

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ
EXTENSIÓN EN EL CARMEN
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Creada Ley No 10 – Registro Oficial 313 de noviembre 13 de 1985

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA AGROPECUARIA

INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO EN LA CALIDAD
GERMINATIVA Y CONCENTRACION DE CEPAS DE *TRICHODERMA*
SPP.

AUTOR: Bravo Vera Dayana Cristina

TUTOR: Ing. Vivas Cedeño Jorge Sifrido, M.C.

El Carmen - Manabí - Ecuador

Agosto 2026

	NOMBRE DEL DOCUMENTO: CERTIFICADO DE TUTOR(A),	CÓDIGO: PAT-01-F-004
	PROCEDIMIENTO: TITULACIÓN DE ESTUDIANTES DE GRADO,	REVISIÓN: 1 Página 2 de 39

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, bajo la autoría de la estudiante Bravo Vera Dayana Cristina, legalmente matriculada en la carrera de Ingeniería Agropecuaria, período académico 2026(1), cuyo tema del proyecto es **“Influencia del almacenamiento en la calidad germinativa y concentración de cepas de *Trichoderma spp.*”**

La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

El Carmen, 15 de agosto de 2026

Lo certifico,



Ing. Vivas Cedeño Jorge Sifrido, M.C.

Docente Tutor

Área: Agricultura, Silvicultura, Pesca y Veterinaria

UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ

EXTENSIÓN EL CARMEN

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TÍTULO:

“Influencia del almacenamiento en la calidad germinativa y concentración de cepas de

Trichoderma spp.”

AUTOR: Bravo Vera Dayana Cristina

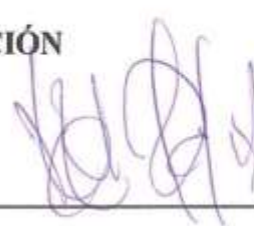
TUTOR: Ing. Vivas Cedeño Jorge Sifrido, M.C.

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA AGROPECUARIA

TRIBUNAL DE TITULACIÓN

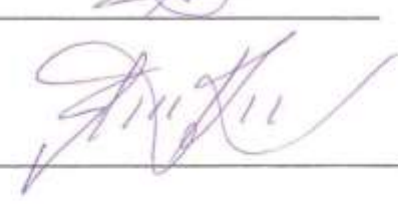
MIEMBRO Mg. Mejía Chanaluísa Kleber Fernando.



MIEMBRO Mg. Cobeña Loo Nexar Vismar.



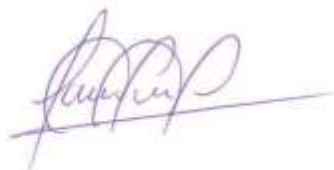
MIEMBRO PhD. López Mejía Francel Xavier.



DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **Dayana Cristina Bravo Vera** con cédula de ciudadanía **135159281-9**, estudiante de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Extensión el Carmen, de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, declaro que soy autora de la tesis titulada “**Influencia del almacenamiento en la calidad germinativa y concentración de cepas de *Trichoderma spp***”, esta obra es original y no infringe derechos de propiedad intelectual. Asumo la responsabilidad total en su contenido y afirmo que todos los conceptos, ideas, textos y resultados que no son de mi autoría están debidamente citados y referenciados.

Atentamente,



Dayana Cristina Bravo Vera

DEDICATORIA

A Dios: Te doy gracias, querido Padre celestial, por haber estado a mi lado en cada instante de incertidumbre y dificultad, por no abandonarme y por darme la fortaleza necesaria para llegar a este día tan significativo.

A mi mamá, cuya dedicación y amor han sido mi guía a lo largo de mi vida. La confianza que ha depositado en mí, así como sus constantes sacrificios, han constituido el cimiento de mis logros.

A mis docentes, en especial a la Ing. Elizabeth Tacuri, al Ing. Jorge Vivas, al Ing. Paúl González, al Dr. Napoleón Vera y al Dr. Fernando Mejía, quienes no solo me instruyeron en los fundamentos de la ciencia, sino también en la forma de investigar y aplicar el conocimiento. Su experiencia y paciencia han sido invaluableles.

Esta tesis está dedicada a la comunidad agrícola, con la intención de que los resultados y las conclusiones aquí expuestos contribuyan a mejorar sus métodos y su calidad de vida. Finalmente, agradezco a la vida por las enseñanzas adquiridas y por la oportunidad de crecer y aprender mediante este reto. Este trabajo refleja mi trayectoria y mi compromiso con la ciencia y la comunidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, doy gracias a Dios por brindarme salud, fortaleza y sabiduría para concluir esta etapa tan importante de mi vida.

A mi madre, por su fe inquebrantable, su apoyo y por ser un pilar fundamental en mi formación.

Agradezco su confianza en mí, incluso en mis momentos de inseguridad.

A los docentes Ing. Paúl González e Ing. Jorge Vivas, por su comprensión, orientación y valiosos conocimientos, fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A los docentes de la ULEAM, Extensión El Carmen, y al personal de la Granja Experimental Río Suma, por compartir sus conocimientos y enriquecer mi formación profesional.

Expreso a todos ellos mi más profundo agradecimiento.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA.....	3
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Objetivos	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
Hipótesis	12
CAPÍTULO I	13
MARCO TEÓRICO	13
1.1. Origen de Trichoderma	13
1.3. Descripción	14
1.4. Generalidades.....	14
1.5. Almacenamiento de bioinsumos	15
1.6. Tiempos recomendados para el almacenamiento de Trichoderma	15
1.7. Unidades formadoras de colonias	15
1.7.1. Método de conteo	15
1.7.2 Cámara de Neubauer.....	16
1.7.3 Diluciones	16
CAPÍTULO II.....	18
2.1 Antecedentes	18
CAPÍTULO III	20
3.1. Ubicación del ensayo	20
3.2. Métodos	20
3.2.1. Materiales y equipos	20
3.2.1.1. Equipos.....	20
3.2.1.2. Materiales	20
3.3. Limpieza previa	21
3.4. Preparación del sustrato	21
3.5. Inoculación de <i>Trichoderma spp.</i>	21
3.6. Crecimiento de inóculos de <i>Trichoderma spp.</i>	22
3.7. Almacenamiento	22
3.8. Recuento de UFC.....	23
3.9. Cálculo de UFC	23
3.10. Tratamientos	25
3.11. Unidad experimental.....	25

