad et al., 2007).

Tabla 4: Taxonomía *Botrytis spp*.

Taxonomía	
Reino:	Fungi
División:	Ascomycota



Subdivisión:	Pezizomycotina
Clase:	Leotiomycetes
Orden:	Helotiales
Familia:	Sclerotiniaceae
Género:	<i>Botrytis</i>

7.3.1 Caracterización morfológica

7.3.1.1 Morfología macroscópica

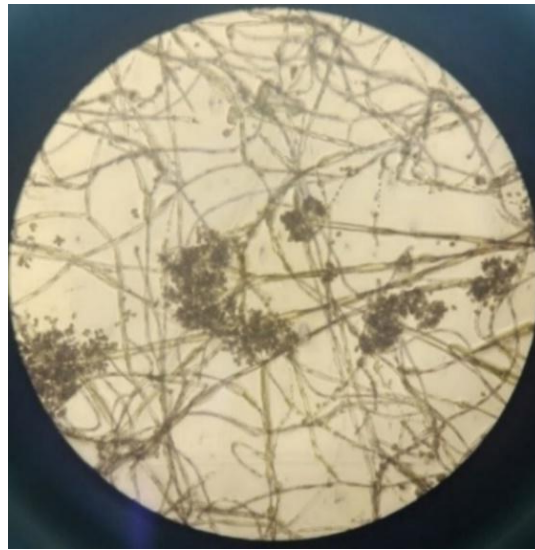
Las colonias en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) se puede observar con un color que varía de blanco algodonoso en estadios iniciales a gris oscuro o marrón cuando el hongo produce conidios, tiene una textura algodonosa o lanosa en el centro con bordes más delgados (Muñoz, 2008).

7.3.1.2 Morfología microscópica

Según Elad et al. (2007), el hongo fitopatógeno *Botrytis spp.* presenta las siguientes características morfológicas microscópicas:

- Hifas hialinas y septadas, que con el tiempo adquieren un color marrón claro. Estos presentan un diámetro de entre 5 y 10 μm .
- Conidióforos largos y ramificados, con un ensanchamiento en el ápice. Su tamaño varía entre 300 y 1000 μm de longitud y entre 5 y 10 μm de diámetro.
- Conidios unicelulares, hialinos y grisáceos, con forma ovoide. Su tamaño oscila entre 6 y 12 μm de longitud y entre 4 y 9 μm de ancho.

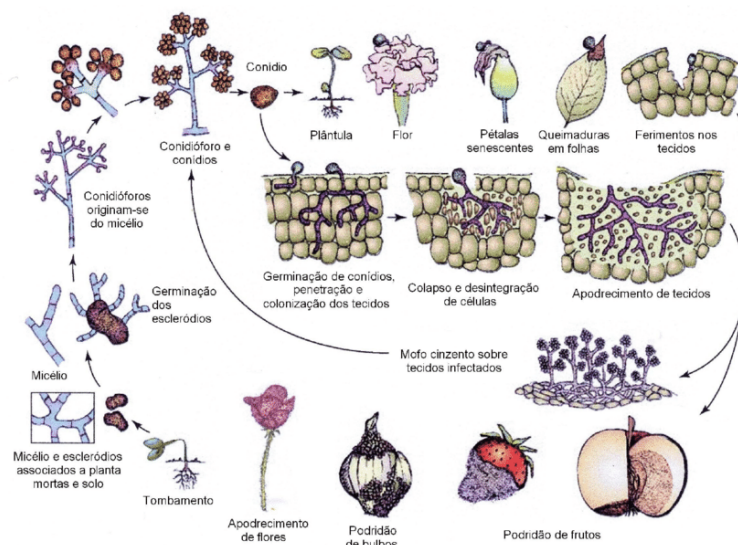
Figura 1. Aislamiento de *Botrytis spp.* observado a 20X con microscopio OLYMPUS, mostrando hifas septadas, conidióforos ramificados y conidios ovoides característicos del género.



7.3.3 Ciclo biológico

Su ciclo biológico inicia con la supervivencia en esclerocios o como saprofito, seguido por la dispersión de conidios por viento, agua o contacto. La infección ocurre a través de heridas o estomas, facilitada por enzimas y toxinas. Una vez dentro del hospedante, coloniza los tejidos y produce nuevos conidios, cerrando el ciclo. Su control requiere estrategias integradas debido a su alta capacidad de dispersión y resistencia a fungicidas (Agrios, 2007).

Figura 2. Esquema que muestra el ciclo biológico de *Botrytis spp* desde la invasión al hospedero.



Fuente: (Agrios, 2007).

7.3.4 Síntomas

En hojas, las lesiones iniciales son manchas marrones o grisáceas rodeadas de un halo amarillento, que progresan hacia la necrosis extensa del tejido (Gauthier et al., 2021). En flores y botones florales, es común observar decoloración, marchitamiento prematuro y áreas húmedas que eventualmente se tornan marrones o grises, afectando significativamente la calidad de las flores (Téllez, 2022). En tallos, se presentan lesiones alargadas de color marrón que, si no se controlan, pueden causar colapso estructural y marchitamiento. Estas lesiones suelen aparecer cerca de heridas o áreas dañadas, especialmente en cultivos ornamentales como rosas. En brotes jóvenes, *Botrytis spp.* causa necrosis que avanza desde el ápice hacia la base, resultando en la muerte regresiva de ramas completas (Terrones et al., 2019).

Las condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas agravan la expresión de estos síntomas, especialmente en tejidos envejecidos o dañados, que son más susceptibles a la infección inicial (Téllez, 2022).

7.3.5 Signos

Los signos del patógeno son fácilmente identificables en los tejidos afectados. El desarrollo de un micelio denso y de color gris claro a oscuro es uno de los signos más evidentes. Este micelio, visible a simple vista, suele cubrir las áreas infectadas y es más pronunciado en condiciones de alta humedad (Agrios, 2007).

Según indica Muñoz (2008), el hongo produce una capa de conidios que le otorgan el característico aspecto polvoriento o aterciopelado grisáceo. Estas estructuras reproductivas son responsables de la rápida diseminación de la enfermedad a través del viento, el agua o el contacto físico.

En casos avanzados o bajo condiciones específicas, forma esclerocios, estructuras pequeñas, duras y negras que le permiten sobrevivir en ambientes adversos. Estos esclerocios, junto con los conidios y el micelio, son los principales signos utilizados para confirmar la presencia del patógeno en cultivos afectados (Gauthier et al., 2021).

7.3.6 Control biológico

7.3.6.1 Uso de microorganismos biocontroladores

El uso de agentes de biocontrol como hongos, bacterias y levaduras, combina mecanismos como competencia, antibiosis y estimulación de defensas de la planta para

inhibir el crecimiento del patógeno. Por ejemplo, el hongo *Trichoderma spp.* se aplica directamente en el follaje o en heridas de tallos, donde coloniza rápidamente el tejido y produce enzimas como quitinasas que degradan las paredes celulares de *Botrytis spp.*, previniendo su desarrollo (Merchán, Ferrucho & Álvarez, 2014). De manera similar, como indica Altieri et al. (2023) las bacterias como *Bacillus subtilis* liberan antibióticos naturales, como la iturina, que afectan la membrana celular del patógeno y reducen su capacidad de infección.

7.3.6.2 Mecanismo de acción de los microorganismos biocontroladores

7.3.6.2.1 Competencia por espacio y nutrientes

La competencia es uno de los mecanismos más comunes entre microorganismos antagonistas. En este caso, el agente de biocontrol compite con el patógeno por recursos esenciales como nutrientes, agua y espacio. Esto previene que el mismo acceda a nutrientes esenciales como azúcares o aminoácidos (Hernández et al., 2007).

7.3.6.2.2 Mico parasitismo

El mico parasitismo es uno de los mecanismos más efectivos de los hongos antagonistas. En este proceso, el hongo antagonista detecta y ataca al patógeno mediante contacto directo, penetrando su micelio o sus estructuras reproductivas y degradándolas con enzimas específicas (Infante et al., 2009).

7.3.6.2.3 Antibiosis

La antibiosis ocurre cuando el agente de biocontrol produce compuestos químicos que son tóxicos para el patógeno. Estos compuestos pueden ser metabolitos secundarios, enzimas o sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento, germinación o esporulación del patógeno (Altieri et al., 2023).

7.4 Reacción en Cadena Polimerasas (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para la amplificación de fragmentos específicos de ADN. La PCR se basa en la replicación enzimática del ADN mediante ciclos térmicos que incluyen tres fases principales: desnaturalización del ADN, alineamiento de los cebadores y extensión de la cadena de ADN por la ADN polimerasa (Sambrook & Russell, 2001).

7.5 Espaciador del Transcrito Interno (ITS1 e ITS4)

Los Espaciadores del Transcrito Interno (ITS) son regiones del ADN ribosómico altamente variables que se utilizan ampliamente en la identificación molecular de hongos y otros organismos. Según White et al. (1990), los cebadores ITS1 e ITS4 se emplean para amplificar estas regiones, permitiendo la caracterización y diferenciación de especies fúngicas a nivel molecular.

7.6 Método de Secuenciación por Sanger

El método de secuenciación por Sanger es una técnica de secuenciación de ADN basada en la incorporación de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) marcados con fluorocromos durante la síntesis de ADN (Sanger et al., 1977). Estos nucleótidos terminadores generan fragmentos de diferentes longitudes que son separados mediante electroforesis capilar y detectados por fluorescencia con la finalidad de validar secuencias y análisis de genes específicos (Smith et al., 1986).

