
Implementación de un protocolo para la reproducción de cepas de *Trichoderma spp.* previo a su uso como biofertilizante

Laura Sofía Sierra Robles



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



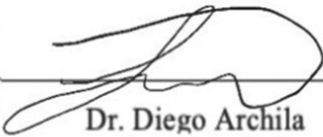
Implementación de un protocolo para la reproducción de cepas de
Trichoderma spp. Previo a su uso como biofertilizante

Trabajo de graduación presentado por Laura Sofía Sierra Robles para
optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

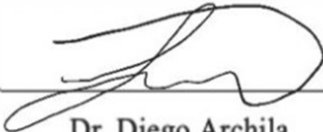
Guatemala,

2024

Vo. Bo.:

(f) 
Dr. Diego Archila

Tribunal Examinador:

(f) 
Dr. Diego Archila

(f) 
Ing. Angela Meoño

(f) 
Dra. Dalia Lau

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 enero 2025

Prefacio

El presente trabajo, titulado “Implementación de un protocolo para la reproducción de cepas de *Trichoderma spp.* previo a su uso como biofertilizante”, fue realizado como parte de un proyecto para la empresa Tak Global © durante mi periodo de prácticas profesionales universitarias. La idea del proyecto surgió durante mi incorporación al laboratorio de fitopatología en una finca, donde fui asignada a desarrollar métodos para la reproducción de *Trichoderma*.

A lo largo de la investigación, llevé a cabo un total de 17 pruebas iniciales, en las cuales evalué diversas condiciones de incubación y analicé el comportamiento del hongo en cada una. Estas pruebas permitieron identificar las condiciones más favorables para el crecimiento de *Trichoderma*, las cuales sirvieron como base para el desarrollo de ensayos posteriores. Con esta información, se ampliaron las pruebas hasta alcanzar un total de 35 ensayos, incluyendo tanto las condiciones previamente establecidas como pruebas con nuevas cepas.

Este proceso permitió determinar un método de reproducción de *Trichoderma* que fuera económico, rápido y eficiente para su aplicación agrícola. Además, la investigación combina estudios sobre las condiciones del sustrato y validación molecular mediante PCR, contribuyendo así a la mejora de su aplicación en biotecnología agrícola.

Agradecimientos

Primeramente, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios, por brindarme la oportunidad, fortaleza y sabiduría para realizar y culminar mi carrera. A Él encomiendo todos mis logros y mis pasos hacia el futuro.

A mis padres, Luis Sierra y Aracely Robles, les debo todo lo que soy. Gracias por su incondicional apoyo, su sabiduría, las enseñanzas importantes que siempre guardaré en mi corazón, y, sobre todo, por su amor incondicional. Ellos han sido mi mayor inspiración y mi guía en cada etapa de mi vida.

A mi hermano, Juan Andrés Sierra, quiero agradecerle profundamente por ser mi pilar y motivación constante. Su compañía y ánimo han sido fundamentales en este camino. Extiendo también mi agradecimiento a toda mi familia, que siempre estuvo ahí para apoyarme en los momentos más importantes de mi vida.

A Angela Meoño y Tak Global ©, agradezco la oportunidad que me brindaron de realizar mi tesis en su empresa y su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigas Diana Aguilar y Valeria Mayen, quienes hicieron que mi paso por la universidad fuera una experiencia especial y memorable. Gracias por su amistad, apoyo y las memorias que siempre llevaré conmigo.

Finalmente, agradezco a mi universidad por brindarme las herramientas necesarias para enfrentar los desafíos de la vida profesional, así como a los catedráticos que me guiaron y apoyaron a lo largo de este trayecto académico.

A todos, muchas gracias.

Índice

Prefacio	i
Agradecimientos	ii
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract.....	xi
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	2
Tabla 1. Porcentajes en incremento de importaciones en los años 2008, 2014 y 2015	2
Tabla 2. Valor y cantidad de las importaciones de fertilizantes químicos.....	3
3 Justificación	6
4 Marco teórico	8
4.1 Historia y fundación de Tak Global: compromiso con la innovación agrícola y sostenibilidad 8	
4.2 Agricultura 8	
4.3 Métodos de control de plagas.....	11
4.4 Métodos alternos	13
4.5 Trichoderma spp.....	15
Figura 1. Estructura macroscópica y microscópica de Trichoderma viride.....	16
Figura 2. Estructura microscópica de Trichoderma harzianum	18
Figura 3. Representación de los beneficios de Trichoderma en las plantas.....	22
4.6 Fertilizantes.....	22
4.7 Suelos.....	23
Tabla 3. Categoría de la utilización de la tierra en 2020.....	24
4.8 Métodos de validación de cepas.....	26
Figura 4. Diagrama proceso PCR.....	28
4.9 Otros métodos de genotipificación.....	29
Figura 5. Gráfico de fases	29
Figura 6. Expresión genética TaqMan	32
Figura 7. Principio del colorante SYBR Green.....	33
4.10 Análisis del producto.....	33
Figura 8. Diagrama principio electroforesis en gel.....	34
Figura 9. Funcionamiento del PCR – RFLP	35
4.11 Identificación molecular Trichoderma	36

5.	Objetivos.....	38
5.1	Objetivo general	38
5.2	Objetivos específicos.....	38
6.	Hipótesis.....	39
6.1	Hipótesis alterna (Ha)	39
6.2	Hipótesis nula (Ho)	39
7.	Metodología.....	40
7.1	Sitio de estudio.....	40
7.2	Sujeto de estudio	40
7.3	Población y muestra	40
7.4	Tipo de investigación	40
7.5	Tamaño de muestra	40
7.6	Variables.....	41
	Tabla 4. Variable de tiempo	41
	Tabla 5. Variable de crecimiento	41
	Tabla 6. Variable calidad del micelio	42
7.7	Primeras pruebas realizadas con Trichoderma comercial	42
7.8	Pruebas a partir de cepas crecidas en el laboratorio.....	43
7.9	Diseño de primers.....	43
7.10	Extracción de ADN	44
7.11	Amplificación	44
	Tabla 7. Amplificación.....	45
7.12	Realización de PCR convencional	45
	Tabla 8. Programa PCR para amplificación de los genes objetivo	45
7.13	Resumen metodologías.....	45
	Figura 10. Diagrama de metodología pruebas con Trichoderma comercial	47
	Figura 11. Metodología con Trichoderma a partir de la cepa en placa	48
7.14	Análisis de datos	48
8.	Análisis de resultados.....	50
8.1	Resultados del conteo de esporas y concentraciones de crecimiento	50
	Figura 12. Cantidad de esporas bajo condiciones de iluminación	50
	Figura 13. Cantidad de esporas bajo condiciones sin iluminación	51
	Figura 14. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz entero	52
	Figura 15. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz quebrado	53
	Figura 16. Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: remojo	54
	Figura 17. Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: lavado inmediato	55
	Tabla 9. Conteo de esporas según condición de incubación.....	56
	Tabla 10. Concentraciones según dosis	56
	Figura 18. Comparación en las concentraciones según los días de incubación	57
	Figura 19. Estructuras observadas.....	58
	Figura 20. Concentraciones totales UCF/ml	59

8.2 Resultados de la validación de cepas.....	59
Tabla 11. Concentraciones de ADN.....	59
Figura 21. Amplificación de la muestra control.....	60
Figura 22. Resultados de las muestras silvestres	61
Figura 23. Secuencia de nucleótidos <i>T. harzianum</i>	62
Figura 24. Secuencia de nucleótidos <i>T. viride</i>	63
Figura 25. Regiones para las sondas	64
9. Discusión de resultados.....	65
10. Conclusiones.....	70
11. Recomendaciones	71
12. Referencias.....	72
13. Apéndice.....	83
13.1 Apéndice A: datos crudos obtenidos en la investigación	83
Tabla 12. Medición de crecimiento en tiempo.....	83
Tabla 13. Concentraciones según muestras	83
Tabla 14. Conteo total de esporas	84
Tabla 15. Concentraciones finales.....	86
13.2 Apéndice B: procedimiento operativo estándar 01. Producción.....	87
Figura 26. Cuadrantes utilizados para forma de conteo de concentración UFC/ml.....	89
Figura 27. Ejemplo de implementación de cuadro de concentración UFC/ml	90
13.3 Apéndice C: procedimiento operativo estándar 02. Extracción ADN.....	90
13.4 Apéndice D: procedimiento operativo estándar 03. Validación molecular de cepas de <i>Trichoderma</i> mediante PCR convencional	94
13.5 Apéndice E: figuras	97
Figura 28. Comparación del crecimiento de <i>Trichoderma</i> en condiciones de Luz.....	97
Figura 29. Comparación de <i>Trichoderma</i> según la condición del sustrato	97
Figura 30. Comparación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> 6 días después de inoculación bajo 1 día de remojo del sustrato.....	97
Figura 31. Comparación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> 6 días después de inoculación bajo 2 días de remojo del sustrato	98
Figura 32. Comparación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> 2 semanas después de inoculación según condiciones de remojo del sustrato	98

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Porcentajes en incremento de importaciones en los años 2008, 2014 y 2015</i>	2
Tabla 2. <i>Valor y cantidad de las importaciones de fertilizantes químicos</i>	3
Tabla 3. <i>Categoría de la utilización de la tierra en 2020</i>	24
Tabla 4. <i>Variable de tiempo</i>	41
Tabla 5. <i>Variable de crecimiento</i>	41
Tabla 6. <i>Variable calidad del micelio</i>	42
Tabla 7. <i>Amplificación</i>	45
Tabla 8. <i>Programa PCR para amplificación de los genes objetivo</i>	45
Tabla 9. <i>Conteo de esporas según condición de incubación</i>	56
Tabla 10. <i>Concentraciones según dosis</i>	56
Tabla 11. <i>Concentraciones de ADN</i>	59
Tabla 12. <i>Medición de crecimiento en tiempo</i>	83
Tabla 13. <i>Concentraciones según muestras</i>	83
Tabla 14. <i>Conteo total de esporas</i>	84
Tabla 15. <i>Concentraciones finales</i>	86

Lista de figuras

Figura 1. Estructura macroscópica y microscópica de <i>Trichoderma viride</i>	16
Figura 2. Estructura microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	18
Figura 3. Representación de los beneficios de <i>Trichoderma</i> en las plantas	22
Figura 4. Diagrama proceso PCR	28
Figura 5. Gráfico de fases.....	29
Figura 6. Expresión genética TaqMan.....	32
Figura 7. Principio del colorante SYBR Green	33
Figura 8. Diagrama principio electroforesis en gel	34
Figura 9. Funcionamiento del PCR – RFLP	35
Figura 10. Diagrama de metodología pruebas con <i>Trichoderma</i> comercial	47
Figura 11. Metodología con <i>Trichoderma</i> a partir de la cepa en placa	48
Figura 12. Cantidad de esporas bajo condiciones de iluminación.....	50
Figura 13. Cantidad de esporas bajo condiciones sin iluminación.....	51
Figura 14. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz entero	52
Figura 15. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz quebrado.....	53
Figura 16. Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: remojo	54
Figura 17. Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: lavado inmediato.....	55
Figura 18. Comparación en las concentraciones según los días de incubación	57
Figura 19. Estructuras observadas	58
Figura 20. Concentraciones totales UFC/ml.....	59
Figura 21. Amplificación de la muestra control	60
Figura 22. Resultados de las muestras silvestres.....	61
Figura 23. Secuencia de nucleótidos <i>T. harzianum</i>	62
Figura 24. Secuencia de nucleótidos <i>T. viride</i>	63
Figura 25. Regiones para las sondas	64
Figura 26. Cuadrantes utilizados para forma de conteo de concentración UFC/ml.....	89
Figura 27. Ejemplo de implementación de cuadro de concentración UFC/ml	90
Figura 28. Comparación del crecimiento de <i>Trichoderma</i> en condiciones de Luz	97

Figura 29. <i>Comparación de Trichoderma según la condición del sustrato</i>	97
Figura 30. <i>Comparación de crecimiento de Trichoderma 6 días después de inoculación bajo 1 día de remojo del sustrato</i>	97
Figura 31. <i>Comparación de crecimiento de Trichoderma 6 días después de inoculación bajo 2 días de remojo del sustrato</i>	98
Figura 32. <i>Comparación de crecimiento de Trichoderma 2 semanas después de inoculación según condiciones de remojo del sustrato</i>	98

Resumen

El control de enfermedades en cultivos y el incremento de la productividad agrícola han dependido del uso de insumos químicos, incluyendo pesticidas, herbicidas y fertilizantes. No obstante, estas prácticas presentan serias desventajas ambientales, ya que muchas de las sustancias utilizadas, como los compuestos aromáticos y sus derivados metilados o etilados, generan contaminación en el agua y el aire, generando residuos persistentes que pueden tener efectos negativos tanto en los ecosistemas como en la salud humana.

Para países como Guatemala, cuya economía se fundamenta en gran medida en la agricultura, explorar alternativas sostenibles a los agroquímicos es esencial. Entre estas, destacan hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, conocidos por su capacidad para controlar plagas y enfermedades mediante mecanismos como la producción de compuestos antifúngicos o la competencia por nutrientes. Asimismo, especies bacterianas como *Bacillus subtilis* promueven el crecimiento vegetal y optimizan la absorción de nutrientes esenciales.

Sin embargo, *Trichoderma spp.* se posiciona como una de las alternativas más prometedoras por sus múltiples beneficios. Este hongo no solo actúa como un efectivo agente de control biológico, compitiendo agresivamente contra patógenos y promoviendo la salud del suelo, sino que también estimula directamente el desarrollo vegetal. Su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y su rápida reproducción lo convierten en una solución sostenible y de alto impacto para mejorar los rendimientos agrícolas y reducir la dependencia de insumos químicos. Estos hongos poseen un notable potencial de biocontrol frente a fitopatógenos del suelo mediante mecanismos directos e indirectos, como el micoparasitismo, la competencia por nutrientes y espacio, y la inducción de la resistencia en las plantas. La creciente resistencia de los patógenos a los pesticidas químicos y la constante amenaza de enfermedades fúngicas en cultivos resaltan la necesidad de desarrollar tecnologías verdes basadas en agentes de biocontrol. *Trichoderma* se perfila como un candidato ideal debido a su versatilidad y efectividad.

Este estudio tuvo como objetivo implementar un protocolo para evaluar la concentración óptima de crecimiento de *Trichoderma* utilizando arroz como sustrato. Los resultados demostraron que el tipo de arroz, las condiciones de iluminación y el método de remojo influyen significativamente en la producción de esporas. El arroz entero fue más eficiente y práctico que el quebrado, la incubación bajo luz incrementó la producción de esporas, y el remojo prolongado mejoró las condiciones del sustrato.

Además, parte del protocolo incluye un método para la validación de presencia de especies de *Trichoderma* en el sustrato. Para esto se diseñaron tanto cebadores como sondas para la identificación de cepas *T. harzianum* y *T. viride* utilizando una PCR en tiempo real utilizando qPCR, para una detección y cuantificación precisa de las especies. Los cebadores se validaron mediante PCR convencional. Finalmente, Los hallazgos de este trabajo resaltan la importancia de varios factores necesarios para optimizar la producción de *Trichoderma* spp. en aplicaciones agrícolas y biotecnológicas. Los hallazgos respaldan la hipótesis alterna, destacando la importancia de estos factores para optimizar la producción de *Trichoderma* spp. en aplicaciones agrícolas y biotecnológicas.

Palabras clave: biofertilizante, *Trichoderma* spp., persistencia en suelo, PCR convencional, electroforesis

Abstract

Disease control in crops and the increase in agricultural productivity have traditionally relied on the use of chemical inputs, including pesticides, herbicides, and fertilizers. However, these practices present significant environmental drawbacks, as many of the substances used, such as aromatic compounds and their methylated or ethylated derivatives, contribute to water and air pollution, leaving persistent residues that can negatively impact both ecosystems and human health.

For countries like Guatemala, whose economy is largely based on agriculture, exploring sustainable alternatives to agrochemicals is essential. Among these, fungi such as *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* stand out for their ability to control pests and diseases through mechanisms like the production of antifungal compounds or competition for nutrients. Similarly, bacterial species such as *Bacillus subtilis* promote plant growth and optimize the absorption of essential nutrients.

However, *Trichoderma spp.* emerges as one of the most promising alternatives due to its numerous benefits. This fungus not only acts as an effective biological control agent by aggressively competing against pathogens and promoting soil health but also directly stimulates plant development. Its adaptability to different environmental conditions and rapid reproduction makes it a sustainable and impactful solution for enhancing agricultural yields and reducing reliance on chemical inputs. These fungi exhibit remarkable biocontrol potential against soil-borne phytopathogens through direct and indirect mechanisms, such as mycoparasitism, nutrient and space competition, and the induction of plant resistance. The growing resistance of pathogens to chemical pesticides and the ongoing threat of fungal diseases in crops underscore the need to develop green technologies based on biocontrol agents. *Trichoderma* stands out as an ideal candidate due to its versatility and effectiveness.

This study aimed to implement a protocol to evaluate the optimal growth concentration of *Trichoderma* using rice as a substrate. The results demonstrated that the type of rice, lighting conditions, and soaking method significantly influence spore production. Whole rice proved

more efficient and practical than broken rice, incubation under light increased spore production, and prolonged soaking improved substrate conditions.

Additionally, part of the protocol includes a method for validating the presence of *Trichoderma* species in the substrate. To achieve this, primers and probes were designed to identify *T. harzianum* and *T. viride* strains using real-time PCR (qPCR) for precise detection and quantification of the species. The primers were validated through conventional PCR. Finally, the findings of this study highlight the importance of several factors necessary to optimize the production of *Trichoderma* spp. for agricultural and biotechnological applications. These findings support the alternate hypothesis, emphasizing the relevance of these factors in optimizing the production of *Trichoderma* spp. for agricultural and biotechnological uses.

Keywords: biofertilizer, *Trichoderma* spp., soil persistence, conventional PCR, electrophoresis

I. Introducción

El manejo de enfermedades vegetales y la mejora de los rendimientos agrícolas han dependido tradicionalmente del uso de métodos químicos, como pesticidas, herbicidas y fertilizantes. Sin embargo, estas estrategias presentan importantes limitaciones desde una perspectiva ambiental, ya que muchas de las sustancias químicas empleadas, como compuestos aromáticos y derivados metilados o etilados, contribuyen a la contaminación del agua y el aire, además de dejar residuos persistentes que pueden ser perjudiciales para los ecosistemas y la salud humana. Además, el uso prolongado de estos productos contribuye al desarrollo de organismos resistentes, lo que plantea desafíos significativos en la protección de cultivos a largo plazo (Naher et al., 2014).

En este contexto, los hongos filamentosos del género *Trichoderma*, ampliamente presentes en los ecosistemas del suelo, se destacan como una alternativa biológica sostenible. Estos hongos poseen un notable potencial de biocontrol frente a fitopatógenos del suelo mediante mecanismos directos e indirectos, como el micoparasitismo, la competencia por nutrientes y espacio, y la inducción de la resistencia en las plantas. Además, *Trichoderma* promueve el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas y la liberación de enzimas (Tyśkiewicz et al., 2022).

La creciente resistencia de los patógenos a los pesticidas químicos y la constante amenaza de enfermedades fúngicas en cultivos resaltan la necesidad de desarrollar tecnologías verdes basadas en agentes de biocontrol. *Trichoderma* se perfila como un candidato ideal debido a su versatilidad y efectividad, ya sea como formulaciones independientes o en combinación con otros microorganismos benéficos para las plantas, como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Guzmán-Guzmán et al., 2023).

Este estudio busca implementar un protocolo que utilice arroz como sustrato para optimizar el crecimiento de especies de *Trichoderma* y validar su efectividad mediante técnicas moleculares, con el fin de ofrecer una herramienta práctica y sostenible para la agricultura moderna.

II. Antecedentes

Se conoce que el uso de agroquímicos es muy importante en la agroindustria ya que resulta ser una herramienta muy útil debido a su extenso uso. En Guatemala tiene relevancia debido a que es un país productor en el sector primario. Según datos nacionales proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), durante los años 2008 – 2015, se observó un incremento en las inversiones en la importación de insumos agrícolas (Instituto Nacional de Estadística [INE], 2023).

En países agricultores como Guatemala las alternativas a los agroquímicos resultan ser de mucha importancia. *Trichoderma spp.* es una especie de hongo que se ha utilizado como biocontrol debido a su rápida propagación y nivel de desarrollo. Dentro de las especies con más efectos contra hongos fitopatógenos están *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum*. Poseen un rápido crecimiento y una alta capacidad de esporulación y adaptación a diferentes tipos de suelos, por lo que sobrevive en diferentes ambientes (Companioni et al., 2019).

Actualmente es de mucha relevancia la utilización de nuevas alternativas a los fertilizantes comerciales para la protección de los suelos y mantener los cultivos de manera sostenible. Los microorganismos antagonistas, como los hongos, tienen la capacidad de ejercer un efecto de biocontrol sobre patógenos y han sido empleados para controlar enfermedades en cultivos (Blanco y Castro, 2021). Estos se pueden encontrar en el suelo de forma natural y contribuyen al desarrollo sostenible de la agricultura.

Tabla 1. Porcentajes en incremento de importaciones en los años 2008, 2014 y 2015

Insumo	Presentación	2008	2014	2015	Crecimiento (%) 2008-2015
Plagicida	Toneladas (miles)	12.50	8.02	16.12	28.95
	Litros (miles)	15.92	14.68	23.04	44.78
	USD (millones CIF ¹³)	180.25	215.20	190.51	5.70
Fertilizante	Toneladas (miles)	529.19	896.67	925.79	74.94

Insumo	Presentación	2008	2014	2015	Crecimiento (%)	
					2008-2015	
	Litros (miles)	1.69	2.08	1.99	18.06	
	USD (millones CIF)	291.66	321.26	315.05	8.02	

Nota. Datos tomados del Instituto Nacional de Estadística (2011, 2014, 2015).

En la Tabla 1 se puede observar que existe una tendencia de aumento en las importaciones anuales y además que este incremento se da año con año. Por ejemplo, se muestra que en el 2008 se consumieron 12 500 toneladas de plaguicidas y en 2015 este consumo incrementó a 16 200 toneladas, particularmente, todas estas con potencial a acumulación en los suelos ya que algunas sustancias pueden ser dañinas ambiental y socialmente (García y Gálvez, 2022).

En años recientes, el encarecimiento de los fertilizantes químicos ha sido una consecuencia de múltiples factores globales que han impactado el comercio internacional. Entre estos factores destacan la crisis generada por el conflicto entre Rusia y Ucrania y el incremento sostenido en la demanda mundial de insumos agrícolas desde el inicio de la pandemia de COVID-19. Datos recientes indican que, durante el primer semestre de 2022, el valor en dólares estadounidenses de las importaciones de fertilizantes químicos en América Latina y el Caribe (ALC) experimentó un aumento promedio del 136.6% en comparación con el mismo período del año anterior, mientras que el volumen físico importado registró un crecimiento marginal del 4%. Esta situación evidencia no solo la volatilidad en los mercados internacionales, sino también la vulnerabilidad de los sistemas agrícolas dependientes de insumos importados, lo que subraya la urgencia de adoptar alternativas sostenibles como el uso de microorganismos antagonistas y biofertilizantes (Consilla et al., 2022).

Tabla 2. *Valor y cantidad de las importaciones de fertilizantes químicos*

País	Valor (USD) enero - junio		Cantidad (t): enero - junio		Valor Unit. (USD/T)		Var %
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	
	Panamá	48,567,208	87,182,945	122,964	86,638	394.97	
Perú	216,174,024	402,038,425	750,084	573,919	288.20	700.51	143
Brasil	4,579,291,98	12,830,707,30	16,641,92	19,339,58	275.17	664.34	141

País	Valor (USD) enero - junio		Cantidad (t): enero - junio		Valor Unit. (USD/T)		Var %
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	
	1	9	2	1			
Chile	205,757,602	321,186,837	494,615	320,284	416.00	1,002.82	141
El Salvador	56,458,431	111,819,030	183,878	152,208	307.04	734.64	139
Uruguay	164,132,948	306,142,197	504,333	398,867	325.45	767.53	136
Colombia	356,965,322	821,754,882	1,073,844	1,066,344	332.42	770.63	132
Argentina	709,740,019	1,280,726,497	1,639,234	1,326,946	432.97	965.17	123
Guatemala	198,375,266	351,096,975	538,346	436,528	368.49	804.29	118
Honduras	114,553,021	201,090,620	293,880	236,994	389.80	848.51	118
Ecuador	212,008,811	360,022,222	541,293	434,070	391.67	829.41	112
Belice	10,390,360	17,925,156	22,963	18,767	452.48	955.12	111
México	405,266,600	1,941,521,420	214,585	475,738	374.22	784.22	110
Paraguay	189,407,097	286,524,350	623,613	470,853	303.73	608.52	100
Bolivia	30,391,639	35,633,997	55,100	33,932	551.57	1,050.17	90
Guyana	13,729,925	20,537,547	29,814	23,696	460.52	866.69	88
Barbados	2,105,074	2,010,338	1,294	1,398	1,626.7	1,438.13	-12
República Dominicana	75,212,080	112,567,103	-	-	-	-	-

Nota. Datos adaptados de Aumenta 137% el valor de las importaciones de fertilizantes químicos de América Latina y el Caribe en 2022., por ., Consilla Donaire, J. Arias Segura, J. y D. Rodríguez Sáenz, 2022, y Trade Data Monitor - Global Trade Data Statistics Supplier, 2022.

La tabla anterior refleja cómo las crisis globales recientes han encarecido los fertilizantes químicos en la región de ALC, con un aumento en el valor de las

importaciones desproporcionado respecto a las cantidades adquiridas. Este escenario subraya la vulnerabilidad económica y productiva de los países dependientes de insumos agrícolas importados, lo que podría incentivar la búsqueda de alternativas locales sostenibles, como el uso de biofertilizantes y microorganismos como *Trichoderma*.

Hoy en día, este tipo de alternativas a los fertilizantes comerciales para la protección de los suelos y sostenibilidad de los cultivos tiene mucha importancia y campo. Como estrategia alterna se pueden utilizar microorganismos antagonistas, ya que tienen la capacidad de ejercer un efecto de biocontrol sobre patógenos y han sido empleados para controlar enfermedades en cultivos (Blanco y Castro, 2021). Estos microorganismos se pueden encontrar en el suelo de forma natural y contribuyen al desarrollo sostenible de la agricultura.

En Guatemala las alternativas a estos agroquímicos resultan ser de mucha importancia debido a que es un componente crucial en la economía del país. Algunos microorganismos utilizados para el reemplazo de agroquímicos son las bacterias y hongos.

III. Justificación

La agricultura posee un impacto social y económico alto, sin embargo, en países en donde el porcentaje de economía depende de una gran parte este sector primario el incremento de la productividad agrícola y mejora de calidad es de relevancia. De acuerdo con estudios realizados por la Encuesta Nacional de Empleo e Ingresos en el año 2022 el 34.2% de la población ocupada en el sector informal son de agricultura y se encuentra dentro de las tres actividades predominantes entre la población ocupada con un 27.1% (INE, 2023).

