



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTAGONISTAS  
FUNGOSOS CULTIVABLES, NATIVOS DE SUELOS AGRÍCOLAS  
DEL CANTÓN SANTA CRUZ PARROQUIA BELLAVISTA DE LA  
PROVINCIA DE GALÁPAGOS”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:** MARÍA ELENA DEL ROSARIO ROMERO

**DIRECTOR:** ING. FERNANDO JOSE RIVAS FIGUEROA Ph.D.

Riobamba - Ecuador

2022

© 2022, **María Elena Del Rosario Romero**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor

Yo, María Elena Del Rosario Romero, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

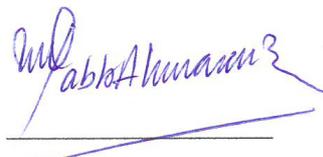
Riobamba, 27 de mayo de 2022

A handwritten signature in blue ink that reads "María D.R." with a decorative flourish underneath.

**María Elena Del Rosario Romero**  
**172166028-8**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Proyecto de Investigación, **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTAGONISTAS FUNGOSOS CULTIVABLES, NATIVOS DE SUELOS AGRÍCOLAS DEL CANTÓN SANTA CRUZ PARROQUIA BELLAVISTA DE LA PROVINCIA DE GALÁPAGOS”**, realizado por la señorita: **MARÍA ELENA DEL ROSARIO ROMERO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova Ph <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2022-05-27
Ing. Fernando José Rivas Figueroa Ph.I <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2022-05-27
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		2022-05-27

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida, por brindarme sabiduría y fortaleza necesaria para no desfallecer durante estos años. A mi padre Máximo que con paciencia y sacrificio me ha apoyado siempre, es así que hoy me permite culminar una de las etapas más importantes de mi formación profesional. A mi mami querida María por ser mi pilar fundamental y por demostrarme siempre su amor, su apoyo incondicional, por ser mi mejor amiga, gracias por sus oraciones, consejos y por inculcar en mí el ejemplo de una gran mujer y que por sobre todas las cosas nunca apartarme del camino de Dios. A mi mejor amigo y novio Diego por brindarme su apoyo incondicional, su amistad sincera, gracias por todos los momentos compartidos, el amor y la paciencia brindada y por siempre hacerme ver el lado bueno de las cosas. A mis hermanas Nancy, Margoth, Martha y Valeria por el apoyo que me brindaron a lo largo de esta etapa, en especial a Nancy quien siempre me brindo los recursos necesarios durante mi vida estudiantil.

**María**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por ser mi guía a lo largo de mi vida, brindándome sabiduría para culminar mis metas.

A mi familia por ser mi motor para seguir esforzándome cada día, agradezco de todo corazón la confianza que depositaron en mí.

A los docentes de la carrera de Agronomía por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi vida estudiantil.

A mi tribunal de titulación conformado por el Ing. Fernando Rivas Ph.D. en calidad de director y al Ing. Pablo Álvarez Ph.D. como asesor, por la calidad humana, por haberme permitido ser parte de este proyecto, por las asesorías, la dedicación y paciencia que me brindaron a lo largo del desarrollo del trabajo de integración curricular.

Al Ing. Álvaro Rivera por ser más que un docente un gran amigo, quien me brindo todo su apoyo desde el primer día de mis actividades, gracias por toda su dedicación. Al Ing. Juan Guerra por toda la paciencia y dedicación brindada a lo largo del desarrollo de mi trabajo de investigación.

A mis amigos y amigas con quienes compartí dentro y fuera de las aulas y con quienes compartimos dentro de laboratorio por su amistad, por los buenos momentos que compartimos y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

**María**

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1

## CAPÍTULO I

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Control biológico .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Importancia de los antagonistas fúngicos en el control biológico .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1</b>	<i>Los microorganismos antagonistas.....</i>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Diferentes antagonistas microbianos .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1</b>	<b><i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>5</b>
1.3.1.1	<i>Aspectos generales de Trichoderma.....</i>	5
1.3.1.2	<i>Distribución mundial de Trichoderma spp.....</i>	6
1.3.1.3	<i>Taxonomía .....</i>	6
1.3.1.4	<i>Fisiología de Trichoderma .....</i>	7
1.3.1.5	<i>Características morfológicas de Trichoderma.....</i>	7
1.3.1.6	<i>Sistemática del género Trichoderma.....</i>	7
1.3.1.7	<i>Especies de interés dentro de algunos clados .....</i>	11
1.3.1.8	<i>Control de calidad de producciones de Trichoderma .....</i>	13
1.3.1.9	<i>Capacidad antagonista.....</i>	14
1.3.1.10	<i>Mecanismos de acción de Trichoderma .....</i>	14
1.3.1.11	<i>Micoparasitismo .....</i>	14
1.3.1.12	<i>Antibiosis .....</i>	15
1.3.1.13	<i>Competencia por los nutrientes.....</i>	15
1.3.1.14	<i>Usos de Trichoderma en la remediación de la contaminación .....</i>	16
<b>1.3.2</b>	<b><i>Beauveria bassiana</i>.....</b>	<b>17</b>
1.3.2.1	<i>Aspectos generales .....</i>	17
1.3.2.2	<i>Modo de acción .....</i>	17
1.3.2.3	<i>El desarrollo del hongo .....</i>	17
1.3.2.4	<i>Aplicaciones en campo .....</i>	18
<b>1.3.3</b>	<b><i>Metarhizium</i>.....</b>	<b>18</b>

1.3.3.1	<i>Aspectos generales</i> .....	18
1.3.3.2	<i>Importancia</i> .....	18
1.3.3.3	<i>Balance biológico</i> .....	18
<b>1.4</b>	<b>Métodos de aislamiento y caracterización de antagonistas fúngicos.</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.1</b>	<b><i>Aislamiento de microorganismos</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.2</b>	<b><i>Caracterización de microorganismos</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.3</b>	<b><i>Tipo de siembra:</i></b> .....	<b>19</b>
1.4.3.1	<i>Dilución</i> .....	19
1.4.3.2	<i>Centrifugación</i> .....	20
<b>1.4.4</b>	<b><i>Medios de cultivo</i></b> .....	<b>20</b>
1.4.4.1	<i>Papa dextrosa agar (PDA)</i> .....	21
1.4.4.2	<i>PDA enmendado</i> .....	21
1.4.4.3	<i>Medio selectivo de Trichoderma (TSM)</i> .....	21
1.4.4.4	<i>Medio rosa de bengala</i> .....	21
<b>1.4.5</b>	<b><i>Métodos de preservación</i></b> .....	<b>21</b>
1.4.5.1	<i>Método Castellani</i> .....	21
1.4.5.2	<i>Método de glicerol a -20°C</i> .....	22

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.1</b>	<b><i>Características del lugar</i></b> .....	<b>23</b>
2.1.1.1	<i>Localización</i> .....	23
2.1.1.2	<i>Ubicación geográfica</i> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Materiales y equipos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1</b>	<b><i>De escritorio</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>De Laboratorio</i></b> .....	<b>24</b>
2.2.2.1	<i>Materiales</i> .....	24
2.2.2.2	<i>Insumos</i> .....	25
2.2.2.3	<i>Medios de cultivo</i> .....	26
2.2.2.4	<i>Equipos</i> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Metodología</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Aislamiento de hongos antagonistas de suelo</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Caracterización macroscópica de los hongos antagonistas</i></b> .....	<b>28</b>
2.3.2.1	<i>Obtención de cultivos monospóricos</i> .....	28
2.3.2.2	<i>Caracterización cultural de hongos antagonistas</i> .....	29

<b>2.3.3</b>	<b><i>Caracterización morfológica</i></b> .....	<b>29</b>
2.3.3.1	<i>Microcultivo de hongos antagonistas</i> .....	29
2.3.3.2	<i>Montaje de placas</i> .....	29
2.3.3.3	<i>Conservación de los hongos antagonistas</i> .....	29
<b>2.3.4</b>	<b><i>Identificación molecular de las cepas obtenidas mediante PCR</i></b> .....	<b>30</b>
2.3.4.1	<i>Obtención de micelio para extracción de ADN genómico</i> .....	30
2.3.4.2	<i>Extracción del ADN genómico</i> .....	30
2.3.4.3	<i>PCR</i> .....	31
2.3.4.4	<i>Electroforesis</i> .....	32
2.3.4.5	<i>Secuenciación</i> .....	32
2.3.4.6	<i>Análisis de secuencias</i> .....	32
2.3.4.7	<i>Análisis Filogenéticos</i> .....	33

### **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterización morfológica y molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.</b> ..	<b>35</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Caracterización morfológica</i></b> .....	<b>36</b>
3.2.1.1	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M1A PDAE (A).....	36
3.2.1.2	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R3 M3 PDAE (B).....	37
3.2.1.3	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M1A RB (C).....	38
3.2.1.4	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M3 RB (D).....	39
3.2.1.5	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M2A-D PDA (E).....	40
3.2.1.6	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M3 PDAE (F) .....	41
3.2.1.7	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M5-D RB (G).....	43
3.2.1.8	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M2A RB (H).....	44
3.2.1.9	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R3 M3 PDA (I).....	45
3.2.1.10	<i>Trichoderma</i> spp. cepa b. R2 M3 PDA (J) .....	46
3.2.1.11	<i>Trichoderma</i> spp. cepa a. R2 M3 PDA (K) .....	48
3.2.1.12	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R1 M2A PDA (M) .....	49
3.2.1.13	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R2 6B PDAE (N).....	50
3.2.1.14	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R3 6B PDA (O).....	51
3.2.1.15	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R2 6B PDA (P) .....	52
3.2.1.16	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R2 M4 RB (R) .....	53
3.2.1.17	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R2 M1A RB (S) .....	55
3.2.1.18	<i>Trichoderma</i> spp. cepa R3 M2A PDAE (U) .....	56