7.7 Análisis Bioinformático en NCBI

El análisis bioinformático es una herramienta esencial en la interpretación de datos de secuenciación. El National Center for Biotechnology Information (NCBI) proporciona diversas bases de datos y herramientas bioinformáticas como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la comparación de secuencias (Altschul et al., 1990). A través de plataformas como GenBank y el Nucleotide Database, es posible almacenar, recuperar y analizar secuencias genéticas, permitiendo la identificación de organismos y el estudio de relaciones filogenéticas (Benson et al., 2012). Estas herramientas facilitan el procesamiento y la interpretación de datos en investigaciones de biología molecular y biotecnología.

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS

8.1 Hipótesis afirmativa

Los hongos endófitos seleccionados tienen capacidad de biocontrol para *Botrytis spp.* en condiciones laboratorio.

8.2 Hipótesis nula

Los hongos endófitos seleccionadas no tienen capacidad de biocontrol para *Botrytis spp.* en condiciones laboratorio.

9. METODOLOGIA

9.1 Tipos de investigación

9.1.1 Cualitativa

Se utilizó un enfoque de investigación cualitativa para identificar la especie de los hongos con potencial de biocontrol para *Botrytis spp.* en condiciones de laboratorio. Este proceso incluyó la descripción de aspectos como la forma, el tamaño, el color y las estructuras del hongo.

9.1.2 Cuantitativa

La investigación adoptó un enfoque cuantitativo, mediante tres ensayos experimentales. El primer ensayo tuvo como objetivo seleccionar los aislamientos con mayor capacidad antagonica contra *Botrytis spp.* Para ello, se realizaron pruebas in vitro en las que se cuantificó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno *Botrytis spp.* en presencia de los aislamientos evaluados.

El segundo ensayo se enfocó en la viabilidad de conidias de los aislamientos con mayor potencial de antagonismo. Se llevo a cabo una prueba para determinar la capacidad de supervivencia de las conidias bajo condiciones ambientales adversas, permitiendo evaluar su estabilidad y persistencia en el tiempo.

Para el análisis estadístico de los dos primeros ensayos, se utilizó el software INFOSTAT 2022, aplicando la prueba de comparación de medios de Tukey con un nivel de significancia del 5 %.

El tercer ensayo correspondió al análisis molecular, en el cual se consideró el porcentaje de similitud genética de los aislamientos seleccionados comparados frente a los genomas de hongos registrados en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta fase permitió determinar la especie de los hongos con potencial biocontrolador.

9.2 Tipo de método

9.2.1 Experimental

Esta investigación busco evaluar hongos con potencial de biocontrol sobre *Botrytis spp.* en condiciones controladas de laboratorio. Dado que nos permitió manipular una o más variables independientes para observar y medir su efecto sobre una o más variables

dependientes, en un ambiente controlado. Además de que su objetivo principal es establecer relaciones de causa y efecto entre las variables estudiadas (Galarza, 2021).

9.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

9.3.1 Observación Directa

La observación directa sirvió de base para analizar el comportamiento de los aislamientos nativos con potencial de biocontrol frente al patógeno *Botrytis spp.*

9.3.2 Comparativa

Esta investigación se basó en dos diseños experimentales con el fin de comparar los datos obtenidos a través de la observación directa y de esta manera confirmar o rechazar la hipótesis planteada.

9.4 Localización

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología del Campus Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

9.5 Origen y aislamiento de hongos

9.5.1 Colecta de material vegetal (Fase de campo)

La colecta se desarrolló en dos locaciones (Campus Salache-UTC y Toacazo) ubicadas en la provincia de Cotopaxi. Se seleccionaron rosas que presentaron síntomas típicos de *Botrytis spp.*, como manchas marrones en pétalos, pudrición húmeda en botones, lesiones oscuras en tallos y caída de hojas.

Las muestras destinadas al aislamiento de hongos endófitos con potencial de biocontrol cumplieron con los siguientes criterios: plantas que no presentaran ningún tipo de fisiopatías, ataque de patógenos o plagas, además se seleccionaron hojas jóvenes de color verde, flores y frutos.

Luego de la colecta en los sectores seleccionados, se obtuvieron 15 muestras de plantas de las cuales se aislaron 14 cepas de hongos endófitos con potencial de biocontrol y una cepa del hongo patógeno *Botrytis spp.*, como se muestra en la (Tabla 5).

Tabla 5. Origen de aislamientos de cepas nativas pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.

N°	Simbología/ Aislamiento	Origen	Locación	Coordenadas	
				S	W
1	MF	Manzana-Fruto	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
2	MT	Manzana-Tallo	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
3	CaH	Capulí-Hoja	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
4	LH	Limón-Hoja	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
5	MH	Manzana-Hoja	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
6	MaT	Margycarpus-Tallo	Toacazo	0°47'08.6"	78°44'34.8"
7	CaT	Capulí-Tallo	Toacazo	0°47'08.6"	78°44'34.8"
8	MoT	Mora-Tallo	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
9	LF	Limón-Fruto	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
10	RH	Rosa-Hoja	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
11	MoH	Mora-Hoja	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
12	CaF	Capulí-Fruto	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
13	DH	Durazno-Hoja	Toacazo	0°47'08.6"	78°44'34.8"
14	DF	Durazno-Fruto	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"
15	<i>Botrytis</i> <i>spp.</i>	Rosa-Flor	Salache	1°00'01.5"	78°37'06.3"

9.5.2 Aislamiento de cepas nativas (Fase de laboratorio)

Las muestras vegetales recolectadas se colocaron en diferentes cajas Petri, separando (hojas, flores y frutos). Primero, se lavaron con agua potable para eliminar residuos de tierra. Posteriormente, las muestras se desinfectaron sumergiéndolas por 2 minutos cada una en una solución de hipoclorito de sodio al 3%, para finalizar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, con el objetivo de evitar contaminaciones por microorganismos externos, todo este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar-BIOBASE.

De acuerdo con Fuhrman y Campbell (1998), tras la desinfección del material vegetal, este fue cortado en secciones de 0,5 cm y se colocó en cajas de Petri que contenían Agar Papa Dextrosa (PDA). Para la preparación del PDA, se utilizó una concentración de 9,75 g en 250 ml de agua destilada. A esta mezcla se añadieron 0,5 ml de ácido láctico como antibiótico, cuando la temperatura del medio descendió por debajo de 50 °C. Según Gänzle (2015), el ácido láctico disminuye el pH del medio, lo que inhibe el crecimiento de bacterias competidoras y favorece la colonización del hongo. Las cajas Petri se incubaron en condiciones controladas de 27 °C durante un periodo de 7 días.

Después de los siete días de incubación en la incubadora-REBELK, se procedió a seleccionar colonias puras, asegurándose de que el micelio no estuviera contaminado con bacterias u otros hongos. Posteriormente, se realizó un subcultivo para purificar el aislamiento Aragón, Gonzales & Palomo (s. f.)

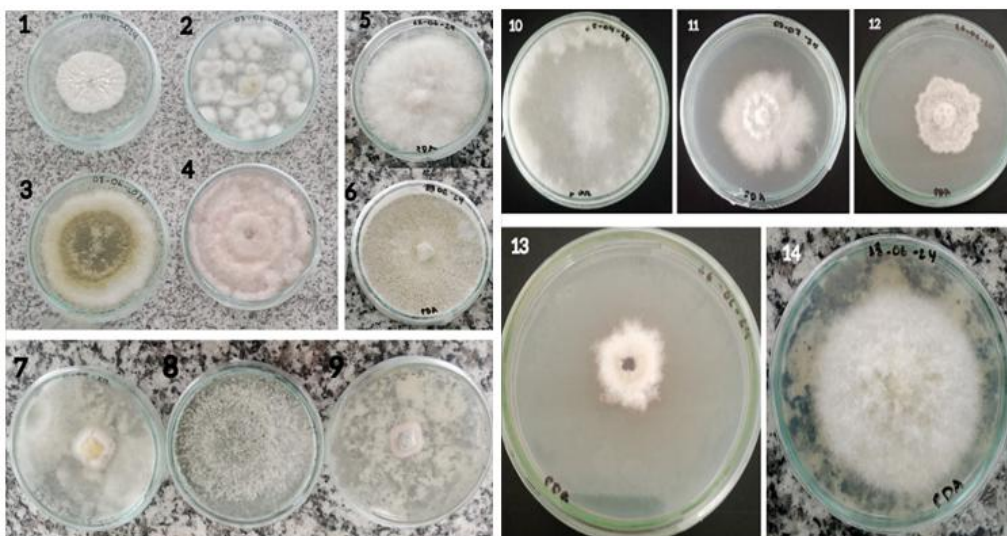
9.5.3 Purificación de Hongos

9.5.3.1 Técnica dilución en placa

A partir de un cultivo multiespórico, se obtuvo un cultivo monoespórico mediante el crecimiento de micelio en una caja de 7 días. Se recolectaron micelio y conidias de la superficie de la caja Petri utilizando un asa quirúrgica estéril, los cuales se suspendieron en 200 ml de agua destilada para preparar una suspensión diluida del hongo (Gutiérrez, 2012). Posteriormente, se transfirieron 10 μ l de la suspensión a placas de 55 mm x 15 mm con medio de cultivo PDA y ácido láctico solidificado, distribuyendo uniformemente las esporas mediante un asa de Driglasky estéril. Las placas se incubaron a 27 °C durante 24 horas, tras lo cual se observaron las conidias (Gänzle, 2015). Este procedimiento permitió reducir la densidad de esporas o fragmentos de micelio, facilitando el crecimiento separado de las colonias y su selección sin contaminación (Aragón, González & Palomo, s. f.).