Para proporcionar un mejor producto en donde se proteja y aumente el rendimiento y calidad de estos es importante el uso de elementos externos que proporcionen protección a las plantas, el uso más común en el campo agroindustrial es de plaguicidas, sin embargo, estos pueden permanecer por años en el suelo y agua teniendo efectos tóxicos para los seres humanos y causando problemas crónicos en la salud (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022). Además, es importante mencionar que el suelo puede ser degradado y dañar a los organismos que habitan en el (National Pesticide Information Center, 2015) por lo que existen alteraciones al ecosistema. Los pesticidas son un conjunto de químicos que se utilizan para la eliminación de insectos, roedores, hongos y malezas. Como parte de estos se encuentran los insecticidas, herbicidas, nematicidas, fungicidas, entre otros (Pathak et al., 2022). Este conjunto no siempre es enfocado en un solo organismo por lo que resulta siendo dañino en un el ecosistema general.

Actualmente, existen nuevas alternativas en donde se busca utilizar productos con menos agresividad al medio ambiente y que proporcionen los mismos resultados, un ejemplo de esto son las especies de *Trichoderma*. Estos son hongos saprófitos que se utilizan como agentes de control biológico ya que tienen una capacidad de reproducción alta y efectividad contra hongos fitopatógenos, causando una eficiencia en los mecanismos de defensa de la planta y así mejorar la calidad de la

planta (Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura [Intagri S.C.], s. f.). Es importante mencionar que *Trichoderma* es uno de los agentes biológicos más utilizados con más de 60% de los biofungicidas registrados (Charoenrak y Chamswarng, 2016). Por lo que representa un amplio campo de trabajo y presenta mucha efectividad gracias a su alta tasa de reproductividad. Mencionado esto, en esta investigación se pretende utilizar este agente de biocontrol para conocer a qué concentraciones es favorable su reproducción utilizando arroz como sustrato.

4. Marco teórico

4.1 Historia y fundación de Tak Global: compromiso con la innovación agrícola y sostenibilidad

En 1987, Alfredo Mirón identificó en una finca ubicada en San José Pinula, Guatemala. Con la visión de desarrollar cultivos de Leatherleaf, se asoció con Ralph Faircloth, Archie Baldocchi y John Marcell, quienes compartían los mismos objetivos (TAK GLOBAL, s. f.). Este esfuerzo conjunto dio lugar a un emprendimiento que, más de tres décadas después, continúa siendo un referente destacado en la industria.

TAK GLOBAL se ha consolidado como un líder global en la producción de follajes verdes, con una capacidad de producción superior a 1,000 contenedores anuales. Su compromiso con la innovación, el crecimiento de sus colaboradores y la excelencia en la calidad han sido pilares fundamentales en su éxito continuo. Entre los principales productos que ofrece TAK GLOBAL se encuentran especies como *Eucalyptus polyanthemos*, *Eucalyptus gunnii*, *Leatherleaf*, *Monstera deliciosa*, *Chamaedorea cataractarum* y *Gypsophila paniculata*. Asimismo, produce productos secos y preservados como *Eunymus japonicus var.* y *Rumohra adiantiformis*, entre otros.

Este enfoque empresarial ha posicionado a TAK GLOBAL como un referente en el sector, destacándose no solo por su capacidad productiva, sino también por su compromiso con la sostenibilidad y el desarrollo agrícola en Guatemala.

4.2 Agricultura

La agricultura es una de las actividades económicas más antiguas y fundamentales para la subsistencia humana, al proveer alimentos, materias primas y recursos esenciales para la economía global. Se define como el proceso mediante el cual el ser humano cultiva plantas y cría animales para obtener productos útiles. En el contexto de los sistemas agrícolas modernos, diversos autores han analizado su evolución y eficiencia productiva (Trewavas, 2001). A lo

largo de la historia, la agricultura ha evolucionado desde técnicas rudimentarias hasta prácticas intensivas y tecnológicas que buscan optimizar la producción y la sostenibilidad.

A lo largo de la historia, la agricultura ha evolucionado desde técnicas rudimentarias hasta prácticas intensivas y tecnológicas que buscan optimizar la producción y la sostenibilidad.

La agricultura sostenible, por su parte, es un “sistema integrado de prácticas de producción de plantas y animales con una aplicación específica al sitio, que a largo plazo: satisface las necesidades humanas de alimentos y fibra, mejora la calidad ambiental, utiliza de manera eficiente los recursos no renovables y los recursos de la finca, integrando ciclos biológicos naturales y controles adecuados; mantiene la viabilidad económica de las operaciones agrícolas; y mejora la calidad de vida de los agricultores y la sociedad en general (Velten et al., 2015).

4.2.1 Agricultura en el desarrollo global

La agricultura enfrenta desafíos críticos a nivel mundial, como el cambio climático, el crecimiento de la población y la degradación de los recursos naturales. Según la FAO (2009), la producción agrícola debe incrementarse un 70% para 2050 a fin de satisfacer la demanda de alimentos. La adopción de nuevas tecnologías, como la agricultura de precisión, los biofertilizantes y las prácticas sostenibles, ha permitido mejorar la productividad y minimizar el impacto ambiental.

Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos, los sistemas agroalimentarios presentan retos importantes en términos de sostenibilidad. Según el informe El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2023, estas actividades generan beneficios significativos para la sociedad, pero también implican costos ocultos económicos, sociales y ambientales que representan cerca del 10% del producto interno bruto mundial. Este contexto subraya la necesidad de adoptar medidas estratégicas y fomentar la

colaboración de todos los actores involucrados en los sistemas agroalimentarios para lograr un equilibrio entre productividad y sostenibilidad (FAO, 2023).

4.2.2 Agricultura en Guatemala

En Guatemala, la agricultura es un pilar fundamental de la economía, contribuyendo aproximadamente con el 22% del PIB nacional y generando empleo para más del 40% de la población (FAO, 2019). La producción agrícola se centra en cultivos como maíz, frijol, caña de azúcar, café y banano, tanto para el consumo local como para la exportación (PNUD, 2022). Sin embargo, la agricultura en Guatemala enfrenta limitaciones significativas relacionadas con la falta de acceso a tecnología, la vulnerabilidad climática y la degradación de suelos.

Actualmente, Guatemala importa la mayoría de sus fertilizantes de países como Estados Unidos, Noruega y Rusia; aunque las importaciones desde Rusia han disminuido desde la implementación de sanciones en 2022. A pesar de estos desafíos, el sector agrícola guatemalteco es robusto, apoyado por la diversidad de sus más de 22 microclimas y sus suelos fértiles que favorecen una amplia variedad de cultivos. Este entorno también beneficia a los importadores, como es el caso del aguacate, cuya temporada de mayor producción en Guatemala es opuesta a la de Perú, mejorando así la confiabilidad del suministro para exportaciones.

Guatemala también exporta una diversidad de cultivos como caña de azúcar, café, bananos, melón, bayas y vegetales. Además, cultivos emergentes como el aguacate y el mango están ganando terreno, aunque aún no utilizan fertilizantes específicos para optimizar su producción (Alianza Mundial para la Contabilidad de la Riqueza y la Valoración de los Servicios de los Ecosistemas [WAVES], 2019).

4.2.3 Problemáticas actuales

La agricultura enfrenta múltiples desafíos, como la aparición de plagas y enfermedades, la falta de fertilidad en los suelos y los efectos adversos del cambio climático. Por ejemplo, la disminución de la biodiversidad agrícola y el uso indiscriminado de agroquímicos han incrementado la aparición de fitopatógenos resistentes (Savary et al., 2019). Además, la capacidad de la agricultura para satisfacer las necesidades humanas actuales y futuras está bajo amenaza debido a problemas como

el cambio climático, la elevada pérdida de biodiversidad, la degradación del suelo a través de procesos como la erosión, compactación, salinización y contaminación, así como la contaminación y el agotamiento de los recursos hídricos. Otros factores, como los crecientes costos de producción, la reducción constante del número de explotaciones agrícolas y la pobreza en las zonas rurales, también contribuyen a una disminución de la población rural, lo que agrava la crisis agrícola (Velten et al., 2015).

4.3 Métodos de control de plagas

4.3.1 Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas o biológicas utilizadas para controlar, prevenir o eliminar organismos considerados plagas, que afectan negativamente a los cultivos, animales o la salud humana. Según la definición de la United States Environmental Protection Agency (EPA), se considera plaguicida a "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, así como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a ser utilizadas como regulador de plantas, defoliante o desecante" (United States Environmental Protection Agency [EPA], 2016).

Sin embargo, su utilización ha demostrado efectos secundarios en la salud humana. Un estudio exhaustivo sobre el uso de plaguicidas encontró vínculos con el carcinoma de células renales, la forma más común de cáncer de riñón. Cuatro herbicidas (2,4,5-T, atrazina, cianazina y paraquat) y dos insecticidas (clorpirifos y clordano) estuvieron implicados. Otro estudio sugiere que dos herbicidas ampliamente utilizados, pendimetalina y atrazina, también podrían estar asociados con la función renal deteriorada en aplicadores masculinos de plaguicidas. Además, la investigación *Parkinson's Disease, Environment, and Genes* mostró que algunos plaguicidas, como el paraquat, maneb, ziram, benomil y varios organofosforados (incluidos diazinon y clorpirifos), contribuyen al inicio y progresión de la enfermedad de Parkinson (PD). Otros estudios han confirmado que estos plaguicidas están relacionados con la progresión de síntomas motores, cognitivos o depresivos de la PD (National Institute of Environmental Health Sciences [NIH], s.f.).

Por lo tanto, aunque los plaguicidas son herramientas clave en la protección

agrícola, su uso indebido y prolongado puede tener consecuencias graves, lo que hace necesario un uso racional, regulado y basado en prácticas sostenibles.

4.3.2 Herbicidas

Los herbicidas son un tipo de plaguicida diseñado específicamente para eliminar o inhibir el crecimiento de plantas no deseadas, conocidas como malezas. Estas compiten con los cultivos por nutrientes, agua y luz, reduciendo significativamente el rendimiento agrícola. Los herbicidas actúan mediante diferentes mecanismos, tales como la inhibición de la división celular, la fotosíntesis o la producción de aminoácidos, o imitando las hormonas naturales del crecimiento vegetal, lo que provoca deformidades en las plantas (Ross y Childs, 1996). Los métodos de aplicación incluyen la pulverización sobre el follaje, la aplicación al suelo y su uso directo en sistemas acuáticos (EPA, 2016).

Los herbicidas comerciales presentan diversos mecanismos de acción, actuando principalmente en sitios moleculares específicos. Algunos herbicidas inhiben enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, mientras que otros bloquean la fotosíntesis al unirse a la proteína D-1, evitando la transferencia de electrones. También existen herbicidas que acumulan porfirinas fotodinámicas al inhibir la protoporfirinógeno oxidasa, lo que interfiere con los procesos celulares. A pesar de los avances en la comprensión de estos mecanismos, aún existen herbicidas cuyo sitio molecular de acción no ha sido identificado completamente (Duke, 1990).

Si bien su efectividad en la agricultura es indiscutible, el uso prolongado de herbicidas puede conducir al desarrollo de resistencia en algunas especies de maleza, lo que representa un desafío significativo para el manejo sostenible de los cultivos.

4.3.3 Fungicidas

Los fungicidas son sustancias químicas o biológicas utilizadas para prevenir o erradicar enfermedades causadas por hongos en los cultivos. Estos patógenos pueden provocar pérdidas significativas en la producción agrícola al afectar el crecimiento, desarrollo y calidad de las plantas. En general, los fungicidas actúan bloqueando una vía metabólica específica en el hongo, lo cual impide la germinación de esporas o el crecimiento de hifas (Mueller et al., 2021).

Existen diferentes tipos de fungicidas según su modo de acción, (Crop Science

US, s.f.):

- Fungicidas de contacto: se aplican en la superficie de las hojas y previenen que las esporas fúngicas germinen o penetren en la planta. Estos fungicidas requieren una aplicación cuidadosa, ya que la cobertura total es esencial para su efectividad.
- Fungicidas curativos: penetran en la planta y detienen la infección después de que ha ocurrido. Actúan evitando que las esporas fúngicas se diseminen, formen lesiones y produzcan cuerpos fructíferos o nuevas esporas, lo cual previene la reinfección. Es importante destacar que estos fungicidas no pueden reparar tejidos dañados, por lo que su uso debe realizarse antes de que la infección sea severa.
- Fungicidas sistémicos (o penetrantes): actúan dentro de la planta y pueden ser localmente sistémicos (se mueven dentro de un área limitada) o translocados a través del sistema vascular de la planta. Estos fungicidas tienen acción tanto preventiva como curativa y son una herramienta importante para detener infecciones fúngicas y proteger el cultivo.

La aplicación oportuna y adecuada de los fungicidas es fundamental para proteger los cultivos, sin embargo, un uso inadecuado puede generar problemas como el desarrollo de resistencia en los hongos y daños ambientales.

4.3.4 Insecticidas

Los insecticidas son compuestos químicos diseñados para controlar poblaciones de insectos al eliminarlos o inhibir comportamientos destructivos. Se clasifican según su estructura química y mecanismo de acción, lo que determina su efectividad y posibles aplicaciones. Entre los tipos principales se encuentran los organoclorados, que alteran la transmisión nerviosa al generar un desequilibrio de sodio/potasio o bloquear los receptores GABA, causando hiperactividad neuronal; los organosulfuros, que actúan como ovicidas con baja toxicidad para otras especies; y los organoestánicos, que inhiben la formación de ATP al interferir en la fosforilación. Aunque son esenciales para proteger cultivos y prevenir enfermedades transmitidas por insectos, su uso puede generar efectos adversos en especies no objetivo, el ambiente y la salud humana (Araújo et al., 2023; EPA, 2016).

4.4 Métodos alternos

El control biológico es una estrategia clave en la agricultura sostenible que busca

utilizar organismos vivos o sus derivados para reducir el impacto de plagas y enfermedades en los cultivos. Este enfoque se basa en mecanismos como la competencia, antibiosis y el parasitismo, lo que permite un manejo integrado de cultivos más ecológico y menos dependiente de productos químicos. Según Parnell et al. (2016), los métodos alternativos contribuyen a mejorar la biodiversidad del suelo y optimizan los rendimientos agrícolas al reducir las presiones fitopatológicas sin comprometer el equilibrio ecológico.

4.4.1 Especies no fúngicas en el manejo integrado de cultivos

Organismos no fúngicos, como bacterias beneficiosas y nematodos entomopatógenos, ofrecen alternativas prometedoras para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas. Dentro del género *Bacillus*, *B. subtilis* destaca por su capacidad para promover el desarrollo vegetal y optimizar la absorción de nutrientes esenciales. Por ejemplo, la cepa UPMB10 tiene la habilidad de crecer de forma diazotrófica y, cuando se inocula en plantas de maíz bajo condiciones controladas, mejora significativamente la captación de nitrógeno (Kuan, et al., 2016). Asimismo, la cepa Q6 posee propiedades como la solubilización de fosfatos y coloniza eficientemente raíces de algodón en suelos con alta salinidad, lo que potencia la absorción de fósforo (Ahmad et al., 2018). Además, *B. subtilis* IA6 puede estimular el crecimiento de las plantas mediante la solubilización de fosfatos, y este efecto se incrementa al combinarse con *Bacillus* sp. IA16, una cepa que facilita la solubilización de zinc (Ahmad et al., 2021). Estas capacidades hacen de *Bacillus* un género clave para promover prácticas agrícolas sostenibles (González-León et al., 2022).

4.4.2 Hongos utilizados en el control biológico: alternativas a *Trichoderma*

Además de *Trichoderma*, otros hongos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium* spp. han demostrado ser eficaces en el control de plagas y enfermedades agrícolas. Estos organismos actúan mediante mecanismos como la infección directa de insectos, la producción de compuestos antifúngicos o la competencia por nutrientes en el suelo.

El hongo *Metarhizium anisopliae* es uno de los agentes biológicos más utilizados a nivel mundial para el control de insectos, siendo estudiado desde su descubrimiento en 1879 debido a su eficacia como herramienta de manejo integrado de plagas. Este hongo, al igual que otros entomopatógenos, es un patógeno generalista, aunque su rango de hospedadores es más

limitado en comparación con *Beauveria bassiana* (Swoboda, 2022.).

Por su parte, *B. bassiana* es un hongo filamentoso entomopatógeno con un amplio rango de hospedadores entre los insectos artrópodos. Sus esporas se adhieren a la superficie del cuerpo del insecto, germinan y forman estructuras conocidas como apresorios. Posteriormente, sus hifas secretan enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y quitinasas que permiten penetrar la cutícula del insecto y colonizar su hemolinfa, rica en nutrientes. Tras la muerte del hospedador, *B. bassiana* produce esporas en la superficie del insecto, las cuales se dispersan en el ambiente, permitiendo el ciclo de infección (Iida et al., 2023).

4.5 *Trichoderma spp.*

Algunas especies antagonistas trabajan mediante la liberación de enzimas, este es el caso de *Trichoderma spp.*; no solo se destacan por su facilidad de aislamiento, cultivo y crecimiento si no por la producción de enzimas como xilanasas y celulasas en la pared celular de estos hongos, activando rutas como la del ácido salicílico o de etileno (Valdés, 2014). Son hongos que se encuentran comúnmente en plantas en estado de descomposición o materiales celulósicos. Estas especies están caracterizadas por ser de color verde brillante y estar formados por conidióforos ramificados. Existen más de 20 especies de *Trichoderma* que pueden ser utilizados como biocontrol contra patógenos como *Fusarium ciceris*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y nematodos parásitos de plantas (Mukhopadhyay y Kumar, 2020).

4.5.1 *Trichoderma viride*

Hongo anaerobio facultativo distribuido en suelo, plantas, vegetación muerta y madera. Presenta hifas septadas, conidioforos, filíes (presentes en el grupo o solitarias) y conidios. Posee una alta capacidad de desarrollo en diversos sustratos, es un antagonista natural para fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium rosseum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia spp*, *Phythium spp*, *Alternaria spp*, *Armillaria mellea*, *Rosellinia spp*. (Biocultivos S.A., s. f.). *Trichoderma viride* presenta una morfología algodonosa en la superficie de los medios, con color verde olivo, al observarlo microscópicamente se observan ramificaciones que le permiten penetrar el sustrato, además se muestra una gran cantidad de conidios; esto puede observarse en la Figura 1.

Figura 1. Estructura macroscópica y microscópica de *Trichoderma viride*



Nota. Adaptado de “In vitro antifungal activity of *Trichoderma* strains on pathogenic fungi inciting hot pepper (*Capsicum annuum* L.).” (p. 425-430), por A. Aswini, T. Sharmila, K. Raaga, R. Sri Deepthi, y M. S. R. Krishna, 2016, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. JOCPR*, 8 (4).

4.5.1.1 Implementación en la agricultura

En los cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Trichoderma viride* ha demostrado ser una herramienta eficaz como agente de control biológico contra diversas enfermedades. Este enfoque es especialmente relevante debido a la creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos que afectan tanto al medio ambiente como a la salud humana. Una de las principales enfermedades que afectan al frijol es el moho blanco y la pudrición del tallo, causados por *Sclerotinia sclerotiorum*.

Un estudio realizado en 2021 evaluó la eficacia de *T. viride* y *T. erinaceum*, así como un consorcio de ambas especies, para el control biológico de esta enfermedad. Los resultados indicaron que *T. viride* (NAIMCC- F-02500) y *T. erinaceum* (NAIMCC-F-02171) aplicados de manera individual redujeron significativamente la tasa de infección de *S. sclerotiorum*, aumentando la tasa de supervivencia de las plantas hasta un 74.5%. Este estudio también reveló que el uso de *Trichoderma spp.* no solo mejora la resistencia de las plantas, sino que también activa respuestas de defensa en el frijol, subrayando su potencial como una estrategia sostenible para el manejo de enfermedades en cultivos agrícolas (Kumar, et al., 2021).

También se ha destacado en el control de la pudrición radicular de la soya (*Glycine max*). Un estudio reciente investigó los efectos de *T. viride* como tratamiento biológico de semillas y su impacto en la comunidad microbiana del suelo rizosférico. Los resultados

mostraron que *T. viride* redujo significativamente el índice de enfermedad en las raíces de soya (15.11%), siendo comparable con un fungicida químico (17.33%). Sin embargo, a diferencia del fungicida químico, *T. viride* mostró ventajas adicionales, como el mantenimiento de la estabilidad y la complejidad de la red de co-ocurrencia microbiana en la rizosfera.

Además, se observó que *T. viride* incrementó la diversidad β de la comunidad microbiana y redujo la abundancia relativa de microorganismos clasificados como saprótrofos-simbiótrofos, sin afectar negativamente la ecología del suelo. Este enfoque biológico resultó más favorable para el equilibrio microbiano, reduciendo la incidencia de patógenos potenciales como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Naganishia*. Así, *T. viride* no solo controla eficazmente enfermedades, sino que también preserva la salud del suelo, lo que lo convierte en una alternativa más amigable con el medio ambiente en comparación con los fungicidas químicos (Gao et al., 2023).

4.5.2 *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso muy conocido debido a sus propiedades como un agente de biocontrol. Durante el crecimiento de este hongo se presenta al principio un micelio blanquecino que eventualmente se convierte en verde, muchas veces con amarillo, después de su esporulación. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran a los cinco días de incubación a una temperatura aproximada de 25 °C (Romero-Arenas et al., 2009). Su morfología ramificada le permite su rápida identificación, posee un micelio hialino y septado con conidióforos ramificados de estructura compacta. Estos muchas veces son rugosos y se forman de conidios agrupados en las puntas de las fiálides (University of Adelaide, s.f.).

Figura 2. Estructura microscópica de *Trichoderma harzianum*



Nota. Adaptada de *Trichoderma* por University of Adelaide, s.f. Todos los derechos reservados.

4.5.2.1 Implementación en la agricultura

En 2022, los tomates (*Solanum lycopersicum*) representaron el producto número 368 más comercializado a nivel mundial, con un comercio total de \$10.4 mil millones. Entre 2021 y 2022, las exportaciones de tomates disminuyeron un -2.47%, pasando de \$10.6 mil millones a \$10.4 mil millones. Este comercio representó el 0.044% del comercio mundial total (Product Trade, Exporters and Importers, s. f.).

Los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) son afectados por diversas enfermedades, entre las cuales destaca la marchitez por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Este patógeno representa una amenaza significativa para los cultivos a nivel mundial.

En este contexto, *Trichoderma harzianum* ha demostrado ser un agente eficaz contra patógenos de raíz como *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp.. Algunas cepas de *T. harzianum* pueden colonizar de manera robusta y duradera las superficies radiculares, llegando incluso a penetrar la epidermis de las raíces. Esta interacción no solo protege a las plantas contra patógenos, sino que también fomenta el desarrollo radicular, incrementa la productividad del cultivo y mejora la tolerancia a condiciones de estrés abiótico al optimizar la absorción de minerales (Mwangi, et al., 2011).

Otro de los cultivos que se ven beneficiados por la utilización de *T. harzianum* es para el chile. En cultivos de chile (*Capsicum annuum*), *T. harzianum* ha sido empleado como un

agente de biocontrol para prevenir enfermedades causadas por *Phytophthora capsici*. Además de reducir la incidencia de la enfermedad, se ha observado un efecto positivo en la calidad del suelo, promoviendo la salud a largo plazo del sistema agrícola.

En 2006, se llevó a cabo un estudio para evaluar la capacidad de *Trichoderma harzianum* en el control de la pudrición de raíces en plantas de chile (*Capsicum annuum*), causada por *Phytophthora capsici*. Las interacciones entre ambos organismos se analizaron in vitro en medios de cultivo (V8c, Czapek y agar-agua al 2%) e in vivo en plantas cultivadas en sustratos inoculados con *P. capsici* y *T. harzianum*. Los resultados demostraron que *T. harzianum* inhibió el crecimiento de *P. capsici* en todos los medios, siendo la inhibición más significativa en Czapek.

En el sustrato de crecimiento, *T. harzianum* redujo consistentemente la población de *P. capsici*, lo que se tradujo en una disminución del daño en las raíces de entre un 24% y un 76%. Aunque el peso seco de las plantas tratadas con *T. harzianum* disminuyó entre un 21.2% y un 24.7% en comparación con las plantas no inoculadas, este efecto fue mucho menor que en las plantas solo infectadas por *P. capsici*, donde la reducción en peso seco osciló entre un 59.8% y un 68.6%. Estos resultados sugieren que *T. harzianum* es eficaz para reducir el impacto de *P. capsici* y los daños asociados en las plantas de chile (Ahmed et al., 1999).

4.5.3 Porcentaje de utilización

Trichoderma es un género utilizado en diferentes cultivos, por ejemplo, en cultivos de arroz, papa, frijol, cereales, soja, cacao, hortalizas, frutas como manzana, melón, fresa, uva o en cultivos forestales. Para el caso de *Phaseolus vulgaris* L, el frijol común, es uno de los cultivos en donde se ha utilizado *Trichoderma spp.* como un bioproducto ya que de las principales enfermedades que atacan cultivos de frijol es la pudrición blanca por *Sclerotinia sclerotiorum* o enfermedades en raíces causados por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* Sacc. (Meyer et al., 2022). Se ha encontrado que un 20% de cepas de *Trichoderma* pueden producir fosfatos solubles a partir de roca fosfórica y un ocho por ciento de cepas evaluadas por un estudio de Hoyos-Carvajal y editores, mostró que *Trichoderma* tiene una capacidad para producir sideróforos para convertir el hierro férrico en maneras solubles mediante quelación (Hoyos-Carvajal et

al., 2009).

4.5.4 Mecanismos de acción

Los mecanismos por los cuales *Trichoderma* antagoniza es mediante mecanismos directos e indirectos, tales como antibiosis, microparasitismo, inducción de resistencia, enzimas líticas y competencia por espacio y nutrientes (Asad, 2022).

4.5.4.1 Antibiosis

Tiene la capacidad de producción de compuestos antifúngicos que actúan mediante contacto directo con los agentes patógenos inhibiendo el crecimiento y reproducción (Companioni et al., 2019). *Trichoderma* posee una alta reproducción de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran peptaboloïdes, péptidos no ribosomales (NRP), poliquétidos (PK), terpenos y pironas 6-pentil-2H-piran-2ona (6-PP). Estos metabolitos son los responsables de la degradación de las paredes celulares de las células hospedantes (Meyer et al., 2022).

4.5.4.2 Competencia por espacio y nutrientes

Trichoderma es un hongo con una capacidad alta de reproducción por lo que le brinda un beneficio debido a su colonización. Al tener mayor espacio permite la reducción de enfermedades y su carácter saprófito permite que se utilicen los sustratos compitiendo directamente por los nutrientes (Companioni et al., 2019).