3.11.1. Diseño estadístico.....	25
3.12. Características de la unidad experimental.....	25
CAPÍTULO IV	26
4.1. Resultados.....	26
4.1.1. Concentración de <i>Trichoderma spp.</i> según el tiempo de almacenamiento.....	26
CONCLUSIONES.....	29
RECOMENDACIONES	30
1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS.....	34

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo analizar cómo el tiempo de almacenamiento afecta la calidad germinativa y la concentración de *Trichoderma sp.* producida en un medio líquido compuesto por 5 % de humus de lombriz y 5 % de melaza. La investigación se realizó en la Granja Experimental Río Suma de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen, mediante un diseño de bloques completos al azar (DBCA). Se establecieron seis tratamientos correspondientes a períodos de almacenamiento de 1 a 6 meses, con cuatro repeticiones cada uno. La concentración de microorganismos se evaluó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), mientras que la capacidad de colonización se analizó en cajas Petri. Los datos se procesaron mediante análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5 % de significancia. Los resultados mostraron una disminución gradual de la concentración de *Trichoderma spp.*, desde 1×10^8 UFC/mL al inicio hasta $3,7 \times 10^7$ UFC/mL al quinto mes. La capacidad de colonización presentó diferencias entre los períodos evaluados. Se concluyó que el tiempo de almacenamiento influye significativamente en la concentración y viabilidad del bioinsumo. El uso de humus de lombriz y melaza constituye una alternativa económica para la producción de *Trichoderma spp.* y favorece el desarrollo de bioinsumos destinados al control biológico y a una agricultura sostenible.

Palabras clave: *Trichoderma spp.*, almacenamiento, bioinsumos, viabilidad germinativa.

ABSTRACT

This study aimed to analyze how storage time affects the germination quality and concentration of *Trichoderma spp.* produced in a liquid medium composed of 5 % vermicompost and 5 % molasses. The research was conducted at the Río Suma Experimental Farm of Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, El Carmen Extension, using a randomized complete block design (RCBD). Six treatments corresponding to storage periods from 1 to 6 months were established, with four replicates each. Microorganism concentration was evaluated by counting colony-forming units (CFU/mL), while colonization capacity was assessed in Petri dishes. Data were analyzed through analysis of variance and Tukey's test at a 5 % significance level. The results showed a gradual decrease in *Trichoderma spp.* concentration, from 1×10^8 CFU/mL initially to 3.7×10^7 CFU/mL in the fifth month. Colonization capacity differed among the evaluated storage periods. It was concluded that storage time significantly influences the concentration and viability of the bio-input. The use of vermicompost and molasses represents an economical alternative for producing *Trichoderma spp.* and supports the development of bio-inputs for biological control and sustainable agriculture.

Keywords: *Trichoderma spp.*, storage, bio-inputs, germination viability

INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de agroquímicos en la agricultura actual ha generado degradación de los suelos, contaminación ambiental y resistencia en organismos patógenos, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles, como los bioinsumos microbianos (Fróna, 2023). Dentro de estas opciones, el género *Trichoderma* destaca por su capacidad para ejercer control biológico mediante la competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos antibióticos y el parasitismo directo sobre hongos fitopatógenos, como *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora* (Baker et al., 1985). Además, favorece el crecimiento vegetal y mejora la fertilidad del suelo, por lo que es reconocido como uno de los agentes más utilizados en la agricultura sostenible (Howell et al., 2002).

Su producción masiva puede realizarse en sustratos accesibles, como humus de lombriz y melaza, lo que reduce costos y facilita su aplicación en zonas rurales (Michel-Aceves et al., 2008). Sin embargo, su eficacia en campo depende de que mantenga su viabilidad y concentración durante el almacenamiento, aspectos que suelen verse afectados por el tiempo y las condiciones de conservación (Hernández-Melchor et al., 2019). Aunque en laboratorio muestra un alto potencial, la disminución progresiva de las unidades formadoras de colonias (UFC) y de la capacidad de colonización limita su uso práctico si no se establecen referencias claras sobre su vida útil.

Por ello, esta investigación tuvo como objetivo evaluar la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad germinativa y concentración de cepas de *Trichoderma sp.* producidas en sustrato líquido económico. El estudio se realizó en la Granja Experimental Río Suma de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen, mediante un diseño experimental que contempló periodos de almacenamiento de 1 a 6 meses, determinando cambios en UFC/mL y porcentaje de colonización. Los resultados aportan información relevante para definir tiempos óptimos de uso y validar estrategias de producción accesibles para la comunidad agrícola local.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la influencia del almacenamiento en la calidad germinativa y concentración de cepas de *Trichoderma sp.*

Objetivos específicos

- Determinar la influencia del almacenamiento en la viabilidad de bioinsumos a base de *Trichoderma sp.*
- Diagnosticar la concentración de *Trichoderma sp.* (UFC/mL) según el tiempo de almacenamiento.

Hipótesis

Hipótesis alternativa Ha: El tiempo de almacenamiento de bioinsumos influye significativamente sobre la viabilidad y concentración (UFC mL⁻¹) de *Trichoderma sp.*

Hipótesis nula (Ho): El tiempo de almacenamiento de bioinsumos no influye significativamente sobre la viabilidad germinativa y concentración (UFC mL⁻¹) de *Trichoderma sp.*

Variables

Variable independiente:

Tiempo de almacenamiento del bioinsumo de *Trichoderma spp.*

Variables dependientes:

- Concentración de *Trichoderma spp.* (UFC/mL),
- Porcentaje viabilidad de *Trichoderma spp.*,

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Origen de Trichoderma

Trichoderma spp corresponde a un género de hongos que incluye varias especies. Se encuentra distribuido en todo el mundo y habita de manera natural en el suelo, principalmente en terrenos con restos orgánicos o residuos vegetales en descomposición (Lumsden, 1990).

Durante más de siete décadas se ha investigado el uso de especies de *Trichoderma* como agentes de control de hongos fitopatógenos. Sin embargo, su comercialización como agente de control biológico se intensificó a comienzos del siglo XXI, debido al cambio hacia sistemas agrícolas que demandan alimentos con menos residuos de fungicidas. Desde entonces, *Trichoderma* se ha convertido en uno de los antagonistas de hongos fitopatógenos más utilizados en la agricultura sostenible moderna (Pineda, 2017).