Se purificaron las 14 cepas de hongos endófitos con potencial de biocontrol obtenidas del muestreo realizado en las dos locaciones en la provincia de Cotopaxi (Figura 3).

Figura 3. Fotografías de los aislamientos purificados: 1 (MF), 2 (MT), 3 (CaH), 4 (LH), 5 (MH), 6 (MaT), 7 (CaT), 8 (MoT), 9 (LF), 10 (RH), 11 (MoH), 12 (CaF), 13 (DH), 14 (DF).



De las 14 cepas de hongos endófitos para posibles biocontroladores se seleccionaron 6 cepas (Figura 4) que mostraron un mayor desempeño en crecimiento in vitro (cm) para llevar a cabo las pruebas antagónicas.

Figura 4. *Cepas seleccionadas para pruebas de antagonismo.*

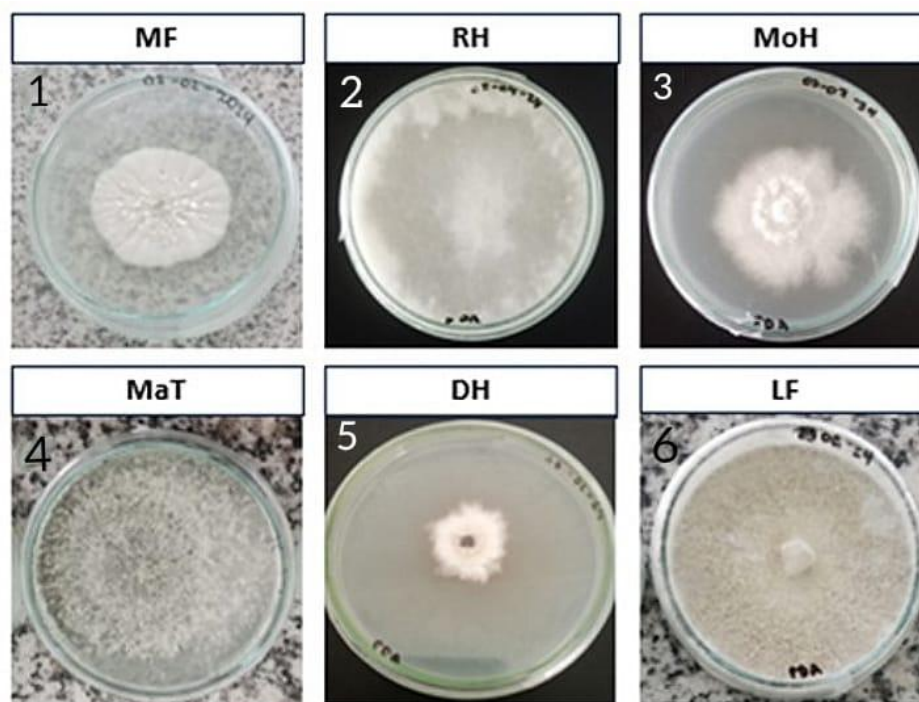


Tabla 6. *Codificación de cepas seleccionadas para realizar pruebas de antagonismo.*

N°	Codificación	Significado
1	MF	Manzana-Fruto
2	RH	Rosa-Hoja
3	MoH	Mora-Hoja
4	Mat	Margycarpus-Tallo
5	DH	Durazno-Hoja
6	LF	Limón-Fruto

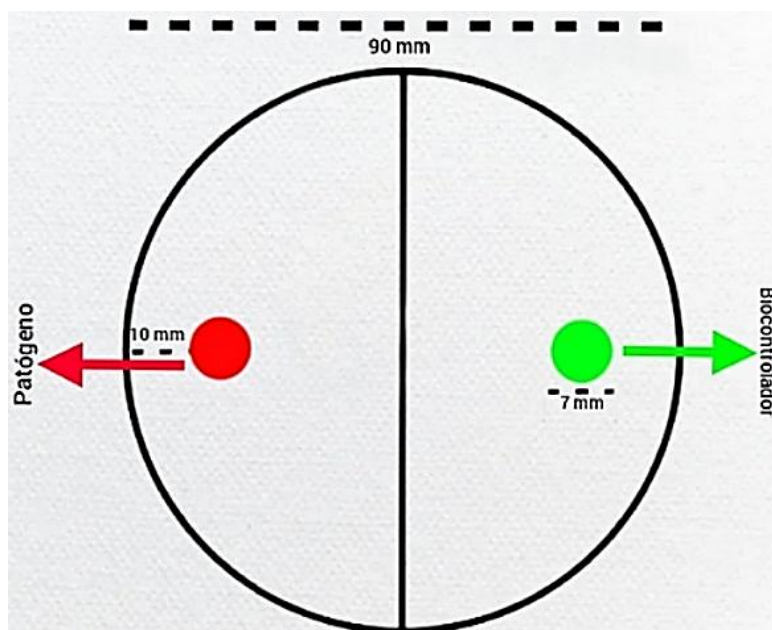
9.6 Selección de cepas con capacidad antagónica (Primer ensayo)

9.6.1 Pruebas antagónicas

Las pruebas antagónicas in vitro se desarrollaron mediante la técnica de cultivos duales, esta técnica consistió en extraer con la parte inferior de una punta de micropipeta esterilizada un disco de aproximadamente 0,7 cm de diámetro de la caja Petri que contenía el micelio del patógeno (*Botrytis spp.*) y de los biocontroladores. Posteriormente, estos discos se sembraron en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA con ácido láctico (Calvo et al., 2012).

Se midió 1 cm desde el extremo de la caja Petri y se sembró el hongo patógeno, en el extremo opuesto a la misma distancia se sembró el hongo biocontrolador. De cada muestra se realizaron cinco réplicas como se observa en la (Figura 5). Adicionalmente se sembraron cajas Petri con el micelio testigo *Botrytis spp.* Las muestras se incubaron durante siete días a una temperatura de 25 °C (Acosta et al., 2021).

Figura 5. Esquema, técnica de cultivo dual.



9.6.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), fue utilizado para evaluar la capacidad los hongos biocontroladores de inhibir el crecimiento de *Botrytis spp.* en condiciones de laboratorio. Para la cual fue utilizada la fórmula planteada por Ezziyyani et al. (2004), donde:

Porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno (PICR) es:

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

Lo que significa:

R1: Radio de crecimiento del hongo patógeno (sin biocontrolador).

R2: Radio de crecimiento del hongo patógeno en presencia del hongo biocontrolador.

9.6.3 Análisis estadístico

Para evaluar la significancia estadística del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) entre los tratamientos estudiados, se realizó un análisis de varianza (ADEVA) bajo un diseño completamente al azar (DCA), como se muestra en la (Tabla 7). Para ello, se utilizó el software INFOSTAT 2022 y se aplicó la prueba de comparación de medios de Tukey con un nivel de significancia del 5 %. El diseño experimental incluyó 6 tratamientos y 5 repeticiones.

Tabla 7. Esquema de ADEVA (Primer ensayo).

F de V	GL	
Tratamiento	t-1	5
Total	n-1	29
E. Exp	Diferencia	24

9.6.3.1 Factor en estudio

El factor en estudio fue la capacidad antagonica de los hongos en condiciones de laboratorio.

9.6.3.2 Variable o parámetro

- **Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR):** Evaluado a los 6 días.

9.6.3.3 Tratamientos

La (Tabla 8) presenta los 6 tratamientos experimentales empleados en el estudio, organizados según el tipo de hongo evaluado como posible agente de biocontrol. Cada tratamiento corresponde a un aislamiento fúngico endófito, identificado con una codificación única para facilitar su análisis y comparación.

Tabla 8. Tratamientos y su respectiva codificación.

Tratamiento	Descripción
T1	Hongo (MF)
T2	Hongo (RH)
T3	Hongo (DH)
T4	Hongo (LF)
T5	Hongo (MoH)
T6	Hongo (MaT)

9.7 Viabilidad de conidios de las cepas con capacidad antagónica (Segundo ensayo)

9.7.1 Conteo de conidios

Se emplearon los tres aislados que mostraron capacidad de antagónica en los bioensayos realizados previamente (RH, MaT y LF). De cada aislado se prepararon ocho replicados, los cuales fueron cultivados en medio Potato Dextrosa Agar (PDA) suplementado con ácido láctico, en placas de Petri de 90 mm x 15 mm. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 28 días (Hidalgo y Tello, 2022).

Para preparar la solución madre, las ocho placas de cada aislado fueron disueltas en 500 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de esta solución hasta alcanzar una concentración adecuada para el conteo, utilizando una cámara de Neubauer. Se consideraron los cuatro cuadrantes de la cámara para realizar el conteo promedio con el microscopio OLYMPUS (Hidalgo y Tello, 2022).

Con esta información y la siguiente fórmula, se calculó la concentración de conidios/ml:

$$\text{Concentración conidios/ml} = \frac{\text{Promedio conidias contadas} \times \text{Factor de dilucion}}{0,0001 \text{ ml}}$$

Al realizar el conteo de conidias, se determinó que la concentración final de conidias/ml en los tratamientos RH, MaT y LF corresponde a los valores presentados en la (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración final de conidios en dosis a $\times 10^8$ (conidias/ml).