El mecanismo por el cual los patógenos tienen la capacidad de infectar a otras plantas es cambiando las condiciones de la planta por medio de la producción de un estrés oxidativo por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y esto resulta una ventaja para *Trichoderma* ya que esto le permite crear una competencia para la rizosfera ya que soporta el estrés oxidativo y posee una tolerancia por los ROS que otros hongos no poseen. *Trichoderma* tiene la capacidad de implementar mecanismos antioxidantes en las raíces (Meyer et al., 2022) beneficiando esta relación simbiótica.

4.5.4.3 Microparasitismo

Se conoce que la función principal de *Trichoderma* es ser un hongo parásito, por lo que este es su mecanismo principal. Primero, tiene la capacidad de detectar por medio de quimiotrofia hospedantes y al reconocerlo se enrolla y adhiere; por medio de la asociación de azúcar en la pared de *Trichoderma* con lectina de la pared del patógeno.

Por último, ocurre la penetración, en donde debido a la producción de enzimas se degrada la pared celular del patógeno, permitiendo la entrada de las hifas de *Trichoderma* al hospedero. De esta forma se pierde el contenido citoplasmático de la célula hospedera y se degrada (Companioni et al., 2019). La manera de inducción de *Trichoderma* a un patógeno difiere según la cepa, sin embargo, este hongo tiene la capacidad de secretar hexoquinasas a bajos niveles y al existir una degradación de las quininas se degradan las paredes celulares provocando una liberación de oligómeros que inician el parasitismo (Gajera et al., 2013).

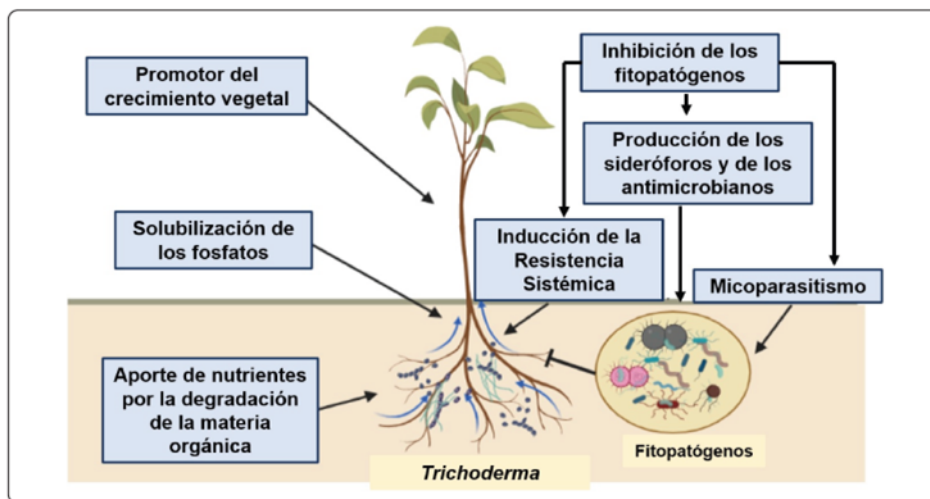
4.5.4.4 Fungistasis

Las cepas de *Trichoderma* crecen muy bien en el suelo debido a que son resistentes a compuestos tóxicos como herbicidas, fungicidas e insecticidas por lo que crean resistencia a estos compuestos tóxicos. Debido a esta resistencia creada por las cepas de *Trichoderma* resulta eficiente para el control de *R. solani*, *P. ultimum* o *Sclerotium rolfsii* (Gajera et al., 2013).

4.5.4.5 Inducción de resistencia

Cuando se agrega *Trichoderma* spp. a la rizosfera para atacar infecciones virales, bacterianas y fúngicas induce a la resistencia del patógeno, esto debido a mecanismos a la respuesta hipersensible (HR), la resistencia sistemática adquirida e inducida. Esto produce un aumento en la concentración de metabolitos y enzimas relacionadas con mecanismos defensivos; trabajando con enzimas como fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS), quininas y glucanasas (Gajera et al., 2013). Como se puede observar en la Figura 3 además de los diversos mecanismos de acción que posee *Trichoderma* también aporta beneficios a la planta.

Figura 3. Representación de los beneficios de *Trichoderma* en las plantas



Nota. Adaptada de “Bacillus subtilis y Trichoderma: características generales y su aplicación en la agricultura” (p. 2387), por Y. González-León, J. Ortega-Bernal, M. A. Anducho-Reyes y Y. Mercado-Flores, 2022, *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25.

4.6 Fertilizantes

Los fertilizantes son productos químicos que se aplican en los suelos para proporcionar nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, algunos otros incluyen micronutrientes como el zinc y otros metales que le brindan lo necesario a las plantas para su óptimo crecimiento (EPA, 2016). Los fertilizantes se utilizan y clasifican según su composición y origen, estos siendo: inorgánicos, orgánicos, líquidos, foliares y de liberación controlada.

4.6.1 Persistencia

Durante el siglo XX inició la utilización de pesticidas sintéticos, una revolucionaria innovación para el área agroindustrial, sin embargo, esto representó una liberación de compuestos sintéticos en los ecosistemas de la tierra (Barbash, 2014). La utilización de los pesticidas no solo degrada los suelos, esto incluye la degradación microbiana, hidrólisis química, fotólisis y volatilización. Se ha encontrado que la mayor persistencia se encuentra en suelos ya que en el caso de plantas y animales los residuos son metabolizados más rápido debido a que es un sistema vivo en crecimiento a comparación de un suelo. Por otra parte, es importante mencionar que los organoclorados, son los más persistentes en el medio ambiente debido a su estructura, el cual contiene cinco átomos por molécula provocando que el proceso sea más lento; este tipo de persistencia ambiental también provoca la acumulación de metales

pesados además de residuos orgánicos que resultan ser perjudiciosos para el ambiente (Mandal et al., 2020).

4.6.2 Toxicología de *Trichoderma* como biofertilizante

El género *Trichoderma* representa una alternativa no solo un agente de biocontrol si no una herramienta que puede ser utilizada para la biodegradación de agrotóxicos. *Trichoderma* se ha utilizado como desintoxicante de cianuro en desechos sólidos y aguas residuales ya que posee rodanasa y cianuro de hidratasa, enzimas que son capaces de degradarlo. Además, es importante mencionar que es compatible con biofertilizantes a base de *Azotobacter chroococcun*, esta es una bacteria fijadora de nitrógeno por lo que mutuamente son una herramienta importante para los cultivos (Valdés, 2014).

4.7 Suelos

4.7.1 Perfil ambiental Guatemala

En febrero del 2023 el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) notificó que estarían realizando un estudio de suelos en Guatemala y Honduras para fomentar la resiliencia de los sistemas agroalimentarios. El objetivo del proyecto era fortalecer los sistemas nacionales de información sobre suelos en donde se mostraba que a la fecha el país contaba con 20 mil 490 kilómetros cuadrados de territorio documentado, con mapas a escala 1:50,000. Los departamentos que se muestran en este estudio de suelos son: Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Sololá, San Marcos, Quetzaltenango y Totonicapán (Asociación Guatemalteca de Noticias [AGN], 2019). Aún no se han mostrado los resultados del estudio, sin embargo, se puede observar que el territorio es grande y debe cuidarse. Un estudio realizado por un investigador de la Universidad San Carlos de Guatemala se publicó junto con un periodista de Prensa Libre en 2017, en donde se mencionaba que cada año en Guatemala se pierden alrededor de 250 toneladas métricas de suelo cultivable. El 51% de las tierras guatemaltecas son forestales, sin embargo, la mala utilización de los suelos ha provocado erosión en la tierra, cambios que van de la mano con el cambio climático y a mayor intensidad este tipo de tierras erosionadas llegan a contaminar ríos, mares, lagos y calles. Es importante mencionar que en Huehuetenango existe una tasa de 183 toneladas de pérdida de suelo por hectárea al año, Izabal pierde alrededor de 129.23 toneladas de suelo; Quiché tiene una pérdida anual de 124.84 de

toneladas y en Alta Verapaz 115.33 toneladas (Marroquín, 2017). El estudio de perfil ambiental realizado en el 2020 por la Universidad Rafael Landívar muestra las categorías del uso de las tierras según su categoría de utilización como lo son territorio agrícola, bosques y medios seminaturales, zonas húmedas, territorios artificializados y cuerpos de agua; esto se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. *Categoría de la utilización de la tierra en 2020*

Categoría nivel 1	Categoría de uso de la tierra	Área (ha)	%
Territorio agrícola	granos básicos	1 160 351	10.66 %
	arroz	14 623	0.13 %
	hortalizas	161 763	1.49 %
	otros cultivos anuales	45 499	0.42 %
	subtotal de cultivos anuales	1 382 237	12.69 %
	café	539 712	4.96 %
	palma de aceite	183 748	1.69 %
	hule	140 050	1.29 %
	caña de azúcar	323 689	2.97 %
	cardamomo	169 429	1.56 %
	otros cultivos permanentes	69 741	0.64 %
	zonas agrícolas heterogéneas	195 846	1.80 %
	subtotal de cultivos permanentes	1 699 037	15.60 %
	subtotal cultivos	3 081 274	28.30 %
	pasto cultivado	341 034	3.13 %
	pasto natural	1 533 570	14.08 %
subtotal de pastos	1 874 604	17.22 %	
	total de territorios agrícolas	4 955 878	45.51 %
Bosques y medios seminaturales	bosques latifoliados	1 761 289	16.18 %

Categoría nivel 1	Categoría de uso de la tierra	Área (ha)	%
	bosque de coníferas	183 119	1.68 %
	bosque mixto	728 600	6.69 %
	bosque de manglar	23 664	0.22 %
	subtotal de bosques	2 696 672	24.77 %
	plantaciones forestales	91 850	0.84 %
	árboles dispersos	241 132	2.21 %
	subtotal de otras tierras forestales	332 982	3.06 %
	vegetación arbustiva baja (matorral y/o guamil)	1 706 410	15.67 %
	espacios abiertos, sin o con poca vegetación	43 921	0.40 %
	subtotal de matorrales y espacios con escasa/ninguna vegetación	1 750 331	16.07 %
	total de bosques y medios seminaturales	4 779 985	43.90 %
Zonas húmedas	zonas húmedas (áreas inundables, humedales y otras)	795 508	7.31 %
	total de zonas húmedas	795 508	7.31 %
Territorios artificializados	zonas urbanas	152 846	1.40 %
	zonas industriales o comerciales y redes de comunicación	25 620	0.24 %
	minas, escombreras y zonas en construcción	5 138	0.05 %
	zonas verdes artificiales, no agrícolas	3 778	0.03 %
	total de territorios artificializados	187 382	1.72 %

Categoría nivel 1	Categoría de uso de la tierra	Área (ha)	%
Cuerpos de agua	cuerpo de agua (ríos, lagos, lagunas, estuarios y otros)	170 147	1.56 %
	Total de cuerpos de agua	170 147	1.56 %
	Total nacional	10 888 900	100 %

Nota. Datos adaptados de *Tierras: Serie Perfil ambiental de Guatemala*, por M. E. García Munguía y J. Gálvez, 2022, Editorial Cara Parens.

La tabla anterior muestra las categorías del uso de tierra en el 2020 según resultados del perfil ambiental de Guatemala en 2022, realizado por la Universidad Rafael Landívar. Esto muestra la categoría del uso de tierra, el área y el porcentaje de incremento. Según los datos obtenidos por este estudio, la agricultura anual decreció de 12.95% a 12.69% entre los años 2003 – 2020, sin embargo, la agricultura permanente incrementó un 3.69% según estadísticas obtenidas para el año 2020 (García y Gálvez, 2022).

4.8 Métodos de validación de cepas

4.8.1 Morfología

Microbiológicamente, *Trichoderma* puede identificarse mediante tinciones que permitan observar su estructura, ya que posee características morfológicas distintivas. Una manera sencilla es utilizando tinción con verde de malaquita o azul de lactofenol. El verde de malaquita permite visualizar microorganismos con esporas, ya que penetra la pared celular y, tras la aplicación de calor, permanece en las esporas mientras se elimina de las células vegetativas, facilitando su observación (Cromakit, 2024b).

Por otro lado, el azul de lactofenol es un colorante ampliamente utilizado en la detección de levaduras y hongos, ya que contiene fenol, ácido láctico y azul de metilo. El fenol, en concentraciones elevadas, inactiva enzimas hidrolíticas y evita la lisis celular, mientras que el ácido láctico preserva las estructuras fúngicas. Finalmente, el azul de metilo se une a la quitina de las paredes celulares, permitiendo que las hifas fúngicas se tiñan de azul intenso, facilitando su observación microscópica (Cromakit, 2024a).

4.8.2 PCR – principio

Un análisis por reacción en cadena polimerasa (PCR) se basa en la replicación de

secuencias específicas de ADN. Se amplifican los ácidos nucleicos que se utilizan para desnaturalizar y renaturalizar segmentos cortos de ADN o ARN utilizando la enzima polimerasa y un aislado de *Thermus aquaticus*, conocido como Taq (Khehra et al., 2023). La polimerasa se puede agregar únicamente a un grupo 3'-OH por lo que requiere de un cebador, esto permite que se delimite una región de la secuencia a amplificar (Khan Academy, s.f.b). El producto de PCR es esta secuencia amplificada en millones de copias.

4.8.2.1 Componentes y proceso

A continuación, se muestran los componentes básicos para la realización de un PCR (Khan Academy, s.f.b):

- ADN molde: contiene la secuencia de ADN deseada en la muestra
- ADN polimerasa: enzima que sintetiza nuevas hebras de ADN complementarias de la secuencia objetivo. Es importante mencionar que es una enzima termoestable, por lo que no se desnaturaliza a altas temperaturas.
- Cebadores: pequeños pedazos de una hebra de ADN que complementan la secuencia objetivo.
- Nucleótidos (dNTPs): bases de nucleótidos siendo adenina, timina, citocina y guanina.
- Buffer: solución que permite las condiciones óptimas para la desnaturalización y renaturalización del ADN.

4.8.2.2 Pasos del PCR

Desnaturalización: ocurre a una temperatura de 94 ° C entre un ciclo de 0.5 - 2 minutos, en este proceso se rompen los enlaces de hidrógeno en la doble hebra de ADN y se convierte en un ADN de una sola hebra, ocurrido esto se convierte en el template de ADN para la producción de nuevas hebras (Byjus, 2024)

Hibridación: en este paso la temperatura disminuye entre (40 - 70) ° C, esta disminución posibilita la reformación de los enlaces de hidrógeno y debido a esto ocurre la hibridación de las cadenas (Synthetic Biology, 2019).

Elongación: esta tercera parte se lleva a una temperatura de 72 ° C, en donde la Taq polimerasa se une a las hebras de ADN monocatenarios cebados y cataliza la replicación, por medio de esto se sintetizan selectivamente las regiones del ADN objetivo, posterior a

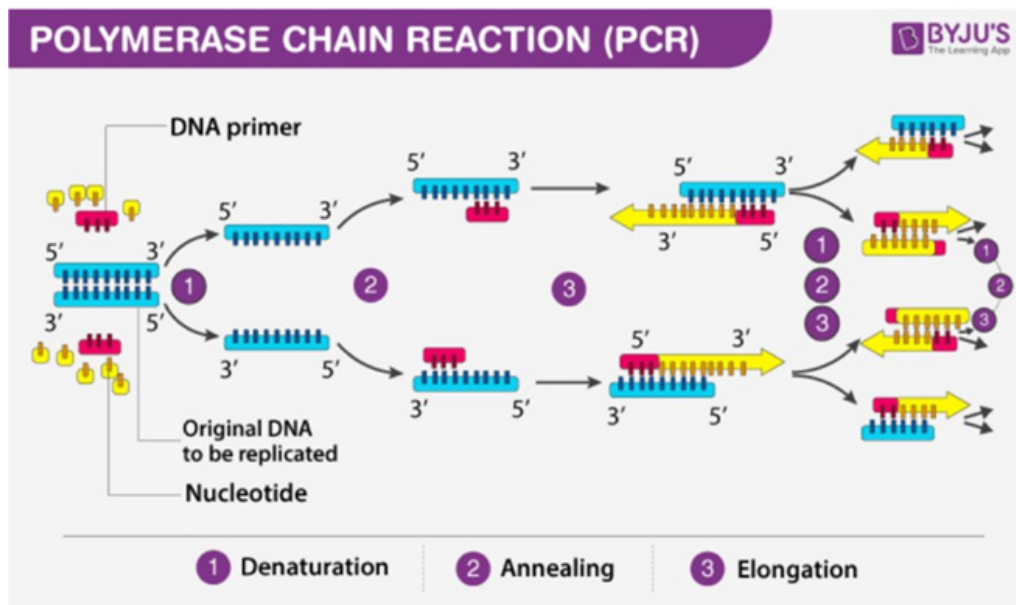
esto se llevan a cabo entre 20 - 40 ciclos para sintetizar una cantidad de ADN analizable as (Synthetic Biology, 2019).

La siguiente figura representa las tres etapas principales del proceso de PCR:

1. Desnaturalización: el ADN de doble hebra se separa en dos hebras simples mediante el aumento de temperatura.
2. Alineamiento (Annealing): se unen los cebadores (primers) específicos a las secuencias complementarias en cada hebra de ADN.
3. Elongación: la ADN polimerasa extiende los cebadores, sintetizando nuevas hebras complementarias mediante la adición de nucleótidos.

Este ciclo se repite múltiples veces para amplificar exponencialmente una región específica del ADN objetivo.

Figura 4. Diagrama proceso PCR



Nota. Adaptada de *PCR: Principle, steps, types, components and applications of PCR* por Byjus, 2024. Todos los derechos reservados.

4.9 Otros métodos de genotipificación

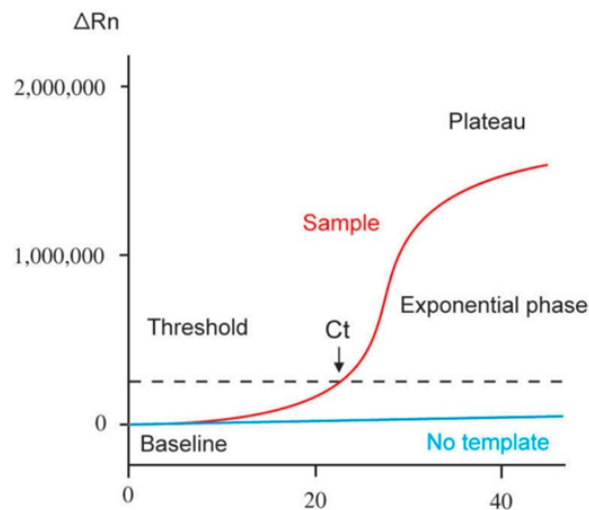
4.9.1 qPCR – Principio

La prueba de la reacción de la cadena de ADN polimerasa por tiempo real (qPCR) es un análisis en donde un fragmento de ADN se copia y amplifica billones de veces y se visualiza en gel de agarosa, de manera que esta acumulación se observa en tiempo real. Esto por medio de la incorporación de una molécula fluorescente que se une al ADN amplificado y el incremento de su fluorescencia es proporcional a la cantidad de moléculas amplificadas, debido a esto se puede demostrar la presencia o ausencia de fragmentos de ADN o ARN en una muestra (Herrera, 2022).

4.9.2 Cuantificación

La cuantificación de este tipo de PCR se puede observar de mejor manera al graficarse. El número de moléculas de ADN que se encuentran inicialmente en la muestra determina la porción de amplicones generados después de los ciclos de PCR. La cantidad es proporcional a la cantidad de moléculas de ADN existentes al principio, por lo que se calcula la cantidad de producto generado. Graficar la cantidad de producto obtenido versus la cantidad de ciclos en la reacción genera una curva de la amplificación como se observa en la Figura 5. Gráfico que consta de tres fases: inicial, fase exponencial y plateau (estado de poca actividad).

Figura 5. *Gráfico de fases*



Nota. Adaptado de "Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis" (p. 2387), por I.M. Artika, Y. P. Dewi, I. M. Nainggolan, J. E. Siregar y U. Antonjaya, 2022, Genes, 13 (12).

Como se observa en la figura anterior, esta representación muestra el comportamiento de las tres fases anteriormente mencionadas, los valores de emisión de fluorescencia iniciales no superan la línea base, sin embargo, durante la fase exponencial el PCR llega a un nivel óptimo en donde se duplica su producto en cada ciclo y en esta fase se pueden realizar los cálculos ya que cambia la intensidad de la fluorescencia, por último la tasa de amplificación disminuye por lo que la fluorescencia al igual decreciente (Artika et al., 2022).

4.9.3 Taqman

La técnica TaqMan es un enfoque de PCR en tiempo real que se basa en sondas fluorescentes específicas para detectar y cuantificar secuencias de ADN de manera precisa. Estas sondas se hibridan con la secuencia objetivo durante la amplificación, lo que genera una señal fluorescente que permite monitorear la acumulación del producto en tiempo real. Este método se distingue por su alta especificidad y sensibilidad, siendo ampliamente utilizado en estudios genéticos y aplicaciones diagnósticas moleculares (Álvarez y Doné, 2014).

El diseño de las sondas TaqMan® se basa en la química de la nucleasa 5', utilizando una sonda fluorogénica para detectar productos de PCR conforme se acumulan. Cada ensayo incluye un par de primers sin marcaje y una sonda TaqMan etiquetada con un fluoróforo como FAM™ o VIC™ en el extremo 5', y un supresor no fluorescente (NFQ) unido al extremo 3', lo que asegura la especificidad en la detección (Thermo Fisher Scientific, s. f.).

Las sondas TaqMan tienen una estructura lineal y están etiquetadas con un fluoróforo reportero y un supresor. Durante la fase de extensión del PCR, estas sondas se hibridan con su secuencia objetivo, y la actividad exonucleasa 5' de la Taq polimerasa cliva la sonda, separando el reportero del supresor. Esta separación incrementa la fluorescencia del reportero, permitiendo una cuantificación precisa del producto amplificado. En contraste, los "beacons moleculares" tienen una estructura en bucle y emiten fluorescencia solo al unirse a la secuencia objetivo, donde sufren un cambio conformacional que separa el fluoróforo del supresor (Domiaty-Saad y Scheuermann, 2006).

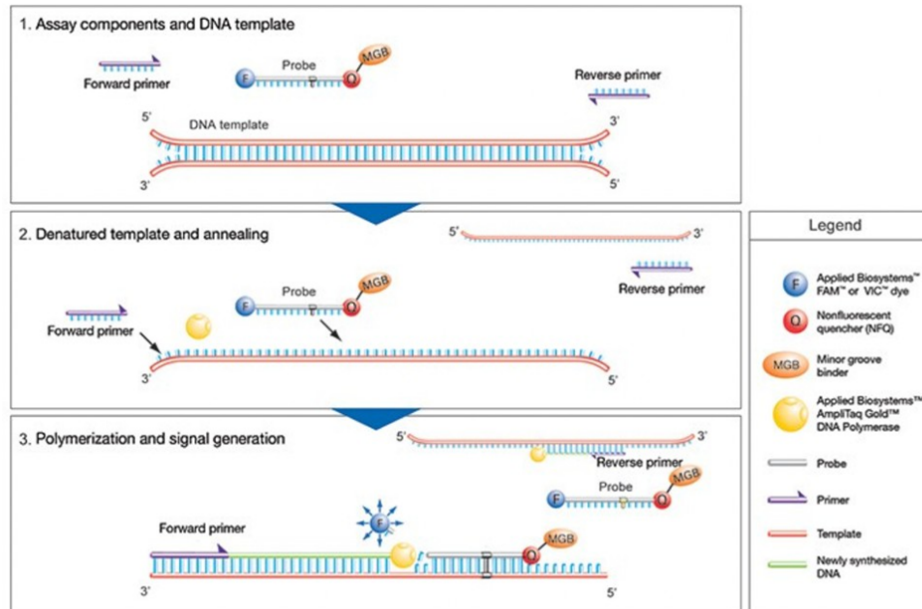
Este enfoque técnico combina precisión y versatilidad, siendo ideal para detectar variaciones genéticas y analizar la expresión de genes con alta confiabilidad. Posee los siguientes pasos:

1. Desnaturalización Inicialmente, la temperatura se eleva para desnaturalizar el ADN complementario (cDNA) de doble cadena. En este paso, la fluorescencia del colorante presente en el extremo 5' de la sonda TaqMan está suprimida debido a la proximidad del supresor no fluorescente (NFQ) ubicado en el extremo 3'.
2. Anillamiento: posteriormente, la temperatura de reacción se reduce para permitir que los primers y la sonda TaqMan se unan específicamente a sus secuencias diana.
3. Extensión: la enzima Taq ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN utilizando los primers no marcados y la plantilla. Cuando la polimerasa alcanza la sonda TaqMan unida a su secuencia diana, su actividad exonucleasa 5' endógena corta la sonda. Esto separa el fluoróforo del supresor, lo que genera una señal fluorescente que puede ser monitoreada en tiempo real para cuantificar el producto amplificado (Thermo Fisher Scientific, s. f.). Esto puede observarse en la Figura 6.

La Figura 6 muestra como la técnica utiliza cebadores y una sonda marcada con un fluoróforo (F) y un apagador (NFQ) unidos a un enlazador de surco menor (MGB).

1. Componentes y molde de ADN: los cebadores y la sonda se alinean con la secuencia objetivo.
2. Desnaturalización y alineamiento: la sonda se une específicamente entre los cebadores.
3. Polimerización y generación de señal: la ADN polimerasa degrada la sonda, separando el fluoróforo del apagador y emitiendo fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN amplificado.

Figura 6. *Expresión genética TaqMan*



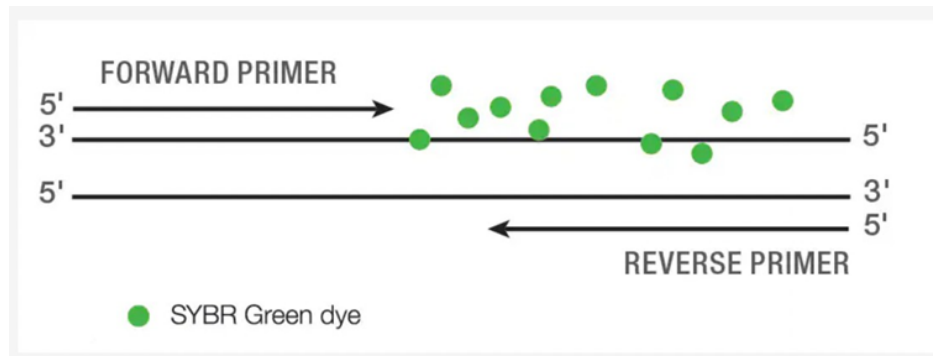
Nota. Adaptada de *TaqMan SNP Genotyping Assay process*, de Thermo Fisher Scientific, s.f. Todos los derechos reservados.

4.9.4 SYBR GREEN

El método SYBR Green utiliza un colorante fluorescente libre que se adhiere específicamente al ADN de doble cadena, incrementando su fluorescencia al unirse. Durante una reacción de qPCR, conforme los primers y la ADN polimerasa duplican la hebra de ADN molde, el SYBR Green se une al ADN de doble cadena formado, permitiendo la detección en tiempo real. Una de las ventajas de este enfoque es que no requiere sondas específicas, lo cual puede ayudar a reducir costos (Pfeifer, 2022).