1.2. Taxonomía de Trichoderma

Trichoderma es un hongo filamentoso presente en el suelo, las plantas, la materia vegetal en descomposición y la madera. Puede desarrollarse en diversas condiciones ambientales y colonizar con rapidez la rizosfera de las plantas.

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

Fuente: Index Fungorum (2025).

1.3. Descripción

Las cepas de *Trichoderma* son comunes en ambientes terrestres, como bosques y suelos agrícolas. Presentan bajos requerimientos nutricionales, aunque su crecimiento se favorece en un rango de temperatura de 25 a 30 °C (Sandle, 2014). Además, poseen una gran capacidad de adaptación y pueden crecer de forma saprofítica, estableciendo relaciones con plantas y otros organismos (Zeilinger, 2016). Estas características facilitan su producción a gran escala para usos agrícolas (Ramos, 2008). Por ello, es importante estudiar la diversidad de especies de *Trichoderma* en diferentes ambientes naturales y ampliar el conocimiento de su valor biotecnológico, ecológico y agrícola (Sandle, 2014).

Varias especies de este género están presentes en la rizosfera o pueden vivir dentro de los tejidos vegetales, lo que les permite favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la producción de hormonas, como auxinas y giberelinas. Además, pueden generar ácidos orgánicos, como el glucónico, fumárico y cítrico, que contribuyen a modificar el pH del suelo y facilitan la disponibilidad de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso, elementos indispensables para el metabolismo vegetal. (Torres, 2015)

1.4. Generalidades

Trichoderma spp es un grupo de hongos filamentosos que se alimenta de materia orgánica en descomposición, se reproduce de manera asexual y se encuentra ampliamente distribuido en el suelo. Su pared celular está compuesta principalmente por quitina y tiene la capacidad de crecer con rapidez en diversos sustratos, tanto sólidos como líquidos, gracias a su adaptación a distintas temperaturas, niveles de pH y condiciones de humedad (Weaver, 2005).

Trichoderma es un tipo de hongo conocido por su capacidad de crecer rápidamente en distintos tipos de materia orgánica, y su capacidad de producir esporas puede aumentar en función de varias condiciones ambientales. Para estimular la esporulación del hongo, es necesario someterlo a períodos de exposición a la luz, con tan solo 3 minutos al día siendo suficientes para generar el estrés necesario que induzca la formación de sus conidios (Chávez, 2008).

1.5. Almacenamiento de bioinsumos

Según la FAO (2024), los bioinsumos son productos procedentes de fuentes biológicas que se aplican en la agricultura para potenciar el desarrollo de las plantas, aumentar la fertilidad del suelo o gestionar plagas y enfermedades. Pueden estar constituidos por microorganismos, como bacterias, hongos y virus, así como por extractos vegetales, compuestos bioactivos o metabolitos naturales. Funcionan como alternativas o complementos de las sustancias químicas sintéticas, promueven una producción más sostenible y reducen el impacto ambiental.

1.6. Tiempos recomendados para el almacenamiento de Trichoderma

Hoyos-Carvajal y colaboradores (2012), identificaron que el período óptimo de conservación de Trichoderma está fundamentalmente influenciado por el tipo de formulación (polvo, gránulos o líquido) y por las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad y luz). En términos generales, las formulaciones comerciales en polvo que se guardan en un sitio fresco y seco (a temperaturas entre 4 y 18 °C) preservan una viabilidad adecuada durante un intervalo de 10 a 14 meses, mientras que cuando se almacenan a temperaturas alrededor de 25–28 °C, la viabilidad se reduce más rápidamente y el tiempo de conservación suele acortarse a 6–12 meses.

1.7. Unidades formadoras de colonias

Las unidades formadoras de colonias (UFC) son una medida utilizada para estimar el número de células bacterianas o fúngicas viables en una muestra.

1.7.1. Método de conteo

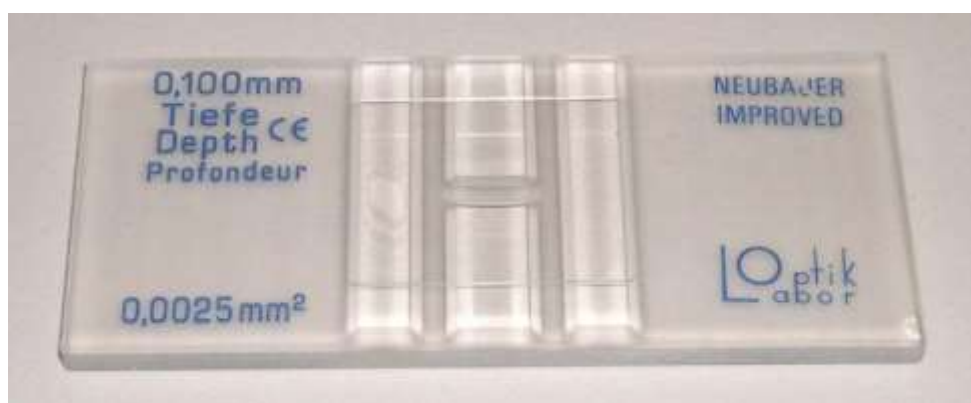
El recuento de UFC es uno de los métodos más comunes para medir microorganismos viables en alimentos, agua, suelos, medicamentos y bioinsumos agrícolas, ya que permite estimar la cantidad de microorganismos vivos en una muestra. Por lo general, los resultados se expresan como UFC por gramo en muestras sólidas o UFC por mililitro en muestras líquidas (Cappuccino-Welsh, 2017).

El procedimiento implica preparar diluciones seriadas de la muestra, sembrar un volumen conocido en un medio de cultivo adecuado, incubar las placas en condiciones controladas y, finalmente, cuantificar las colonias desarrolladas. Para asegurar resultados estadísticamente válidos, se recomienda seleccionar placas con entre 30 y 300 colonias. Un conteo menor incrementa el error de muestreo, mientras que un número mayor dificulta el conteo exacto (U.S. Food and Drug Administration, 2022).

1.7.2 Cámara de Neubauer

El hemocitómetro o cámara de Neubauer es un instrumento de precisión fabricado en vidrio que se utiliza para contar manualmente células y microorganismos en un volumen específico de una suspensión. Aunque fue desarrollado inicialmente para el conteo de células sanguíneas, su uso se ha extendido a la microbiología, la biotecnología, la micología y los cultivos celulares, donde permite estimar bacterias, levaduras, esporas y conidios de hongos como *Trichoderma spp.* (Madigan et al., 2021).