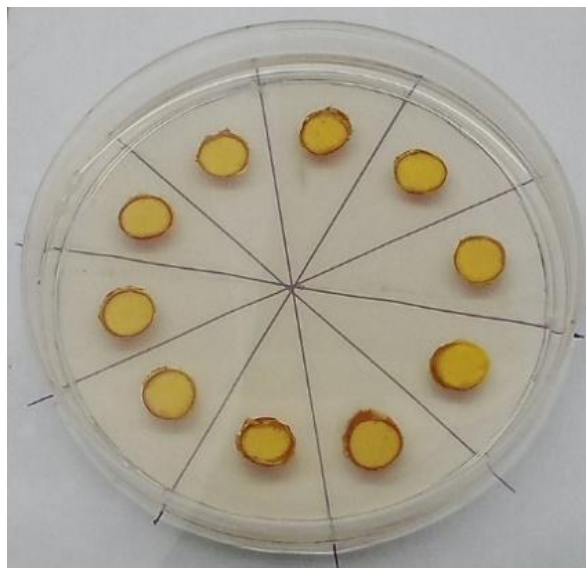
Tratamientos	Conteo de conidias				Promedio	TOTAL
	C1	C2	C3	C4		
RH	6	21	13	9	12,25	$1,23 \times 10^8$
MaT	35	40	44	55	43,5	$4,35 \times 10^8$
LF	15	21	22	16	18,5	$1,85 \times 10^8$

9.7.2 Prueba de viabilidad de conidios

Con un aspersor se depositaron 58 μ l de la suspensión ajustada a una concentración de 1×10^8 conidios/ml en cada pétalo de rosa, asegurando que presentarán características de salud y dimensiones aproximadas de 5.5 cm \times 6 cm. Las hojas con los pétalos tratados fueron expuestas a luz solar directa durante intervalos de 0, 1 y 2 horas. Los pétalos no expuestos a la luz se utilizaron como controles. (Alves et al., 1998).

De cada pétalo tratado, se extrajo un disco de 7 mm de diámetro utilizando la parte posterior de puntas estériles de micropipetas. Estos discos fueron cultivados en cajas Petri que contenían PDA suplementado con ácido láctico, como se ilustra en la (Figura 6). La viabilidad de los conidios fue evaluada después de 6 días de incubación a 25 °C.

Figura 6. Cultivo de discos con pétalos tratados, en (PDA) Potato Dextrosa Agar.



9.7.3 Análisis estadístico

Para evaluar la significancia estadística en el porcentaje de germinación de las conidias de los 3 hongos con potencial de biocontrol, se realizó un análisis de varianza (ADEVA) bajo un diseño completamente al azar con interacción de factores (a x b), como se muestra en la (Tabla 10). El análisis se llevó a cabo utilizando el software INFOSTAT 2022, aplicando la prueba de comparación de medios de Tukey con un nivel de significancia del 5%. El diseño experimental incluyó 9 tratamientos y 5 repeticiones.

Tabla 10. Esquema de ADEVA (Segundo ensayo).

F de V		GL
TRATAMIENTOS	(a x b) – 1	8
Factor A	a-1	2
Factor B	b-1	2
Factor A*B	(a-1) (b-1)	4
TOTAL	(a x b x r) – 1	44
E. EXP	DIFERENCIA	36

9.7.3.2 Factor en estudio

Factor a: Hongos con potencial biocontrolador.

- Hongo 1: (MaT)
- Hongo 2: (LF)
- Hongo 3: (RH)

Factor b: Tiempo de exposición solar.

- Tiempo 1: 0 horas
- Tiempo 2: 1 horas
- Tiempo 3: 2 horas

9.7.3.3 Variable o parámetro

- **Porcentaje de germinación de conidias:** Evaluado a los 6 días.

9.7.3.4 Tratamientos

La (Tabla 11) presenta los 9 tratamientos experimentales evaluados en el estudio, organizados según la combinación de dos factores.

Tabla 11. *Tratamientos con su respectiva codificación.*

Tratamiento	Descripción
T1	Hongo 1 – 0 horas
T2	Hongo 1 – 1 horas
T3	Hongo 1 – 2 horas
T4	Hongo 2 – 0 horas
T5	Hongo 2 – 1 horas
T6	Hongo 2 – 2 horas
T7	Hongo 3 – 0 horas
T8	Hongo 3 – 1 horas
T9	Hongo 3 – 2 horas

9.8 Identificación morfológica y molecular de los hongos con capacidad antagónica (Tercer ensayo)

9.8.1 Identificación morfológica

9.8.1.1 Observación macroscópica y microscópica

Tras un periodo de incubación de 7 días a una temperatura de 25 °C utilizando la incubadora REBELK, se procedió a observar las características morfológicas de los hongos endófitos con capacidad de biocontrol (MaT, LF y RH), evaluando aspectos como el color, la forma, tamaño y textura (Sánchez & Oliva, 2015).

La observación microscópica se realizó agregando una gota de azul de metileno sobre el portaobjetos para teñir las estructuras (González, Diamont, & Gutiérrez, 2010). A continuación, con una pinza estéril, se tomó un trozo de cinta adhesiva transparente para capturar una parte de la colonia del hongo, la cual se colocó sobre el portaobjetos con la gota de azul de metileno. Posteriormente, se ajustó el microscopio óptico OLYMPUS, comenzando con el lente objetivo de menor aumento (4x) y avanzando a uno de mayor aumento (20x) (Sánchez & Oliva, 2015).

9.8.2 Identificación molecular

9.8.2.1 Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las muestras puras de los hongos aislados, se ajustó el protocolo de Flores (2021), a las condiciones del laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Primero, se colocó 200 μ l de PBS en tubos de 1,5ml, se añadieron entre 50 y 100 mg de cada muestra (M1-RH, M2-MaT y M3-LF) y se mezclaron usando un vórtex SCIENTIFIC. Se centrifugó por 2 minutos a 14700 x g. Luego, se retiró el PBS con una micropipeta BOECO GERMANY de 1000 μ l.

Se agregaron tres perlas de vidrio, 500 μ l de solución de extracción (compuesta por Tris HCl, EDTA, CTAB, NaCl, y pH 8), y 2 μ l de β -mercaptoetanol por muestra. La mezcla se agitó con el vórtex BOECO GERMANY durante 30 segundos para romper las células de los hongos. Posteriormente, los tubos se incubaron a 60 °C utilizando el termo bloque BOECO GERMANY y se agitaron cada 10 minutos por 30 segundos con el vórtex SCIENTIFIC.

Después, se agregaron 500 μ l de cloroformo frío a cada tubo, se mezclaron y se dejaron reposar durante 2 minutos. Los tubos se centrifugaron a 14 700 x g durante 8 minutos utilizando la centrifuga HERMLE, lo que permitió la separación de fases. La fase superior, que contenía el ADN, se transfirió a otros tubos. A esta solución se le agregaron 500 μ l de etanol frío, 150 μ l de acetato de sodio y 300 μ l de etanol al 70 %, y se dejó reposar a -20 °C durante 2 horas (Flores, 2021).

Tras el tiempo de reposo, los tubos se centrifugaron nuevamente, formando un pellet de ADN en el fondo. El sobrenadante se descartó, y el pellet se lavó dos veces con etanol al 70 % y una vez con etanol al 96 %, centrifugando por 2 minutos a 14700 x g tras cada lavado. Las muestras se secaron en una cabina de flujo laminar BIOBASE durante 30 minutos, hasta que el alcohol se evaporó completamente. Finalmente, el ADN se volvió

a suspender en 50 μl de agua pura y se calentó a 37 °C durante 30 minutos (Flores, 2021).

Para comprobar la presencia de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, disolviendo 0,5 g de agarosa en 50 ml de tampón TAE 1X, al cual se añadieron 1,75 μl de SYBR Safe como intercalante de ADN. En el primer pocillo del gel se colocaron 10 μl de un marcador de peso molecular de 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), y en los siguientes se depositaron 5 μl de la extracción de ADN de las muestras M1, M2 y M3, mezcladas con 2 μl de BlueJuice como tampón de carga. El gel se corrió a 110 V durante 30 minutos y se visualizó bajo luz UV utilizando un Transiluminador y el software ENDUROTM GDS. Las muestras que mostraron la presencia de ADN se almacenaron a -20 °C (Flores, 2021).

9.8.2.2 Amplificación de la región ITS (PCR)

Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se prepararon cinco tubos: tres con ADN de las muestras RH (M1), MaT (M2) y LF (M3), uno como control positivo y otro como control negativo. Se utilizó la enzima DreamTaqTM 1X en un volumen final de 12,5 μl para cada reacción, se incluyó 2,5 μl de cada primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) a una concentración final de 1 μM , 2,5 μl de agua ultrapura y 5 μl de ADN de cada muestra o cada control. El volumen final de la reacción fue de 25 μl por muestra, como indica la (Tabla 12).

Tabla 12. Preparación master MIX para PCR.

Master MIX				
	Ci	Cf	Vi	Rx (5x)
DreamTaqTM	2X	1X	12,5 μl	62,5 μl
PF-ITS1	10 μM	1 μM	2,5 μl	12,5 μl
PR-ITS4	10 μM	1 μM	2,5 μl	12,5 μl
H₂O₀			2,5 μl	12,5 μl
ADN/Control			5 μl	25 μl
Vf			25 μl	

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Boeco TC-TE siguiendo un perfil térmico que consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de un proceso de ciclado de 35 ciclos que incluyeron: una desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento de 35 ciclos a 55 °C por 30 segundos y extensión

a 72 °C por 1 minuto; después se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos y finalmente se mantuvieron las muestras a 4 °C de forma indefinida (White et.al, 1990). Este procedimiento se detalla en la (Tabla 13):

Tabla 13. *Procedimiento de amplificación de PCR.*

	Termo ciclado		
	T°	T	Ciclos
Desaturación inicial	95 °C	3 min	1
Desaturación	95 °C	30 s	
Alineamiento	55 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	1 m	
Extensión Final	72 °C	5 m	1
Hold	4 °C	∞	-

Para confirmar la presencia del producto de PCR, se realizó el proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y una corrida electroforética por 30 minutos.