La amplificación del ADN se monitorea en cada ciclo de la reacción. Cuando el ADN entra en la fase logarítmica lineal de amplificación, la fluorescencia aumenta por encima del nivel de fondo. El ciclo en el que esta fluorescencia se vuelve detectable se denomina ciclo de cuantificación (Cq) o punto de cruce. Mediante el uso de diluciones de concentraciones conocidas de ADN patrón, se puede crear una curva de calibración que relacione el logaritmo de la concentración con el Cq. Esto permite calcular la cantidad de ADN o ADNc en muestras desconocidas a partir de sus valores de Cq (Sigma Aldrich, s. f.).

Figura 7. Principio del colorante SYBR Green



Nota. Adaptada de *Trust your SYBR Green qPCR Data. Behind the Bench.* Por J. Pfeifer, s.f., Thermo Fisher Scientific. Todos los derechos reservados.

El SYBR Green es un colorante fluorescente que se une de manera específica a la doble hebra de ADN. Durante la PCR en tiempo real, su fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN bicatenario sintetizado, permitiendo la monitorización del proceso de amplificación.

4.9.5 Genotipificación con TaqMan

La genotipificación mediante TaqMan se basa en el uso de sondas específicas marcadas con fluoróforos que permiten la identificación de variantes alélicas en loci específicos. El ensayo de discriminación alélica por nucleasa 5', conocido como ensayo TaqMan, es un método basado en PCR para la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). En este procedimiento, la región flanqueante al SNP se amplifica en presencia de dos sondas fluorescentes específicas para cada alelo. Estas sondas no emiten fluorescencia en solución debido a un quencher en el extremo 3', lo que asegura alta especificidad. La inclusión de dos sondas permite detectar ambos alelos en una sola reacción (Hui, DelMonte y Ranade, 2008).

4.10 Análisis del producto

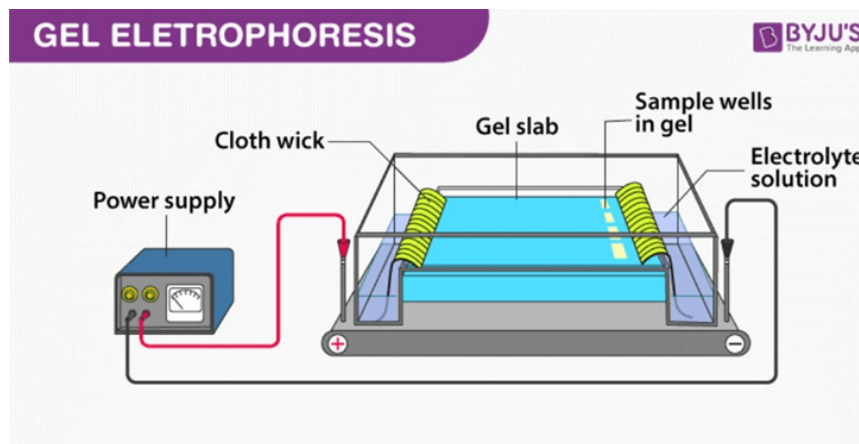
Al finalizar el PCR se obtienen secuencias de ADN que se pueden analizar por medio de electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida que posteriormente es revelado. Esta técnica se basa en la separación de partículas según el peso, estas partículas pueden ser ADN, ARN, proteínas y carbohidratos. Primero se aplica una corriente eléctrica que

mueve las partículas a través del gel, como se mencionó anteriormente por el peso las moléculas más grandes se mueven lentamente y las pequeñas migran con mayor velocidad (Foxman, 2012).

En el caso del ADN está cargado negativamente debido a la estructura que posee de fosfatos, debido a esto al colocarlo en el campo eléctrico el ADN debe estar apuntando al ánodo para que migre de forma correcta en el gel. Para conocer la distancia de la migración en las bandas se pueden colocar marcadores estándar y de esta forma estimar el tamaño molecular del fragmento y la distancia que recorrió en el gel (Oliveira et al., 2017).

La siguiente figura muestra el montaje básico para electroforesis, donde las muestras se cargan en un gel y migran bajo un campo eléctrico hacia el polo positivo, permitiendo su separación según el tamaño molecular.

Figura 8. Diagrama principio electroforesis en gel



Nota. Adaptada de *PCR: Principle, steps, types, components and applications of PCR* por Byjus, 2024. Todos los derechos reservados.

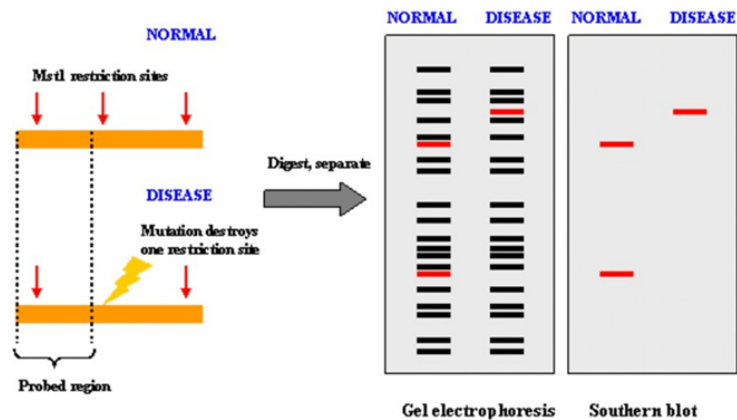
4.10.1 PCR-RFLP

Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism se basa en la digestión de los amplicones obtenidos por PCR con enzimas de restricción específicas, generando fragmentos polimórficos que sirven como marcadores para la identificación de especies. Este enfoque ha sido utilizado para diferenciar especies como *Pyropia*, mediante el análisis de ADN plastidial, espaciadores internos transcritos (ITS) y ADN mitocondrial (mtDNA) (Kim, Choi y Choi, 2017).

En donde se permite detectar diferencias en secuencias de ADN homólogas a través de la variabilidad en la longitud de los fragmentos generados tras la digestión con endonucleasas de restricción. Como marcador molecular, es altamente específico para una combinación determinada de clon/enzima y, en su mayoría, presenta herencia co-dominante, permitiendo identificar ambos alelos en muestras heterocigotas. Además, el uso de sondas marcadas en el análisis de RFLP permite la detección de patrones de electroforesis característicos de un genotipo específico en un locus determinado (NCBI, s.f).

El Southern blot permite identificar secuencias específicas de ADN mediante digestión con enzimas de restricción, separación por electroforesis y transferencia a una membrana. Una sonda complementaria marca la región de interés. En este ejemplo (Figura 9), una mutación elimina un sitio de corte, lo que genera un patrón distinto de bandas en individuos con enfermedad respecto a los normales.

Figura 9. *Funcionamiento del PCR – RFLP*



Nota. Adaptada de *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, por National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2024. Todos los derechos reservados.

4.10.2 Microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como simple sequence repeats (SSR), son secuencias cortas de ADN compuestas por repeticiones en tándem de di, tri, tetra o penta-nucleótidos. Se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas eucariotas y son altamente polimórficos, lo que los hace útiles como marcadores genéticos en estudios de diversidad y diferenciación de especies (Tautz y Renz, 1984). Su amplificación mediante PCR requiere el diseño de primers específicos dirigidos a secuencias flanqueantes únicas, y los productos se separan por electroforesis, visualizándose mediante tinción con plata o fluoróforos (Gebhardt, 2007). Debido a su especificidad y variabilidad, los SSR se han empleado en estudios de genética de plantas y mejoramiento agrícola, permitiendo análisis de variabilidad genética en especies como el arroz (Miah et al., 2013).

4.11 Identificación molecular *Trichoderma*

En los hongos, la región espaciadora transcrita interna (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal nuclear (nrDNA) incluye las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S rRNA, que está ubicado entre los genes 18S (subunidad pequeña, SSU, en los extremos 3') y 28S rRNA (subunidad grande, LSU, en los extremos 5') dentro de la unidad repetitiva del ADN ribosomal nuclear. Esta región ha sido ampliamente utilizada en estudios de ecología fúngica y filogenia debido a su baja variación intraespecífica y alta variación interespecífica. Además, su popularidad radica en ventajas como la capacidad de ser amplificada fácilmente en todos los linajes de hongos mediante cebadores universales (Imoulan et al., 2017).

En el caso específico de *Trichoderma*, la secuenciación de la región ITS ha demostrado ser una herramienta clave para su identificación molecular. Por ejemplo, un estudio realizado por Haque et al. (2020) utilizó esta técnica para identificar cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo rizosférico y evaluar su actividad antagonista contra *Aspergillus niger*. Los resultados mostraron que las secuencias nucleotídicas obtenidas de ITS1 coincidieron en un 97%-100% con secuencias publicadas de *Trichoderma spp.*, confirmando las cepas como *T. asperellum* (GenBank: MK937669) y *T. viride* (GenBank: MK503705). Además, el análisis filogenético de los aislamientos reveló árboles óptimos con longitudes de rama de 0.69585023 y 0.10077756 para *T. asperellum* y *T. viride*, respectivamente.

Estudios similares también destacan la utilidad del análisis molecular para superar las limitaciones de las identificaciones basadas únicamente en características morfológicas. Por ejemplo, Guigón-López et al., 2010) identificaron cepas nativas de *Trichoderma* en México como *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* mediante la secuenciación de ITS, resaltando la precisión del método para diferenciar especies con alta similitud morfológica. Esta integración de métodos moleculares y análisis filogenéticos subraya la importancia de la región ITS como marcador confiable para estudios taxonómicos y ecológicos en hongos.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Implementar un protocolo para evaluar la concentración óptima de crecimiento de *Trichoderma* utilizando arroz como sustrato, considerando las condiciones más favorables determinadas en el estudio, como la iluminación, el estado del sustrato y la humedad.

5.2 Objetivos específicos

- Optimizar un método de preparación del sustrato que facilite el crecimiento de *Trichoderma viride* y *Trichoderma spp.*, evaluando la concentración inicial óptima para maximizar el rendimiento de las cepas en condiciones de laboratorio. Esta evaluación incluirá el impacto de variables como la iluminación, el estado del sustrato (entero o quebrado) y la humedad en la producción de esporas.
- Implementar un método de validación de las cepas que crecieron en el sustrato utilizando una genotipificación de *Trichoderma* mediante una PCR convencional.

6 Hipótesis

6.1 Hipótesis alterna (Ha)

Las características del sustrato, incluyendo el tipo de arroz, las condiciones de iluminación y el tipo de remojo, tienen un efecto significativo en la concentración de crecimiento de *Trichoderma*.

6.2 Hipótesis nula (Ho)

Las características del sustrato, incluyendo el tipo de arroz, las condiciones de iluminación y el tipo de remojo, no tienen un efecto significativo en la concentración de crecimiento de *Trichoderma*.

7 Metodología

7.1 Sitio de estudio

El presente trabajo de graduación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de TAK Global durante el período de prácticas de abril – julio 2023 y desde mayo 2024 hasta el día presente. Laboratorios del Departamento de Bioquímica y Microbiología. Las cepas fueron obtenidas del laboratorio de fitopatología de la Universidad del Valle de Guatemala.

7.2 Sujeto de estudio

El sujeto de estudio son las especies: *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma spp.*

7.3 Población y muestra

La población de este estudio está conformada por todas las posibles combinaciones de sustratos (arroz entero y arroz quebrado) y condiciones ambientales (iluminación y humedad) que puedan influir en el crecimiento de *Trichoderma spp.* en condiciones de laboratorio. Las muestras seleccionadas correspondieron a aquellas que mostraron un mejor crecimiento bajo las condiciones evaluadas. Estas condiciones incluyeron combinaciones específicas de sustrato (arroz entero y arroz quebrado) y variables ambientales como iluminación y humedad, las cuales fueron previamente establecidas durante los experimentos. Estas muestras fueron tomadas para un análisis detallado y comparación de resultados en función de su rendimiento en el crecimiento de *Trichoderma spp.*

7.4 Tipo de investigación

Investigación experimental con un enfoque cuantitativo.

7.5 Tamaño de muestra

Se utilizaron un aproximado de 35 muestras ya que se probaron tres distintas concentraciones en dos cepas y en diferentes condiciones.

7.6 Variables

Tabla 4. *Variable de tiempo*

Definición conceptual	Presencia de micelio y correcto desarrollo.
Indicador	Coloración del sustrato
Instrumento de medición	Fotos y comparación de sustratos
Definición operacional	Identificar cuánto tiempo tardó el crecimiento según concentración
Tipo	Cuantitativa continua

Nota. Tabla de autoría propia.

Esta tabla presenta la definición conceptual, operacional, el indicador, el instrumento de medición y el tipo de la variable "tiempo" utilizada para evaluar el crecimiento de micelio, considerando la coloración del sustrato y el tiempo requerido para su desarrollo según la concentración.

Tabla 5. *Variable de crecimiento*

Definición conceptual	Presencia de <i>Trichoderma</i> en las bolsas con sustrato
Indicador	Crecimiento en el sustrato y en el conteo de esporas
Instrumento de medición	Cámara de Neubauer
Definición operacional	Identificar si se obtuvo un desarrollo correcto y eficiente a lo largo del tiempo de incubación.
Tipo	Presencia de <i>Trichoderma</i> en las bolsas con sustrato

Nota. Tabla de autoría propia.

La Tabla 5 presenta la definición conceptual y operacional, el indicador, el instrumento de medición y la clasificación de la variable "crecimiento", utilizada para evaluar la presencia y desarrollo de *Trichoderma* en bolsas con sustrato, considerando tanto la observación del sustrato como el conteo de esporas a lo largo del tiempo de incubación.

Tabla 6. *Variable calidad del micelio*

Definición conceptual	Características morfológicas y funcionales del hongo <i>Trichoderma</i> durante su crecimiento, incluyendo factores como densidad, coloración y uniformidad.
Indicador	Densidad y uniformidad del micelio sobre el sustrato. Coloración homogénea típica del género <i>Trichoderma</i> (verde intenso).
Instrumento de medición	Observación directa mediante lupa estereoscópica para evaluar características morfológicas. Registro fotográfico para análisis comparativo.
Definición operacional	Identificación del desarrollo correcto y eficiente a lo largo del tiempo de incubación.
Tipo	Cualitativa ordinal

Nota. Tabla de autoría propia.

La Tabla 6 presenta la definición conceptual y operacional, así como el indicador, el instrumento de medición y la tipificación de la variable "calidad del micelio", empleada para valorar las características morfológicas y funcionales del hongo *Trichoderma* durante su desarrollo, considerando su densidad, uniformidad y coloración, a través de observación directa y registro fotográfico para análisis comparativo.

7.7 Primeras pruebas realizadas con *Trichoderma* comercial

Se emplearon dos tipos de arroz, entero y quebrado, como sustrato para el crecimiento de *Trichoderma*. Se pesaron 100 g de cada tipo de arroz por triplicado y se lavaron; posteriormente, la mitad de la cantidad se dejó en remojo durante dos días y la otra mitad se esterilizó mediante autoclave a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos. El sustrato fue preparado en bolsas de celofán aptas para autoclave.

Para la inoculación, se diluyeron 1 y 0.5 gramos de producto comercial de *Trichoderma* en 5 ml de agua estéril y la mezcla se vertió en las bolsas con sustrato,

identificando cada una según la concentración de inóculo, el tipo de sustrato (arroz entero o quebrado), la condición de lavado (inmediato o remojo) y el tratamiento experimental. Las bolsas fueron sometidas a diferentes condiciones de luz, humedad e incubación: oscuridad a temperatura ambiente, luz a temperatura ambiente e incubación en cámara controlada. Durante el periodo de incubación, cada dos días las bolsas se agitaron suavemente sin abrirlas para garantizar un crecimiento uniforme del micelio y prevenir la contaminación.

7.8 Pruebas a partir de cepas crecidas en el laboratorio

Las cepas de *Trichoderma* que se encontraban en medios PDA fueron resembradas en nuevos medios PDA y, posteriormente, se preparó una solución de esporas utilizando agua peptonada estéril. Una vez que las placas presentaron suficiente crecimiento, se añadió 1 ml de agua peptonada estéril para recolectar las esporas, agitando para facilitar su desprendimiento, y el líquido obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles para realizar nuevas siembras bajo condiciones de trabajo en campana. Para la preparación del sustrato, se pesaron 100 g de arroz para cada prueba, con un total de 600 g, los cuales fueron lavados y remojados durante dos días. Después de este tiempo, se pesaron nuevamente 100 g y se colocaron en bolsas de celofán aptas para autoclave, donde se esterilizaron durante 20 minutos a 121 °C y 1 atm.

Para la siembra de las cepas en el sustrato, se seleccionaron colonias de *Trichoderma* y se diluyeron en 5 ml de agua estéril, añadiendo esta solución a cada bolsa con sustrato y homogenizando la mezcla en su interior. La incubación se llevó a cabo en un área a temperatura ambiente (20–23 °C) y con una humedad relativa del 13%, durante al menos una semana, manipulando las bolsas cada dos días para esparcir el hongo sin abrirlas. Posteriormente, se realizó el conteo de esporas mediante la preparación de cuatro diluciones seriadas (1:10), utilizando 1 g de arroz con *Trichoderma* y efectuando el conteo en cámara de Neubauer, calculando las concentraciones con base en los cuadrantes observados.

7.9 Diseño de primers

Para la elaboración de los primers y sondas específicas para *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, se obtuvieron las secuencias FASTA del portal del NIH. En el caso de *T. harzianum*, se utilizó la secuencia correspondiente a *Trichoderma harzianum* HT2 genes for

18S rRNA, región ITS, 5.8S rRNA e ITS2; mientras que para *T. viride* se empleó la secuencia de *Trichoderma viride* CBS 119325 de la región ITS. Ambas secuencias fueron alineadas en APE ©, donde se identificó la región polimórfica específica de cada especie. Posteriormente, los primers y sondas fueron diseñados utilizando la herramienta PrimerQuest™ Tool ©, asegurando su especificidad para cada cepa.

Secuencias de los cebadores

Cebador directo (forward): 5' – GATGAAGAACGCAGCGAAATG – 3' (21 mer)

Cebador inverso (reverse): 5' – GGGTTCGAGGGTTGAAATGA – 3' (20 mer)

7.10 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante dos métodos: inoculando directamente las esporas recolectadas de las bolsas de arroz o remojando el arroz en buffer PBS, donde el agua con *Trichoderma* desprendido del sustrato fue centrifugada, y el pellet resultante se utilizó para la extracción. El procedimiento detallado está descrito en el POE (Procedimiento Operativo Estándar 02: extracción de ADN), incluido en el Apéndice C. Los pasos clave incluyeron la limpieza de las muestras si presentaban suciedad, la selección del tejido según la matriz de origen, y su transferencia a tubos Eppendorf. Se empleó buffer CTAB precalentado a 65°C para macerar el tejido y facilitar la lisis celular, seguido de incubación a la misma temperatura para maximizar la extracción del ADN. Posteriormente, se utilizó una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico para separar las fases, y se recuperó el sobrenadante para la precipitación del ADN con isopropanol frío y acetato de amonio. Tras centrifugación, el pellet fue lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en buffer TE precalentado. Finalmente, el ADN fue almacenado a 4°C o -20°C según el tiempo de uso esperado.

7.11 Amplificación

Para realizar la amplificación del gen, se estandarizó la concentración del ADN extraído a 100 ng/μL en todas las muestras. Luego, se empleó el buffer 2x GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix de PROMEGA como componente principal de la mezcla de reacción.

Tabla 7. Amplificación

GoTaq™ Hot Start Colorless Master Mix	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (uL)
	2x	2x	10
Primer Forward	100 uM	10uM	2
Primer Reverse	100 uM	10uM	2
AND	Según muestra	100ng/uL	3
Agua libre de nucleasas	-	-	3

Nota. Tabla de autoría propia.

7.12 Realización de PCR convencional

La tabla a continuación detalla el programa de PCR diseñado para lograr la amplificación eficiente de los genes objetivo. Este protocolo fue desarrollado con base en la estandarización de la temperatura de alineamiento (T_m) de los primers, asegurando condiciones óptimas para la correcta amplificación del ADN extraído. Este programa en los pasos de desnaturalización a extensión debe ser repetido durante 45 ciclos (detalle en Apéndice D).

Tabla 8. Programa PCR para amplificación de los genes objetivo

Pasos	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Iniciación	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Elongación	Finalización
Temperatura (°C)	95	95	55	72	72	4
Tiempo	2 min	10 segundos	50 segundos	2 min	9 min	–

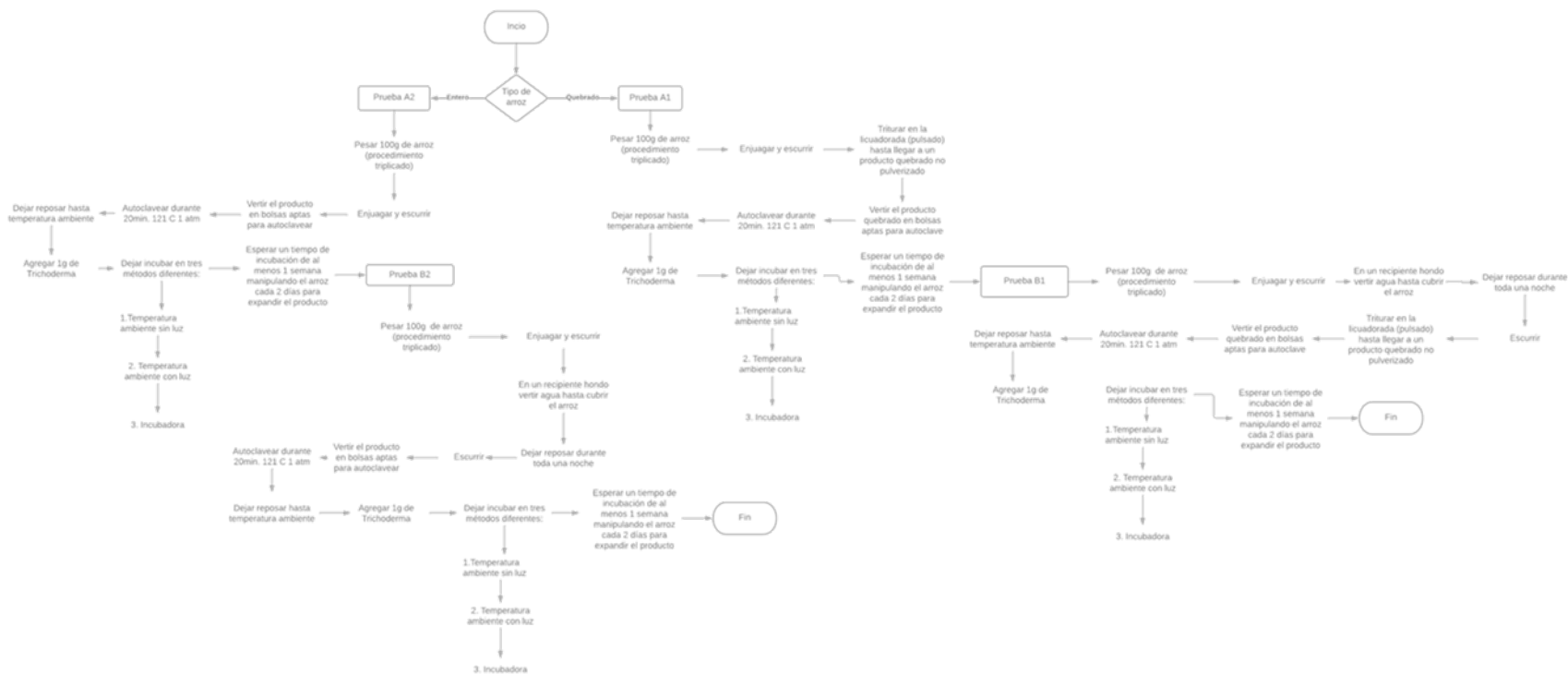
Nota. Tabla de autoría propia.

7.13 Resumen metodologías

En los siguientes diagramas se pueden observar los tipos de pruebas según el tipo de *Trichoderma* que se utilizó, primero se muestra la metodología de las pruebas realizadas con *Trichoderma* comercial. Este fueron un total de 17 pruebas iniciales, en donde se

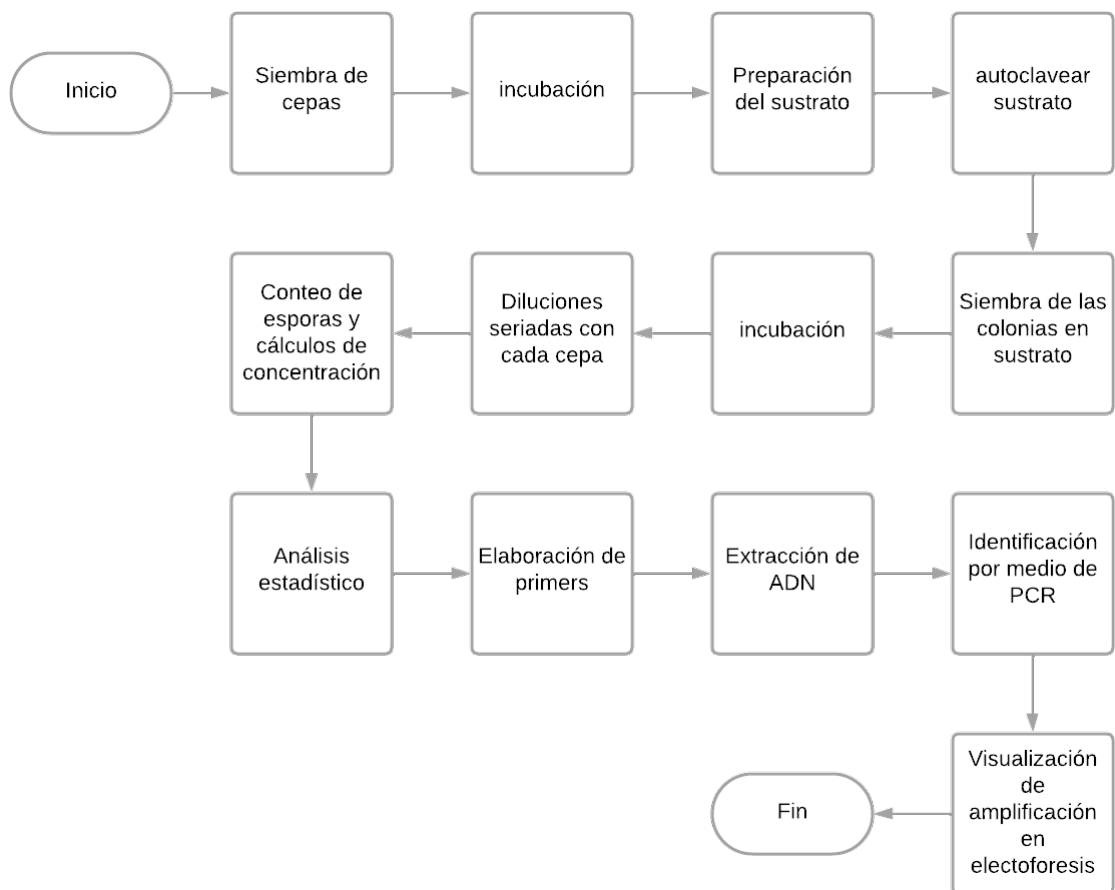
realizó un trabajo triplicado cambiando el remojo del sustrato, la estructura del sustrato, la iluminación y el tipo de incubación. En el siguiente diagrama se sigue una metodología en donde se realiza a partir de una cepa pura en placas con agar PDA. Posteriormente, se puede observar la descripción del principio de la extracción y amplificación del ADN extraído para la validación de la metodología.