El dispositivo está compuesto por un cristal con una cuadrícula grabada de dimensiones conocidas y mantiene una separación constante de 0,1 mm entre la superficie de medición y el cubreobjetos especializado. Estas características permiten conocer con precisión el volumen examinado y determinar la densidad de células o microorganismos presentes en la muestra (Cappuccino-Welsh, 2017)



En microbiología agrícola, la cámara de Neubauer se utiliza para estandarizar la densidad de inóculos de microorganismos beneficiosos, como *Trichoderma*, *Beauveria* y *Metarhizium*. Esto permite preparar suspensiones con concentraciones apropiadas tanto para experimentos de laboratorio como para aplicaciones en campo (Atlas, 2010).

1.7.1 Diluciones

Las diluciones son procedimientos de laboratorio mediante los cuales se reduce la concentración de una muestra al mezclar un volumen específico con una cantidad definida de un diluyente estéril, como agua peptonada, solución salina o agua destilada. En

microbiología, permiten obtener concentraciones apropiadas de microorganismos para su medición, aislamiento e identificación, y evitan un crecimiento excesivo que dificulte el conteo de colonias o células (Madigan et al., 2021).

Las diluciones son fundamentales en microbiología, ya que muchas muestras contienen concentraciones muy elevadas de microorganismos. Si una muestra se sembrara directamente en un medio de cultivo, el crecimiento confluyente impediría distinguir las colonias. Por esta razón, se realizan diluciones decimales seriadas, en las que cada dilución reduce la concentración en un factor de diez respecto de la anterior (Cappuccino-Welsh, 2017).

Las diluciones seriadas se utilizan para medir bacterias, hongos, levaduras y esporas presentes en alimentos, agua, suelos, productos farmacéuticos y bioinsumos agrícolas. Esta técnica es esencial para obtener resultados precisos y reproducibles (International Organization for Standardization, 2017).

CAPÍTULO II

2.1 Antecedentes

Según, el fortalecimiento del modelo de desarrollo social que se basa en la producción y el consumo ha provocado que la agricultura impacte negativamente en el medio ambiente debido al uso excesivo de productos químicos como fertilizantes y pesticidas. Varios estudios alertan sobre un rápido aumento de la población en los próximos 30 años, lo que significa que las emisiones generadas por la agricultura aumentarán más del 50 % para que las personas puedan obtener suficientes alimentos de buena calidad. No obstante, esto genera una presión hacia un cambio climático severo, que representa un riesgo para la disponibilidad de alimentos FAO (2018). Por esta razón, es urgente desarrollar e implementar nuevas soluciones para la producción agrícola que causen menos daño al medio ambiente o, idealmente, que ayuden a mitigar los daños ya causados. mencionan que una opción viable es la utilización de microorganismos que puedan combatir enfermedades y promover el uso de fertilizantes orgánicos. Por ejemplo, el hongo filamentoso *Trichoderma spp.* que es un tipo de hongo saprófito que puede encontrarse en diferentes sustratos. Su relevancia radica en su papel en los ecosistemas, ya que actúa como descomponedor de materia orgánica y es esencial en el ciclo de nutrientes del suelo. (Fróna, 2023).

Sin embargo, durante muchos años los agricultores para incrementar la productividad de los cultivos y asegurar la subsistencia familiar, recurren a diversos insumos externos, como agroquímicos sintéticos, los mismos que al utilizarse de manera inadecuada o en exceso, dichos productos pueden dar lugar a la contaminación de los suelos Martín y Rivera, (2015).

El grupo *Trichoderma* tiene una gran capacidad para manejar patógenos de plantas (Kumar et al., 2023), por sus métodos tales como competencia, antibiosis, parasitismo y endofitismo (Saeed, 2022), estas características convierten a este hongo benéfico en una alternativa para combatir agentes fitopatógenos, rasgo que no tienen los fungicidas sintéticos (Acosta et al., 2013).

Una opción para aumentar la fertilidad de los suelos es la utilización de hongos del género *Trichoderma spp.* "Las especies de este género son hongos de vida independiente, que interactúan de manera significativa en las raíces del suelo y en el entorno foliar, mostrando una notable capacidad para desactivar los exudados que provienen de las semillas en proceso de germinación". En la actualidad, se está empleando ampliamente en diversos cultivos gracias a

su eficaz labor como controlador biológico; además, parece que también funciona como un promotor del crecimiento (Howell, 2002).

(Sánchez, 2021), menciona que la *Trichoderma* muestra una gran variedad genética y se puede hallar en diversos materiales, como tierras de cultivo y residuos de plantas, lo que demuestra su notable habilidad para adaptarse. Adicionalmente (Matas, 2023), indica que, por los progresos en la biotecnología molecular, se han identificado más de 100 especies dentro del mismo género, lo cual destaca su importancia y posibilidades en el sector agrícola.

CAPÍTULO III

3.1. Ubicación del ensayo

La investigación en su fase de campo se realizó en las instalaciones de la Granja Experimental Río Suma de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión El Carmen (Figura 1), ubicada geográficamente a X 674882; Y 9971241, Km 30 de la vía El Carmen - Santo Domingo, cantón el Carmen, provincia de Manabí, Ecuador.

Figura 1. Ubicación de la Granja Experimental Río Suma, ULEAM, Extensión El Carmen.



3.2. Métodos

3.2.1. Materiales y equipos

3.2.1.1. Equipos

- ✚ Autoclave
- ✚ Cámara de flujo laminar
- ✚ Microscopio
- ✚ Estufa

3.2.1.2. Materiales

- ✚ Cajas Petri
- ✚ Alcohol
- ✚ *Trichoderma spp.* (cepas en polvo)

- ✚ Jeringas
- ✚ Mechero
- ✚ Potato Dextrosa Agar (PDA)
- ✚ Cámara de Neubauer
- ✚ Pipeta

3.3. Limpieza previa

Todos los materiales fueron inspeccionados y, cuando fue necesario, lavados con agua y detergente neutro para eliminar residuos. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar completamente.

3.4. Preparación del sustrato

1. Se preparó un sustrato líquido utilizando humus de lombriz y melaza al 5 % (v/v).
2. El humus se mezcló con agua y se filtró para obtener un extracto homogéneo.
3. Se añadió la melaza como fuente de carbono y energía para favorecer el crecimiento microbiano.
4. La mezcla se homogenizó cuidadosamente y se mantuvo en condiciones higiénicas hasta su utilización en los ensayos experimentales.