9.8.2.3 Secuenciación y análisis bioinformático

Los productos de amplificación de la región ITS se enviaron a la empresa IDgen para su secuenciación mediante la técnica Sanger. Los resultados se recibieron en formato .ab1. Para la identificación molecular, las secuencias crudas se analizaron en el software Geneious Prime v2025.0.3. Durante el análisis, se eliminaron las regiones de baja calidad, se realizó un alineamiento de novo con las secuencias ITS1 e ITS4 de cada muestra, se revisó el resultado de principio a fin y se generó una secuencia consenso. Esta secuencia se comparó con las secuencias registradas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2023) usando la herramienta BLASTn® (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar el microorganismo correspondiente a la región ITS amplificada.

10. RESULTADOS Y DISCUSIONES

10.1 Selección de cepas con capacidad antagónica (Primer ensayo)

10.1.1 Análisis estadístico

Como se observa en la (Tabla 14), el p-valor es menor al 0, 0001 lo que indica que los tratamientos tienen un efecto significativo en el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno *Botrytis spp.* (PICR).

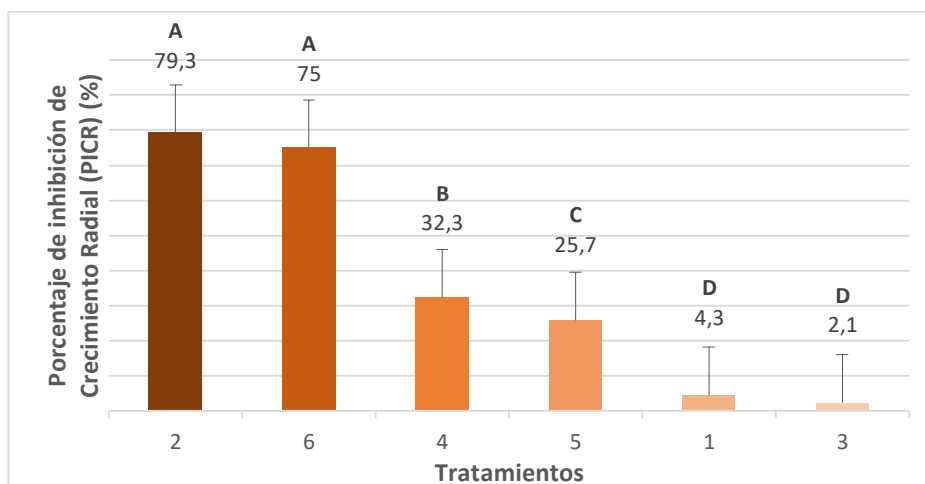
El coeficiente de variación (CV) es de 7,37% a los 6 días. Este valor es considerado aceptable, ya que están por debajo del 10%, lo que refleja una buena precisión y confiabilidad del diseño experimental.

Tabla 14. ANOVA para la variable Porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR) a los 6 días.

F.V.	GL	CM	P- VALOR
Tratamiento	5	5665,36	0,0001 **
Total	29		
E. Exp	24	7,22	
CV %	7,37		

En la prueba de Tukey al 5% se puede observar cómo los tratamientos 2 (RH) y 6 (MaF) son los más efectivos ya que tienen un PICR de 79,3% y 75%, seguido por el tratamiento 4 (LF) con un PICR 32,3 %. Además, mostraron un crecimiento acelerado en comparación con el hongo patógeno. Este rápido establecimiento del biocontrolador puede ser un factor clave en su efectividad en el porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR) del patógeno, en términos de biocontrol la rapidez con la que un antagonista se establece es crucial, ya que determina su capacidad para desplazar al patógeno y ejercer su acción a través de mecanismos como la competencia, antibiosis y micoparasitismo (Spadaro & Droby, 2015).

Figura 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR) evaluado a los 6 días.



10.2 Viabilidad de conidias de las cepas con capacidad antagónica (Segundo ensayo)

10.2.1 Análisis estadístico

Según lo indicado en la Tabla 15, el p-valor de los tratamientos fue menor a 0,0001, lo que evidenció diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las conidias. El factor a (hongos con potencial biocontrolador) mostró una significancia estadística elevada, con un p-valor menor a 0,0001, lo que sugirió que este factor influyó significativamente en la germinación de conidias. De manera similar, el factor b (tiempo de exposición solar) también resultó altamente significativo, evidenciando su impacto sobre la variable de estudio.

Por otro lado, la interacción entre los factores (a × b) presentó un p-valor menor a 0,0001, lo que indicó que los efectos combinados de ambos factores afectarán significativamente el porcentaje de germinación de conidias.

El coeficiente de variación (CV) fue del 4,19 %, valor considerado aceptable para este tipo de investigación, ya que fue menor al 10 %. Este resultado reflejó una baja variabilidad relativa en los datos y respaldó la confiabilidad de los resultados obtenidos.

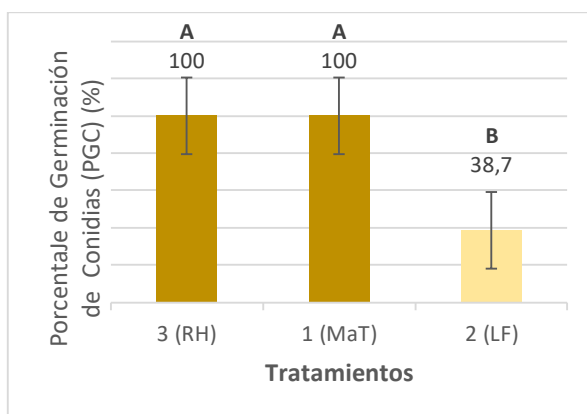
Tabla 15. ANOVA porcentaje de germinación de conidias a los 6 días.

F.V.	GL	CM	P-VALOR	
Tratamiento	8	4923,89	0,0001	**
Factor A	2	188809	0,0001	**
Factor B	2	295,56	0,0001	**
Factor A*B	4	295,56	0,0001	**

Total	44	
E. Exp	36	11,11
CV %	4,19	

En la comparación del porcentaje de germinación de conidias (PGC) para el factor a, se identifican dos grupos estadísticamente diferentes. Los tratamientos clasificados en el rango A presentaron un 100 % de germinación, sin diferencias significativas entre ellos. En contraste, el tratamiento ubicado en el rango B mostró una reducción significativa en la germinación, alcanzando solo un 38,7 %. Estos resultados indicaron que el factor a tuvo un efecto significativo en la germinación de conidias, evidenciando diferencias marcadas entre los niveles evaluados.

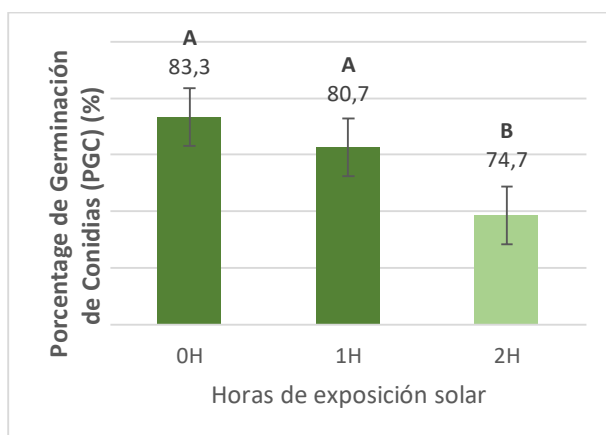
Figura 8. Porcentaje de germinación de conidia, evaluados a los 6 días, factor A (Hongos).



En la evaluación del factor b, también se encuentran diferencias significativas con la formación de dos grupos distintos. Los tratamientos con valores de germinación de 83,33 % y 80,67 % fueron agrupados en el rango "A", mientras que el tratamiento con 74,67 % de germinación se situó en el rango "B". Aunque la variabilidad entre estos niveles no fue tan amplia como en el factor a, los resultados sugieren que este factor también influyó significativamente en la respuesta de germinación.

Los resultados demuestran que como indica (Braga et al., 2015) la exposición solar afecta la germinación de conidias debido a la radiación ultravioleta, la desecación y el estrés oxidativo, reduciendo su viabilidad con el tiempo. Estos factores dañan el ADN, las membranas celulares y disminuyen la capacidad de desarrollo del hongo. En consecuencia, la germinación de conidias disminuye significativamente con el aumento del tiempo de exposición como se observa en la (Figura 9).

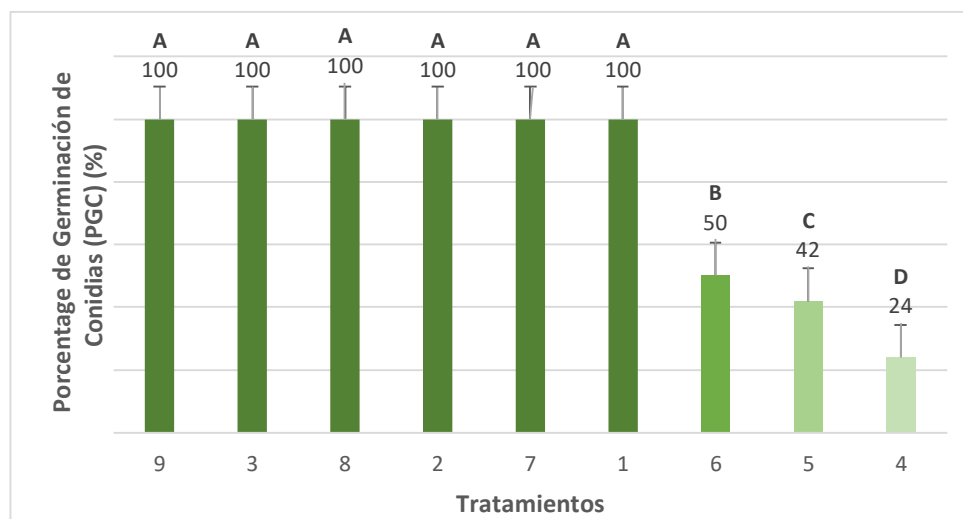
Figura 9. Porcentaje germinación de conidias evaluados a los 6 días, factor B (tiempo de exposición solar).