3.2.1.19	<i>Trichoderma spp. cepa R2 6B-D RB (V)</i> .....	57
3.2.1.20	<i>Trichoderma spp. cepa R3 7A PDAE (X)</i> .....	58
3.2.1.21	<i>Trichoderma spp. cepa R3 M1A RB (Y)</i> .....	59
<b>3.2.2</b>	<b><i>Caracterización molecular</i></b> .....	<b>64</b>
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>73</b>
	<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> .....	6
<b>Tabla 2-2:</b>	Listado de las localidades y el tipo de cultivo en el Cantón Santa Cruz .....	23
<b>Tabla 3-2:</b>	Medios de cultivo utilizados para el aislamiento.....	27
<b>Tabla 4-2:</b>	Composición del medio líquido.....	30
<b>Tabla 5-2:</b>	Primers utilizados en la PCR .....	31
<b>Tabla 6-3:</b>	Identificación morfológica de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con las medidas largo y ancho de fiálides, conidios y clamidosporas.....	61
<b>Tabla 7-3:</b>	Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en 3 medios de cultivo: PDA, SNA y AHM.....	62
<b>Tabla 8-3:</b>	Identificación molecular mediante análisis BLASTn de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. alineadas con especies de la base de datos del NCBI .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Árbol filogenético con consecuencias parciales de <i>rpb2</i> de aislados representativos de <i>Trichoderma</i> spp.....	10
<b>Figura 2-3:</b>	Características culturales de la cepa (A) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	36
<b>Figura 3-3:</b>	Características morfológicas cepa (A) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f), conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c). ....	37
<b>Figura 4-3:</b>	Características culturales cepa (B) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	37
<b>Figura 5-3:</b>	Características morfológicas cepa (B) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).....	38
<b>Figura 6-3:</b>	Características culturales cepa (C) desarrollada en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días). ....	38
<b>Figura 7-3:</b>	Características morfológicas cepa (C) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	39
<b>Figura 8-3:</b>	Características culturales cepa (D) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	39
<b>Figura 9-3:</b>	Características morfológicas cepa (D) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	40
<b>Figura 10-3:</b>	Características culturales cepa (E) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	41
<b>Figura 11-3:</b>	Características morfológicas cepa (E) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).....	41
<b>Figura 12-3:</b>	Características culturales cepa (F) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	42
<b>Figura 13-3:</b>	Características morfológicas cepa (F) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	42
<b>Figura 14-3:</b>	Características culturales cepa (G) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	43
<b>Figura 15-3:</b>	Características morfológicas cepa (G) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	44
<b>Figura 16-3:</b>	Características culturales cepa (H) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y medio AHM (c) (15 días).....	44
<b>Figura 17-3:</b>	Características morfológicas cepa (H) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	45

<b>Figura 18-3:</b>	Características culturales cepa (I) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	46
<b>Figura 19-3:</b>	Características morfológicas cepa (I) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	46
<b>Figura 20-3:</b>	Características culturales cepa (J) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	47
<b>Figura 21-3:</b>	Características morfológicas cepa (J) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	47
<b>Figura 22-3:</b>	Características culturales cepa (K) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	48
<b>Figura 23-3:</b>	Características morfológicas cepa (K) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	48
<b>Figura 24-3:</b>	Características culturales cepa (M) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	49
<b>Figura 25-3:</b>	Características morfológicas cepa (M) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).....	50
<b>Figura 26-3:</b>	Características culturales cepa (N) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	50
<b>Figura 27-3:</b>	Características morfológicas cepa (N) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	51
<b>Figura 28-3:</b>	Características culturales cepa (O) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	51
<b>Figura 29-3:</b>	Características morfológicas cepa (O) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	52
<b>Figura 30-3:</b>	Características culturales cepa (P) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	53
<b>Figura 31-3:</b>	Características morfológicas cepa (P) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	53
<b>Figura 32-3:</b>	Características culturales cepa (R) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	54
<b>Figura 33-3:</b>	Características morfológicas cepa (R) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	54
<b>Figura 34-3:</b>	Características culturales cepa (S) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	55
<b>Figura 35-3:</b>	Características morfológicas cepa (S) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). .....	56

<b>Figura 36-3:</b>	Características culturales cepa (U) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	56
<b>Figura 37-3:</b>	Características morfológicas cepa (U) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y Clamidosporas (cl) (c).....	57
<b>Figura 38-3:</b>	Características culturales cepa (V) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	58
<b>Figura 39-3:</b>	Características morfológicas cepa (V) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	58
<b>Figura 40-3:</b>	Características culturales cepa (X) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	59
<b>Figura 41-3:</b>	Características morfológicas cepa (X) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	59
<b>Figura 42-3:</b>	Características culturales cepa (Y) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).....	60
<b>Figura 43-3:</b>	Características morfológicas cepa (Y) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b). ....	60
<b>Figura 44-3:</b>	Árbol filogenético inferido a partir del alineamiento de las secuencias (Rpb2) de <i>Trichoderma</i> spp.....	66
<b>Figura 45-3:</b>	Árbol filogenético inferido a partir del alineamiento de las secuencias (Rpb2) de <i>Trichoderma</i> spp.....	67

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Número de aislados de <i>Trichoderma</i> por cada medio de cultivo utilizado: PDA, PDAE, RB y TSM.....	34
<b>Gráfico 2-3:</b> Número de aislados de <i>Trichoderma</i> por muestra según cultivo. ....	35
<b>Gráfico 3-3:</b> Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en 3 medios de cultivo: PDA, SNA y AHM. ....	63

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** AISLAMIENTO DE HONGOS ANTAGONISTAS
- ANEXO B:** OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE MICROCULTIVOS DE LOS AISLADOS OBTENIDOS
- ANEXO D:** MONTAJE DE PLACAS
- ANEXO E:** CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Trichoderma* MEDIANTE EL MÉTODO DE CASTELLANI
- ANEXO F:** EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO
- ANEXO G:** PROCEDIMIENTO PARA PRUEBAS PCR Y CONFIRMACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS
- ANEXO H:** REVELADO DE GEL MEDIANTE EL TRANSILUMINADOR
- ANEXO I:** CRECIMIENTO MICELIAL DE AISLADOS DE *Trichoderma* EN MEDIO DE CULTIVO PDA
- ANEXO J:** MEDICIÓN DE FIÁLIDES, CONIDIOS
- ANEXO K:** PREPARACIÓN DE CEPAS PARA ENVIAR A SECUENCIAR
- ANEXO L:** COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SNA
- ANEXO M:** COMPONENTES PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR-AVENA
- ANEXO N:** CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma*

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar cultural, morfológica y molecularmente antagonistas fungosos cultivables, nativos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos. Las muestras de suelo correspondieron a 8 cultivos del Cantón Santa Cruz (cultivo de Kale, melón, café *var. Catimor* y *var. Típica*, tomate, maíz amarillo, bosque no intervenido y pimiento), se preparó la solución madre, en donde se tomó 27,77 g de suelo diluido en 250 mL de agua y se procedió a realizar 3 repeticiones por muestra, en 4 medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA), papa dextrosa agar enmendado (PDAE), Rosa de bengala (RB) y Medio selectivo para *Trichoderma* (TSM), las siembras se conservaron a 25°C y fueron observadas características de *Trichoderma* spp. como: fiálides, clamidosporas y conidios. Para determinar el género y especie fue necesario realizar la caracterización molecular. Se realizó la extracción del ADN genómico con la ayuda del Kit Promega Wizard® y para la identificación se empleó la técnica de amplificación cadena del ADN polimerasa (PCR) en el programa Rpb2. Como resultado de los 8 cultivos muestreados, el que presentó mayor cantidad de aislados fue el cultivo de café *var. catimor* con 6 aislados, seguido por los cultivos de Kale con 4, melón 4, Café *var. Típica* 1, tomate 1, maíz amarillo 4, bosque no intervenido 1 y pimiento 0 aislados, las especies de *Trichoderma* obtenidas fueron *harzianum*, *lentiforme*, *breve*, *andinense*, *longibrachiatum* y *reesei*. Concluyendo con la obtención de 21 cepas, 2 clados y 6 especies en el análisis filogenético, además que la técnica más apropiada para el aislamiento fue la siembra por el método de dilución y *extensión en placa* en el medio de cultivo RB. Se sugiere realizar pruebas de antagonismo con las 21 cepas de *Trichoderma*.

**Palabras clave:** <AISLAMIENTO>, <CARACTERIZACIÓN>, <*Trichoderma*>, <ANTAGONISTAS>, <ANÁLISIS FILOGENÉTICO>, <GALÁPAGOS (PROVINCIA)>.

  
D.B.R.A.I.  
Ing. Christian Castillo

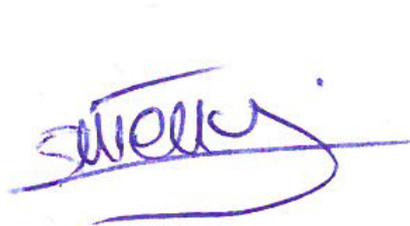


1293-DBRA-UTP-2022

## ABSTRACT

The objective of this research work was to isolate and characterize culturally, morphologically, and molecularly cultivable antagonistic fungi native to agricultural soils of the Santa Cruz canton, Bellavista parish, Galapagos province. The soil samples corresponded to 8 crops of the Santa Cruz canton (Kale, melon, coffee *var. Catimor* and *var. Típica*, tomato, yellow corn, undisturbed forest, and bell pepper). The stock solution was prepared where 27.77 g of soil diluted in 250 mL of water was taken, and three replicates per sample were made, in 4 culture media: potato dextrose agar (PDA), potato dextrose agar amended (*PDAE*), Rose Bengal (RB) and Selective medium for *Trichoderma* (*TSM*), the sowings were conserved at 25°C and were observed characteristics of *Trichoderma* spp., such as phialides, chlamydo spores, and conidia. It was necessary to perform molecular characterization to determine the genus and species. Genomic DNA extraction was performed with the help of the Promega Wizard® Kit, and the DNA polymerase chain amplification (PCR) technique in the Rpb2 program was used for identification. As a result of the eight crops sampled, the one that presented the highest number of isolates was the coffee *var. catimor* crop with six isolates, followed by the Kale crops with 4, melon 4, and coffee *var. Típica* 1, tomato 1, yellow corn 4, undisturbed forest 1, and bell pepper 0 isolates. The *Trichoderma* species obtained were *harzianum*, *lentiforme*, *breve*, *andinense*, *longibrachiatum*, and *reesei*. It was concluded with the obtaining of 21 strains, two clades, and six species in the phylogenetic analysis. In addition, the most appropriate technique for the isolation was the sowing by the dilution method and extension in the plate in the *RB* culture medium. It is recommended to carry out antagonism tests with the 21 strains of *Trichoderma*.