Figura 10. Diagrama de metodología pruebas con *Trichoderma* comercial



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 11. Metodología con *Trichoderma* a partir de la cepa en placa



Nota. Figura de autoría propia.

7.14 Análisis de datos

- Tiempo de reproducción: se observa la diferencia por medio de un gráfico de dispersión en donde muestra el tiempo en días de crecimiento vs la concentración obtenida.
- Cantidad de desarrollo: conteo por medio de esporas en cámara Neubauer, se contaron las esporas observadas en 4 cuadrantes y se realizó el cálculo final de la concentración.
- Efectividad: gráfico de tiempo vs desarrollo obtenido.
- Análisis de Mann Whitney: según el valor p obtenido se estableció si existían diferencias significativas entre las concentraciones en ambas cepas, rechazando o aceptando la hipótesis propuesta para la investigación. Estas estadísticas fueron realizadas y analizadas por medio de Excel © y el software R versión 4.3.2 (2023-

10-31). Este entorno de programación permitió aplicar pruebas estadísticas no paramétricas, como Mann-Whitney, y generar representaciones gráficas claras y personalizadas. Las visualizaciones incluyeron gráficos de barras, gráficos de caja y dispersión, empleando el paquete ggplot2. Los gráficos destacaron las variaciones en la cantidad de esporas bajo diferentes condiciones, como iluminación, tipo de sustrato (arroz entero y quebrado), remojo e inoculación inmediata, así como dosis de *Trichoderma*. Adicionalmente, las concentraciones totales de las esporas se presentaron en gráficos de barras con escalas logarítmicas para facilitar la interpretación de diferencias en órdenes de magnitud.

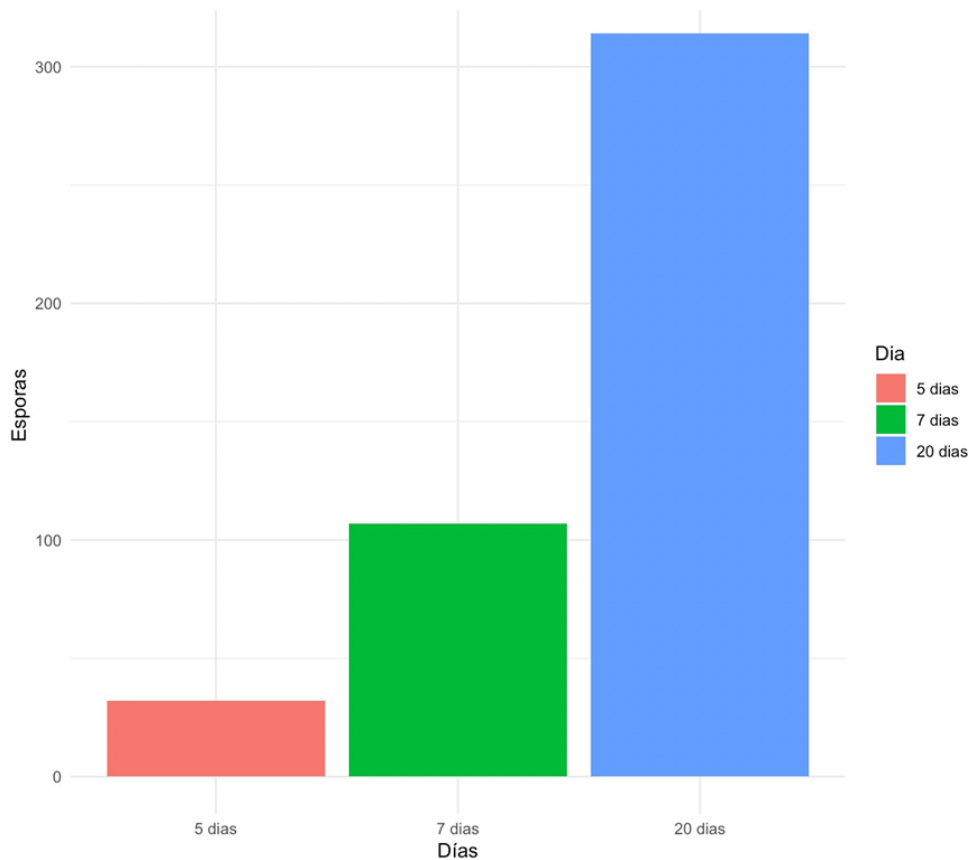
8 Análisis de resultados

8.1 Resultados del conteo de esporas y concentraciones de crecimiento

Evaluación del efecto de la iluminación en el crecimiento de *Trichoderma spp.*: conteo de esporas en condiciones de incubación con luz y sin luz durante diferentes días

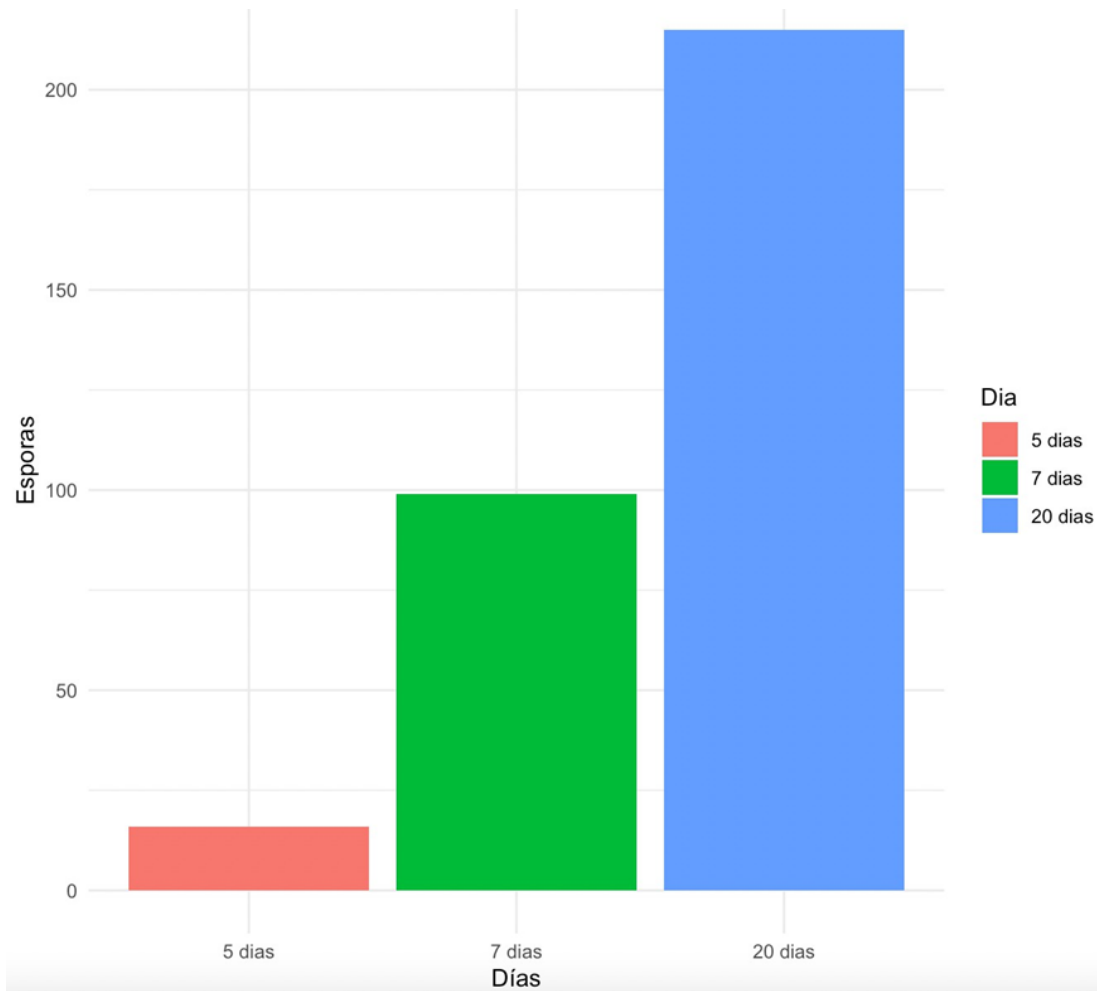
Con el objetivo de evaluar si la iluminación puede tener un efecto con el crecimiento de *Trichoderma* se realizaron dos tipos de incubación durante el tiempo (1 semana) con y sin luz. Se observó que existió un conteo de esporas entre 205.75 ± 72 para luz y 125.75 ± 45 sin luz. En donde se observó un crecimiento mayor y más eficiente ante la presencia de luz. Estos resultados indican que para *Trichoderma* existe un mejor crecimiento ante la luz natural.

Figura 12. Cantidad de esporas bajo condiciones de iluminación



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 13. Cantidad de esporas bajo condiciones sin iluminación



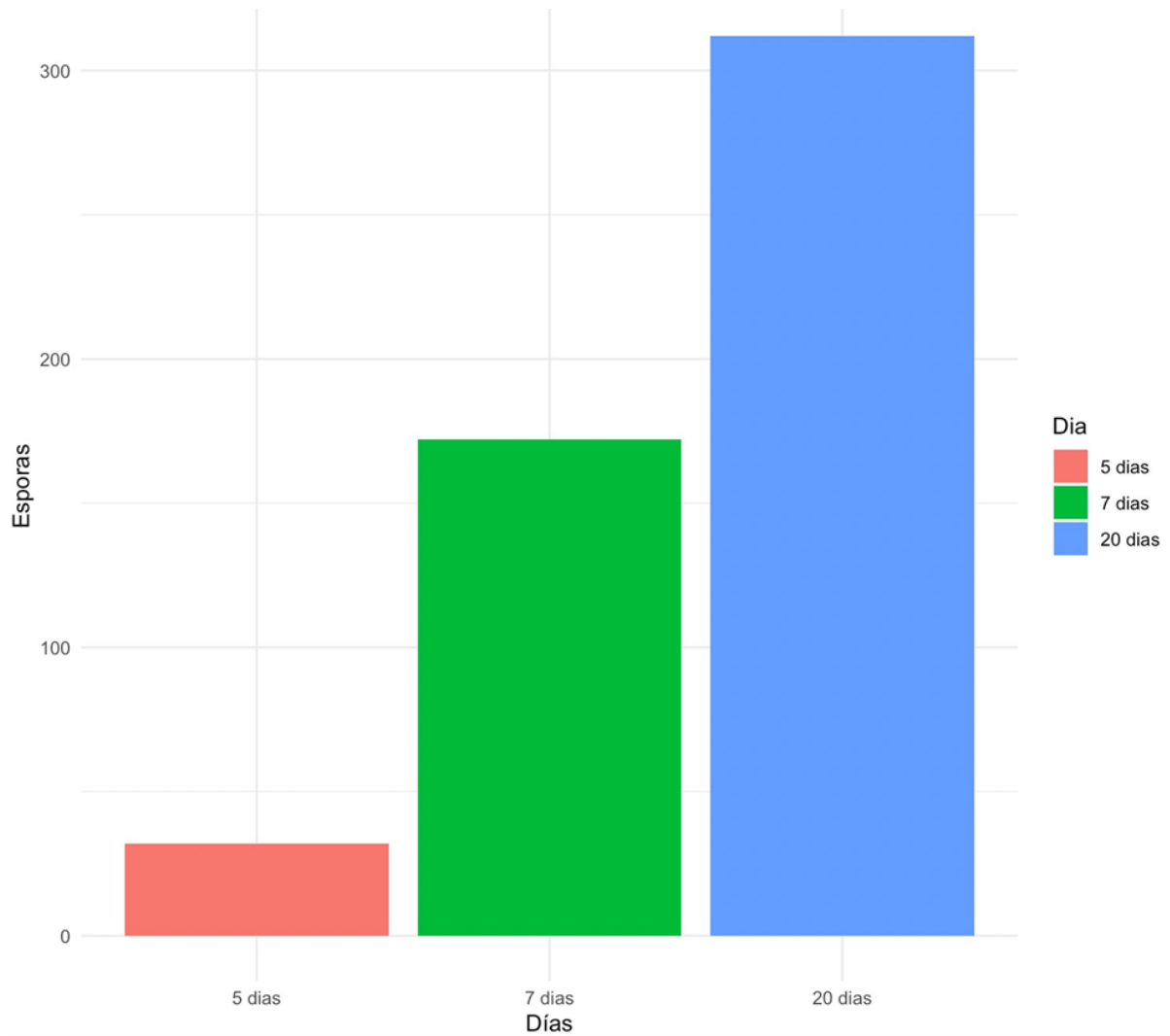
Nota. Figura de autoría propia.

Las presentes figuras muestran los resultados obtenidos para la incubación sin iluminación y con iluminación. Se realizó un total de 6 muestras en donde 3 muestras fueron expuestas a la luz y 3 fueron incubadas sin luz. Al realizar el análisis estadístico de Mann Whitney se obtuvo un valor $p = 0.015$, por lo que $p = < 0.05^{**}$. En el eje X se pueden observar las dos condiciones a las que fueron expuestas las muestras y en el eje Y la cantidad de esporas contadas en la cámara Neubauer. Los datos presentados reflejan que *Trichoderma spp.* exhibe un crecimiento significativamente mayor en presencia de luz natural, lo cual sugiere que la iluminación actúa como un factor positivo en la proliferación de esporas. Esta información es crucial para optimizar condiciones de cultivo en futuras aplicaciones agrícolas y biotecnológicas, favoreciendo la producción eficiente de esporas en sistemas controlados.

Evaluación del efecto de la condición del sustrato en el crecimiento de *Trichoderma spp.*: conteo de esporas en condiciones de incubación con luz y sin luz durante diferentes días.

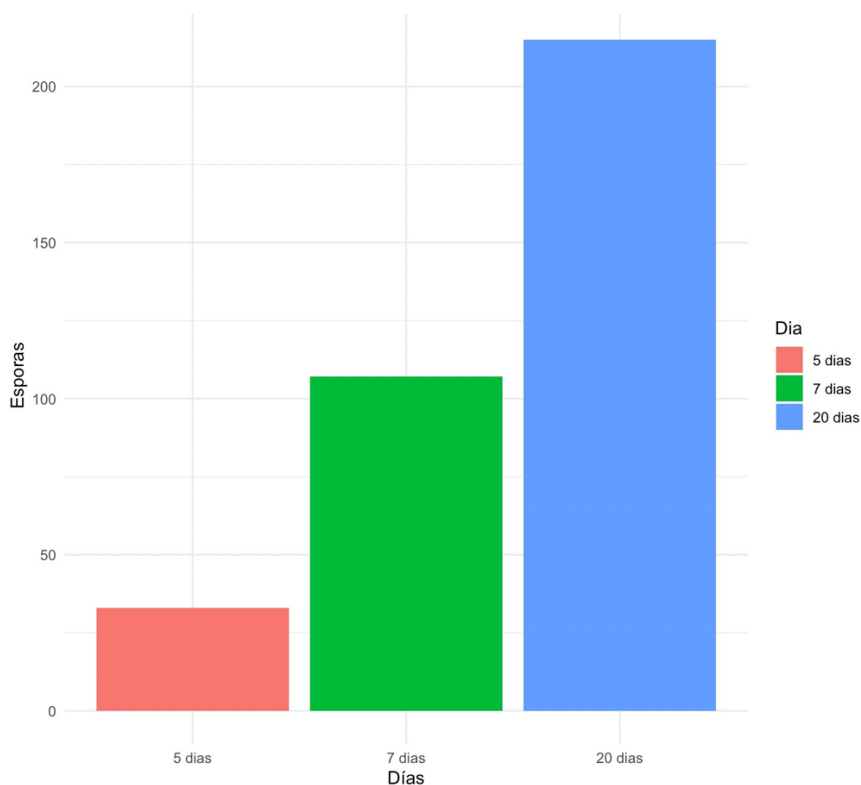
El presente experimento tuvo como propósito evaluar el impacto del tipo de sustrato en el crecimiento de *Trichoderma spp.*, utilizando arroz entero y arroz quebrado como medios de cultivo. Los resultados mostraron un conteo promedio de esporas de 208.75 en arroz entero y 112.7 en arroz quebrado. Aunque ambos sustratos permitieron el crecimiento efectivo del hongo, el arroz entero presentó ventajas superiores en términos de producción de esporas.

Figura 14. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz entero



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 15. Cantidad de esporas bajo condiciones de arroz quebrado



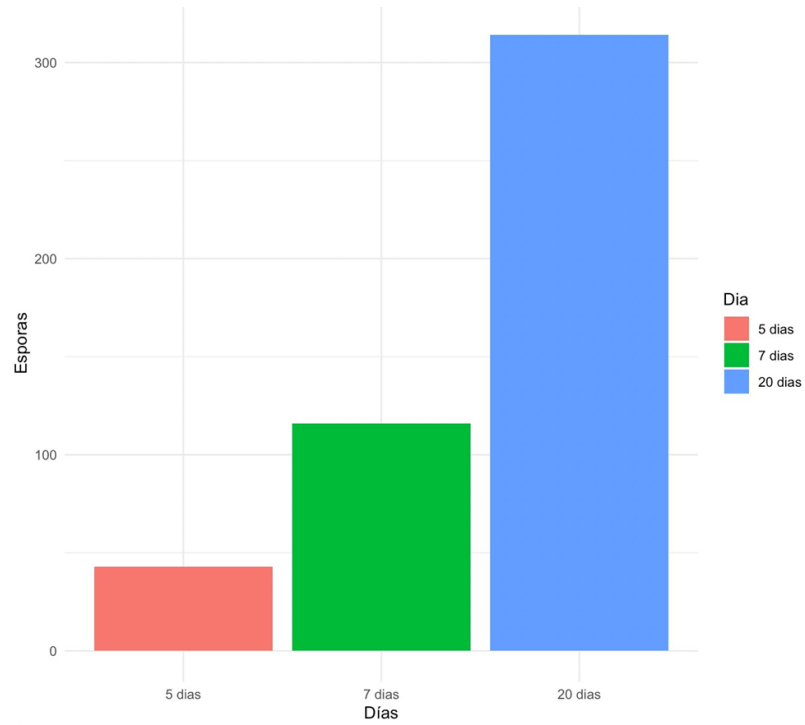
Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra los resultados obtenidos para las diferentes condiciones de sustrato, entero y quebrado. Se realizó un total de 6 muestras en donde 3 muestras fueron con arroz quebrado y 3 fueron con arroz entero. Al realizar el análisis estadístico de Mann Whitney se obtuvo un valor $p = 0.004$, por lo que $p = < 0.05^{**}$. En el eje X se pueden observar las dos condiciones a las que fueron expuestas las muestras y en el eje Y la cantidad de esporas contadas en la cámara Neubauer. El gráfico muestra un aumento significativo en el conteo de esporas con el tiempo, alcanzando su punto máximo a los 20 días. Estos resultados sugieren que la incubación prolongada favorece el desarrollo óptimo de *Trichoderma spp.* en arroz entero, destacando este sustrato como una opción eficiente para la producción de esporas en aplicaciones biotecnológicas.

El experimento se diseñó para evaluar el efecto del remojo del sustrato en el crecimiento de *Trichoderma*, comparando dos condiciones: un remojo inmediato y un remojo de dos días. La Figura 16 muestra el conteo de esporas en diferentes tiempos de incubación (5, 7 y 20 días) bajo la condición de remojo. Se observó que existió un promedio en el conteo de esporas de 211.75 para un remojo de

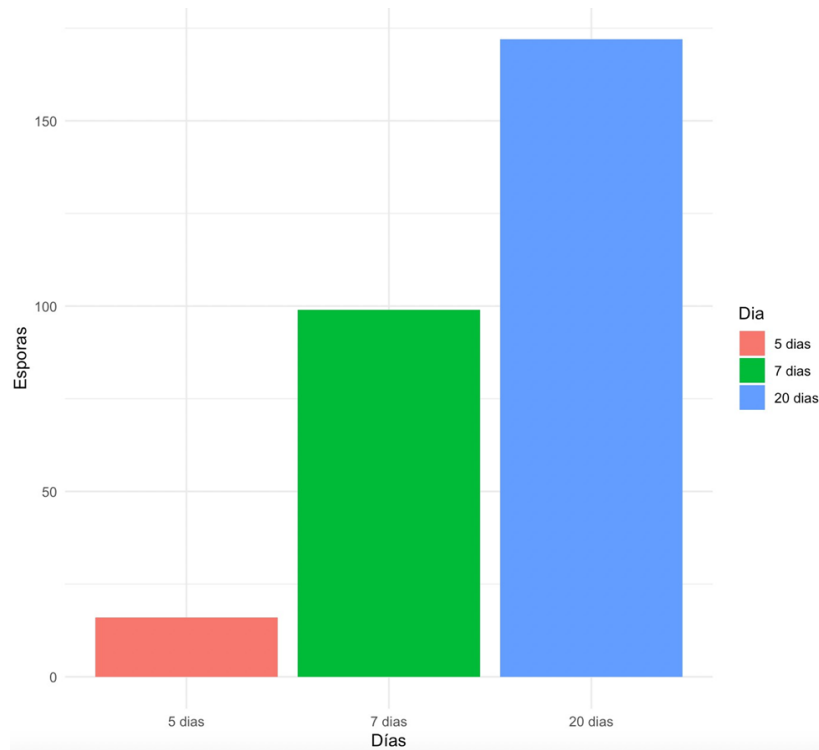
dos días y 109.17 en un remojo inmediato. En donde se observó un crecimiento mayor, eficiente y rápido ante un remojo de dos días.

Figura 16. *Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: remojo*



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 17. Cantidad de esporas bajo condiciones de humedad: lavado inmediato



Nota. Figura de autoría propia.

Los resultados indican que el remojo prolongado favorece un mayor crecimiento del hongo, evidenciado por un conteo de esporas significativamente superior en la condición de remojo de dos días en comparación con el remojo inmediato. Este hallazgo sugiere que un sustrato con mayor contenido de humedad inicial proporciona condiciones óptimas para la esporulación y el desarrollo eficiente de *Trichoderma*. Se recomienda considerar esta estrategia de preparación del sustrato para maximizar la producción del hongo en futuras aplicaciones. En esta experimentación se realizó un total de 6 repeticiones en donde 3 muestras únicamente se lavaron por lo cual tuvieron un remojo inmediato y 3 muestras fueron lavadas y tuvieron un remojo de 2 días. Al realizar el análisis estadístico de Mann Whitney se obtuvo un valor $p = 0.003$, por lo que $p = < 0.05^{**}$. En el eje X se pueden observar las dos condiciones a las que fueron expuestas las muestras y en el eje Y la cantidad de esporas contadas en la cámara Neubauer.

Tabla 9. *Conteo de esporas según condición de incubación*

Luz	Sin Luz	Entero	Quebrado	Remojo	Inmediato
312	101	312	74	312	74
244	89	288	110	288	110
288	116	244	128	244	128
229	215	229	72	229	72
256	87	256	101	256	107
241	172	241	116	241	131
216	99	216	89	216	97
234	127	234	215	234	106
107	-	99	107	101	87
131	-	87	131	116	99
97	-	172	97	89	172
106	-	127	106	215	127

Nota. Tabla de autoría propia.

El presente cuadro de resultados muestra los valores obtenidos en los conteos de esporas obtenidos según la condición de incubación. Se muestran los valores para las incubaciones con luz, sin luz, utilización de arroz entero, arroz quebrado, remojo de dos días y un remojo inmediato, estos datos fueron obtenidos mediante conteos en la cámara de Neubauer. Estos valores se pueden observar graficados de las Figuras 6-8.

Tabla 10. *Concentraciones según dosis*

Cantidad (g)	Concentración (UFC/ml)
1	1.5×10^{10}
	6.3×10^{10}
	2.63×10^{10}
0.5	1.6×10^9
	5.3×10^9
5	4.60×10^{10}
10	3.60×10^9

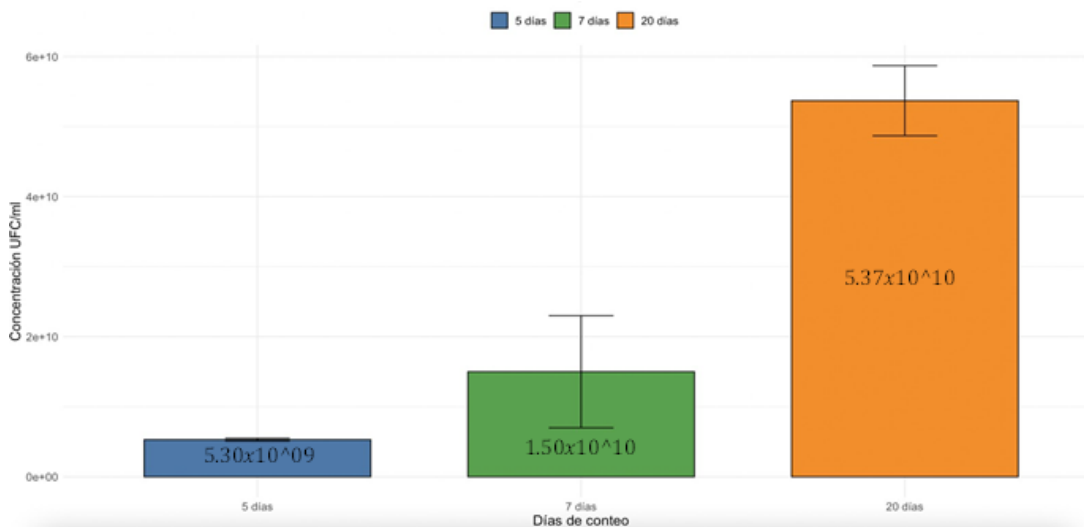
Nota. Tabla de autoría propia.

El presente cuadro de resultados demuestra los resultados obtenidos al variar la cantidad de

Trichoderma sembrada en el sustrato, estas tres dosis siendo de 0.5g, 1g, 5, 10g. Los conteos realizados para las dosis de 0.5 gramos y 1 gramo fueron al completarse una semana de la inoculación, sin embargo, para las dosis de (5-10) gramos se realizaron a los tres días de inoculación.

Con el objetivo de evaluar cuando es mejor realizar los conteos de esporas en el sustrato, para conocer si existe algún efecto con el crecimiento de *Trichoderma* se realizaron conteos en diferentes tiempos. Estos conteos fueron realizados a los 5 días, 7 días y 20 días. En donde se observó una mayor concentración de *Trichoderma* a los 20 días de incubación, esto con una diferencia de 3.87×10^{10} UFC/ml.