La interacción entre los factores a y b mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, lo que resultó en la formación de cuatro grupos diferenciados. Los tratamientos con un 100 % de germinación fueron agrupados en el rango "A", mientras que los tratamientos con 50 %, 42 % y 24 % se clasificaron en los rangos "B", "C" y "D", respectivamente, evidenciando una disminución progresiva en la germinación. Estos resultados indicaron que la combinación de niveles de los factores evaluados afectó significativamente la capacidad germinativa, generando contrastes marcados entre los tratamientos.

Estos resultados concuerdan con estudios previos, donde se ha observado que la tolerancia de los hongos a condiciones ambientales adversas varía dependiendo de su estructura celular y mecanismos de protección contra radiación UV (Osses, 2024).

Figura 10. Porcentaje de germinación de conidias evaluados a los 6 días, interacción de factores (A*B)

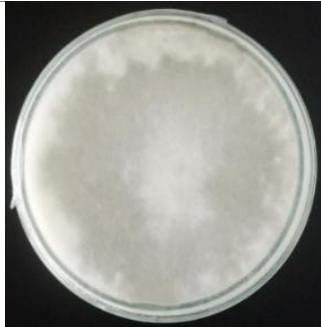
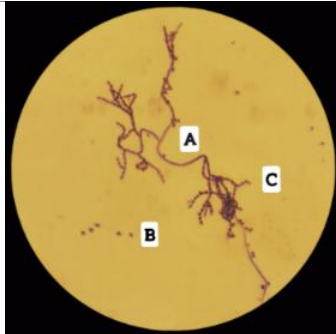
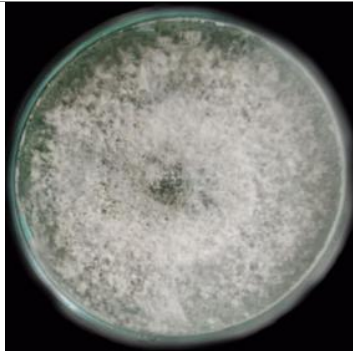
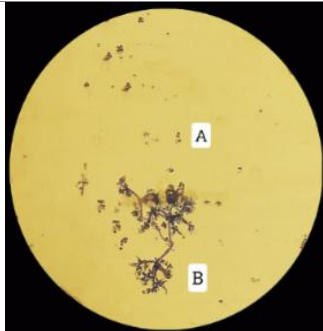


10.3 Identificación morfológica y molecular de los hongos con capacidad antagonista (Tercer ensayo)

10.3.1 Observación macroscópica y microscópica

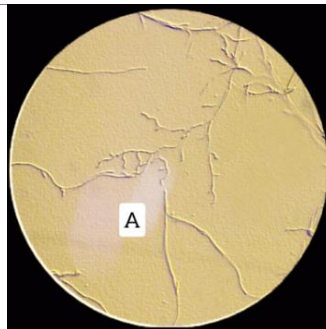
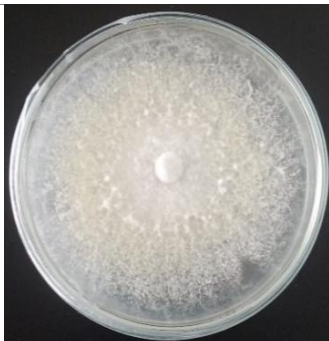
A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo, se seleccionaron las tres cepas con mayor capacidad de inhibir a *Botrytis spp.*: RH1, MaF y LF para realizar la identificación morfológica. Según lo indicado por Sánchez y Oliva (2015), se analizó la estructura macro y microscópica de estas cepas para poder conocer la especie de cada cepa como se observa en la (Tabla 16).

Tabla 16. Identificación morfológica de hongos con potencial antagonista.

COD. ID	OBSR. MACROSCÓPICA	OBSR. MICROSCÓPICA	Fuente ID especie:
RH			De acuerdo a Nessma et al. (2022), se puede decir que el hongo corresponde a <i>Neurospora crassa</i> .
	Descripción: Hongo filamentosos con crecimiento rápido, que se extendió desde el centro hasta el borde de la caja con una consistencia algodonosa sobre el Agar Papa Dextrosa (PDA), al principio era blanco, pero después se tornó naranja.	Descripción: A: Conidióforo con macro conidios B: Ascosporas C: Macro conidios	
MaT			De acuerdo a Zin y Badaluddin (2020), se puede decir que el hongo corresponde a <i>Trichoderma asperellum</i> .
	Descripción: Crecimiento rápido, cubriendo la placa en pocos días, micelio inicialmente blanco,	Descripción: A: conidias esféricas B: conidióforos ramificados, con fiálides en ángulos variables.	

volviéndose verde debido a la esporulación, con textura algodonosa o afelpada, con anillos concéntricos.

LF



De acuerdo a Zhou et al. (2024), se puede decir que el hongo corresponde a *Annulohyphoxylon* spp.

Descripción:

Hongo filamentoso con un crecimiento moderado a lento, crea colonias concéntricas. A medida que la colonia va creciendo se va tornando verde en el envés del cultivo. No se observó esporulación en el laboratorio por lo que se sometió a pruebas moleculares para posterior identificación.

Descripción:

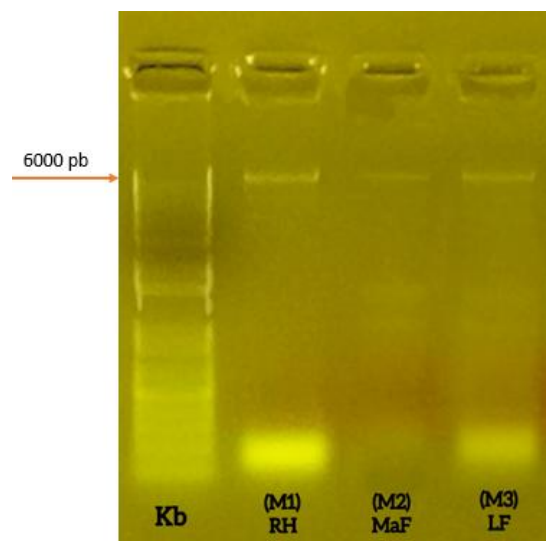
A: hifas hialinas ramificadas.

10.3.2 Identificación de molecular

10.3.2.1 Extracción de ADN y cuantificación

Una vez extraído de manera manual el ADN de los hongos RH, MaF y LF, se evaluó la integridad del ADN extraído. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando un marcador de peso molecular 1 Kb Plus Ladder y las muestras de ADN M1-RH, M2-MaF y M3-LF, las cuales se cargaron con 2µl BlueJuice. La electroforesis se ejecutó a 110 V durante 30 minutos. En la (figura 11) se observa que las bandas correspondientes a cada muestra tienen un tamaño de 6000 pb, lo que confirma que el tamaño del ADN fue el esperado y que se logró obtener ADN en todas las muestras

Figura 11. *Electroforesis en gel de agarosa muestras de ADN total (RH, MaF y LF).*



La cuantificación del ADN extraído se realizó en el laboratorio IDgen utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One^c, que midió la concentración de ácidos nucleicos a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Para considerar que una muestra sea pura y de buena calidad, se determinó el radio 260/280, cuyo rango ideal es de 1.8 a 2.0. Valores inferiores a este rango pueden indicar contaminación por fenol o proteínas, mientras que valores superiores a 2.0 podrían sugerir la presencia de ARN. Según los datos presentados en la tabla 17, las relaciones 260/280 obtenidas para las muestras M1 (RH), M2 (MaF) y M3 (LF) fueron de 2.04, 2.07 y 2.26, respectivamente. Estos resultados indican que las muestras no presentaron contaminación con proteínas ni con ARN, es decir las muestras fueron purificadas y el ADN extraído es apto para procedimientos posteriores de amplificación.

Además, la absorbancia a 230 nm permitió detectar posibles contaminantes como sales caotrópicas o carbohidratos, para lo cual la relación 260/230 debe encontrarse entre 2.0 y 2.2 para considerarse limpia. Un valor inferior sugiere la presencia de contaminantes que podrían comprometer la funcionalidad de la muestra. De acuerdo con la (Tabla 17), las relaciones 260/230 obtenidas para las muestras M1 (RH), M2 (MaF) y M3 (LF) fueron de 1.88, 2.97 y 2.64, respectivamente. Aunque algunos valores exceden ligeramente el rango, se concluye que el ADN extraído es apto para procesos posteriores.