**Keywords:** <ISOLATION>, <CHARACTERIZATION>, <*Trichoderma*>, <ANTAGONIST>, <PHYLOGENETIC ANALYSIS>, <GALÁPAGOS (PROVINCE)>.



**Silvana Patricia Céleri Quinde**

**C.C. 0602669830**

## INTRODUCCIÓN

Los hongos antagonistas benefician a la moderación del deterioro que provocan las enfermedades, principalmente en donde se dan las circunstancias para su desarrollo y conservación como lo son los agroecosistemas. Los microorganismos benéficos muestran diversos modos de acción que les ayudan a desempeñar su efecto biorregulador, por lo que una de las claves para elegir a un agente de control biológico debe ser lo ya mencionado además de poseer una alta capacidad de propagación. Desde el punto de vista práctico es necesario tener un conocimiento profundo acerca de los mecanismos de acción los antagonistas que se presenten, ya que esto posibilita una apropiada y mejor recopilación de aislamientos con una elevada potencialidad para el control de diversos fitopatógenos (Infante et al., 2015: pp.87-90).

Desde hace tiempo se ha venido estudiando las especies consideradas como agentes de biocontrol, dentro de las especies más extensamente estudiadas y aplicadas, se conoce las del género *Trichoderma*, por su control eficiente, plasticidad ecológica, alta condición reproductiva, reacción estimulante sobre los cultivos, además actualmente se encontró una propiedad que se basa en el efecto inductor de resistencia sistémica sobre la planta frente a diversos patógenos (Infante et al., 2015: pp.91-92).

Ecuador se encuentra ubicado a 972 km del archipiélago de Galápagos, el cual posee una superficie de 8.010 kilómetros cuadrados, se compone de cinco islas principales que exceden los 500 kilómetros cuadrados como son: Isla Isabela, Isla Fernandina, Isla San Salvador, Isla San Cristóbal e Isla Santa Cruz, esta última es conocida también como Isla Infatigable o Isla Chaves, se encuentra ubicada como la segunda isla más habitada y más grande del archipiélago, además posee una extensión de 986 kilómetros cuadrados y una altitud que no supera los 864 metros (González, 2013, pp.32-42).

### **El problema**

En el cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos existe un escaso número de estudios destinados a conocer los antagonistas fungosos presentes en esos suelos, se desconoce el potencial de microorganismos antagonistas fungosos para el control biológico de las diversas enfermedades que se presentan en los principales cultivos de las zonas en estudio. Siendo la segunda isla más habitada y más grande del archipiélago no dispone de estudios basados en el aislamiento y la caracterización a nivel cultural, morfológico y molecular de especies del género *Trichoderma*, que son una de las especies más estudiadas y aplicadas por considerarse como agentes de control biológico. Además, no se cuenta con investigaciones basadas en pruebas de

antagonismo con cepas de *Trichoderma* que permitan conocer la capacidad antagonista frente a diversos agentes fitopatógenos habitantes del suelo.

## **Justificación**

Con el pasar del tiempo se ha venido observando un incremento acelerado de plagas y enfermedades que atacan a una gran variedad de plantas, la naturaleza ha sido quien se encarga de propiciar un equilibrio, controlando las poblaciones de organismos mediante depredadores, parásitos y otros medios naturales (Hernández et al., 2007: pp.79-93). Hoy en día el manejo de plagas y enfermedades es un punto clave en la producción agrícola de alimentos, lo que muchas veces involucra el uso excesivo de productos químicos para su control. Es por ello que se abre una puerta a la investigación que implica métodos de control biológico, es decir, métodos menos invasivos y más naturales que generen mayores alternativas para el manejo de plagas y enfermedades que azotan a los diferentes cultivos, es este caso a cultivos como: café, pimiento, maíz amarillo, melón, y hoja de kale, perteneciente a las localidades Media Luna, El Cascajo, La Fortuna y Camino Viejo de la parroquia Bellavista cantón Santa Cruz de las Islas Galápagos. Por esta razón el conocer el potencial de control biológico de los microorganismos fungosos de suelo de las Islas Galápagos es de vital importancia.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

- Aislar y caracterizar antagonistas fungosos cultivables, nativos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos.

### ***Objetivos específicos***

- Aislar antagonistas fungosos cultivables, nativos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos.
- Caracterizar cultural, morfológica y molecularmente los antagonistas fungosos cultivables, nativos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos.
- Determinar las técnicas más apropiadas que permitan el aislamiento de antagonistas fungosos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos.

## **Hipótesis**

### ***Nula***

Las muestras de los distintos suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos no difieren en la diversidad de antagonistas fungosos que pueden ser cultivados en laboratorio.

### ***Alterna***

Las muestras de los distintos suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos difieren en la diversidad de antagonistas fungosos que pueden ser cultivados en laboratorio.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Control biológico

Es un método agrícola de control de plagas (malezas, enfermedades de las plantas, insectos, ácaros, etc.) que utiliza parásitos, depredadores, herbívoros u otros medios naturales. Puede ser un componente importante del control integrado de plagas y es de gran importancia económica para la agricultura (Robledo, 2016). El control biológico también se lo define como el uso de organismos para suprimir la densidad de población o el impacto de una plaga específica, haciéndolo menos abundante o reduciendo su daño (Guerrero, 2016, pp.20-25).

El control biológico utiliza la capacidad que poseen algunos microorganismos para dominar las poblaciones de vectores en plantas, es decir, utiliza organismos vivos para reducir la población de organismos considerados plaga de una manera menos perjudicial para el ambiente. Es importante identificar de forma apropiada tanto plagas como enfermedades presentes en una plantación, para obtener un control positivo y eficiente (Vidal, 2021, pp.214-226).

### 1.2 Importancia de los antagonistas fúngicos en el control biológico

Favorecen la resistencia ante amenazas de plagas y enfermedades. Tienen efectos directos sobre hongos fitopatógenos. El uso de microorganismos antagonistas ha inducido resistencia en frutos y otras partes de las plantas (Guerrero, 2016, p.25).

Si se habla del universo biológico, se sabe que hay una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de manera que los antagonistas cooperan para que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. Los microorganismos al estar en condiciones naturales se hallan en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. No es fácil precisar cuáles son aquellos mecanismos que participan en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. Comúnmente, se conoce que los antagonistas carecen de un singular modo de acción y la multiplicidad de dichos antagonistas es una propiedad fundamental para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista dispone de varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández, 2001, pp.96-100).

### **1.2.1 Los microorganismos antagonistas**

Pueden ser bacterias, levaduras y hongos que poseen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (Hernández, 2007, p.90). Además, se sostiene que los microorganismos de control biológico y en especial *Trichoderma* spp. pueden reaccionar a cambios en su hábitat de maneras inalcanzables por los fungicidas químicos, tanto por su capacidad para competir ecológicamente como por atacar patógenos que ya están establecidos o aquellos que llegarán después. Cabe aclarar que las medidas de control biológico no poseen la capacidad de erradicar al patógeno o su daño y si bien la reducción del nivel de severidad de la enfermedad es la medida más obvia de efectividad de un tratamiento, reducir niveles de enfermedad en futuros cultivos es también un indicativo de control (Guerrero, 2016, p.21).

## **1.3 Diferentes antagonistas microbianos**

### **1.3.1 *Trichoderma***

#### *1.3.1.1 Aspectos generales de Trichoderma*

El género *Trichoderma* posee diversas especies que se identifican por ser hongos saprófitos, que subsisten en suelos que poseen distintas porciones de materia orgánica, dichos hongos tienen la capacidad de descomponer la materia orgánica y en ciertas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les faculta a demostrar una mayor plasticidad ecológica. Las diversas especies de *Trichoderma* se hallan presentes en todas las latitudes, a partir de las zonas polares hasta la ecuatorial. Su distribución tan extensa y su plasticidad ecológica están rigurosamente relacionadas con la elevada capacidad enzimática de la que disponen para atenuar los sustratos, un metabolismo adaptable y la capacidad de tolerar inhibidores microbianos. Sin embargo, se han llevado a cabo escasas investigaciones de la sobrevivencia, además, presentándose en la rizósfera de la planta el establecimiento y multiplicación de dicho antagonista. Al ser un hongo que se aísla sencillamente, que posee un rápido crecimiento y se desarrolla en diversos sustratos y por su cualidad de biocontrolador dentro de una extensa gama de fitopatógenos el género *Trichoderma* se convierte en un extraordinario modelo para ser estudiado (Infante et al., 2015: p.89).

El hongo *Trichoderma* posee la facultad de colonizar diferentes sustratos sobre condiciones ambientales variadas, además cuenta con una gran cantidad de enzimas hidrolíticas halladas en el Reino Fungi, también posee un sistema muy eficiente de reparación celular lo cual lo ha llevado a poder crecer en condiciones desfavorables. La investigación acerca de la capacidad que tiene

*Trichoderma* para atacar otros hongos ha dado paso al desarrollo de cuantiosos agentes de control biológico (Meyer *et al.*, 2019).