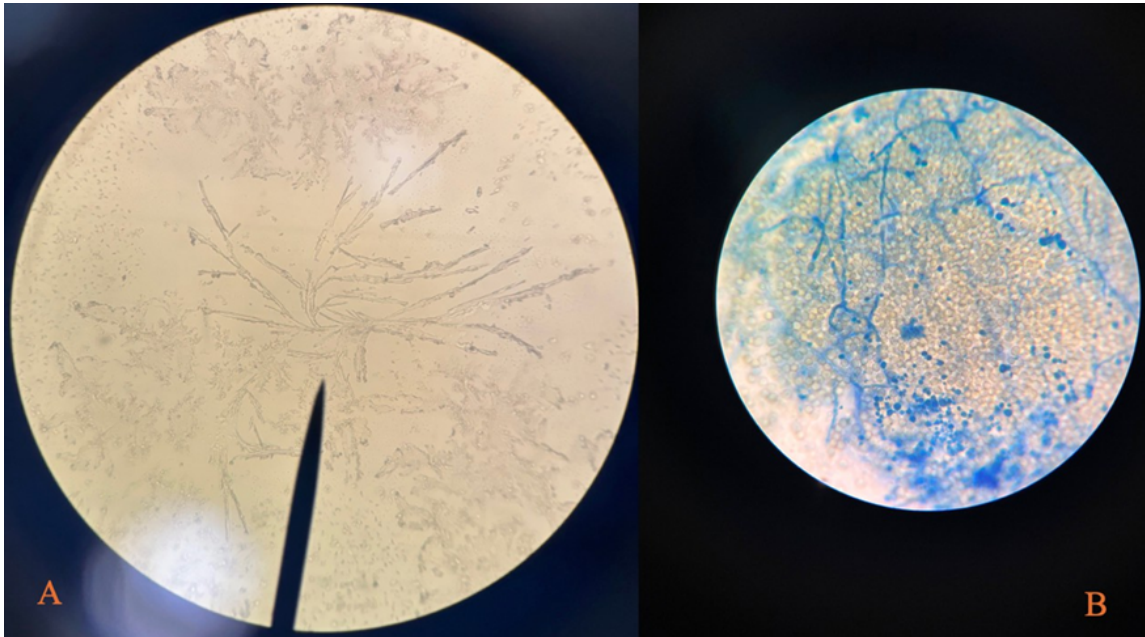
Figura 18. Comparación en las concentraciones según los días de incubación



Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra los resultados obtenidos para distintos días del conteo de esporas, en el eje X se muestran los días de incubación y en el eje Y se pueden observar los valores de concentración para cada prueba. En donde se obtuvo una concentración de 5.37×10^{10} UFC/ml para un conteo a los 20 días mientras que para un conteo en 5 días se obtuvo una concentración de 5.30×10^09 UFC/ml, una concentración baja a comparación de 1.50×10^{10} valor obtenido a los 7 días de incubación.

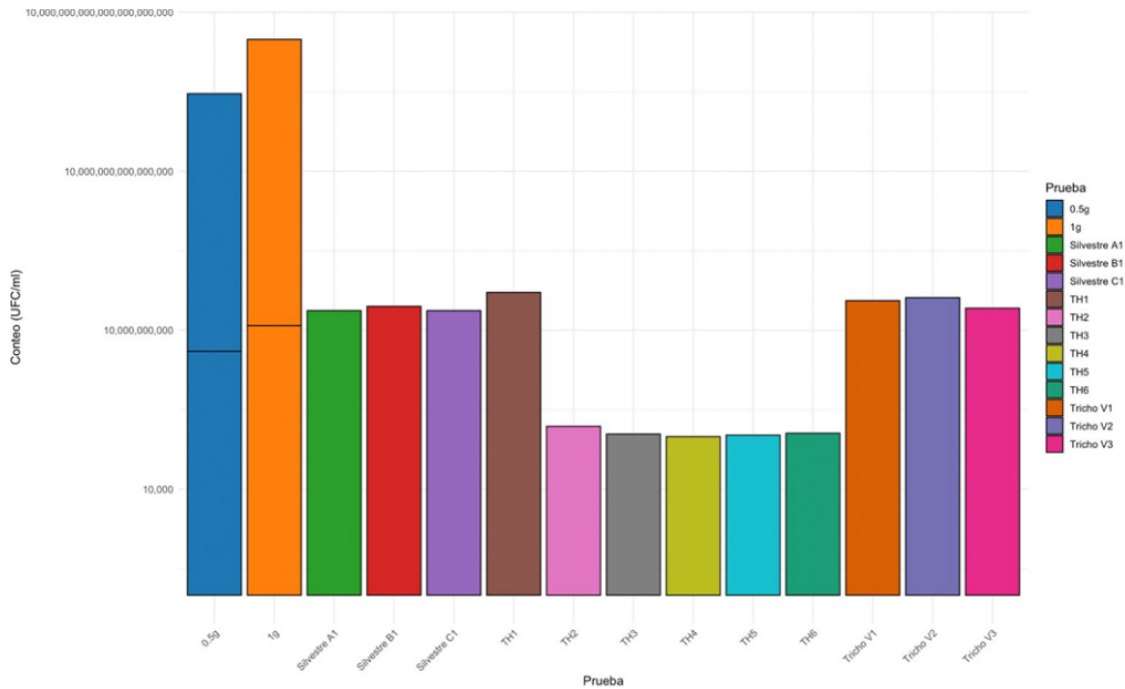
Figura 19. *Estructuras observadas*



Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra las estructuras de *Trichoderma*. A: se observa una estructura formada durante el conteo de esporas (40X). B: muestra la morfología de *Trichoderma* después de una tinción con azul de lactofenol, se observan esporas y ramificaciones del hongo (100X). Con el objetivo de demostrar las diferentes concentraciones y los efectos de las condiciones evaluadas según las pruebas realizadas se realizaron los conteos y cálculos de concentraciones en UFC/ml. En donde las pruebas fueron diluidas 1/10 hasta llegar a 10^{-04} y con esta dilución se contaron las esporas para realizar sus cálculos de concentración.

Figura 20. Concentraciones totales UCF/ml



Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra las concentraciones finales obtenidas para cada prueba, en el eje X se muestran las diferentes pruebas y en el eje Y se observan las concentraciones obtenidas. Estos datos se pueden observar en la Tabla 15, Apéndice A.

8.2 Resultados de la validación de cepas

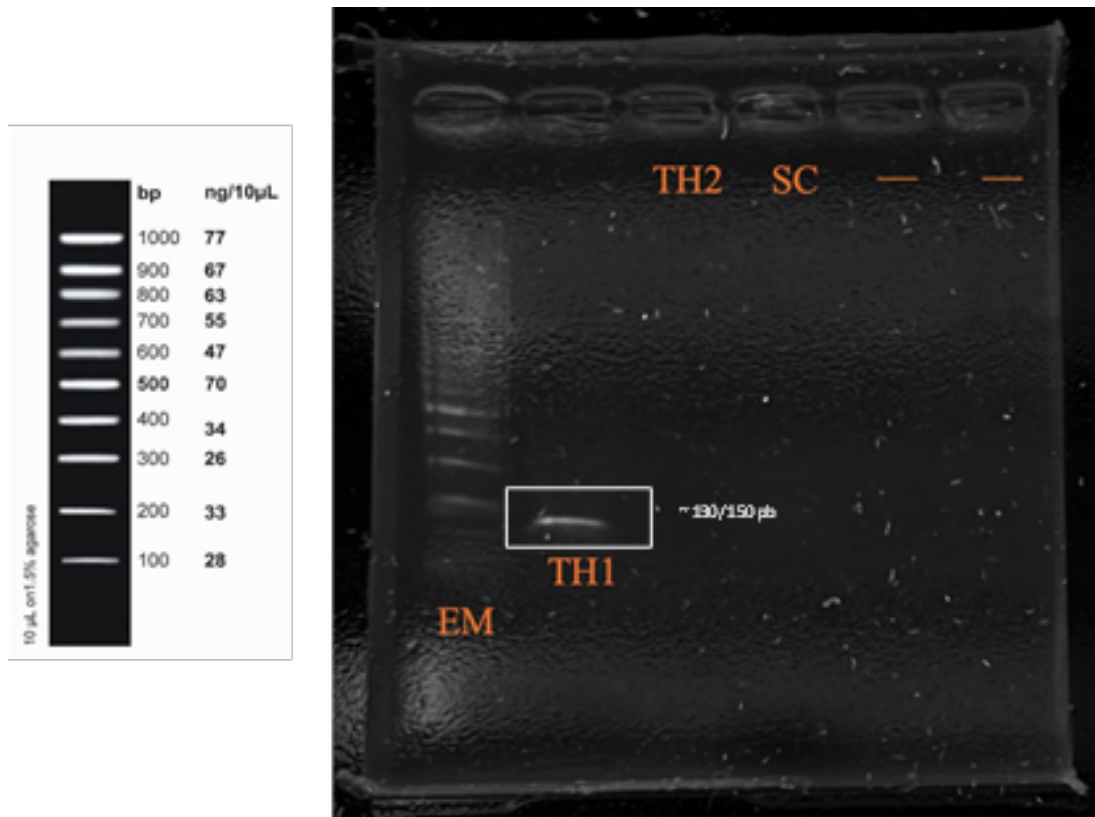
Tabla 11. Concentraciones de ADN

Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230
TH1	1485.8	1.91	1.95
TH2	624.6	1.97	6.47
SC	318.5	1.76	5.25
TV1	44.0	2.00	-1.22
TV2	54.4	2.04	-0.54
TV3	33.6	1.90	-4.57
SA1	75.5	2.46	-0.20
SB1	604.9	2.02	3.56
SA1	965.4	2.06	1.49

Nota. Tabla de autoría propia.

Con el objetivo de validar el protocolo mediante un control positivo, se realizó una PCR convencional empleando ADN proveniente de un producto comercial puro de *Trichoderma harzianum* (Micsa®) sembrado en 100 gramos de sustrato. La amplificación exitosa confirma la funcionalidad del método y su capacidad para identificar cepas de *Trichoderma* en sustratos experimentales.

Figura 21. Amplificación de la muestra control

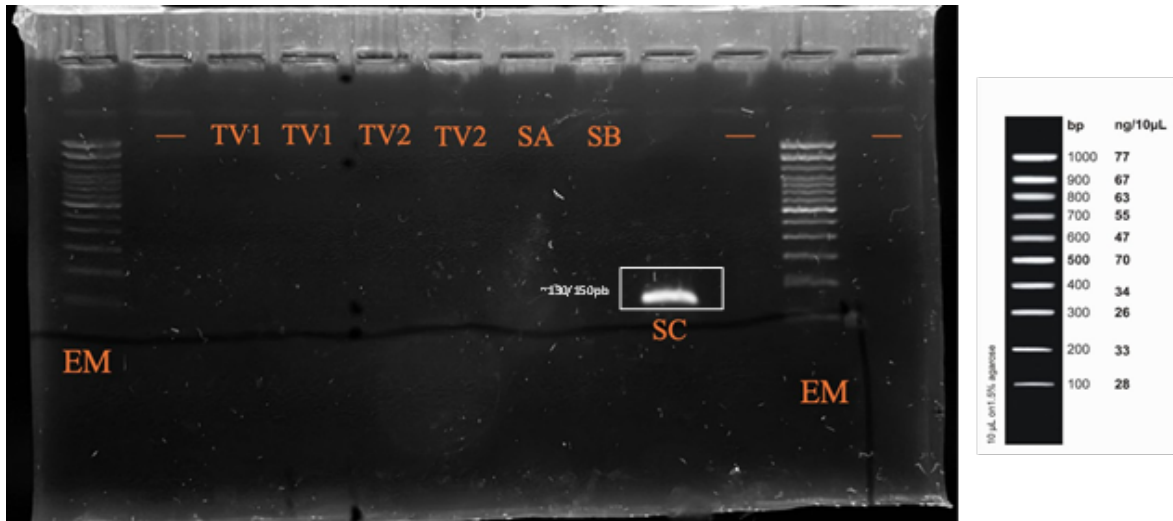


Nota. Figura de autoría propia.

La figura muestra el resultado de la amplificación correspondiente a la muestra control. En el pozo 1 se depositó la escalera molecular (EM) como referencia de tamaño. El pozo 2 contiene la muestra amplificada de *Trichoderma harzianum*, mientras que el pozo 3 corresponde a una muestra no amplificada utilizada como control negativo. En el pozo 4 se colocó una muestra de suelo, y los pozos 5 y 6 se dejaron sin carga, actuando como controles vacíos.

Con el objetivo de validar la presencia de *Trichoderma* en muestras de *Trichoderma* silvestre (wildtype), se realizó una PCR convencional utilizando ADN extraído de una cepa silvestre. Los resultados muestran una amplificación exitosa, evidenciando la presencia de genes específicos de *Trichoderma*, lo que confirma su identificación molecular en la muestra ambiental.

Figura 22. Resultados de las muestras silvestres



Nota. Figura de autoría propia.

La figura presenta el resultado de la amplificación de la muestra silvestre. Los pozos 1 y 11 contienen la escalera molecular (EM) utilizada como referencia de tamaño. Los pozos 2, 10 y 12 permanecieron vacíos y funcionaron como controles negativos. En los pozos 3 y 4 se colocaron muestras no amplificadas correspondientes al inóculo de placa TV1 y TV2. Finalmente, el pozo 9 contiene la muestra silvestre amplificada (SC).

Para validar la presencia y crecimiento de *Trichoderma* en el sustrato utilizado, se realizó una genotipificación mediante PCR convencional, utilizando primers específicos dirigidos a la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal. La visualización del diagrama destaca la ubicación de los primers Forward (GATGAAGAACGCAGCGAAATG) y Reverse (GGGTTCGAGGGTTGAAATGA), los cuales delimitan un amplicón de 137 pares de bases (pb).

La región ITS1, que se encuentra entre los genes 18S rRNA y 5.8S rRNA, varía en longitud de 50 a 350 bp, mientras que la región ITS2, localizada entre los genes 5.8S rRNA y LSU rRNA, tiene una longitud de 50 a 650 bp (Akhoundi et al., 2017). Estas regiones fueron seleccionadas por su alta variabilidad entre especies dentro del género *Trichoderma*, lo que permite una identificación confiable.

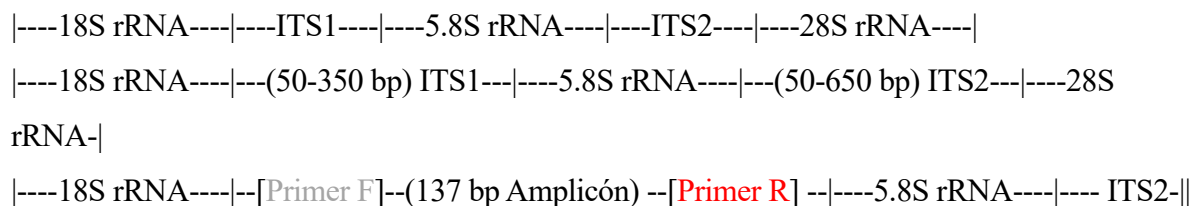


Figura 23. Secuencia de nucleótidos *T. harzianum*

1	GTGTAACGGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGC														
1 0 1	AGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCC CCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTC														
2 0 1	<table border="1"> <tr> <td>GTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAAC</td> <td>GATGAAGAACGC</td> <td>CGATAAGTAATG</td> </tr> <tr> <td>AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC</td> <td>AGCGAAATG</td> <td>TGAATTGCA</td> </tr> </table>					GTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAAC	GATGAAGAACGC	CGATAAGTAATG	AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC	AGCGAAATG	TGAATTGCA				
GTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAAC	GATGAAGAACGC	CGATAAGTAATG													
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC	AGCGAAATG	TGAATTGCA													
3 0 1	<table border="1"> <tr> <td>GAATTCAGTG</td> <td>AATCTTTGAACGCA</td> <td>GCCAGTATTCTGGCGGGC</td> <td>TCATTTCAACC</td> <td>CTC</td> </tr> <tr> <td>AATCATCG</td> <td>CATTGCGCCC</td> <td>ATGCCTGTCCGAGCG</td> <td>CTCGAACCC</td> <td>CG</td> </tr> </table>					GAATTCAGTG	AATCTTTGAACGCA	GCCAGTATTCTGGCGGGC	TCATTTCAACC	CTC	AATCATCG	CATTGCGCCC	ATGCCTGTCCGAGCG	CTCGAACCC	CG
GAATTCAGTG	AATCTTTGAACGCA	GCCAGTATTCTGGCGGGC	TCATTTCAACC	CTC											
AATCATCG	CATTGCGCCC	ATGCCTGTCCGAGCG	CTCGAACCC	CG											
4 0 1	GGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACA GTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAC														
5 0 1	TCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAA														

Sequence Name: Tharzianum

Amplicon Length: 137

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	GATGAAGAACGCAGCGAAATG (Sense)	259	280	21	62	47.6
Probe	AATCTTTGAACGCACATTGCGCCC (Sense)	319	343	24	68	50
Reverse	GGGTTCGAGGGTTGAAATGA (AntiSense)	376	396	20	62	50

Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra la región de nucleótidos elegida de *T. harzianum* para la elaboración de los primers, en donde en verde se observa la región seleccionada para el primer forward, mientras que el primers reverse se muestra en color rojo. De color naranja se muestra la sección seleccionada según la región polimórfica para que las sondas Taqman se unan a esta región, garantizando la detección de la especie.

Con el objetivo de diseñar primers específicos utilizando la especie *Trichoderma viride* se muestra la secuencia de nucleótidos extraída y empleada para la elaboración de los primers, asegurando su especificidad para la amplificación de esta especie.

Figura 24. Secuencia de nucleótidos *T. viride*

1	GAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTG CCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAA			
1 0 1	CCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGT TATTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACCT			
2 0 1	TCAACAACGGATCTCTT GGTCTGGCATC	GATGAAGAACGC AGCGAAATG	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCG	AATCTT TGAAC
3 0 1	GCACATT GCGCCC	GCCAGTATTCTGGCGGGC ATGCCTGTCCGAGCG	TCATTTCAACC CTCGAACCC	CTCCGGGGGGTTCGGCGTT GGGACTTCGGGAACC
4 0 1	CCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCAT GCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCA			
5 0 1	CGTCCGTA AACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC TGAACCTAAG			

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)
Sequence Name: Tviride
Amplicon Length: 137

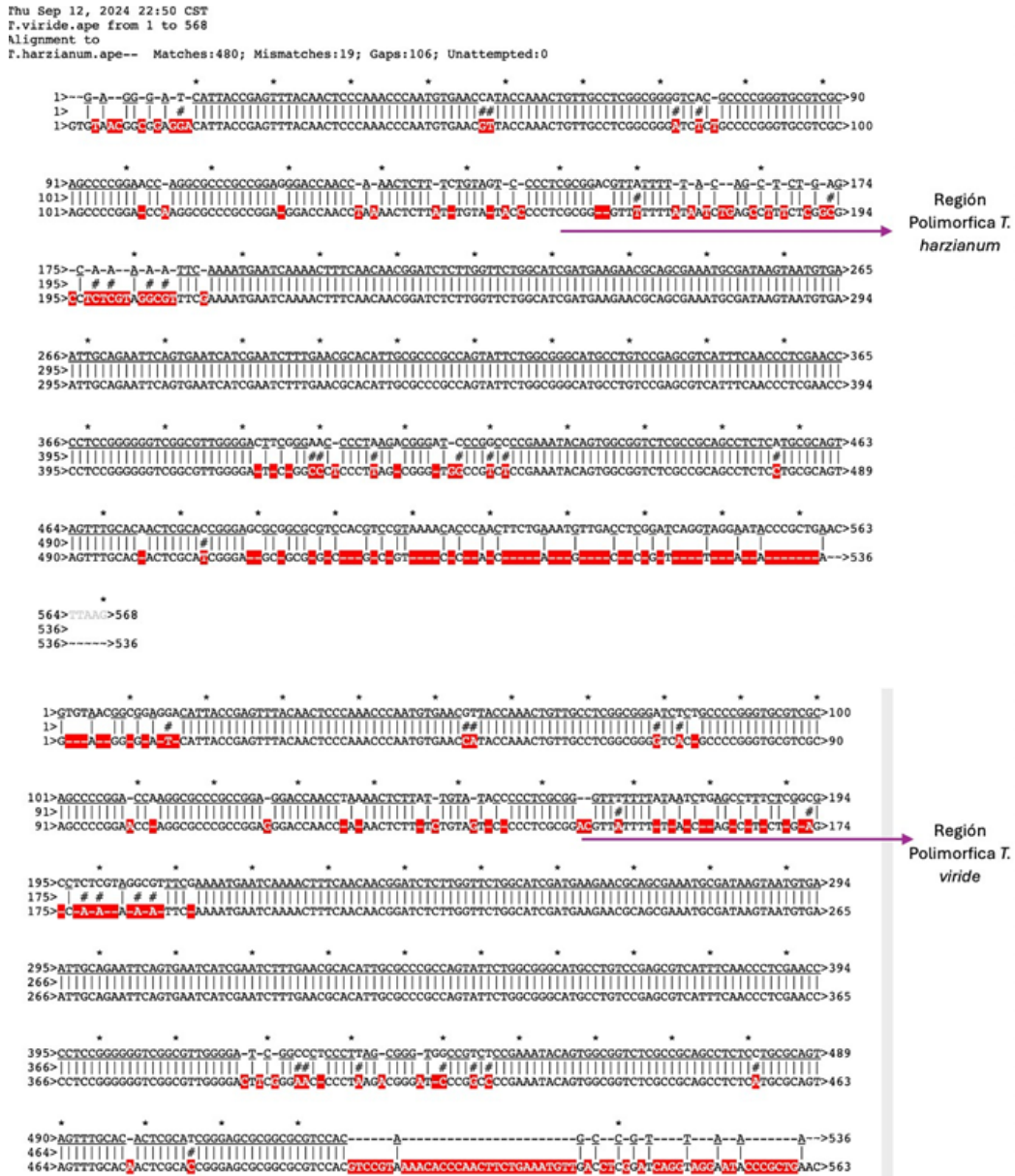
		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	GATGAAGAACGCAGCGAAATG (Sense)	230	251	21	62	47.6
Probe	AATCTTTGAACGCACATTGCGCCC (Sense)	290	314	24	68	50
Reverse	GGGTCGAGGGTTGAAATGA (AntiSense)	347	367	20	62	50

Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra la región de nucleótidos elegida de *T. viride* para la elaboración de los primers, en donde en verde se observa la región seleccionada para el primer forward, mientras que el primers reverse se muestra en color rojo. De color naranja se muestra la sección seleccionada según la región polimórfica para que las sondas Taqman se unan a esta región, garantizando la detección de la especie.

Con el objetivo de identificar la región polimórfica compartida entre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, se muestra el alineamiento de ambas secuencias junto con la región específica utilizada para el diseño de los primers, resaltando la variabilidad y conservación entre las especies.

Figura 25. Regiones para las sondas



Nota. Figura de autoría propia.

La presente figura muestra la secuencia de ambas especies en donde se eligió la región polimórfica para la elaboración de sondas de *T. harzianum* y *T. viride*, ambas alineaciones fueron elaboradas por medio de APE ©.

9 Discusión de resultados

Con el objetivo de implementar un protocolo para evaluar la concentración óptima de crecimiento de *Trichoderma* utilizando arroz como sustrato se realizó la siguiente experimentación, en donde se probaron diferentes tipos de incubación para asegurar el mejor crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.

Primero, se utilizaron dos tipos de arroz, el primero siendo arroz quebrado o arroz entero. Como se observa en las Figuras 14 y 15 existe una diferencia entre el conteo de esporas después de una semana de incubación, para el arroz entero se obtuvo un valor de media de 208.75 esporas por cuadrante con una mediana de 231.50, mientras que para el arroz quebrado su media de esporas por cuadrante es de 112.17 con una mediana de 106.50. Esto al final del conteo dando una diferencia en la concentración de 8.95×10^{10} UFC/ml. Esto basado en la concentración de *Trichoderma* obtenida en cada prueba en donde se obtuvo 8.94×10^{10} UFC/ml para las muestras utilizando arroz entero y 1.13×10^{06} UCF/ml para las pruebas con arroz quebrado. Esto representa un beneficio significativo en términos de tiempo y costo, ya que el arroz quebrado requiere procesos adicionales como el pesado y la trituración, mientras que el arroz entero puede utilizarse directamente sin necesidad de pasos previos. Por tanto, obtener mejores resultados con el arroz entero puede optimizar los recursos y simplificar los procedimientos.

Sin embargo, es importante mencionar que no depende directamente del tamaño físico del sustrato ya que depende de la disponibilidad de los nutrientes para su desarrollo, aunque en el arroz quebrado podría parecer más accesible por la fragmentación del grano el hongo tiene la capacidad de degradación del sustrato por medio de mecanismos enzimáticos. Los hongos del género *Trichoderma spp.* poseen una notable capacidad para degradar paredes celulares, no solo de hongos competidores, sino también de materiales vegetales como el arroz utilizado como sustrato. Este proceso se debe a la secreción de enzimas hidrolíticas especializadas, incluyendo celulasas, quitinasas y glucanasas, que rompen las estructuras poliméricas de las paredes celulares. Estas enzimas descomponen componentes como celulosa, hemicelulosa y quitina, facilitando la liberación de nutrientes almacenados en el interior del sustrato (Kubicek et al., 2001; Zeilinger y Omann, 2007).

Por ejemplo, en estudios con arroz y otros materiales lignocelulósicos, las celulasas han demostrado ser cruciales para liberar azúcares fermentables, mientras que las proteasas contribuyen a liberar aminoácidos esenciales para el desarrollo fúngico. Este mecanismo enzimático asegura un acceso eficiente a los recursos del grano, independientemente de su integridad física (Novy et al., 2021).

De manera similar, la hidrólisis de las paredes celulares de las semillas de arroz permite que *Trichoderma spp.* acceda al almidón y proteínas contenidas en el endospermo, promoviendo un crecimiento eficiente. Este mecanismo no solo mejora la colonización del sustrato, sino que también asegura que el hongo pueda adaptarse a diferentes condiciones físicas, como el uso de arroz entero o quebrado, debido a su acción enzimática precisa y robusta (García-Espejo et al., 2016).