Tabla 17. *Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One^c.*

Absorbancia del ADN

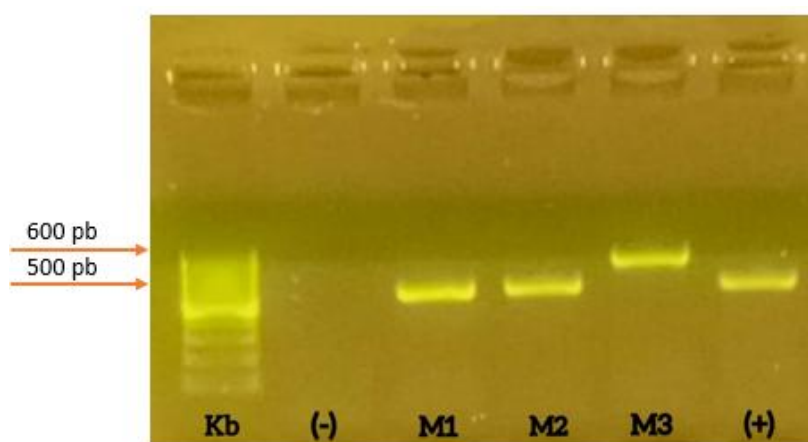
Tratamientos	Cantidad	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
M1 (RH)	368.3	2.04	1.88
M2 (MaT)	52.7	2.07	2.97
M3 (LF)	53.6	2.26	2.64

10.3.2.2 Amplificación de la región ITS (PCR)

En el primer pocillo se cargó un marcador de peso molecular con fragmentos de tamaño conocido de 100bp (Colocar la marca), siendo la banda más cercana de 1000 pb. En los siguientes pocillos, se depositaron 5 μ l de control negativo, 5 μ l de la muestra M1, 5 μ l de la muestra M2, 5 μ l de la muestra M3 y 5 μ l de control positivo. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1,5 % con el objetivo de evaluar la calidad de los amplicones obtenidos a partir de la amplificación de la región ITS.

El análisis de la migración de las bandas en el gel, en comparación con el marcador de peso molecular, indicó que los fragmentos correspondientes a las muestras M1, M2 y M3 presentaban un tamaño aproximado de 600 pb como se observa en la (Figura 12). En función de esto se envió a realizar la secuenciación en el laboratorio IDgen.

Figura 12, *Electroforesis de PCR de las muestras M1 (RH), M2 (MaT) y M3 (LF).*



10.3.2.3 Secuenciación y análisis Bioinformático

Para realizar la identificación molecular, los datos de las secuencias crudas se cargaron en el software Geneious Prime v2025.0.3. Después de eliminar las secuencias de baja calidad, se obtuvo un porcentaje de calidad HQ del 100 % para las tres muestras M1 (RH), M2 (MaT) y M3 (LF). Finalmente, se generó la secuencia de consenso (Anexo 7).

Se realizó un análisis BLAST de las secuencias obtenidas contra la base de datos biológicos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2023). Este

análisis permitió identificar el nombre científico del microorganismo con el mayor grado de identidad de secuencia.

- Muestra M1 (RH): La secuencia presentó un query cover (QC) del 100 % y un porcentaje de identidad (PI) también del 100 % con dos especies distintas (anexo 4). Se determinó mediante características morfológicas la identidad del hongo, lo que finalmente, demostró que se trataba de *Neurospora crassa*.

De acuerdo con Nessma et al. (2022), la especie *Neurospora crassa* se destaca por su capacidad para producir ácido benzoico (BA) que, según Kaur et al. (2005), actúa como un aleloquímico al interferir con el crecimiento de organismos competidores. Estas características posicionan a *N. crassa* como un organismo prometedor en investigaciones agrícolas, ya que su mecanismo de acción está basado principalmente en antibiosis, lo que sugiere que puede ser usado como un agente de biocontrol. No existen suficientes investigaciones sobre el estudio de este hongo en plantas, sin embargo, Kuo et al. (2014) menciona que se ha propuesto su clasificación como un endófito en China.

- Muestra M2 (MaT): La muestra correspondió a *Trichoderma asperellum* (Anexo 8), con un query cover (QC) del 100 % y un porcentaje de identidad (PI) también del 100 %.

Según indica Zin y Badaluddin (2020), la especie de *Trichoderma asperellum* ha sido utilizada como biocontrolador para *Botrytis spp.* debido a su gran capacidad de colonización, además de sus otros mecanismos antagónicos como el mico parasitismo, la competencia por nutrientes y espacio, la inducción de resistencia sistémica en las plantas, la secreción de sideróforos, enzimas, metabolitos secundarios antifúngicos y péptidos.

- Muestra M3 (LF): Se identificó como *Annulohypoxyton spp.* (Anexo 9), presentando un query cover (QC) del 100 % y un porcentaje de identidad (PI) del 100 %. En este caso, al igual que con la muestra M1, se realizó un análisis adicional considerando la morfología del microorganismo, ya que inicialmente se detectó similitud con dos especies distintas.

No existen suficientes investigaciones sobre el estudio de este hongo en plantas, sin embargo, Zhou et al. (2024), indica que *Annulohypoxyton spp.* es capaz de producir 1,8-

cineol que es un mono terpeno con potencial para el control de plagas en cultivos. La producción de este gas permite que logre inhibir la presencia de nemátodos.

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

11.1 Impacto Social

La implementación de métodos biocontroladores puede reducir el uso de productos químicos, protegiendo la salud de las personas que están expuestas. Además, su uso genera conciencia sobre la agricultura ecológica y sostenible, fomentando prácticas más responsables entre productores.

11.2 Impacto Ambiental

Al sustituir fungicidas químicos por biocontroladores se disminuye la contaminación del suelo, el agua y el aire, protegiendo los ecosistemas locales. Debido a que los hongos biocontroladores son organismos naturales que no afectan a especies no objetivo, contribuyendo a la preservación de la biodiversidad.

11.3 Impacto Económico

Si los hongos biocontroladores resultan efectivos, los productores podrán reducir gastos significativos en fungicidas químicos que suelen representar un alto costo en la producción. Además, los productos agrícolas producidos con métodos ecológicos tienen mayor aceptación en mercados internacionales especialmente en regiones que exigen certificaciones orgánicas.

12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.1 Conclusiones

- De 14 hongos aislados se seleccionaron tres cepas con mayor efectividad antagónica frente a *Botrytis spp.* in vitro. *Neurospora crassa* mostró el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con un 79,28 %, ocupando el primer lugar. Seguido por *Trichoderma asperellum* mostrando un PICR de 75,00%. Finalmente, *Annulohypoxylon spp.* presentó un PICR de 32,26 % in vitro.
- Se evaluó la viabilidad de los conidios de los aislamientos seleccionados con mayor efectividad antagónica in vitro. Los resultados confirmaron que *Neurospora crassa* y *Trichoderma asperellum* presentaron un 100 % de

germinación de conidios a las 2 horas de exposición solar, destacando su capacidad como agentes de biocontrol bajo condiciones medioambientales adversas.

- Se logró identificar morfológica y molecularmente a los hongos *Neurospora crassa*, *Trichoderma asperellum* y *Annulohyphoxylon spp.* basados en características tales como: micelio, conidias y conidióforos y su identificación fue confirmada mediante la amplificación de la región ITS la cual confirma la identidad de los hongos.

12.2 Recomendaciones

- Se recomienda complementar la caracterización morfológica de los microorganismos estudiados con un análisis molecular. La secuenciación de ADN permite comparar las secuencias obtenidas con las bases de datos disponibles en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), lo que facilita una identificación más precisa y confiable de los microorganismos.
- Se recomienda realizar ensayos de estos microorganismos en plantas bajo condiciones semi controladas y condiciones de campo para confirmar la eficacia de los hongos biocontroladores identificados. Aunque los resultados en condiciones de laboratorio han sido prometedores, es fundamental validar su desempeño en ambientes más cercanos a los sistemas de producción agrícola. En caso de obtener buenos resultados, estos hongos podrían convertirse en una alternativa más económica y accesible para agricultores y pequeñas comunidades agrícolas. Esto requeriría desarrollar métodos eficientes de producción y distribución que permitan entregar los hongos en un estado listo para su uso, reduciendo la necesidad de procesos adicionales de reactivación o purificación por parte del agricultor.

13. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, L., Azania, D. & Azania, R. (2021). Cultivo dual in vitro de cepas nativas de *Trichoderma spp.* frente a *Botrytis sp.* patógeno de *Passiflora ligularis Juss* . *Revista de*

Investigación Agropecuaria Ciencia y Biotecnología.
<https://doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>

Amaya, E. (2021). Control de botrytis (*Botrytis cinerea*), con fungicidas en pos cosecha de rosas, en la empresa Royal Flowers - Mulaló. UTC. Latacunga.
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7620>

Agrios, NG (2007). *Fitopatología* (2da ed., Vol. 1). México: Limusa Noriega Editores.

Altieri, V., Rossi, V. & Fedele, G. (2023). Biocontrol de *Botrytis cinerea* según la influencia de las etapas de crecimiento de la vid y las condiciones ambientales. *Plants*.
<https://doi.org/10.3390/plants12193430>

Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., & Leather, S. R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Elsevier Science*.
[file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/4TTOYICW/Alves_et_al_1998\[1\].pdf](file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/4TTOYICW/Alves_et_al_1998[1].pdf)

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)

Aragón, L., Gonzales, M., & Palomo, Á. (sf). *Manual de laboratorio: Aislamiento y conservación de hongos y bacterias*.
<https://web.tuat.ac.jp/~satrepsbanana/img/file15.pdf>

Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, B., & León, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* por fermentación sólida en la región de San Martín, Perú. *Revista Peruana de Biología*.