Desde hace un tiempo se han incrementado las investigaciones sobre el hongo *Trichoderma*, conociendo así sus funciones tales como: promover el crecimiento de las plantas y también la germinación de las semillas, *Trichoderma* es un hongo que se encarga de incitar de manera minuciosa las defensas de las plantas ante patógenos y de igual manera ante el estrés ambiental (Meyer *et al.*, 2019).

### 1.3.1.2 Distribución mundial de *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* se hayan presentes en diversas zonas y hábitats, principalmente en suelos que poseen elevada capacidad de materia orgánica. Su crecimiento es facilitado por la existencia de elevadas densidades de raíces, las cuales son colonizadas velozmente. Especies como *T. polysporum* y *T. minutisporum* tienen su distribución en tierras frías, las especies *T. viride* y *T. aureovirida* están limitadas al norte de Europa y a Reino Unido, *T. pseudokoningii* abarca en el suroeste de Oceanía, *T. reesei* delimitada a una banda ecuatorial estrecha, *T. stromaticum* su división está limitada solo en América del Sur, *T. longibrachiatum* fue encontrado en América del Norte y Sur, África, Europa e India, *T. citrinoviride* se encontró en América del Norte y Sur, el sureste de Asia, Europa y al suroeste de Oceanía, y *T. harzianum* y *T. asperellum* son realmente cosmopolitas (Rojas, 2020).

### 1.3.1.3 Taxonomía

**Tabla 1-1:** Clasificación taxonómica de *Trichoderma*

Reino	Fungí
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes/ Deuteromycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

**Fuente:** (Jaklitsch, 2009; Acurio, 2017)

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

*Trichoderma* pertenece a la clase Sordariomycetes del filo Ascomycota y, por tanto, a la especie donde se conoce la fase asexual, los conidióforos se forman a partir del micelio vegetativo con un eje central y ramas laterales, que terminan en fiálides, en forma de botella o alargadas, en la punta de las fiálides se producen los típicos conidios unicelulares, esféricos, ovalados o alargados, verde

en la mayoría de las especies. Los conidióforos se agregan comúnmente en pústulas esparcidas por toda la colonia. La totalidad de las colonias de *Trichoderma* en su comienzo poseen tonalidades que van desde el color blanco hasta un color verde oscuro o algunas veces una tonalidad amarillenta, su esporulación suele presentarse compacta. Generalmente al observar las colonias de *Trichoderma* bajo el microscopio se aprecia que el micelio es fino y nada denso (Jaklitsch, 2009, pp.1-40).

#### 1.3.1.4 Fisiología de *Trichoderma*

Se trata de un hongo aeróbico, que posee la facultad de tolerar un extenso intervalo de temperaturas. En cuanto al crecimiento de *Trichoderma* expuesto a la luz, esta influye principalmente sobre la esporulación. Es decir, las colonias del hongo que son expuestas a desarrollarse en condiciones de luz alterna, se presentan de color blanco y algodonosas al principio y posteriormente presentan zonadas concéntricas, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de color verde oscuro, en tanto que, al ser expuestas a luz continua se muestran uniformemente de color verde oscuro. Estos hongos se pueden encontrar en suelos que poseen una gran cantidad de materia orgánica y cuyos aislamientos favorecen a la descomposición de materia orgánica, además de los hongos a los cuales degrada (Martínez et al., 2013: pp.1-11).

#### 1.3.1.5 Características morfológicas de *Trichoderma*

Las características que presenta *Trichoderma* son aquellas como: crecimiento rápido, presencia de micelio septado y ramificado, fiálides hialinas y dependiendo de la especie pueden ser redondas u ovaladas, casi en todas las especies las fiálides tienden a ser alargadas y en el extremo se forman los conidios, se suelen presentar colores con tonalidades verdes y rara vez marrones y grises, se da la presencia de clamidosporas (Bahena, 2020, pp.8-9).

#### 1.3.1.6 Sistemática del género *Trichoderma*

A partir de fines del siglo XIX, se designó *Trichoderma viride* como el nombre que se debía atribuir a cada uno de los organismos fungosos formadores de colonias que posean características propias del género, provenientes de aislamientos de muestras tanto del suelo como de restos vegetales, o también que se hayan obtenido de ascosporas previamente aisladas de peritecios de diversas especies del género *Hypocrea*. La sencillez taxonómica en *Trichoderma* es un producto de poco interés en el género fuera de la disciplina de la micología, y generalmente se acepta que,

bajo el microscopio, todos los aislamientos tienen “la misma cara” (Samuels y Hebbbar, 2015, pp.35-160).

Esta continuo hasta finales de la década de 1960, cuando el género se dividió en nueve “agregados de especies”, como lo demuestran las diferencias morfológicas de la fase asexual en cultivo puro. El término “agregados” se empleó para denotar que especies con diferente biología y morfología durante la fase sexual pueden compartir la misma morfología durante fase asexual, debido a su relativa sencillez, el sistema taxonómico de nueve “especies” fueron ampliamente adoptados y todavía están en uso, en la actualidad, se emplea para caracterizar el morfotipo de *Trichoderma*, debido a que no tiene utilidad taxonómica. El esquema taxonómico se empezó a prolongar a inicios de los 90, se establecieron 5 grupos dentro del género con ciertos agregados de especies; para la fase sexual se tomó en consideración las características morfológicas y también el número de especies (Druzhinina y Kubicek, 2005, p. 3447).

Para el estudio tanto taxonómico como sistemático del género, se dio paso al empleo de la filogenia molecular, a inicios del 2000 el número de especies expuestas se incrementó notablemente, manifestando así que *Trichoderma*, aunque presente sencillez morfológica de oculta una amplia diversidad de linajes filogenéticos, que discreparon hace algún tiempo dando como resultado la aparición de cientos de especies adaptadas a diversos hábitats y sustratos. El número de especies definidas molecularmente superó las 100 en el 2006 y hoy por hoy se acerca a las 300 (Druzhinina et al., 2011: p.3450).

Un efecto directo de los cambios taxonómicos recientes es la constatación de que la mayoría de los nombres utilizados hasta hace poco para los aislamientos de *Trichoderma*, basados en gran parte en la morfología, son incorrectos (Druzhinina y Kubicek, 2005: p. 3454).

El concepto de especies filogenéticas en hongos se ejecuta a partir de la generación y el análisis de árboles filogenéticos, que fueron construidos a partir de secuencias parciales de genes que se compartían y conservaban relativamente entre todos los organismos comparados. En este caso, las especies filogenéticas se pueden puntualizar como el grupo monofilético más reducido (grupo que consta de nodos internos y secuencias que se derivan de él) se caracterizan por un conjunto fijo de polimorfismos de ADN dentro de la región secuenciada. En la práctica, la identificación del nodo que dividen estrechamente especies filogenéticas no siempre es clara, y la solución encontrada es utilizar las secuencias de varios genes independientes en el genoma para realizar análisis combinatorios en un proceso denominado gen concordancia genealógica (Conrado et al., 2019: p.538).

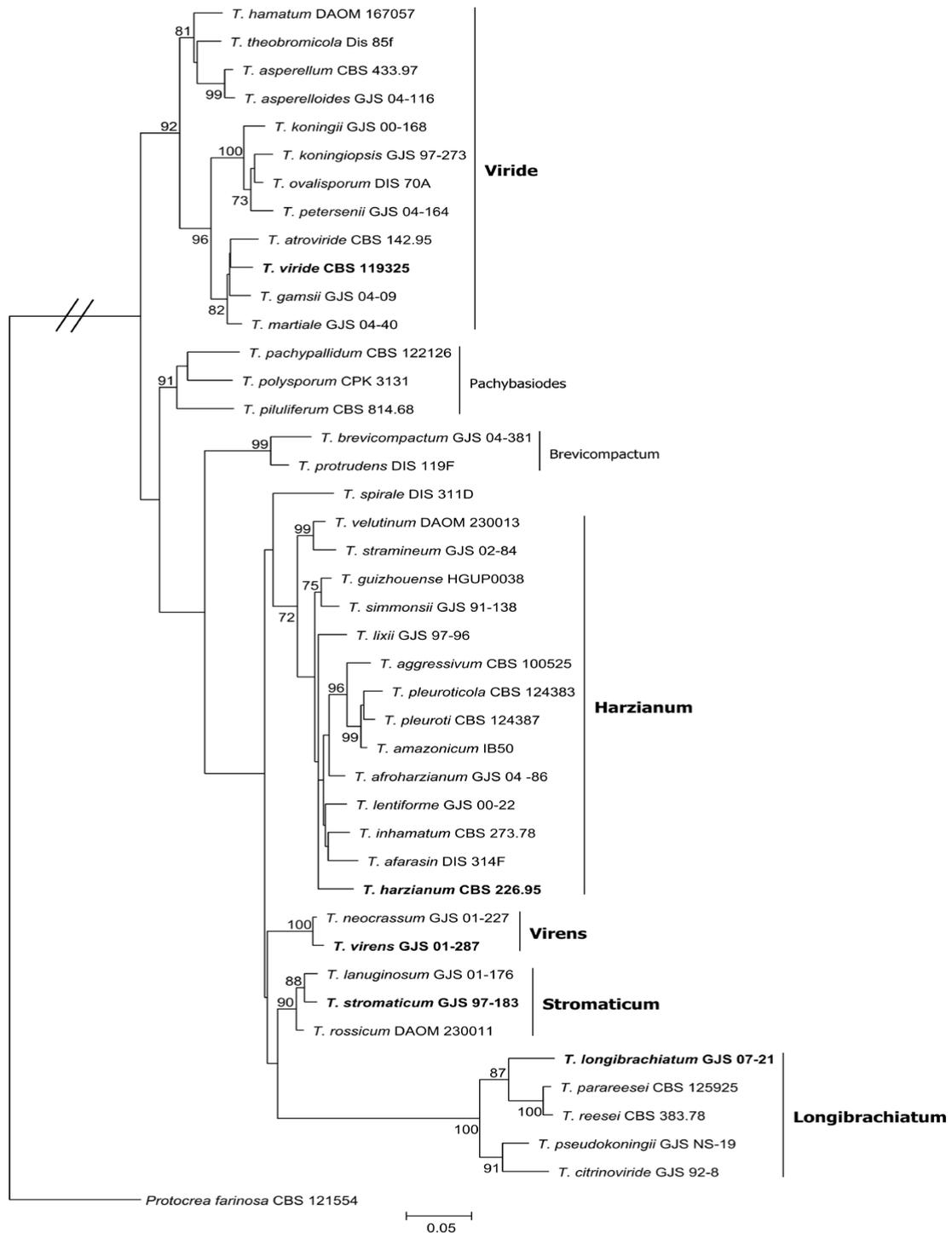
Las secuencias de los espaciadores internos transcritos 1 y 2 entre las regiones codificantes de las subunidades de ARN ribosomal 18S y 28S amplificaron fácilmente y se usaron para los primeros estudios de caracterización filogenética y molecular de hongos incluido *Trichoderma*. Sin embargo, esta región está muy conservada y no proporciona suficiente resolución para delimitar especies estrechamente relacionadas con *Trichoderma* y otros ascomicetos, aunque se considera una región de código de barras universal para la identificación de hongos (Shoresh et al., 2005, pp.76-79).