3.5. Inoculación de *Trichoderma spp.*

1. La inoculación de *Trichoderma spp.* se realizó bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación del cultivo.
2. Se preparó el sustrato líquido estéril y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
3. Se transfirió una porción del inóculo de *Trichoderma spp.* al medio utilizando material previamente esterilizado y dentro de un ambiente de trabajo limpio.
4. La mezcla se homogenizó cuidadosamente para favorecer la distribución uniforme del hongo en el sustrato.
5. Finalmente, el cultivo inoculado se incubó en condiciones controladas

de temperatura y aireación, con agitación periódica cuando fue necesario, para promover el crecimiento del microorganismo y la producción de biomasa. Durante el proceso se realizaron observaciones periódicas para verificar la ausencia de contaminación y el adecuado desarrollo del cultivo.

3.6. Crecimiento de inóculos de *Trichoderma spp.*

Tras la inoculación, los cultivos se incubaron bajo condiciones controladas de temperatura, generalmente entre 25 y 28 °C, favoreciendo el desarrollo del hongo. Durante el período de incubación, el medio se agitó periódicamente para mejorar la oxigenación y mantener una distribución homogénea de los nutrientes y del micelio. Se realizaron observaciones diarias para evaluar el crecimiento, verificando cambios en la turbidez, formación de biomasa y ausencia de contaminación por otros microorganismos. Una vez alcanzado el crecimiento óptimo, evidenciado por una abundante biomasa y una coloración característica del cultivo, el inóculo se consideró apto para su empleo en los ensayos experimentales.

3.7. Almacenamiento

El almacenamiento de *Trichoderma spp.* se realizó una vez obtenido el crecimiento adecuado del cultivo, con el propósito de conservar su viabilidad y capacidad biológica hasta su utilización. El inóculo se transfirió a recipientes estériles y herméticos, previamente identificados con información como fecha de preparación y tratamiento correspondiente. Posteriormente, los recipientes se mantuvieron en temperatura entre 4 y 8 °C para reducir la actividad metabólica del hongo y prolongar su vida útil. Durante el periodo de almacenamiento se evitó la exposición directa a la luz solar, altas temperaturas y cambios bruscos de humedad, factores que pueden afectar la viabilidad del microorganismo. Asimismo, se realizaron inspecciones periódicas para verificar la ausencia de contaminación y conservar las características físicas del cultivo. Antes de su aplicación, se evaluó la apariencia del inóculo y, cuando fue necesario, su viabilidad, asegurando que mantuviera su eficacia para los ensayos o aplicaciones posteriores.

3.8. Recuento de UFC

Para realizar el procedimiento, se preparó una muestra de 1mL de *Trichoderma* en 9mL de H₂O con una concentración eficiente para el conteo en este caso fue de 1×10^8 , se tomó una pequeña parte de la muestra con una pipeta y se la colocó en la cámara de Neubauer ya con el cubreobjetos colocado, se ubicó la punta de la pipeta en el extremo de la cámara, una vez colocada la muestra se esperó que el líquido penetre entre la cámara, pasado el tiempo se llevó al microscopio, se fijó la cámara con la pinza de sujeción después se enfocó el microscopio hasta que se pudo visualizar las células de la *Trichoderma*, pero como fue difícil el conteo realizamos diluciones.

La primera dilución constó de 1mL de la muestra en 9mL de H₂O, se volvió a repetir el procedimiento, se extrajo una porción reducida de la muestra utilizando la pipeta y se colocó en la cámara de Neubauer con el cubreobjetos ya colocado, la punta de la pipeta se situó en el borde de la cámara; una vez depositada la muestra, se aguardó a que el líquido se distribuyera entre las paredes de la cámara. Tras un periodo de espera, se llevó al microscopio, se aseguró la cámara con la pinza de sujeción y luego se ajustó el enfoque del microscopio hasta que se pudieron observar las células de *Trichoderma*. Sin embargo, dado que el conteo fue complicado, decidimos realizar una segunda dilución.

Ya en la segunda dilución disponemos de 1mL de la anterior dilución en 9mL se rehace el método se tomó una pequeña cantidad de la muestra con la pipeta y se colocó en la cámara de Neubauer, donde ya se había colocado el cubreobjetos. La punta de la pipeta se posicionó en el borde de la cámara; una vez que se dejó caer la muestra, se esperó a que el líquido se distribuyera por las paredes de la cámara. Después de un breve intervalo, se llevó al microscopio, se fijó la cámara con la pinza y luego se ajustó el enfoque del microscopio hasta que las células de *Trichoderma* se hicieron visibles, aplicando la norma de contar únicamente las que están dentro o sobre dos límites seguidos (tipo L) para prevenir repeticiones.

3.9. Cálculo de UFC

Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) representan la medida estándar en microbiología utilizada para contar los microorganismos vivos que tienen la

capacidad de multiplicarse y generar una colonia visible en condiciones de cultivo controladas. A diferencia del conteo microscópico directo (como el que se efectúa con la cámara de Neubauer), el recuento de UFC se limita a contabilizar solamente las células que están vivas y son reproductivas, lo que lo establece como el método de referencia para analizar la calidad sanitaria de alimentos, agua, fármacos, muestras clínicas y ambientes.

El principio matemático y conceptual detrás del conteo mediante diluciones en serie y el cálculo de UFC se estableció a finales del siglo XIX y principios del XX gracias a Robert Koch, quien es conocido como el pionero de la microbiología moderna, junto a sus colegas, quienes crearon métodos para cultivar microorganismos en medios sólidos. Sin embargo, la fórmula que se utiliza hoy fue estandarizada y aceptada a mediados del siglo XX por organizaciones internacionales como la Organización Internacional de Normalización (ISO), AOAC Internacional y la FAO/OMS, basándose en principios estadísticos de Ronald Aylmer Fisher y otros especialistas en biometría aplicada a la microbiología.

La idea principal que llevó al desarrollo de la fórmula es que una colonia que se puede ver proviene de una sola célula viva o de un grupo de células que no se pueden separar y que funcionan juntas cuando se siembran. Por eso se utiliza el término "unidades formadoras de colonias" en lugar de "número de células". Según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} * 10\,000}{\text{Número de cuadros} * \text{Dilución}}$$

3.10. Tratamientos

Tabla 1. Descripción de los tratamientos establecidos en la investigación.