Ayala, P. (2010). Evaluación de 4 métodos de inducción de basales en plantas maduras de rosa (*Rosa spp*), variedad Vendela en la florícola Sigesa Flowers. Tabacundo, Ecuador. [Tesis de grado]. Universidad Politécnica Salesiana.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1823/11/UPS-YT00077.pdf>

- Banco Central del Ecuador (2025).** Producto Interno Bruto por Industria. <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/IEMensual.html> . Consultado el 13 de enero de 2025.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. (2012).** GenBank. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1202>
- Braga, G., Rangel, D., Fernandes, É., Flint, S., & Roberts, D. (2015).** Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 61(3), 405-425. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0483-0>
- Cabrera, G., Álvarez, E., & Sosa de Castro, N. (2006).** Patologías que afectan a *Rosa sp.* *Revista Agropecuaria y de Ciencias Ambientales*. Recuperado de [https://aulavirtual. agro .unlp .edu .ar /pluginfile .php /101182 /mod folder /content /0 /patologias %20rosa %20corrientes .pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/101182/mod_folder/content/0/patologias%20rosa%20corrientes.pdf)
- Calvache, A. (2017).** Cultivo de rosas para exportación. *Puerta de investigación* . [https://www .researchgate .net /publicación /320387356 Cultivo de Rosas para Exportacion](https://www.researchgate.net/publicación/320387356_Cultivo_de_Rosas_para_Exportacion)
- Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S. y Orozco, R. (2012).** Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. [https://www .scielo .sa .cr /pdf /am /v23n2 /a01v23n2 .pdf](https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v23n2/a01v23n2.pdf)
- Castro-Acosta, BP, La Cruz, EPM, & Arias-Montero, JE (2024).** Estudio de Benchmarking como herramienta de optimización estratégica de las exportaciones de rosas ecuatorianas. *Economía y Negocios*. <https://doi.org/10.29019/eyn.v15i1.1270>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2023).** Bases de datos del NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Chavarro, J. (2021).** Evolución y desafíos de la floricultura ecuatoriana en el futuro próximo. METROFLOR. 67 <https://www.metroflorcolombia.com/evolucion-ydesafios-de-la-floriculturaecuadoriana-en-el-futuro-proximo/>
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., y Delen, N. (2007).** *Botrytis spp.* y enfermedades que causan en los sistemas agrícolas: una introducción. En *Botrytis: Biología, patología y control*. Springer eBooks . https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_1
- Flores, F. (2021). Protocolo para la identificación molecular de microorganismos. IDgen.

- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Requena, ME, Rubio, L. y Candela-Castillo, ME (2004).** Biocontrol por *Streptomyces rochei* de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causado por *Phytophthora capsici* . *Anales de Biología*. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Fuhrman, JA y Campbell, L. (1998).** Microbial community structure in the ocean: a molecular approach." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/31100>
- Galarza, C. (2021).** *Editorial: Diseños de investigación experimental*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7890336>
- Gänzle, M. (2015).** Revisitando el metabolismo láctico: metabolismo de las bacterias del ácido láctico en las fermentaciones y el deterioro de los alimentos. *Current Opinion in Food Science*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.002>
- García, D., & Wong, A. (2020).** Efectividad a nivel in vitro de *Trichoderma spp.* nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>
- Gómez, T. (2014).** Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/50427/07790832.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gostinchar, J. (1954).** Cultivo del rosal. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España* . https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1954_13.pdf
- Guerrero, M. (2015).** Descripción etológica de la araña roja del cultivo de rosa (*Rosa sp*) en laboratorio, CEASA, sector Salache, provincia de Cotopaxi. *Repositorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi* . <http://190.15.139.147/navegar?tipo=asunto&orden=ASC&rpp=20&valor=DESCRIPCION+ETOLOGICA>
- Gutiérrez, Y. (2012).** Módulo práctico: Técnicas de laboratorio. *Universidad Politécnica Salesiana* . <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/26698/1/TTQ314.pdf>
- Hernández, N., Bautista, S., Velázquez, M., & Hernández, A. (2007).** Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos.

Revista Mexicana de Fitopatología. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009&lng=es&tlng=es

- Heussler, P. (1991).** Generalidades del cultivo de rosas. En *Seminario de producción y exportación de rosas*. Quito: SEP.
- Hidalgo, D., & Tello, C. (2022).** Manual para la producción de hongos entomopatógenos y análisis de calidad de bioformulados. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*. Manual N° 128, Estación Experimental Santo Domingo, Ecuador.
- Esperanza. (2016).** Enfermedades de la rosa. *Escrito* . <https://es.scribd.com/document/333465648/Enfermedades-de-La-Rosa>
- Ipiales, O., & Cuichán, M. (2024).** Boletín técnico: Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC). *Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC)* . https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/2023/Boletin_tecnico_ESPAC_2023.pdf
- Kaur, H.; Inderjit and Kaushik, S. (2005).** Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* 43(1):77-81.
- Kuo, HC., Hui, S., Choi, J. (2014).** Estilos de vida secretos de *Neurospora crassa*. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/srep05135>.
- Martínez, J. (2005).** 1ª parte: Floricultura. *Georgiusm.com*. <https://georgiusm.com/wp-content/uploads/2015/03/1-1c2aa-parte1.pdf>
- Merchán, J., Ferrucho, R. & Álvarez, J. (2014).** Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-2173201400010000.
- Muñoz, C. (2008).** Identificación rápida de distintas razas de *Botrytis cinerea*. (PDF) [Identificación rápida de distintas razas de Botrytis cinerea](#)
- Nessma A. El-Zawawy, Sameh S. Ali, Maha A. Khalil, Jianzhong Sun, Hoda S. Nouh, (2022).** Exploring the potential of benzoic acid derived from the endophytic fungus strain *Neurospora crassa* SSN01 as a promising antimicrobial agent in wound healing. *Research*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501322001483>

- Osses, J. (2024).** Efectos la Radiación UV-B en la Viabilidad de Conidios Microencapsulados de *Beauveria bassiana* Aislados de *Hylurgus ligniperda*. <https://repositorio.udec.cl/server/api/core/bitstreams/2232dd83-8df7-4727-8f92-5cba32cbce8f/content>
- Panjón, A., & Vintimilla, V. (2008).** Manejo integrado de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de rosas (*Rosa sp*) bajo invernadero. *Repositorio de la Universidad de Cuenca* . <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/23006>
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, RC, Oh, S., Smedmark, JEE, Morgan, DR, Kerr, M., Robertson, KR, Arsenault, M., Dickinson, TA y Campbell, CS (2007).** Filogenia y clasificación de las rosáceas. *Plant Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>
- Palomino, S., & Ccoa, D. (2022).** Efectos de la agricultura intensiva y el cambio climático sobre la biodiversidad. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal Of High Andean Research*. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.328>
- Rojas, J. (2016).** Estudios de la diversidad genética de *Botrytis sp.* en orquídeas y la resistencia al ataque del hongo. https://oa.upm.es/39846/1/JACQUELINE_ROJAS_ROJAS.pdf
- Romoleroux, K. (2017).** Rosáceas. En León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitmam, N., Endara, L., Ulloa Ulloa, C., & Navarrete, H. (Eds.), *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador* . Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500404>
- Rocha, L. (2018).** Identificación de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de rosa (*Rosa sp*), en el sector Lasso, provincia de Cotopaxi. *Repositorio Digital UTA* . <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/b97bcd84-b6cf-4dee-b0b0-6adddd45273f/content>
- Rzedowski, J. y Calderón, G. (2005).** Flora del Bajío y de regiones adyacentes (Rosaceae). *Instituto de Ecología, AC*. <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Rosaceae%20135.pdf>
- Rzedowski, J. (2021).** La familia Rosaceae en México. *Polibotánica*. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.1>

- Sambrook, J., & Russell, D. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
<https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Sánchez, J., Cermeli, M. y Morales, P. (2002).** Ciclo biológico del minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidóptera: *Gracillariidae*) en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Puerta de investigación*.
<https://www.researchgate.net/publicación/27794074>
- Sánchez, R. y Oliva, N. (2015).** Historia del microscopio y su repercusión en la microbiología. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202015000200010
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C., Kent, S. B. H., & Hood, L. E. (1986).** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674-679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>
- Spadaro, D., & Droby, S. (2015).** Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends In Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Téllez, J. (2022).** Botrytis spp.: estado actual del biocontrol. Microsoft Word - Téllez J. 2022. Botrytis spp.- estado actual del biocontrol..docx
- Terrones, J., Nieto, D., Nava, C., Téliz, D., García, R., Vallejo, M., & Sánchez, P. (2019).** *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Tenorio, R. (2019).** Manejo integrado (MI) de *Bemisia tabaci* en cultivos hortícolas, cantón Babahoyo, provincia Los Ríos. *Repositorio Digital de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo* . <https://190.15.129.146/handle/49000/6476>
- Varón, É., Santos, Ó., & Monje, B. (2018).** Generalidades sobre viajes. *Agrosavia* .
https://repositorio.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/616/77501_66459.pdf

- White, T., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990).** PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual.
<https://www.researchgate.net/publication/223397588> White T J T D. Bruns S B Lee and J W Taylor Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics
- Yong, A. (2004).** Revisión bibliográfica EL CULTIVO DEL ROSAL Y SU PROPAGACION. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/nadia,+CT25201a%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/nadia,+CT25201a%20(1).pdf)
- Zardini, E. (1993).** Los géneros de rosáceas espontáneas en la República de Argentina. *Revista de la Sociedad Argentina de Botánica*, 29 (3), 209-228.
<https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2018/09/209-228008.pdf>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020).** Biological functions of Trichoderma spp. for agriculture applications. *Annals Of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>.
- Zhou, S., Dou, G., & Yan, D. (2024).** Fine-scale genomic analysis of the tree endophyte *Annulohyphoxylon* sp. FPYF3050 producing monoterpene 1,8-cineole. *Microbiology Resource Announcements*. <https://doi.org/10.1128/mra.01199-23>