Aunque se han identificado diferentes especies filogenéticas que pertenecen a importantes grupos de especies, como las de los clados *hamatum* y *viride* no pueden separarse por ITS. Los genes que se encargan de codificar proteínas y enzimas con funciones conservadas en eucariotas contienen más polimorfismos, principalmente en regiones de intrones, y brindan una mejor resolución para la delimitación de especies. Una vez que la especie filogenética ha sido identificada por análisis multi-loci, es posible hacer la inferencia inversa y verificar que, entre los genes empleados para la filogenia, que exista un gen que sea capaz de identificar a todos o la mayoría de los genes identificados en el análisis general de varios genes. Este gen se puede utilizar como código de barras para la identificación molecular de cepas, comparándolo con secuencias de referencia de especies conocidas y disponibles públicamente, como en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica, empleando la herramienta BLAST (Conrado et al., 2019, p.538).

Una interrogante acerca de identificación molecular es un procedimiento a aplicar cuando no se puede obtener el 100% de identidad de la secuencia de interés con la secuencia de referencia en la base de datos. Un identificador en el rango del 99% para *tef1* y *rpb2*, y que coincida con un nombre único en la base de datos, aún puede considerarse un identificador positivo. En de valores menores al 99% de identidad (asumiendo que existe una buena cobertura de la secuencia objetivo y el valor estimado del parámetro E-value es cercano a cero) y cuando el investigador desea tener una confirmación de mayor certeza, se propone la composición de un alineamiento múltiple con secuencias *rpb2* y/o *tef1* de las cepas a identificar y las cepas de referencias de especies cercanas a las obtenidas en los resultados del GenBank, seguido de la ejecución del análisis filogenético con protocolos comúnmente empleados en la taxonomía de *Trichoderma* (Chaverri et al., 2015: pp.558-568).

Existen una carencia de intrones en la región *rpb2* en un rango común y fácil de secuenciar, por esta razón, se utiliza para deducir filogenias globales, con especies de los diferentes clados de un solo árbol. Por el contrario, *tef1* posee una mejor resolución para separar especies estrechamente relacionadas, pero esta no es un área fácil de alinear cuando se incorporan especies muy distintas en el mismo análisis (Jaklitsch, 2011, pp.40-50).

La filogenia simplificada del género *Trichoderma* apoyada en secuencias de la región rpb2, se expone en la (**Figura 1-1**) incluye clados con representantes de especies usualmente aisladas del suelo y restos de plantas, así como aquellas especies comúnmente utilizadas en el biocontrol de enfermedades de las plantas.



**Figura 1-1.** Árbol filogenético con consecuencias parciales de rpb2 de aislados representativos de *Trichoderma* spp.

Fuente: Conrado et al., 2019

### 1.3.1.7 Especies de interés dentro de algunos clados

#### Clado *harzianum*

La morfoespecie que se emplea generalmente en el control biológico de enfermedades de las plantas en todo el mundo es *Trichoderma harzianum* (Woo et al., 2014), además destaca en estudios de diversidad de especies en suelos y restos de plantas en diferentes regiones geográficas. No obstante, el concepto de esta especie se define tradicionalmente, incluye muchas especies filogenéticas, algunas verdaderamente cosmopolitas y otras más restringidas, conformando el clado *harzianum* (Chaverri et al., 2015: pp.569-575). Por lo tanto, muchos aislamientos identificados como *T. harzianum* en la literatura pueden describirse mejor como *T. harzianum lato sensu*, en otras palabras, utilizando términos taxonómicos.

Existen poblaciones recombinantes dentro del clado *Harzianum*, dicho de otra forma, existen especies biológicas y también poblaciones clonales, además de algunas líneas filogenéticas solitarias que difieren de otras, lo que dificulta la aplicación de un concepto único de linaje único para identificar especies (Druzhinina et al., 2011: p.3453). Una nueva exploración taxonómica del clado *Harzianum* planteó el reconocimiento de decenas de especies, determinadas según criterios de correlación genealógica (Chaverri et al., 2015: pp.573-582), y a partir de entonces se han detallado nuevas adiciones (Jaklitsch, 2015, pp.51-79-). El grupo monofilético que contiene el material biológico empleado como neotipo de la especie se conservó como *T. harzianum stricto sensu*, y se fijaron otros nombres a las especies filogenéticas restantes. En una muestra de casi doscientos aislamientos del clado *Harzianum*, de diferentes sustratos y regiones, se identificaron ciertos patrones biogeográficos (Chaverri et al., 2015: pp-574-581).

*Trichoderma harzianum stricto sensu* es una especie rara, distribuida principalmente en el hemisferio norte. Las especies *T. afroharzianum* y *T. guizhouense* tienen una distribución mundial y predominan en el suelo. *T. afarasin* y *T. lentiforme* generalmente ocurren como endófitos, pero también habita en el suelo, en África tropical y América tropical respectivamente. Ciertas especies son claramente endófitas, mientras que otras son predominantemente micoparásitas, incluidas especies como *T. pleurotum* y *T. aggressivum*, que se han identificado como parásitos activos en sistemas de producción de hongos comestibles. Los aislamientos que componen dos productos de control biológico vendidos en Europa y EE. UU han sido redefinidos como *T. afroharzianum*, incluida la conocida cepa T-22, que se desarrolló a partir de la fusión de protoplastos y se comercializa extensamente para el biocontrol y la estimulación del crecimiento de las plantas. Se han identificado aislamientos de otros tres productos del hemisferio norte, como pertenecientes a dos especies del clado *Harzianum*: *T. guizhouense* y *T. simonsii* (Chaverri et al., 2015, pp.582-585).

### Clado *Virens*

*Trichoderma virens* es una especie cosmopolita y varias especies asociadas forman el clado *virens*, el cual es filogenéticamente similar al clado *harzianum*. Anteriormente clasificada en el género *Gliocladium*, la especie *T. virens* es morfológicamente fácil de diagnosticar, la cual se caracteriza por la producción de conidióforos con fiálides de fusión convergentemente que le confieren una apariencia penicilada, distinta al patrón de divergencia característico de *Trichoderma*. Las esporas son de color verde, pero generalmente se encuentran introducidas en gotitas cristalinas y no se aglomeran. *T. virens*, es una especie común que habita en el suelo, además se encuentra en nidos de hormigas cortadoras de hojas en Brasil. Las cepas de *T. virens* son antagonistas de otros hongos y se han utilizado durante décadas en el biocontrol de enfermedades provocadas por patógenos del suelo, incluidos oomicetos y hongos (Harris, 1986).

### Clado *stromaticum*

Una especie que se encuentra limitada en América tropical es *T. stromaticum*, relacionada con el cacao y un parásito de *Moniliophthora perniciosa*, un patógeno de la escoba de bruja del cacao (Samuels et al., 2015: pp.38-80). Este hongo se encuentra comúnmente en ramas muertas y retamas, hojas podridas y frutos momificados. Se hicieron descripciones tanto de las fases asexual como sexual de *T. stromaticum* a partir de componentes aislados de regiones productoras de cacao en Brasil, y la utilización de esta especie para el manejo del cacao. Varias especies conjuntamente con *T. stromaticum* rigurosamente asociadas forman el clado *stromaticum* (Samuels et al., 2015: pp.81-85).

### Clado *viride*, *hamatum* y *koningii*

*Trichoderma viride* stricto sensu es una especie que pertenece a un gran clado que incluye decenas de especies con diferentes morfotipos, incluyendo el patrón *viride* que posee conidios de forma globulares y de paredes rugosas y conidióforos piramidales. *Koningii* presenta conidios oblongos a elipsoidales, y el patrón *hamatum* con fiálides subglobosas en forma de pequeños agregados y conidióforos con puntas alargadas. De acuerdo a la gran cantidad de especies filogenéticas presentes en el clado *viride*, se puede dividir en diversos subclados, cada uno de los cuales contiene docenas de especies, como los subclados *viridescens*, *viride*, *koningii* y *hamatum* (Jaklitsch, 2011, pp.80-92).

La especie *Trichoderma atroviride* se encuentra ubicada en medio de los subclados *viride* y *Koningii* y se empleó como guía en estudios genómicos del fenotipo micoparásito. De los subclados *viride*, *viridescens*, *koningii* de los cuales se ha expuesto la mayor parte de la diversidad de especies procede de colectas realizadas en EE. UU y Europa, de manera que se cree común en el Hemisferio Norte. Dentro de las excepciones a este modelo es *T. koningiopsis*, que está ampliamente distribuida y es frecuente en los trópicos, donde se localizan en muestras de suelo, hojarasca y como endófitos. La especie *T. ovalisporum* perteneciente al subclado *koningii* con ocurrencia neotropical y hábito característico de los endófitos (Samuels y Hebbar, 2015: pp.88-95).