Tratamientos	Descripción	Tiempo de almacenamiento (meses)
T1	Humus de lombriz al 5% + melaza al 5%	1mes
T2	Humus de lombriz al 5% + Melaza al 5%	2 meses
T3	Humus de lombriz al 5%+ Melaza al 5%	3 meses
T4	Humus de lombriz 5% + Melaza al 5% :	4 meses
T5	Humus de lombriz al 5% + Melaza al 5%:	5 meses
T6	Humus de lombriz al 5% + Melaza al 5%:	6 meses

3.11. Unidad experimental

3.11.1. Diseño estadístico

En el presente estudio se implementó un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con seis tratamientos y cuatro repeticiones. Para analizar los datos obtenidos se utilizó la prueba de Tukey al 5 % de significancia, mediante el software estadístico InfoStat, versión 2022.

Tabla 2. Representación de las fuentes de variación y los grados de libertad.

Fuentes de variación	gL
Total	23
Tratamientos	5
Repeticiones	3
Error	15

3.12. Características de la unidad experimental

Tabla 3. Descripción de las características de las unidades experimentales.

Características	Cantidad
-----------------	----------

Número de unidades experimentales	24
Volumen de unidades experimentales	2000 mL

CAPÍTULO IV

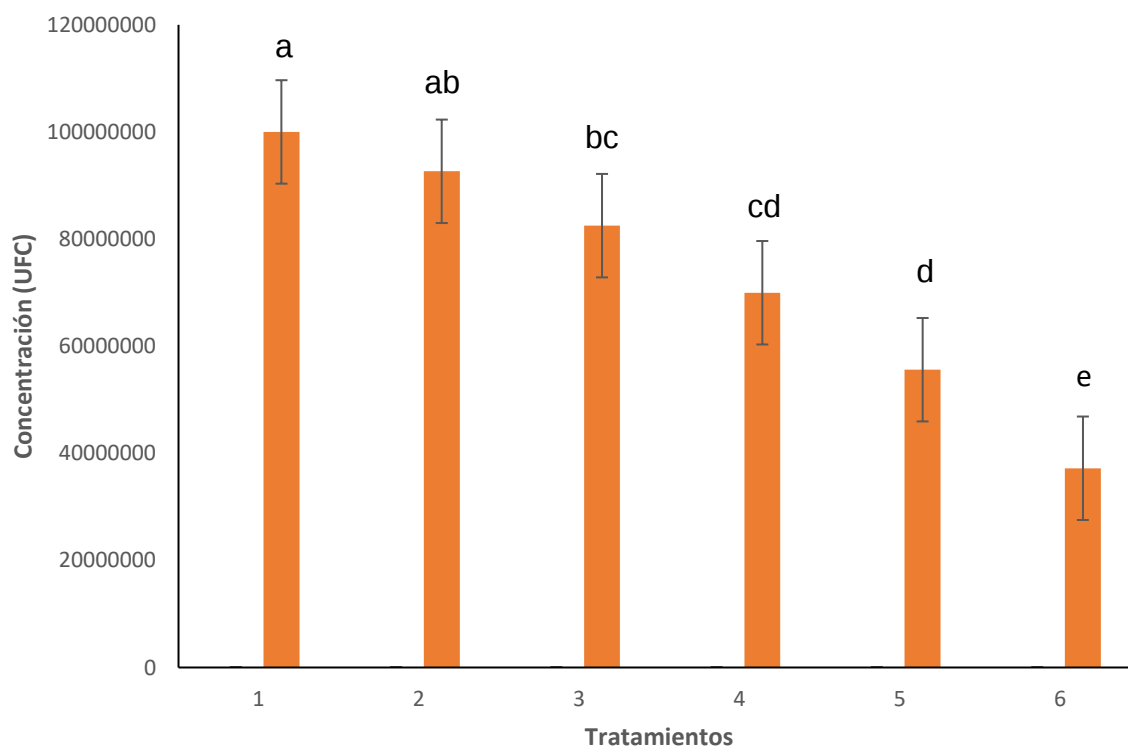
4.1. Resultados

4.1.1. Concentración de *Trichoderma spp.* según el tiempo de almacenamiento

La Figura 2 muestra diferencias estadísticamente significativas en la concentración de UFC entre los tratamientos. Los tratamientos 1 y 2 presentaron los mayores promedios, con aproximadamente 1×10^8 y $9,27 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente. El tratamiento 6 presentó el valor más bajo, con $3,72 \times 10^7$ UFC/mL.

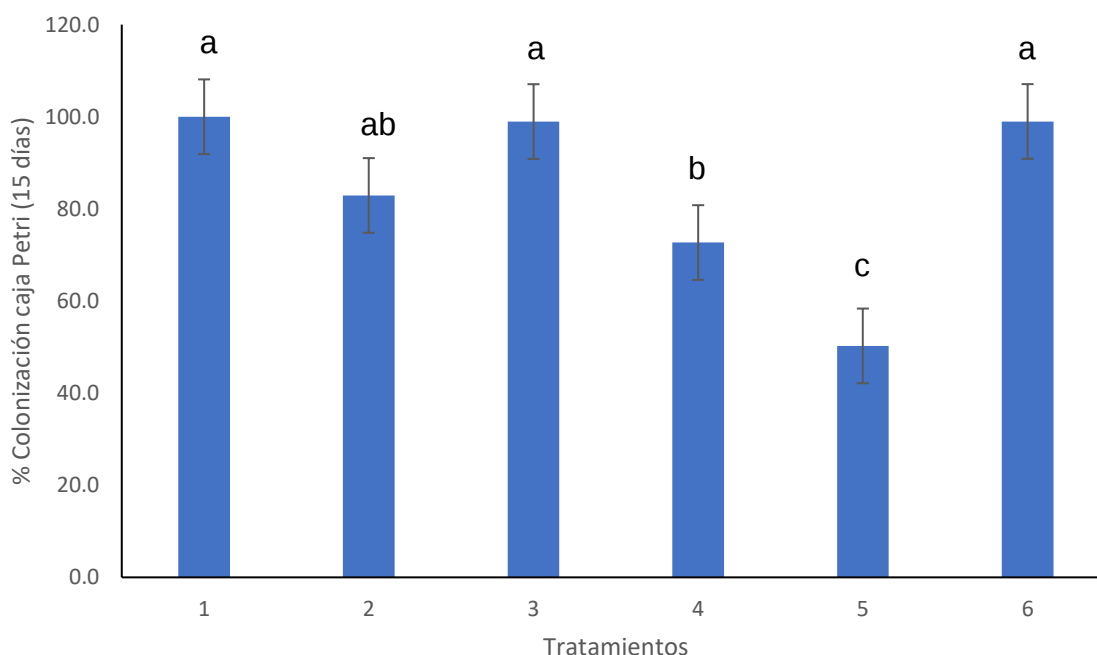
El tratamiento 3 alcanzó una concentración de $8,25 \times 10^7$ UFC/mL. El tratamiento 4 disminuyó a aproximadamente $7,00 \times 10^7$ UFC/mL, mientras que el tratamiento 5 registró cerca de $5,56 \times 10^7$ UFC/mL. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos y muestran una tendencia general de reducción de la concentración conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