Por otra parte, en los casos de incubación si se muestran diferencias significativas en los cuatro distintos tipos de incubación. En el caso de la iluminación como se observa en las Figuras 12 y 13 se obtuvieron mejores resultados para una incubación iluminada se obtuvo una media de 205.08 con una mediana de 231.50 esporas por cuadrante al conteo de 20 días, obteniendo un valor máximo de 312 esporas por conteo de cuadrante y un mínimo de 97; mientras que para una incubación sin luz se obtuvo un valor de media de 125.75 esporas por cuadrante con una mediana de 108.50. Los valores máximos obtenidos fueron de 214 esporas y un mínimo de 87. Esto dando una diferencia de 1.40×10^{11} UCF/ml ya que se obtuvo una concentración de 1.34×10^{11} UFC/ml para una incubación con luz y 1.26×10^{06} UCF/ml para una incubación sin luz. Algunos hongos crecen mejor con luz debido a que la luz actúa como un estímulo que regula importantes procesos fisiológicos y de desarrollo en estos organismos. La luz puede influir en la reproducción, la formación de esporas, la producción de pigmentos y la activación de rutas metabólicas específicas, la luz regula el desarrollo de los hongos, promueve la acumulación de pigmentos y proteínas protectoras y regula el crecimiento (Corrochano, 2019). Además, la luz puede influir en la expresión de genes relacionados con la regulación de la morfología y el metabolismo del hongo, mejorando su adaptación a distintos entornos.

En el caso del remojo si se observa que cambia la reproducción significativamente en las Figuras 28-32 (Apéndice E) se puede observar que en el caso del remojo inmediato que se utilizó únicamente para el lavado tiene un aspecto seco, si existió una reproducción

del hongo, sin embargo, se puede observar que dejar en remojo dos días el arroz le aporta una humedad que facilita y favorece la reproducción del hongo. En las Figuras 16 y 17 se pueden analizar esta dispersión de los datos en donde se observa favorablemente el remojo de dos días ya que las concentraciones finales son mayores. En el caso de un remojo inmediato se obtuvo una media de 109.17 esporas por cuadrante, una mediana de 106.50 con una mínima de esporas de 72 y un máximo de 172, mientras que en el remojo de dos días del arroz se obtuvo una media de 211.75, una mediana de 231.50 esporas por cuadrante y una mínima de 89 con un máximo de 233. Valores que indican que en efecto el remojo brinda mejores condiciones para el crecimiento de *Trichoderma*. Se obtuvo una concentración total de 8.94×10^{10} UFC/ml y para las muestras no remojadas de 1.09×10^6 UFC/ml. Esto se debe a que el contenido de humedad tiene un impacto crucial en el crecimiento de hongos, siendo el agua un elemento esencial para su metabolismo y reproducción. Los hongos requieren un entorno de humedad adecuada para absorber nutrientes y realizar procesos bioquímicos. La cantidad de agua presente en el medio influye en su capacidad de esporulación y propagación, afectando tanto la calidad como la cantidad de crecimiento del hongo (Ali et al., 2017).

El momento óptimo para realizar los conteos de esporas de *Trichoderma* debe considerar la dinámica del ciclo de vida del hongo y la disponibilidad de esporas maduras. Según los resultados, el conteo realizado a los 20 días mostró la mayor concentración (5.37×10^{10} UFC/ml), mientras que los días 5 y 7 registraron valores de 5.30×10^9 y 1.50×10^{10} UFC/ml, respectivamente, esto según la Figura 18. Sin embargo, después de los 7 días se observa una disminución relativa, atribuida a la formación de estructuras más complejas del hongo que reducen la proporción de esporas libres.

Con base en estos datos, el conteo entre los días 4 y 7 parece ser más representativo para evaluar la producción de esporas antes de que ocurran cambios morfológicos en el micelio. Este intervalo temporal asegura la recolección de datos en el pico de producción de esporas, optimizando la evaluación del rendimiento del hongo en el sustrato. Además, la disminución observada a los 20 días puede deberse a una redistribución de recursos hacia el desarrollo de estructuras reproductivas y no a una verdadera disminución en la actividad metabólica del hongo.

En cuanto a la validación de las cepas se realizó un PCR convencional con los primers diseñados (Figuras 23 y 24). En la Figura 21 se observa la amplificación del ADN de una muestra control de *Trichoderma harzianum*, derivada de un producto comercial (Micsa®) cultivado en 100 gramos de sustrato, el ADN fue aislado utilizando un protocolo de extracción basado en CTAB (sección Apéndice), logrando una concentración de 1485.8 ng/μl. La PCR generó un amplicón de 137 pb, claramente visible entre las bandas de 100 pb y 200 pb del gel de agarosa, más cercano a 100 pb. Este resultado confirma la funcionalidad de los primers para la detección de *Trichoderma* spp. además de validar la efectividad del protocolo. En la Figura 22 se puede observar que en una muestra de *Trichoderma* silvestre también pudo ser amplificado lo que demuestra no solo que en esta muestra silvestre existe alguna especie de *Trichoderma* si no también que tanto el protocolo para su reproducción es efectivo, así como el método de extracción y programa para su amplificación por medio de PCR.

Se diseñaron sondas específicas para *T. harzianum* y *T. viride* (Figura 25), lo que permite una diferenciación precisa entre las dos especies. Este diseño se basa en la selección de regiones genómicas conservadas y específicas para cada especie, asegurando la exclusividad de la amplificación. Estas sondas utilizan el ensayo TaqMan, el cual se fundamenta en la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, que desplaza y corta las sondas oligonucleotídicas hibridadas al ADN objetivo, generando una señal fluorescente (Livak et al., 1995). Este sistema requiere dos sondas TaqMan que difieren en el sitio polimórfico: una complementaria al alelo de tipo silvestre y otra al alelo variante. Cada sonda tiene tintes fluorescentes diferentes en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3', lo que permite distinguir entre las dos especies objetivo (*T. harzianum* y *T. viride*) mediante señales fluorescentes específicas (Livak, 1999; Kumar et al., 2022). En las muestras control, se espera una amplificación clara de *T. harzianum* debido a su naturaleza conocida y confirmada previamente mediante PCR convencional. En el caso de la muestra silvestre, se espera que la amplificación dependa de la presencia predominante de *T. harzianum*, *T. viride*, o ambas especies, proporcionando una herramienta eficiente para identificar qué especie es dominante o si coexisten en el entorno evaluado.

El uso de qPCR también permitiría cuantificar la concentración de ADN fúngico en cada muestra, facilitando la evaluación de la abundancia relativa de cada especie en el

sustrato. La eficiencia del protocolo dependerá en gran medida de parámetros clave como la especificidad de las sondas, las temperaturas de alineación (T_m) optimizadas previamente a 55 °C, y la calidad del ADN extraído. Dado que las muestras analizadas incluyen suelo, es esencial considerar posibles inhibidores presentes en el ADN ambiental que podrían afectar la amplificación. Sin embargo, utilizando controles internos de inhibición, se puede garantizar la confiabilidad de los resultados.

Los resultados esperados indican que el qPCR tiene el potencial de ser una herramienta robusta para diferenciar y cuantificar especies de *Trichoderma*. Esto podría complementar los métodos actuales de detección y proporcionar datos cuantitativos más precisos que respalden la implementación del protocolo desarrollado. Experimentos futuros podrían enfocarse en la validación de estas sondas, así como en la estandarización de los protocolos para garantizar resultados reproducibles y comparables en diversas condiciones de análisis.

Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis alterna (H_a) ya que se demostró que las características del sustrato tienen un efecto significativo en el crecimiento de *Trichoderma spp.* Específicamente, el tipo de arroz, las condiciones de iluminación y el método de remojo influyeron de manera notable en la concentración de esporas producidas. Se encontró que el arroz entero es más práctico y eficiente que el arroz quebrado; además, la incubación bajo condiciones de luz y el remojo prolongado del arroz mejoraron significativamente las condiciones del sustrato, favoreciendo el crecimiento del hongo.

En contraste, la hipótesis nula (H_0) fue rechazada, ya que los datos mostraron diferencias significativas al variar las condiciones del sustrato, confirmando que estos factores son determinantes para maximizar la producción de *Trichoderma spp.* Estos hallazgos destacan la importancia de optimizar estos parámetros para el diseño de protocolos más efectivos en aplicaciones de laboratorio y campo.

10 Conclusiones

- Optimización del sustrato. El uso de arroz entero, sin trituración, combinado con un remojo de 48 horas para asegurar la humedad óptima favorece la germinación, el desarrollo del micelio y mantiene altas concentraciones de esporas, facilitando su implementación en laboratorio y campo para *Trichoderma spp.*
- Condiciones de incubación y estandarización del protocolo. La incubación bajo condiciones de luz demostró favorecer significativamente la esporulación de *Trichoderma spp.* Al integrar este factor con la preparación optimizada del sustrato, fue posible establecer un protocolo estandarizado y reproducible, orientado a la evaluación de la concentración inicial y de las condiciones de crecimiento más favorables en arroz.
- Validación molecular. En cuanto a la validación molecular, la genotipificación mediante PCR convencional confirmó la identidad de las cepas de *Trichoderma spp.* cultivadas en el sustrato. Este resultado garantiza la confiabilidad del protocolo implementado y respalda su uso como método estandarizado para la obtención de inóculos de calidad.

11 Recomendaciones

- Para maximizar el rendimiento de *Trichoderma spp.*, se recomienda utilizar arroz entero como sustrato estándar, complementado con un remojo de dos días. Este procedimiento asegura una mayor concentración de esporas y un manejo más eficiente.
- La incorporación de sistemas de iluminación controlada durante la incubación podría aumentar la esporulación de *Trichoderma spp.* de manera consistente. Esto permitiría optimizar la producción de esporas a nivel industrial o en campos de aplicación masiva, de esta misma forma se recomienda también medir la humedad relativa dentro de las bolsas con sustrato para que los resultados siempre puedan ser reproducibles bajo las mismas condiciones.
- Aunque se logró una validación inicial con PCR convencional, es importante utilizar qPCR para diferenciar y cuantificar especies como *T. harzianum* y *T. viride*. Este método no solo confirmará la identidad de las cepas, sino que también permitirá ajustar el protocolo según la eficacia de cada especie en condiciones específicas.

12 Referencias

- Adelaide University. (s.f.). *Trichoderma*. Mycology | University of Adelaide. <https://11nq.com/n55rtcv>
- Agencia Guatemalteca de Noticias [AGN]. (19 de febrero de 2023). Efectuarán estudios de suelos para mejorar producción agrícola. *Agencia Guatemalteca de Noticias*. <https://s11nk.com/n1ui2pu>
- Ahmed, A. S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., y Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48(1), 58–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., y Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis [Infecciones por Leishmania: Objetivos moleculares y diagnóstico]. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Ali, S., Fradi, A., y Al-Araji, A. (2017). Effect of some physical factors on growth of five fungal species [Efecto de algunos factores físicos en el crecimiento de cinco especies fúngicas]. *European Academic Research*, 5(2), 1069–1078.
- Alianza Mundial para la Contabilidad de la Riqueza y la Valoración de los Servicios de los Ecosistemas [WAVES]. (2019). *Cuenta ambiental de agricultura de Guatemala*. WAVES. <https://acortar.link/2Xzgzq>
- Álvarez, M. L., y Doné, S. C. (2014). SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR arrays: Expression profile of genes relevant to a pathway or a disease state [Matrices de PCR cuantitativa SYBR® Green y TaqMan®: Perfil de expresión de genes relevantes para una vía o un estado patológico]. En M. L. Alvarez y M. Nourbakhsh (Ed.), *RNA Mapping. Methods in Molecular Biology*, 1182, 321–359. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_27

- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., y Antonjaya, U. (2022). Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis [Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real: Técnicas actuales, aplicaciones y papel en el diagnóstico de la COVID-19]. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>
- Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of Trichoderma against fungal plant diseases – A review [Mecanismos de acción y potencial de biocontrol de Trichoderma contra enfermedades fúngicas de las plantas: Una revisión. *Ecological Complexity*, 49, 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>
- Aswini A., Sharmila T., Raaga K., Sri Deepthi R. and Krishna M. S. R (2016). In vitro antifungal activity of Trichoderma strains on pathogenic fungi inciting hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. JOCPR*, 8(4). 425-430.
- Barbash, J. E. (2014). The geochemistry of pesticides [La geoquímica de los pesticidas]. En H. D. Holland, K. K. Turekian (Ed.) *Treatise on Geochemistry* (2ª ed, pp. 535–572). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00915-3>
- Benítez, J., Gonzalez-Neira, A., Malats, N., Osorio, A., Robledo, M., Rodríguez, S. y Urioste, M., (s. f.). *Glosario de genética – Amplicón* [Genetics glossary – Amplicon]. Fundación Instituto Roche. <https://11nq.com/h4mz8k5>
- Biocultivos S.A. (s.f.). *Ficha técnica Cepa Trichoderma viride*. Biocultivos S.A. <https://11nq.com/glalbpn>
- Blanco Carrero, E. L. y Castro Molina, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1),6–16. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>
- Bryan, B. (2022, 27 junio). *What are PCR primers?* [¿Qué son los cebadores de PCR?]. miniPCR Bio. <https://www.minipcr.com/what-are-pcr-primers/>
- Byju's. (2 de julio de 2024). *PCR: Principle, steps, types, components and applications of PCR* [PCR: Principio, pasos, tipos, componentes y aplicaciones de la PCR]. Byju's. <https://byjus.com/biology/pcr/>

- Charoenrak, P., y Chamswarnng, C. (2016). Efficacies of wettable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice [Eficacias de productos de biocontrol de *Trichoderma asperellum* en el crecimiento y reducción de panículas sucias en arroz]. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.04.001>
- Chiriboga P., H., Gómez B., G. y Garcés E., K. (2015). *Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura[IICA]. <https://11nq.com/ucwwip0>
- Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G. y García Velasco, R. (2019). *Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura*. *Bioteología Vegetal*, 19(4), 237–248. <http://ref.scielo.org/gbrzwr>
- Consilla Donaire, M., Arias Segura, J. y Rodríguez Sáenz, D. (2022). Aumenta 137% el valor de las importaciones de fertilizantes químicos de América Latina y el Caribe en 2022. <https://hdl.handle.net/11324/21235>.
- Corrochano, L. M. (2019). Light in the fungal world: From photoreception to gene transcription and beyond [La luz en el mundo fúngico: de la fotorrecepción a la transcripción génica y más allá]. *Annual Review of Genetics*, 53, 149–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031415>
- Cromakit. (20 de septiembre de 2024a). *Azul de lactofenol 1x100 ml – Descripción* [Tienda en línea]. Cromakit. <https://sl1nk.com/45aj5yl>
- Cromakit. (28 de marzo de 2024b). *Verde de malaquita 2x100 ml – Descripción* [Tienda en línea]. Cromakit. <https://11nq.com/w8us4gh>
- Crop Science US. (s.f.). *Fungicide Modes of Action*. Bayer Farmer Experience. <https://11nq.com/tknk6r>
- Domiaty-Saad, R., y Scheuermann, R. H. (2006). Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping [Pruebas de ácidos nucleicos para carga viral y genotipado viral]. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.049>
- Duke S. O. (1990). Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental health perspectives*, 87, 263–271. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087263>

- Food and Agriculture Organization. [FAO]. (2009). *How to feed the world in 2050*. FAO. <https://acortar.link/Z4c2Ks>
- Food and Agriculture Organization [FAO]. (2023). *The State of Food and Agriculture 2023. Revealing the true cost of food to transform agrifood systems*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc7724en>
- Foxman, B. (2012). A primer of molecular biology [Una introducción a la biología molecular]. En B. Foxman (Ed.), *Molecular tools and infectious disease epidemiology* (pp. 53–78). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374133-2.00005-8>
- Gajera, H. P., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., y Golakiya, B. A. (2013). Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system – a review [Mecanismo molecular de Trichoderma como agentes de biocontrol contra fitopatógenos: una revisión]. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 133–142.
- Gao, P., Qi, K., Han, Y., Ma, L., Zhang, B., Zhang, Y., Guan, X., y Qi, J. (2023). Effect of Trichoderma viride on rhizosphere microbial communities and biocontrol of soybean root rot. *Frontiers in microbiology*, 14, 1204688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1204688>
- García-Espejo, C. N., Mamani-Mamani, M. M., Chávez-Lizárraga, G. A., y Álvarez-Aliaga, M. T. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del Trichoderma inhamatum (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 20–32. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2016.070100020>
- García Munguía, M. E. y Gálvez, J. (agosto de 2022). Tierras: Serie Perfil ambiental de Guatemala. Editorial Cara Parens. <https://11nq.com/jim9ebh>
- Gebhardt, C. (2007). Molecular markers, maps and population genetics en D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D.K.L. Mackerron, M.A. Taylor y H.A. Ross (Ed.), *Potato Biology and Biotechnology* (pp. 77–89). <https://doi.org/10.1016/b978-044451018-1/50047-6>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., y Mercado-Flores, Y. (2022). Bacillus subtilis y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la

- agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S., y Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96. <https://acortar.link/bhLCL2>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., y Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases – A review [Especies de *Trichoderma*: Nuestros mejores aliados fúngicos en el biocontrol de enfermedades de plantas – Una revisión]. *Plants*, 12(3), 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
- Haque, Z., Iqbal, M. S., Ahmad, A., Khan, M. S., y Prakash, J. (2020). Molecular Characterization of *Trichoderma* spp. Isolates by Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Sequencing Technique and its Use as a Biocontrol Agent. *The Open Biotechnology Journal*, 14(1), 70–77. <https://doi.org/10.2174/1874070702014010070>
- Herrera Díaz, J. (4 de agosto de 2022). *PCR en tiempo real*. Facultad de Química - Universidad Nacional Autónoma de México. <https://11nq.com/nmeaxq3>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98–112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. y Bissett, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. [Estimulación de crecimiento en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Trichoderma*]. *Biological Control*, 51(3) 2009, Pages 409-416, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>
- Hui, L., DelMonte, T., y Ranade, K. (2008). Genotyping using the TaqMan assay [Genotipado usando el ensayo TaqMan]. *Current Protocols in Human Genetics*, 56(1). 2.10.1-2.10.8 <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0210s56>

- Iida, Y., Higashi, Y., Nishi, O., Kouda, M., Maeda, K., Yoshida, K., Asano, S., Kawakami, T., Nakajima, K., Kuroda, K., Tanaka, C., Sasaki, A., Kamiya, K., Yamagishi, N., Fujinaga, M., Terami, F., Yamanaka, S. y Kubota, M. (2023). Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*–based bioinsecticide suppresses severity of powdery mildews of vegetables by inducing the plant defense responses. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1211825>
- Instituto Nacional de Estadística [INE]. (2015). *Compendio Estadístico Ambiental*. INE. <https://s11nk.com/3cz68oh>
- Instituto Nacional de Estadística. (2023). *Encuesta Nacional de Empleo e Ingresos – ENEI*. INE. <https://acortar.link/O3bnxo>
- Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura [Intagri S.C.]. (s. f.). *Factores a considerar para la elección del sustrato ideal en la producción de hortalizas*. Intagri S. C. <https://acortar.link/UzDTpU>
- Islam, M. S., Tudryn, G. J., Bucinell, R., Schadler, L. S. y Picu, R. C. (2017). Morphology and mechanics of fungal mycelium [Morfología y mecánica del micelio fúngico]. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13295-2>
- Kim, Y., Choi, S. J. y Choi, C. (2017). An efficient PCR-RFLP method for the rapid identification of Korean *Pyropia* species. *Molecules*, 22(12), 2182. <https://doi.org/10.3390/molecules22122182>
- Khehra, N., Padda, I. S. y Swift, C. J. (6 de marzo 2023). *Polymerase chain Reaction (PCR)*. National Library of Medicine: National Center of Biology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Kuan, K. B., Othman, R., Abdul Rahim, K., y Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PloS one*, 11(3), e0152478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., y Lorito, M. (2001). Trichoderma: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 11-23.
- Kumar, D., Gautam, R., Pandey, V. P., Yadav, A., Dwivedi, U. N., Ahmad, R., y Yadav, K. (2022). Computational approaches toward single-nucleotide polymorphism discovery and its applications in plant breeding. En P. Sharma, D. Yadav y R. Kumar

- Gaur (Ed.) *Bioinformatics in Agriculture*. (pp. 513-536). Bioinformatics in Agriculture. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89778-5.00019-2>
- Kumar, S., Shukla, V., Dubey, M. K., y Upadhyay, R. S. (2021). Activation of defense response in common bean against stem rot disease triggered by *Trichoderma erinaceum* and *Trichoderma viride*. *Journal of basic microbiology*, 61(10), 910–922. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000749>
- Khan Academy (s. f.a). *Electroforesis en gel*. Khan Academy. <https://acortar.link/Zx3aMu>
- Khan Academy. (s. f.b). *Polymerase chain reaction (PCR)*. Khan Academy. <https://sl1nk.com/7ku8yyb>
- Livak K. J. (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay [Discriminación alélica mediante sondas fluorogénicas y el ensayo de nucleasa 5']. *Genetic analysis : biomolecular engineering*, 14(5-6), 143–149. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(98)00019-9)
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., y Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* 4, 357-362. <https://genome.cshlp.org/content/4/6/357.short>
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., Vithanage, M., Patra, A. K., y Manna, M. C. (2020). Chapter 7 - Impact of agrochemicals on soil health, [Capítulo 7 - Impacto de los agroquímicos en la salud del suelo]. En M. N. V. Prasad (Ed.). *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation*. (pp. 161–187). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-103017-2.00007-6>
- Marroquín Pérez, C. (1 de Agosto de 2017). Cada año Guatemala pierde unas 250 toneladas métricas de suelo cultivable. *Prensa Libre*. <https://11nq.com/89gs9sd>
- Meyer, M. C., Mazaro, S. M., y Silva, J. C. Da. (2022). *Trichoderma su uso en la agricultura*. Empresa Brasileña de Investigación Agropecuária – Embrapa. <https://11nq.com/b5nilwt>
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, K. N., y Latif, M. A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance [Revisión de marcadores microsatélites

- y sus aplicaciones en programas de mejoramiento de arroz para resistencia a la piricularia]. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 22499–22528. <https://doi.org/10.3390/ijms141122499>
- Mora-González, A., Naranjo-Morán, J., Albiño-Quitiaquez, A., Flores-Cedeño, J., Oviedo Anchundia, R., Galarza-Romero, L., Vera-Oyague, M. y Barcos-Arias, M. (2021). Optimización en la aclimatación de plántulas micropropagadas de banano (*Musa sp.*) utilizando tres insumos orgánicos. *Bionatura*. 6. 1452-1461. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.3>
- Mueller, D., Wise, K., Bradley, C., Sisson, A., Smith, D., Hodgson, E., Albert Tenuta, A., Friskop, A., Conley, S., Faske, T., Sikora, E., Giesler, L., y Chilvers, M. (2021). Chapter 1: Fungicide Use in Field Crops en *Fungicide Use in Field Crops Web Book*. Crop Protection network. <https://doi.org/10.31274/cpn-20210329-0>
- Mukhopadhyay, R., y Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: A beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential [*Trichoderma*: Un agente antifúngico beneficioso y perspectivas sobre su mecanismo de biocontrol]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Murray, M. y Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant. *DNA. Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4325.
- Mwangi, M. W., Monda, E. O., Okoth, S. A., y Jefwa, J. M. (2011). Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma Harzianum* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(2), 508–513. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000015>
- Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., y Hossain, K. (2014). *Trichoderma spp.*: A biocontrol agent for sustainable management of plant diseases [*Trichoderma spp.*: Un agente de biocontrol para el manejo sostenible de enfermedades de las plantas]. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1489–1493.
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (s. f.). *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)* [Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción].

National Pesticide Information Center [NPIC]. (4 de noviembre de 2015) *Suelos y pesticidas*.

National Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/envir/soil.es.html>

Novy, V., Nielsen, F., Cullen, D., Sabat, G., Houtman, C. J., y Hunt, C. G. (2021). The characteristics of insoluble softwood substrates affect fungal morphology, secretome composition, and hydrolytic efficiency of enzymes produced by *Trichoderma reesei* [Las características de los sustratos de madera blanda insoluble afectan la morfología fúngica, la composición del secretoma y la eficiencia hidrolítica de las enzimas producidas por *Trichoderma reesei*]. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 105. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01955-5>

Oliveira, C., Aguiar, T. Q, y Domingues, L. (2017). Principles of genetic engineering [Principios de la ingeniería genética]. En A. Pandey y J. A. C. Teixeira (Eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering: Foundations of biotechnology and bioengineering* (pp. 81– 127). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63668-3.00004-4>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (15 de septiembre de 2022). *Residuos de plaguicidas en los alimentos*. Organización Mundial de la Salud. <https://acortar.link/sALPf2>

Parnell, J.J., Berka, R., Young, H.A., Sturino, J.M., Kang Y., Barnhart D.M. y DiLeo, M.V. (2016). From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1110. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110>

Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., y Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review [Estado actual de los efectos de los pesticidas en el ambiente, la salud humana y su manejo ecológico como biorremediación: Una revisión completa]. *Frontiers in Microbiology*, 13, 962619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>

- Pfeifer, J. (3 de noviembre de 2022). *Trust your SYBR Green qPCR Data. Behind the Bench*. Thermo Fisher Scientific Inc. <https://acortar.link/GSGlxZ>
- Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. (2022). *Informe nacional de desarrollo humano Guatemala*. PNUD. <https://www.undp.org/es/guatemala>
- Promega. (s. f.). Taq polimerasa. <https://acortar.link/AfXpsT>
- Real Academia Española. (s.f.). Inocular. En *Diccionario de la lengua española*. <https://acortar.link/JqQLQh>
- Romero-Arenas, O., Huerta Lara, M., Damián Huato, M. A., Domínguez Hernández, F. y Arellano Victoria, D. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 143-151. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77613172015>
- Ross, M. A., y Childs, D. J. (1996). *Herbicide Mode-of-Action Summary*. Purdue University, Department of Botany: Plant Pathology, West Lafayette IN. Report No. WS-23-W.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., y Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Sigma Aldrich [MERCK]. (s. f.). *Universal SYBR Green qPCR Protocol* [Protocolo de qPCR con Universal SYBR Green]. MERCK. <https://11nq.com/p6p1et8>
- Smith, M. (s. f.). *Polymerase chain reaction (PCR)* [Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)]. National Human Genome Research Institute. <https://s11nk.com/56ggt1y>
- Stazzonelli, E., Yasem de Romero, M.G., y Ploper, L.D. (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 37(1), 57-66. <http://ref.scielo.org/t82vjz>
- Swoboda, M., (10 de junio de 2022). *Metarhizium spp. biocontrol agent factsheet* [Ficha técnica de agente de biocontrol *Metarhizium spp.*]. Cornell University: CALS. <https://s11nk.com/60kp01s>
- Tak Global. (n.d.). *About Us*. TAK. <https://www.tak.gt/aboutus>
- Tautz, D., y Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127–4138. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>

- Thermo Fisher Scientific Inc. (s.f.) *How TaqMan Assays Work*. Thermo Fisher Scientific Inc. <https://11nq.com/cgcl740>
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz, C., Bautista, C., Ramírez-Pool, J., Ávalos-Contreras, N., García, S. y Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(4). 947-961 <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Trade Data Monitor, LLC. (12 de septiembre de 2024). *Trade Data Monitor - Global Trade Data Statistics Supplier*. Trade Data Monitor. <https://tradedatamonitor.com/>
- Trewavas, A. (2001). Urban myths of organic farming [Mitos urbanos de las granjas orgánicas]. *Nature*, 410(6827), 409–410. <https://doi.org/10.1038/35068639>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E. y Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- United States Environmental Protection Agency [EPA]. (12 de febrero de 2016). *Agriculture Nutrient Management and Fertilizer*. EPA. <https://11nq.com/pa8y963>
- Valdés Ríos, E. L. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(1). <https://aes.ucf.edu/cu/index.php/aes/article/view/40>
- Velten, S., Leventon, J., Jager, N., y Newig, J. (2015). What is sustainable agriculture? A Systematic review. *Sustainability*, 7(6), 7833–7865. <https://doi.org/10.3390/su7067833>
- Zeilinger, S., y Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene regulation and systems biology*, 1, 227–234. <https://doi.org/10.4137/grsb.s397>

13 Apéndice

13.1 Apéndice A: datos crudos obtenidos en la investigación

Tabla 12. *Medición de crecimiento en tiempo*

Tiempo (días)	Presencia / Ausencia
0	Ausencia
2	Ausencia
4	Presencia +
6	Presencia +++

Nota. Tabla de elaboración propia.