Dentro del subclado *hamatum* se localizan las siguientes especies: *T. asperelloides* y *T. asperellum*, dos especies hermanas relacionadas filogenéticamente, con morfología similar, pero patrones fisiológicos y moleculares diferentes. Dichas especies son habitantes comunes del suelo en el Neotrópico (Hoyos-Carvajal et al., 2009), además son micoparásitos agresores y pueden causar resistencia sistémica en las plantas (Shoresh et al., 2005: pp.80-82).

#### Clado *longibrachiatum*

Este clado *longibrachiatum* se encuentra constituido por un grupo sólido dentro de la filogenia del género y tienen en común características morfológicas que abarcan la formación de conidióforos con ramas dispersas y una disposición irregular de las fiálides a lo largo de las ramas y del eje principal. *Trichoderma reesei* se caracteriza por ser una especie saprofita con una extensa capacidad para degradar sustratos celulósicos. Un aislado de esta especie ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas celulolíticas, a nivel de escala industrial, a partir del siglo XX (Martínez et al., 2013, pp.2-6). Las especies pertenecientes a este clado son mesófilas, aptas para crecer de manera acelerada y esporular hasta temperaturas de 40° C. Por esta característica, los aislamientos de varias especies pertenecientes a este grupo pueden causar enfermedades o infecciones oportunistas en sujetos inmunodeprimidos, en particular *T. citrinoviride*, *T. bissetii*, y *T. longibrachiatum* stricto sensu (Druzhinina et al., 2008: p.3456).

#### 1.3.1.8 Control de calidad de producciones de *Trichoderma*

Los parámetros que se evalúan para la calidad de producción de *Trichoderma* spp. son basados en: Medio de cultivo: Esterilidad, pH y Materias primas. Inóculo: Pureza, viabilidad y concentración. Incubación: Temperatura del cuarto de crecimiento, Control de producto: Pureza, pH, concentración conidios/mL, características del cultivo, efectividad biológica por bioensayo (cultivo dual), Almacenamiento: Control de temperatura y tiempo de estabilidad (Fernández, 2013, pp.364-365).

### 1.3.1.9 Capacidad antagonista

*Trichoderma* spp. tiene la facultad de ser un hongo altamente antagonista. Esta capacidad está sujeta a la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; por consiguiente, pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de cierto patógeno que de otro y, es por ellos que se debe evaluar la especificidad. Además, en las interacciones antagónicas pueden estar involucrados diferentes mecanismos de acción. La diversidad de estos en un aislamiento es una propiedad importante para su elección como agente de control biológico (Martínez, 2013, p.7).

### 1.3.1.10 Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Los mecanismos de biocontrol que se le atribuyen a *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, es importante recalcar que el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción de este hongo. El hongo es revestido por este biocontrolador, el cual agrede y se introduce en las células provocándole un deterioro significativo, afectando y deteriorando la pared celular, provocando desorden del citoplasma y contracción de la membrana plasmática (Guédez et al., 2009). La habilidad que tienen los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas beneficia a estos mecanismos. Varios escritores han propuesto diferentes mecanismos responsables de su acción biocontroladora, incorporando también la producción de compuestos inhibidores y la secreción de enzimas (Infante et al., 2015: pp.89-91).

Asimismo, se conoce que el género *Trichoderma* manifiesta otros mecanismos, su acción biorreguladora es de manera indirecta. Además, se puede citar mecanismos que inducen o elicitan defensas fisiológicas y bioquímicas como es el caso de la activación de compuestos asociados con la resistencia (Inducción de Resistencia) en las plantas, con la detoxificación de toxinas secretadas por el patógeno y la inactivación de sus enzimas durante el proceso de infección; la solubilización de nutrientes, no son accesibles para las plantas en su forma original. El mecanismo de capacidad podría crear un entorno propicio para el crecimiento de las raíces, ayudando a extender la tolerancia de la planta al estrés (Infante et al., 2015: p.10).

### 1.3.1.11 Micoparasitismo

Al tratar el mecanismo llamado micoparasitismo se puede decir que es un proceso dificultoso que comprende eventos secuenciales, incluido el reconocimiento, el ataque y la posterior penetración y muerte del huésped, es decir, es el ataque directo de un hongo a otro. *Trichoderma* spp. puede ejercer un control biológico directo parasitando una variedad de hongos, detectando otros hongos y creciendo hacia ellos. Se cree que los hongos secretan exoquitinasas de forma constitutiva a

niveles bajos. Cuando las quitinasas degradan las paredes celulares de los hongos, liberan oligómeros que inducen exoquitinasas y comienza el ataque (Benítez et al., 2004).

Para Martínez (2013) se refiere a un proceso de gran complejidad en la interacción antagonista-patógeno, que se lleva a cabo en cuatro etapas, las cuales son: Crecimiento quimiotrófico donde *Trichoderma* spp. puede detectar a distancia a sus potenciales huéspedes, Reconocimiento: Se considera que existe una elevada especificidad del antagonista por el sustrato. La Adhesión y enrollamiento: ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno. Actividad lítica: Que hace relación al rendimiento de las enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente glucanasas, quitinasas y proteasas, que reducen la pared celular del patógeno y permiten la entrada del micelio de *Trichoderma* spp.

#### 1.3.1.12 Antibiosis

Aquellos metabolitos que son secretados por el hongo *Trichoderma* spp y que poseen actividad antifúngica. Compone un grupo de compuestos tanto volátiles como no volátiles, bastante distinto en cuanto se refiere a estructura y función. Una alta cantidad de cepas de *Trichoderma* spp. originan compuestos metabolitos secundarios, algunos de estos inhiben a otros microorganismos, en donde no se ejerce contacto físico. En otras palabras, se puede decir que este mecanismo se hace presente durante interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagonizados; entre estos metabolitos, se ha descrito la producción de ácido harcianico, alamecinas, tricolina, peptaibols, antibióticos, 6-pentil-a-pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico y otros. En algunos casos, la producción de antibióticos se correlaciona con la capacidad de control biológico y los antibióticos purificados imitan el efecto de todo el agente (Benítez et al., 2004).

#### 1.3.1.13 Competencia por los nutrientes

*Trichoderma* posee una gran capacidad para transportar y absorber nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en la capacidad de *Trichoderma* para obtener ATP a partir del metabolismo de diferentes azúcares, como los derivados de polímeros muy extendidos en ambientes fúngicos: celulosa, glucano y quitina entre otros, todos ellos dando glucosa. Los componentes clave del metabolismo de la

glucosa incluyen enzimas de asimilación y permeasas, junto con proteínas involucradas en las modificaciones de la membrana y la pared celular (Benítez et al., 2004).

De acuerdo a Martínez (2013), explica que para que haya competencia es necesario que exista la escasez o limitación de un requerimiento, es por ellos, que se puede definir a la competencia como una conducta desigual de dos o más organismos frente a un requerimiento igual, solo si el empleo del mismo por uno de ellos, menore la cantidad necesaria para los otros. Cabe recalcar que al encontrarse *Trichoderma* spp. en casi todo el mundo, es una clara señal de que este hongo es un competidor extraordinario tanto por recursos nutricionales y el espacio donde se encuentra. Hierro, carbono y nitrato son los elementales en cuanto a la competencia por nutrientes de *Trichoderma*. La competencia de este antagonista se ve favorecida por algunos atributos entre los cuales se hayan: una elevada velocidad de crecimiento, así como en el microambiente los competidores son detenidos por la segregación de los metabolitos de diferente naturaleza. Este modo de acción consiste en impedir el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista.

#### *1.3.1.14 Usos de Trichoderma en la remediación de la contaminación*

Es muy posible que *Trichoderma* posea usos muy significativos a gran escala en la remediación de contaminantes tanto en suelos como en aguas. En estudios realizados en cepas de *T. harzianum* que se caracteriza por ser altamente competente en la rizosfera, se pudo conocer que perfeccionan el crecimiento de las raíces de una variedad de las plantas. Este crecimiento mejorado de la raíz, cuando se combina con una planta que hiper-acumula tóxicos, aumentará el volumen de suelo colonizados por raíces, incluida la mejora de la penetración profunda de las raíces. Otro aspecto fundamental de *Trichoderma* spp. es que en las raíces aumenta la absorción de nitratos y otros iones, inclusive pueden intensificar la absorción de varios metales tóxicos y metaloides, en consecuencia, debería ayudar a actividades fitoextractivas (Harman, 2016).

En la región de la rizosfera, algunas cepas de *Trichoderma* spp. liberan metabolitos que mejoran el crecimiento de las plántulas y también provoca resistencia al estrés abiótico. Este hongo tiene un gran potencial contra los patógenos transmitidos por el suelo y es posible que pueda reemplazar a los pesticidas químicos en un futuro próximo (Kumar y Ashraf, 2017: pp.497-453).

### 1.3.2 *Beauveria bassiana*

#### 1.3.2.1 Aspectos generales

Estos hongos mantienen una relación simbiótica con sus huéspedes vegetales. *Beauveria* segrega una cadena de enzimas y metabolitos secundarios, esto es para cumplir con las funciones ecológicas. Cabe recalcar que la aplicación de este hongo es muy codiciado para el control biológico, además varios estudios han manifestado la capacidad que posee para producir otras enzimas vitales que incorporan amilasa, asparaginasa, celulasa, galactosidasa, etc (Amobonye, 2020, pp.1019-1022).