Figura 2. Concentración de UFC por tratamiento según el almacenamiento de *Trichoderma spp.* cultivado en medio líquido.



El análisis realizado por Albrecht y colaboradores en 2023 muestra que se pueden obtener cepas nativas de *Trichoderma spp.* con elevadas concentraciones: hasta $6,1 \times 10^6$ conidios/mL en medio PDA y $1,1 \times 10^7$ UFC/mL en sustrato de marlo, lo que comprueba que este hongo puede crecer adecuadamente utilizando métodos simples y materiales accesibles. Esto coincide con los hallazgos de la presente investigación, donde se establece que el género tiene una gran capacidad para desarrollarse en sustratos como el humus de lombriz y la melaza, apoyando además lo indicado por autores como Sandoval y Belesansky en 2020, así como Michel-Aceves et al. en 2008 quienes encontraron que las cepas nativas son más idóneas para las condiciones de cada zona y su producción no necesita de una infraestructura complicada.

Figura 3. Porcentaje de colonización de *Trichoderma spp.* en caja Petri a los 15 días, según el tiempo de almacenamiento.



La Figura 3 muestra el porcentaje de colonización de *Trichoderma spp.* en cajas Petri a los 15 días para seis tratamientos. Los tratamientos 1, 3 y 6 presentaron los porcentajes más altos, con valores cercanos a 100 %, 99 % y 99 %, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. El tratamiento 2 registró aproximadamente 83 %, el tratamiento 4 cerca de 73 % y el tratamiento 5 alrededor de 50 %, valor que se diferenció de los demás. En términos generales, la capacidad de colonización varió entre los períodos de almacenamiento evaluados.

Los resultados muestran que la concentración de *Trichoderma spp.* disminuyó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Este comportamiento coincide con estudios que señalan que la formulación y el soporte nutritivo influyen en la conservación de las estructuras reproductivas. Asimismo, los parámetros mínimos de concentración y germinación pueden disminuir progresivamente durante el almacenamiento, lo que explica la influencia directa de la conservación sobre el desempeño del bioinsumo en campo.

CONCLUSIONES

El período de almacenamiento afectó de manera significativa la concentración y la viabilidad de *Trichoderma spp.* producido en un medio líquido con humus de lombriz y melaza. La concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL se redujo gradualmente hasta $3,7 \times 10^7$ UFC/mL a los cinco meses, lo que representa una disminución cercana al 63 % respecto del valor inicial.

La capacidad de colonización presentó diferencias entre los tratamientos evaluados. Los resultados del análisis estadístico muestran valores altos en los tratamientos 1, 3 y 6, y una disminución marcada en el tratamiento 5. Esta variación debe interpretarse considerando la correspondencia exacta entre cada tratamiento y el tiempo de almacenamiento.

El medio utilizado resultó efectivo y accesible para producir *Trichoderma spp.* en altas concentraciones iniciales, lo que valida el uso de alternativas económicas para la elaboración de bioinsumos en contextos locales. Los resultados confirman, además, que la concentración disminuye durante el almacenamiento, por lo que es necesario verificar la viabilidad antes de su aplicación agrícola.

Los resultados ofrecen una guía práctica para la comunidad agrícola, al establecer los tiempos máximos de almacenamiento recomendados antes de que su eficacia como agente de control biológico se vea comprometida, contribuyendo al uso seguro y eficiente de alternativas sostenibles en la producción agrícola.

RECOMENDACIONES

Para el uso efectivo del bioinsumo: se recomienda emplear el producto a base de *Trichoderma spp.*, elaborado con humus de lombriz y melaza, dentro del período de almacenamiento en el que conserve una concentración y capacidad de colonización adecuadas. Antes de su aplicación en campo, especialmente después de períodos prolongados, debe realizarse una evaluación de viabilidad.

Para las condiciones de almacenamiento: Es importante guardar los inóculos en envases sellados y esterilizados, en un rango de temperatura constante entre 4 y 8 °C, alejados de la luz solar directa y de cambios bruscos de temperatura. Se sugiere llevar a cabo revisiones mensuales para detectar posibles contaminaciones o disminuciones prematuras en la concentración microbiana.

Para la producción en la región: se propone ampliar el uso de sustratos que incluyan humus de lombriz y melaza como una alternativa accesible y económica para producir *Trichoderma spp.* en la zona. Esto podría reducir los costos de adquisición de insumos comerciales y adaptar el procedimiento a los recursos disponibles en las unidades de producción.

Para futuras investigaciones: Se recomienda investigar el impacto de diferentes periodos de almacenamiento, temperaturas variadas y tipos de envases sobre la viabilidad del hongo, así como evaluar su rendimiento en cultivos específicos y en condiciones reales de campo. También se sugiere examinar la mezcla de este bioinsumo con otros microorganismos beneficiosos para maximizar sus efectos sobre la fertilidad del suelo y el control de patógenos.

Para la difusión de conocimientos: Es esencial compartir los hallazgos y recomendaciones obtenidas con agricultores, organizaciones productivas y profesionales del sector agrícola, a través de talleres, materiales informativos y capacitaciones, con el propósito de fomentar el uso de opciones sostenibles en la producción agrícola de la localidad.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2), 185-191.

Olivo Molina, S. P. (2021). Evaluación de *Trichoderma* spp comercial y nativo en forma líquido y sólido para el incremento de la actividad microbiológica sobre un suelo erosionado en CEYPSA, Sector Salache, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi 2021 (Bachelor's thesis, Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).

Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). In *Anales de biología* (No. 26, pp. 35-45). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.

Vera Gutiérrez, M. M. (2019). Obtención de Esporas de *Trichoderma* spp. a Partir de Subproducto de *Oryza Sativa* (Arroz), Mediante Optimización de Parámetros de Producción y su Evaluación de Acción Antagónica Contra *Fusarium* spp.

Noboa Delgado, E. M. (2022). Sistema embebido para reconocimiento y conteo de esporas del hongo de género *trichoderma* mediante técnicas de visión artificial (Bachelor's thesis).

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98- 112.

Colquehuanca Nina, G. S., & Blanco Villacorta, M. W. (2021). Importancia y beneficios del *Trichoderma* en la producción agrícola. *Revista Estudiantil Agro-Vet*, 5, 78.

Bécquer-Granados, C. J., Puentes-Pérez, A. B., Ávila-Cordoví, U., Quintana-Sanz, M., Galdo-Rodríguez, Y., Medinilla-Nápoles, F., & Mirabales-Valdés, A. (2016). Efecto de la inoculación

con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticales (X. Triticosecale Wittmack), en condiciones de estrés por sequía. *Pastos y forrajes*, 39(1), 19-26.

Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G., & García Velasco, R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotechnología Vegetal*, 19(4), 237-248.

Dubón Avilés, J. T. (2018). *Efecto combinado de GLOMUS, Trichodermas y fitoestimulantes en el rendimiento de la papa (Solanum tuberosum L.), variedad loman, en la Aldea El Colorado, San José Pinula, Guatemala, diagnóstico de cultivos de importancia y servicios realizados en Palencia y San José Pinula, Guatemala, CA* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112.

Cárdenas, J. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Bogotá, Colombia.

Bullor, L., Braude, H., Monzón, J., Cotes Prado, A. M., Casavola, V., Carbajal Morón, N., & Risopoulos, J. (2024). *Bioinsumos: Oportunidades de inversión en América Latina*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2012). The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on two Colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150–156.

Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual* (11th ed.). Pearson Education.

U.S. Food and Drug Administration. (2022). *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, Chapter 3: Aerobic Plate Count. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). Brock Biology of Microorganisms (16th ed.). Pearson.

Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media (4th ed.). CRC Press.

International Organization for Standardization. (2017). ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Geneva: ISO.

ANEXOS

Anexo 1: Elaboración y empacado del bioinsumo líquido en envases plásticos que han sido preparados con anticipación para su conservación.



Anexo 2: Proceso de evaluación y acondicionamiento de los elementos empleados en la creación del bioinsumo en el laboratorio.



Anexo 3: Etiquetado y reconocimiento de los recipientes que alojan el bioinsumo creado para su evaluación futura.



Anexo 4: Última presentación del fertilizante líquido creado con humus de lombriz y melaza, listo para ser almacenado.



Anexo 5: Almacenamiento de los recipientes que contienen el bioinsumo en un ambiente de laboratorio para la supervisión del experimento.



Anexo 6: Materiales e insumos empleados en la elaboración del medio líquido para obtener *Trichoderma spp.*



Anexo 7: Plantación y manejo estéril de las muestras en la cabina de flujo laminar a lo largo del proceso microbiológico.



Anexo 8: Preparar y aplicar las muestras en un entorno estéril dentro de la cabina de flujo laminar.



Anexo 9: Desarrollo de *Trichoderma spp* en un sustrato sólido para analizar su crecimiento.



Anexo 10: Cultivo de colonias de *Trichoderma spp.* en una placa de Petri a lo largo del tiempo de incubación.



Anexo 11: Análisis del desarrollo y la supervivencia de *Trichoderma spp* en un sustrato de cultivo tras la conservación del bioinsumo.



Anexo 12. Análisis de varianza de la concentración (UFC) de conidios de *Trichoderma spp.* almacenadas durante diferentes períodos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración (UFC)	24	0,94	0,92	8,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,11957E+16	5	2,2391E+15	53,32	<0,0001
Tratamiento	1,11957E+16	5	2,2391E+15	53,32	<0,0001
Error	7,55898E+14	18	4,1994E+13		
Total	1,19516E+16	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14562598,23903

Error: 4,19943E+13 gl: 18

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
1	100000000,00	4	3240150,67	a		
2	92650000,00	4	3240150,67	a	b	
3	82500000,00	4	3240150,67		b	c
4	69975000,00	4	3240150,67			c d
5	55600000,00	4	3240150,67			d
6	37200000,00	4	3240150,67			e

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 13. Análisis de varianza del porcentaje de colonización de *Trichoderma spp.* almacenadas durante diferentes períodos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Colonización caja Petri ..	24	0,88	0,84	9,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7887,05	5	1577,41	25,85	<0,0001
Tratamiento	7887,05	5	1577,41	25,85	<0,0001
Error	1098,59	18	61,03		
Total	8985,63	23			

Prueba de Tukey: $\alpha = 0,05$; DMS = 17,55598

Error: 61,0327 gl: 18

Tratamiento	Mediasn	E.E.	
1	100,00 4	3,91	a
6	98,97 4	3,91	a
3	98,96 4	3,91	a
2	82,91 4	3,91	a b
4	72,69 4	3,91	b
5	50,25 4	3,91	c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Tesis Dayana Bravo

ID : b4a8b604e7009e9f2d47b98a6315315b758d2f25



4%

Textos sospechosos

Nombre del fichero : Tesis Dayana Bravo.txt
Tamaño del archivo original : 413,28 kB
Número de palabras : 4431

Depositante : Ricardo González Dávila
Fecha de depósito : 31 de julio de 2026
Tipo de carga : interface
fecha de fin de análisis : 31 de julio de 2026

Resumen (sección 1/2)

Localización de los textos sospechosos en el documento :



Incluido en el porcentaje de textos sospechosos :



Similitudes

0%

Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.



Detección de IA

14%

Textos estilísticamente próximos a un texto generado por una IA.

Este índice es un indicador y no una prueba. Comprueba con el autor si domina los conocimientos mencionados en el documento.



Idiomas no reconocidos

4%

Pasajes en los que parte del vocabulario utilizado no forma parte del diccionario de la lengua.
Puede tratarse de un intento del autor de modificar el texto para evitar ser detectado.



No incluido en el porcentaje de textos sospechosos :



Textos entre comillas

1%

Pasajes entre comillas, a menudo indicativos de una cita.