La Tabla 12 muestra la evolución del crecimiento del hongo en diferentes intervalos de tiempo. Se observa ausencia de desarrollo en los días 0 y 2, mientras que a partir del día 4 se detecta presencia de micelio, aumentando su intensidad hacia el día 6.

Tabla 13. *Concentraciones según muestras*

Muestra	Concentración de esporas
A	2.68E+11
B	2.37E+06
C	9.60E+05
D	1.10E+06
E	1.21E+06
F	2.68E+11
TV1	1.27E+11
TV2	1.70E+11
TV3	6.80E+10
Suelo A1	5.53E+10
Suelo B1	5.50E+10
Suelo C1	8.03E+10

Nota. Tabla de elaboración propia.

La Tabla 13 presenta las concentraciones de esporas obtenidas en diferentes muestras de laboratorio y de suelo. Los resultados evidencian variaciones significativas entre muestras, con valores que oscilan desde 9.60E+05 hasta 2.68E+11, indicando diferencias en la capacidad de producción de esporas según el origen de la muestra.

Tabla 14. *Conteo total de esporas*

Muestra	Dilución	Concentración de esporas	Cuadrante (cámara Neubauer)
A	4	312	1
	4	244	2
	4	288	3
	4	229	4
B	4	256	1
	4	216	2
	4	241	3
	4	234	4
C	4	74	1
	4	128	2
	4	110	3
	4	72	4
D	4	107	1
	4	131	2
	4	97	3
	4	106	4
E	4	87	1
	4	171	2
	4	99	3
	4	127	4
F	4	101	1
	4	116	2
	4	89	3

Muestra	Dilución	Concentración de esporas	Cuadrante (cámara Neubauer)
	4	215	4
TV1	4	129	1
	4	132	2
	4	124	3
	4	124	4
TV2	4	113	1
	4	184	2
	4	179	3
	4	202	4
TV3	4	70	1
	4	70	2
	4	55	3
	4	70	4
Silvestre A1	4	52	1
	4	59	2
	4	50	3
	4	60	4
Silvestre B1	4	64	1
	4	93	2
	4	90	3
	4	74	4
Silvestre C1	4	59	1
	4	56	2
	4	48	3
	4	57	4

Nota. Tabla de elaboración propia.

La Tabla 14 presenta el registro del número de esporas observadas en diferentes cuadrantes de la cámara de Neubauer. Los conteos se realizaron a partir de una dilución

seriada, utilizando específicamente la cuarta dilución (10^{-4}). Estos valores permiten estimar la concentración total de esporas mediante el promedio entre cuadrantes.

Tabla 15. *Concentraciones finales*

Prueba	Conteo (UFC/ml)
Silvestre A1	5.5E+10
Silvestre C1	5.5E+10
Silvestre B1	8.0E+10
Tricho V1	1.3E+11
Tricho V2	1.7E+11
Tricho V3	6.8E+10
1g	1.50E+10
1g	6.30E+10
0.5g	1.60E+09
0.5g	5.30E+09
TH1	2.68E+11
TH2	2.37E+06
TH3	1.21E+06
TH4	9.60E+05
TH5	1.10E+06
TH6	1.30E+06

Nota. Tabla de elaboración propia.

La Tabla 15 muestra las concentraciones finales de esporas (UFC/ml) obtenidas en distintas pruebas y tratamientos, incluyendo muestras silvestres, aislamientos de *Trichoderma* y diferentes condiciones de ensayo. Los valores permiten comparar la capacidad de producción de esporas entre tratamientos y evaluar la variabilidad en los resultados finales de las pruebas realizadas.

13.2 Apéndice B: procedimiento operativo estándar 01. Producción

13.2.1.1 *Trichoderma harzianum*

El siguiente Procedimiento Operativo Estándar (POE) fue elaborado para la empresa Tak Global © con el objetivo de proporcionar una guía detallada y estructurada del paso a paso necesario para llevar a cabo el proceso relacionado con este proyecto. Dada la importancia de este trabajo para la empresa, este POE busca garantizar la replicabilidad y consistencia de los resultados, promoviendo prácticas que conduzcan a resultados favorables en finca, basados en los hallazgos y optimizaciones obtenidos durante la ejecución del proyecto.

POE: producción *T. harzianum*

Objetivo: reproducir y cultivar *Trichoderma harzianum* utilizando arroz como sustrato.

Responsable: técnico de laboratorio

Definiciones

- *Trichoderma spp.*: hongo benéfico que impide el desarrollo de hongos o nemátodos causantes de enfermedades ya que tienen la capacidad de captar los nutrientes de los hongos patógenos o por medio de degradación de materiales orgánicos (Chiriboga P. et al., 2015). Su mecanismo de acción es principalmente mediante la competencia por espacio y nutrientes, el microparasitismo y antibiosis accionando directamente contra hongos fitopatógenos (Stazzonelli et al., 2017).
- Inoculación: introducción de un organismo patógeno (Real Academia Española, s. f.).
- Sustrato: material sólido, natural o de síntesis colocado dentro de un contenedor que permite el desarrollo y crecimiento de un cultivo (Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura [Intagri S.C.], s. f.).
- Micelio: estructura porosa compuesta por filamentos tubulares llamados hifas (Islam et al., 2017).

Materiales y equipo

- Rikoderma 8 WP (*Trichoderma harzianum*) – MICSA ©
- Balanza analítica
- Bolsas de celofán
- Baldes de remojo
- Autoclave
- Arroz precocido 100g
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Cubreobjetos
- Tubos de ensayo para dilución
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Contador numérico

Consideraciones

- Utilizar equipo de protección personal: bata, mascarilla, redcilla y guantes para evitar contaminantes que comprometan la calidad del proceso. El equipo de protección personal no debe estar roto ni sucio.
- Previo a la experimentación se debe lavar el arroz y dejarlo en remojo 2 días.
- Los materiales a utilizar para las diluciones deben ser esterilizados.
- Al final de cada prueba todo el equipo que haya tenido contacto con el *Trichoderma harzarium* debe ser dejado en remojo con jabón y cloro al menos durante 30 min. Este equipo debe ser llevado al autoclave posteriormente.

Procedimientos de laboratorio

- a. Limpieza del arroz
 - Pesar 100 gramos de arroz precocido y colocarlo en un recipiente apto para lavado, este se debe lavar únicamente con agua del grifo. Después se debe dejar en remojo durante 2 días.
- b. Inoculación de *Trichoderma hazarium* en arroz
 - Vertir los 100 g de arroz en bolsas de celofán (aptas para autoclavar).

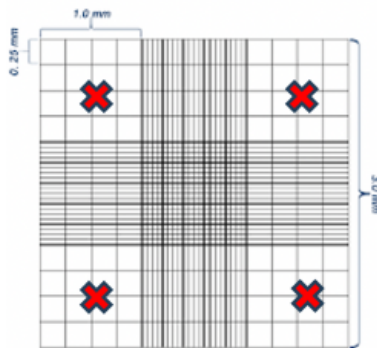
- Esterilizar durante 20 minutos a 121 °C 1 atm en la autoclave.
- Dejar reposar a temperatura ambiente hasta el arroz se encuentre a una temperatura manejable.
- Por cada 100 g de arroz se deben agregar 0.5 g del producto (Rikoderma 8 WP).
- El producto pesado debe ser diluido en 5 ml de agua estéril, esta mezcla debe vertirse en el arroz.
- Homogenizar la mezcla con producto dentro de la bolsa de arroz.
- El área de incubación debe ser un espacio a temperatura ambiente con accesibilidad a la luz. Humedad relativa 13% y una temperatura ente 20-23 °C.
- Esperar un tiempo de incubación de al menos una semana manipulando el arroz cada 2 días expandiendo el producto sin abrir la bolsa.

c. Conteo

- Realizar cuatro soluciones seriadas (1:10) tomando 1 g de arroz con *Trichoderma harzarium*.
- Realizar el conteo de esporas por medio de la cámara de Neubauer.
- Realizar los cálculos según los cuadrantes utilizados para conocer la concentración (UFC/ml) de *Trichoderma harzarium* crecido en el cultivo.

Cuadrantes utilizados para forma de conteo

Figura 26. Cuadrantes utilizados para forma de conteo de cconcentración UFC/ml



$$\text{Concentración} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Células contadas}}{\text{No. Cuadrantes}} * 10,000 \right) \div \text{dilución utilizada}$$

Nota. Figura de autoría propia.

Figura 27. Ejemplo de implementación de cuadro de concentración UFC/ml

Dilución 4	Total
14	
9	
15	
16	54

$$\text{Concentración} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{54}{4} * 10,000 \right) \div 0.00001 = 13500000000 = 1.35 \times 10^{10} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}}$$

Nota. Figura de autoría propia.

Fecha de Elaboración 14/07/2023

13.3 Apéndice C: procedimiento operativo estándar 02. Extracción ADN

El presente procedimiento operativo estándar fue obtenido del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, área de Biología molecular y virología.

POE: extracción ADN a partir de tejido vegetal y cultivos fúngicos

Objetivo: describir las acciones para extraer ADN de virus, hongos, bacterias y vectores, a partir de muestras vegetales y cultivos microbiológicos de hongos.

Definiciones

- Buffer TE: buffer compuesto de Tris-HCl y EDTA.

Materiales y equipo

- Cloro 10%
- Etanol 70%
- Papel absorbente
- Buffer de Extracción CTAB
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- Acetato de Amonio 7.5M
- Isopropanol 5.2.8 Etanol 70% (para extracción)
- Buffer TE
- Tubos Eppendorf 1.5ml

- Puntas de 10ul
- Puntas de 200 ul
- Puntas de 1000 ul
- Micropipeta de 10ul
- Micropipeta de 200 ul
- para ECOTERMO
- Guantes de látex
- Micropipeta de 1000ul
- Gradilla para tubos de 1.5ml
- Marcador indeleble de punta fina
- Horno
- Centrífuga
- Congelador
- Vórtex
- Macerador mecánico
- Pistilos de plástico azules
- Recipiente para descarte para puntas nuevas
- Recipiente para descarte de reactivos
- Frasco de descarte de reactivos

Consideraciones

- Es importante trabajar cada procedimiento en el área designada para cada actividad para evitar.
- Utilizar equipo de protección personal como bata y guantes.
- Para cuando se necesite utilizar una solución precalentada, considerar un tiempo previo para encender el horno a la temperatura requerida.
- Descartar los reactivos en los recipientes rotulados para descarte en la mesa de trabajo y luego descartarlo en el frasco para ECOTERMO.
- Al terminar el procedimiento, desechar los guantes en el descarte de plásticos.
- Para la extracción de ADN se utilizan puntas nuevas, las cuales deben ser desechadas en el descarte rotulado para puntas nuevas.

- Considerar el área de la toma de muestra en la planta según el fitopatógeno a detectar.
- Utilizar tejido fresco, o bien, conservado en frío (-20°C) o deshidratado en sílica gel.

Procedimiento de laboratorio

- Si la muestra es de origen vegetal observar los síntomas según el procedimiento LPV-PTE-1012 “Evaluación y registro de síntomas”. Si la muestra es de semillas germinadas no es necesario analizar la presencia de síntomas.
- Si la muestra tiene rastros de tierra o suciedad lavarla con agua del chorro y secarla con papel.
- Separar las partes de la planta a utilizar según el tipo de matriz de origen: si la muestra es de un cultivo fúngico, el supervisor de Fitopatología e Histología entregará 0.1g a 0.3g de la muestra de micelio en tubo Eppendorf de 1.5ml al supervisor de Biología Molecular. Si el patógeno de interés es bacteria u hongo, tomar 0.1g de la parte de la planta que presenta síntomas y colocarlo en un tubo de 1.5ml. Si el patógeno es un virus, tomar 0.1g de hojas jóvenes que presenten síntomas pero que no se encuentren muy dañadas. Si se realiza extracción de ADN a partir de semillas germinadas, coleccionar las plántulas sin la semilla de la caja Petri y adicionarlas a un tubo Eppendorf de 1.5ml.

Nota: en el caso de plantas, de 3 a 5 hojas seleccionadas se colocan entre el tubo abierto y la tapadera, luego se cierra para dejar discos de las hojas dentro del tubo.

- Comenzar la extracción con el tubo Eppendorf con el tejido, independientemente de su origen.
- Desinfectar el área de trabajo pasando una toalla de papel absorbente con cloro al 10% y luego una con etanol 70%.
- Precalentar el buffer de extracción CTAB a 65°C.
- Incubar el tejido colectado durante la toma de muestra a -20°C mínimo 20 minutos.
- Agregar al tejido 600 ul del buffer de extracción CTAB precalentado a 65°C.
- Macerar con el macerador mecánico durante 30 - 60 segundos.

Nota: utilizar maceradores estériles y colocarlos en un recipiente con cloro (10%) y etanol (70%) por 10 minutos en cada solución, luego lavarlos con agua para su

posterior esterilización.

- Incubar a 65°C durante 15-30 min. Si se extrae ADN de tejido duro como aserrín o corteza incubar de 1.5 - 3 horas.
- Durante la incubación, dejar en el congelador a -20°C una gradilla que va a ser utilizada a continuación.
- Dejar enfriar las muestras por 5 min en la gradilla fría y esperar a que las muestras alcancen temperatura ambiente.
- Agregar 500 ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortexear la mezcla por 10 segundos, o hasta que se observe una solución lechosa homogénea.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Si no se observa una buena separación de las fases, centrifugar por más tiempo.

Nota: si se extrae ADN de aserrín o corteza repetir el paso 5.3.9, 5.3.11 - 5.3.15, sin macerar nuevamente la muestra, solo vortexear luego de agregar el buffer de extracción CTAB.

- Transferir el sobrenadante (aprox. 500 ul), sin tocar la interfase, al tubo nuevo rotulado con el código de la muestra.

Nota: si se toca la interfase, regresar lo colectado al tubo y centrifugar nuevamente.

- Agregar al sobrenadante 1 volumen de Isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de amonio 7.5M.
- Mezclar por inversión e incubar a -20°C mínimo 20 minutos.

Nota: en este paso se pueden dejar las muestras por varios días.

- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
- Descartar el sobrenadante por inversión del tubo.
- Lavar el pellet con 150 ul de etanol 70% frío y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
- Descartar el sobrenadante y secar el precipitado al aire por 45 min o en el horno a 30°C por 10 – 20 min.
- Resuspender el pellet en 50ul de buffer TE precalentado a 65°C. El volumen de resuspensión depende del tamaño del pellet. Si tiene duda del volumen de resuspensión, comuníquese con su jefe inmediato superior.
- Almacenar el ADN resuspendido a 4°C en caso se use al día siguiente o en el

transcurso de la semana, o a -20°C si el tiempo excede la semana.

- Cuantificar el ADN extraído según LPV-PTE-1059 "Cuantificación de ADN y ARN" y realizar un gel de integridad según LPV-PTE-1066 "Electroforesis en gel de agarosa".

Referencias

LPV-PTE-1012 "Evaluación y registro de síntomas"

LPV-ITE-1050 "Preparación de solución stock de Tris-HCl 1.0M" LPV-ITE-1051

"Preparación de solución stock de EDTA 0.5M"

LPV-ITE-1052 "Preparación de buffer de extracción CTAB ADN/ARN" LPV-ITE-1053

"Preparación de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)" LPV-ITE-1054 "Preparación de alícuotas de Acetato de amonio"

LPV-ITE-1055 "Preparación de solución de etanol 70% para extracción" LPV-ITE-1056

"Preparación de buffer TE"

LPV-PTE-1059 "Cuantificación de ADN y ARN" LPV-PTE-1066 "Electroforesis en gel de agarosa"

13.4 Apéndice D: procedimiento operativo estándar 03. Validación molecular de cepas de *Trichoderma* mediante PCR convencional

POE: validación molecular de cepas de *Trichoderma* mediante PCR convencional

Objetivo: establecer un procedimiento estandarizado para la realización de una PCR convencional, destinado a validar molecularmente las cepas de *Trichoderma* cultivadas en sustrato de arroz.

Definiciones

- PCR: técnica de laboratorio para amplificar rápidamente millones de copias de un segmento específico de ADN, que luego puede estudiarse con mayor detalle. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, llamados cebadores para seleccionar un segmento del genoma que se va a amplificar y luego múltiples rondas de síntesis de ADN para amplificar ese segmento (Polymerase Chain Reaction (PCR), s. f.).

- Amplicon: fragmento de ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cualquier otro proceso que dé lugar a la producción de diferentes copias de ese fragmento (Benítez et al., s. f.).
- Primers: segmentos cortos de ADN monocatenario que están diseñados para ser complementarios al principio y al final de la secuencia objetivo que se amplificará. En una PCR, son los cebadores los que dictan exactamente qué secuencia de ADN se copia (Bryan, 2022).
- Taq polimerasa: es una ADN polimerasa termoestable que cataliza la incorporación cebador-dependiente de nucleótidos en ADN doble hebra en la dirección 5'→3' en presencia de Mg²⁺ (TAQ Polymerase | TAQ | Endpoint PCR, s. f.).
- Gel electroforesis: técnica utilizada para separar fragmentos de ADN según su tamaño, los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo (Khan Academy, s. f.).

Materiales y equipo

- ADN extraído utilizando el protocolo CTAB.
- Primers Forward y Reverse a una concentración inicial de 100 µM, diluidos 1:10 para alcanzar 10 µM.
- GoTaq™ Hot Start Colorless Master Mix 2x: 10 µL por reacción.
- Buffer TE 1X y Buffer de corrida TE 1X.
- Termociclador PCR: termociclador PCR Mastercycler Eppendorf Nexus Gradient.
- Agarosa 1.5% para gel de electroforesis.
- Sybr Safe ©
- Thermo Scientific™ Escalera de ADN de 100 bp GeneRuler

Consideraciones

- Utilizar equipo de protección personal: bata y guantes para evitar contaminantes que comprometan la calidad del proceso. El equipo de protección personal no debe estar roto ni sucio.
- Los materiales a utilizar para las diluciones deben ser esterilizados.
- Al final de cada prueba todo el equipo que haya tenido contacto con el *Trichoderma harzarium* debe ser dejado en remojo con jabón y cloro al menos durante 30 min. Este equipo debe ser llevado al autoclave posteriormente o descartado si el material

es descartable.

Procedimiento de laboratorio

a. Mezclas de PCR

- 10 μL de GoTaq™ Hot Start Colorless Master Mix 2x.
- 2 μL de primer forward (diluido a 10 μM).
- 2 μL de primer reverse (diluido a 10 μM).
- 3 μL de ADN (100 ng/ μL).
- 3 μL de agua libre de nucleasas.

b. Ciclo de amplificación

- Iniciación: 95°C durante 2 minutos.
- Desnaturalización: 95°C por 10 segundos.
- Anillamiento: 55°C por 50 segundos.
- Extensión: 72°C por 2 minutos.
- Elongación final: 72°C por 10 minutos.
- Hold: 4°C.

Ciclos de amplificación (45 ciclos)

c. Electroforesis

Preparar un gel de agarosa 1.5%, cargar las muestras PCR y realizar la electroforesis en Buffer de corrida TE 1X durante 25 – 30 minutos a 100 voltios.

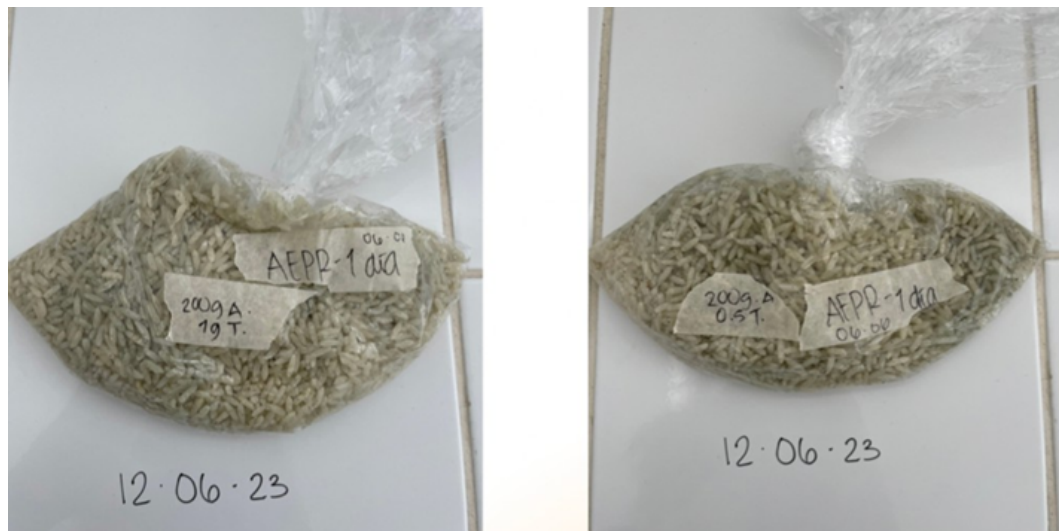
13.5 Apéndice E: figuras

Figura 28. Comparación del crecimiento de *Trichoderma* en condiciones de Luz



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 29. Comparación de *Trichoderma* según la condición del sustrato



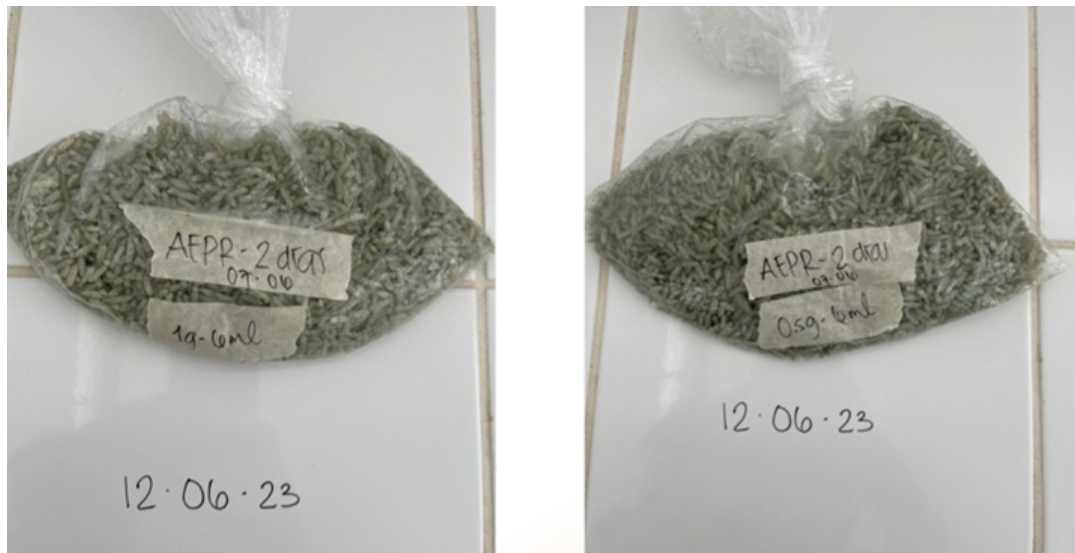
Nota. Figura de autoría propia.

Figura 30. Comparación de crecimiento de *Trichoderma* 6 días después de inoculación bajo 1 día de remojo del sustrato



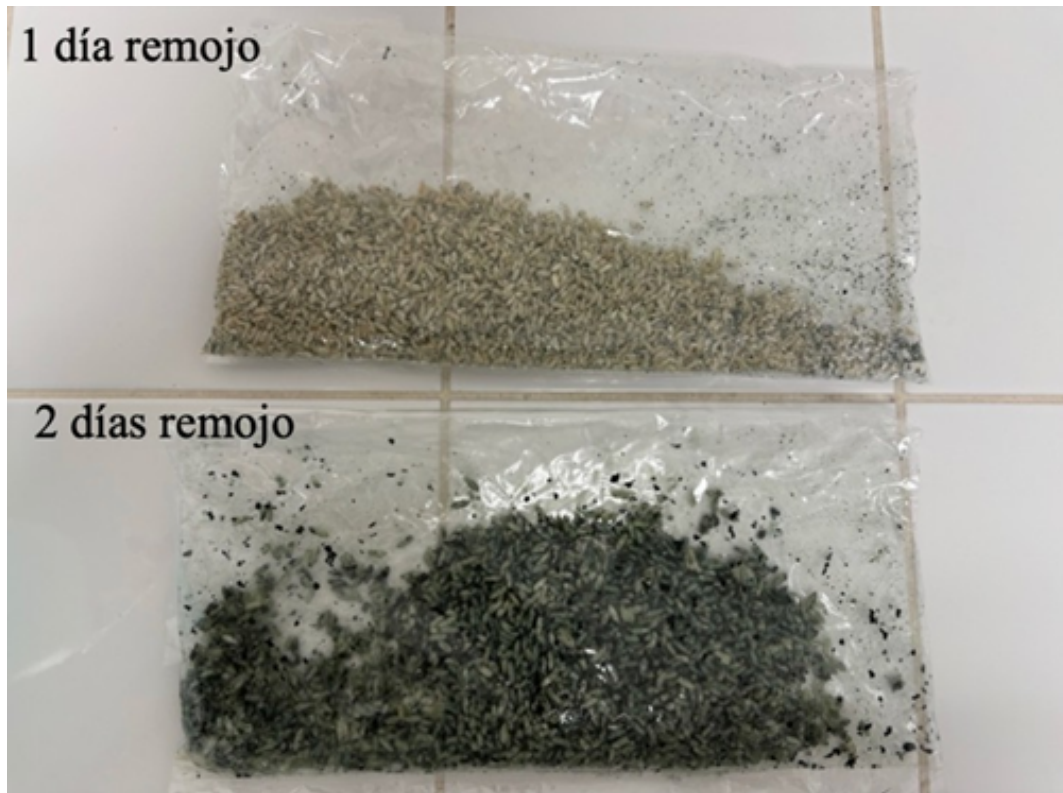
Nota. Figura de autoría propia.

Figura 31. Comparación de crecimiento de *Trichoderma* 6 días después de inoculación bajo 2 días de remojo del sustrato



Nota. Figura de autoría propia.

Figura 32. Comparación de crecimiento de *Trichoderma* 2 semanas después de inoculación según condiciones de remojo del sustrato



Nota. Figura de autoría propia.