#### 1.3.2.2 Modo de acción

El hongo es capaz de infectar a más de 200 especies de insectos. Su aspecto es polvoso, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso. En cuanto al ciclo de vida está conformado por 2 fases: la patogénica y la saprofítica (Conrado *et al.*, 2019: p.538).

#### 1.3.2.3 El desarrollo del hongo

Se pueden definir en algunas etapas:

- Adhesión. El primer contacto que se da entre el hongo entomopatógeno y el insecto ocurre cuando la espora (conidio) es almacenada en la superficie del insecto.
- Germinación. El conidio empieza el desarrollo de su tubo germinativo y un órgano sujetador denominado apresorio, que le da la potestad de fijarse a la superficie del insecto. Para que la germinación sea adecuada se necesita que la humedad relativa sea del 92 % y la temperatura este dentro del rango de 23 a 25 °C.
- Penetración. Después de la fijación mediante mecanismos y químicos, el hongo ingresa en el insecto a través de las partes blandas.
- Producción de toxinas. En el interior del insecto, el hongo tiende a ramificar sus estructuras y colonizar las cavidades de hospedante. Crea la toxina llamada Beauvericina que ayuda a despedazar el sistema inmunológico del patógeno, lo que favorece la invasión del hongo a todos los tejidos.
- Muerte del insecto. La muerte del patógeno y fin de la fase parasítica, da origen al comienzo de la fase saprofítica.
- Multiplicación y crecimiento. Seguido de la muerte del insecto, el hongo incrementa sus unidades infectivas llamadas hifas y estas de manera sincrónica crecen, acabando por invadir

todos los tejidos del insecto y convirtiéndose en resistente a la descomposición, supuestamente por los antibióticos segregados por el hongo (Conrado *et al.*, 2019: p.538).

#### 1.3.2.4 Aplicaciones en campo

El hongo debe ser aplicado en condiciones aptas de medio ambiente como temperatura, humedad, así también como la presencia de los hospederos. Entre las formas de aplicación se pueden encontrar: la más común es aplicaciones foliares, uso de trampas con organismos inoculados con el hongo, añadiendo feromonas para atraer a las plagas; y, a través del riego en “drench” (Conrado *et al.*, 2019: p.538).

### 1.3.3 *Metarhizium*

#### 1.3.3.1 Aspectos generales

El hongo *Metarhizium anisopliae*, forma parte de los hongos más usados en cuanto a control biológico, ya que ha demostrado ser muy efectivo en el control de plagas de insectos como palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) si hablamos de cómo se suministra en los campos de cultivos, la respuesta es en forma de spora, que genera una hifa infectiva, un tubo que por presión mecánica y degradación enzimática rompe la cutícula del insecto y penetra hasta llegar a la hemolinfa (Navarro, 2018).

#### 1.3.3.2 Importancia

Los hongos patógenos de invertebrados del género *Metarhizium* se encuentran comúnmente en todo el mundo, existe evidencias de que algunas cepas han progresado llegando a actuar como bioplaguicidas y muchas otras han mostrado potencial para controlar importantes plagas de insectos (Glare, 2021, pp.440-448).

#### 1.3.3.3 Balance biológico

El objetivo de realizar aplicaciones de *Metarhizium anisopliae* en campo, es para implantar un control biológico, o en otras palabras se refiere a conservar un balance entre los organismos para que los insectos no se conviertan en plagas. El hongo se utiliza en forma integral, combinado con otras formas de control efectivas y menos contaminantes, como trampas y rotación de cultivos, para así limitar el uso de los insecticidas químicos que en gran medida son nocivos para los ecosistemas y la salud humana (Padilla, 2018, pp.84-87).

## **1.4 Métodos de aislamiento y caracterización de antagonistas fúngicos.**

### **1.4.1 *Aislamiento de microorganismos***

El aislamiento se refiere a la separación de cierto microorganismo de los demás que se encontraban junto a él. Se dice que el método más utilizado es el método de siembra por estría en un medio de cultivo sólido en la caja Petri. El triunfo del aislamiento consiste en realizar la mayor cantidad de estrías posibles, con lo cual se asegure un cierto número de células que estén lo suficientemente separadas para su estudio (Samaniego, 2018).

### **1.4.2 *Caracterización de microorganismos***

Desde el punto de vista investigativo se puede definir a la caracterización como una fase de descripción, con el objetivo de identificar los atributos que distinguen a los microorganismos de los demás, ya sea mediante la observación de su forma, color o algún otro aspecto (Marín, 2016, pp.3-7).

### **1.4.3 *Tipo de siembra:***

#### ***1.4.3.1 Dilución***

La dilución se lleva a cabo, generalmente, por alguno de los siguientes sistemas:

- Siembra por estría en placa

El proceso se los realiza en una zona estéril, junto al mechero y abriendo la caja sólo si fuera necesario. Procedimiento: a) Esterilizar el asa de siembra como se ha indicado y tomar una asada de la muestra mixta. b) Colocar la caja de Petri sobre la palma de la mano, no abrir completamente la caja. c) Distribuir el inóculo en el borde del agar y realizar una estría sin despegar el asa, evitando perforar el agar. d) Cerrar la caja y esterilizar el asa. e) Finalmente sellar y etiquetar con marcador indeleble la caja (medio de cultivo utilizado, muestra empleada, No. de equipo, sección y fecha) y finalmente incubar la caja de manera invertida (Ávila et al., 2014).

#### ► Vertido en placa

Esta técnica se emplea para aislar microorganismos o para realizar un recuento en una muestra de interés, se debe tener la muestra homogenizada, seguidamente con la pipeta se toma una alícuota de la muestra diluida y se la deposita en el centro de la caja Petri, se cierra la caja Petri, después se vierte el agar que se encontraba en un baño de agua, se procede a tapar la caja y se hace homogenizar el agar con el inóculo realizando movimientos suaves. Esta técnica tiene la finalidad de obtener colonias aisladas para la obtención de un cultivo puro, o bien para la cuantificación (Urzúa, 2014).

#### ► Extensión en placa

Las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa estéril. Esta suspensión es absorbida por el agar, dejando las células microbianas en la superficie. Las placas se mantienen en incubación hasta la aparición de las colonias. En el método de siembra por estría, no hay la seguridad de que las colonias que se muestran en las placas sembradas por extensión o en el agar gelificado sembrado por el método del vertido en placas sean cultivos axénicos hasta que se vuelva hacer el proceso. Las 2 técnicas de siembra por dilución exponen la ventaja de permitir obtener un mayor número de colonias aisladas que el método de siembra por estría, es por ello que se eligen cuando se desea seleccionar una cepa a partir de una mezcla con varios tipos de microorganismos (Santana, 2020).

#### *1.4.3.2 Centrifugación*

El método por centrifugación consiste en que se pueden separar sólidos de líquidos de distinta densidad mediante una fuerza centrífuga. La centrifuga impulsa a una mezcla a experimentar un movimiento rotatorio con una fuerza de mayor intensidad que la fuerza gravitacional, ocasionando la sedimentación del sólido o de las partículas de mayor densidad (Fuentes, 2015).

#### *1.4.4 Medios de cultivo*

Son aquellas formulaciones de sustancias que contienen compuestos naturales y/o sintéticos, en forma líquida, sólida o semi-sólida cuyo propósito es permitir la multiplicación, o preservar la viabilidad de microorganismos (Enríquez, 2016, pp.6-8).

#### 1.4.4.1 *Papa dextrosa agar (PDA)*

Se trata de un medio muy utilizado que sirve para aislar todo tipo de hongos. Se prepara a partir de infusión de papa y dextrosa. La base que posee el medio es altamente nutritiva, facilita el crecimiento de hongos y levaduras, también permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. El agar es adicionado como agente solidificante (Nuñoa, 2015).

#### 1.4.4.2 *PDA enmendado*

Es considerado un medio modificado, a este PDA se le puede añadir antibióticos, ácidos y fungicidas en el caso de *Trichoderma* puede darse un crecimiento dentro de un medio que contenga fungicida. Este medio es recomendado también para realizar recuentos y para el cultivo de hongos y levaduras de importancia clínica (Nuñoa, 2015).

#### 1.4.4.3 *Medio selectivo de Trichoderma (TSM)*

El TSM es el medio que se estandarizó y se enriqueció para el aislamiento de *Trichoderma*, además, es utilizado para la producción de esporas (Stocco et al., 2015: pp.2-4).

#### 1.4.4.4 *Medio rosa de bengala*

El agar rosa de bengala es un medio de cultivo selectivo para el recuento de hongos filamentosos y levaduras en alimentos de acuerdo a la Norma ISO 21527-1. Delimita notablemente el desarrollo de la colonia de los hongos filamentosos de esta manera se refrena que el crecimiento exacerbado de algunas colonias enmascara a las más lentas y, al mismo tiempo, favorece el recuento (Condalab, 2019).

### 1.4.5 ***Métodos de preservación***

#### 1.4.5.1 *Método Castellani*

Al método Castellani se lo denomina cultivo en agua o llamado también inmersión en agua destilada estéril, posiblemente es la técnica más sencilla para la conservación de las cepas de hongos; Se puede decir que es un método ideal para pequeñas colecciones o laboratorios con bajos recursos, aunque también ha sido utilizado por las grandes colecciones del mundo desarrollado. Resulta beneficioso prácticamente para todos los hongos patógenos porque ha logrado conservar la viabilidad, pureza y estabilidad por períodos de más de 20 años. Entre las ventajas del método

se pueden citar el descenso de la tendencia al pleomorfismo por parte de ciertas especies de hongos, evade el ataque de los ácaros, es un método fácil y de bajo costo, que no necesita de personal especializado y garantiza en gran medida la viabilidad y las características de los cultivos, lo que lo convierten en un atractivo método para muchos laboratorios. Otra ventaja importante es que permite la manipulación de las formas filamentosas de los patógenos dimórficos con un menor riesgo (Fernández, 2013, pp.366-367).

#### *1.4.5.2 Método de glicerol a -20°C*

El glicerol es considerado el mejor crioprotectante para la criopreservación de los cultivos provenientes de luz blanca, este método evita la congelación del agua y ayuda a mantener por más tiempo los hongos (Romero, 2015, pp.30-33).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Materiales y métodos

##### 2.1.1 Características del lugar

###### 2.1.1.1 Localización

Las muestras fueron colectadas en la provincia de Galápagos el detalle de las localidades se encuentra en la siguiente tabla:

**Tabla 2-2:** Listado de las localidades y el tipo de cultivo en el Cantón Santa Cruz

PROCEDENCIA:		ISLAS GALÁPAGOS			
CANTON	SECTOR	COORDENADAS		TIPO DE CULTIVO	CODIGO
		X	Y		
Santa Cruz	Camino Viejo	798390	9922506	Cultivo de hoja Kale (muestra 1)	PTGM1A
Santa Cruz	El Cascajo	884571	9985470	Melón (muestra 1)	PTGM2A
Santa Cruz	Media Luna	797600	9924212	Café ( <i>var. Catimor</i> )	PTGM3
Santa Cruz	La Fortuna	797600	9924212	Café ( <i>var. Típica</i> )	PTGM4
Santa Cruz	El Cascajo	884571	9985470	Tomate	PTGM5
Santa Cruz	Media Luna	797600	9924212	Maíz Amarillo (muestra 1)	PTGM6B
Santa Cruz	Media Luna	797600	9924212	Bosque no intervenido (muestra 1)	PTGM7A
Santa Cruz	El Cascajo	884571	9985470	Pimiento	PTGM8

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

El aislamiento y la caracterización se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

### 2.1.1.2 *Ubicación geográfica*

El Laboratorio de fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) se encuentra ubicado en la Panamericana Sur km 1 1/2, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

Altitud: 2850 m. s. n. m.

Longitud: 78° 40' 59'' W

Latitud: 01° 38' 51'' S

(Negrete y Arévalo, 2014)

## 2.2 **Materiales y equipos**

### 2.2.1 *De escritorio*

- Computadora
- Impresora
- Regla
- Lápices
- Borradores
- Carpeta
- Cuaderno de apuntes
- Esferos
- Papelería en general
- Marcadores
- Tijeras
- Cinta

### 2.2.2 *De Laboratorio*

#### 2.2.2.1 *Materiales*

- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Cubre y porta objetos
- Pinzas

- Envases de muestras
- Puntas de micropipetas (1000, 100, 10  $\mu$ L)
- Varilla
- Matraz Erlenmeyer
- Fundas ziploc
- Etiquetas
- Jeringas
- Calibrador
- Sacabocados
- Asas
- Algodón
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Canastilla
- Gradilla
- Probeta
- Cinta masking
- Fosforera
- Libreta de apuntes
- Cinta parafilm
- Palillos
- Sorbetes
- Sobres de manila
- Mascarilla
- Alcohol

#### 2.2.2.2 *Insumos*

- Cloroformo-Alcohol-Isoamílico (24:1)
- Isopropanol (frío)
- Lacto glicerol
- Chloranfenicol al 5 %
- Etanol al 70% (frío)
- Alcohol al 75 %
- Sulfato de estreptomicina al 1%

- Solución de lisis nuclear (Promega Wizard®)
- Solución de precipitación de proteínas (Promega Wizard®)
- Solución de rehidratación de ADN (Promega Wizard®)
- RNasa (Promega Wizard®)
- Enzima GoTaq Colorless Master Mix, 2x (Promega Wizard®)
- Agua destilada estéril
- Agente intercalante UniSafe DYE (20.000X)
- Gel Loading buffer
- Marcador molecular

#### 2.2.2.3 Medios de cultivo

- Papa Dextrosa Agar (PDA Difco™) (Tabla 3-2)
- Papa dextrosa agar enmendado (PDAE) (Tabla 3-2)
- Medio selectivo de *Trichoderma* (TSM) (Tabla 3-2)
- Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Anexo L)
- Rosa de bengala (RB) (Tabla 3-2)
- Agar harina de maíz (AHM OXOID)
- Agar avena (Anexo M)
- Agua-agar (AA BIOCEN)

#### 2.2.2.4 Equipos

- Autoclave vertical (HIRAYAMA MANUFACTURING CORP.)
- Balanza analítica (RADWAG)
- Vórtex (FISHER SCIENTIFIC)
- Agitador magnético (COLE-PARMER)
- Cámara de flujo laminar (BIOBASE)
- Incubadora (MEMMERT)
- Incubadora (BIOBASE)
- Mechero de Bunsen
- Destilador de agua (BOECO)
- Baño María (STABLETEMP)
- Estereoscopio
- Microscopio óptico (CARL ZEISS)

- Secadora de vidrio (J.P.SELECTA, s.a.)
- Agitador shaker (COMECTA-IVYMEN)
- Centrífuga (EPPENDORF)
- Cámara fotográfica (CANON)
- Micropipeta (1000,100,10 µL)
- Cámara de conteo de Neubauer (HIRSCHMANN®)
- Termociclador (EPPENDORF)
- Transiluminador (Fisher Scientific 88A)
- Ultracongelador (BIOBASE)

## 2.3 Metodología

### 2.3.1 Aislamiento de hongos antagonistas de suelo

Se realizó el aislamiento en muestras de suelo recolectadas en los suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos. En donde se procedió a utilizar 4 medios de cultivo (**Tabla 3-2**) con 3 repeticiones por cada medio de cultivo (solución madre, dilución y centrifugación), dando un total de 288 cajas utilizadas para las 8 muestras analizadas.

**Tabla 3-2:** Medios de cultivo utilizados para el aislamiento

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
PDA	papa dextrosa agar	44
	papa dextrosa agar	44
PDAE	Rosa de bengala	0,02
	Chloramphenicol	0,3
RB	Rosa de bengala	32
	Sulfato de Mg	0,2
	Fosfato de K	0,9
	Cloruro de K	0,15
TSM	Nitrato de amonio	1
	Glucosa	3
	Chloramphenicol	0,25
	Terraclor	0,2
	Rosa de bengala	0,15
	Agar	20

Fuente: (Samuels et al., 2015)

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Las muestras fueron tomadas y vertidas individualmente, en bolsas ziploc, se sellaron y se llevaron al Laboratorio para su conservación en frío, hasta el momento de su procesamiento (Samaniego, 2018).

Se tomó 27,7 g de suelo y se preparó la solución madre, en la cual se colocó por cada gramo de suelo 9 mL de agua. Las siembras se conservaron bajo condiciones de laboratorio, fueron revisadas cada día con el objetivo de observar la presencia de micelio característico de *Trichoderma* spp. cuyas características son: micelio algodonoso y compacto de acuerdo van envejeciendo; al existir carencia de luz el micelio se torna de color blanco algodonoso; en cambio, con presencia de luz se da la esporulación, esta es notoria presentando un color verdoso y en algunos casos tienen apariencia de anillos en forma concéntrica. Cuando se realizó la observación de las muestras se buscó: fiálides, micelio septado, esporas, clamidosporas y conidios, y se corroboraron con claves taxonómicas de Samuels et al., (2015).

### 2.3.2 *Caracterización macroscópica de los hongos antagonistas*

Una vez que se obtuvo el crecimiento de los hongos luego de transcurridos 10 días de la incubación, se procedió a la purificación, mediante repiques continuos. Para ello, se seleccionó con base en las distintas morfologías de las colonias, una fracción de micelio independiente empleando un asa bacteriológica, y se realizó la siembra mediante discos de 7 mm en una placa con medio PDA fresco. Este procedimiento debió ser repetido cada tres o cinco días, hasta la obtención de colonias independientes (morfología en colonia única y consistente). Además, para la caracterización morfológica las cepas de *Trichoderma* spp. se identificaron siguiendo la guía de Samuels et al., (2015).

#### 2.3.2.1 *Obtención de cultivos monospóricos*

Se utilizó la metodología según Alfenas (2016) con las siguientes modificaciones, se procedió a tomar una fracción de micelio procedente de las cajas de repique y con la ayuda de un palillo se colocó el micelio dentro del tubo de ensayo que contenía agua destilada, se agitó hasta que la solución se mezcló para luego verter el contenido del tubo en una caja petri con medio agar-agua al 2%, pH a 5.6, seguidamente se desechó el líquido y los fragmentos de micelio, se selló la caja y se conservó durante un día verticalmente. Finalmente, una vez que las esporas fueron observadas en el microscopio estereoscopio, se seleccionó una sola espora y se sembró en una nueva caja Petri y se incubó por una semana a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ .

### *2.3.2.2 Caracterización cultural de hongos antagonistas*

Se tomó como punto de partida los cultivos monospóricos, y se procedió a realizar cortes de discos de micelio de 7mm diámetro, el cual se transfirió a cajas Petri con medio PDA, además de adicionarle antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% y Chloranfenicol al 5%), se incubaron a 25 °C ± 1. Además, se llevó un registro fotográfico y periódico de la morfología en las cajas Petri, se determinó la tasa de crecimiento micelial (mm/día) cada 24 h, el color de las colonias, su pigmentación y la textura.

### *2.3.3 Caracterización morfológica*

#### *2.3.3.1 Microcultivo de hongos antagonistas*

Para la observación y diferenciación microscópica de los hongos, fue necesario seguir con el método propuesto por Harris (1986), que se asemeja a la actividad que se describe a continuación: en la cabina de flujo laminar, se prepararon las cajas Petri con una base de papel secante y con sorbetes en forma de “A” que sirvieron de base a un portaobjetos, las placas para microcultivo consistieron en sumergirlas dentro del medio y luego se tomó una pequeña fracción de micelio con un palillo que fue cubierta con un cubre objeto, rotulada, sellada con esmalte y se incubó de dos, tres y cinco días, este proceso se lo realizó dentro de la cabina de flujo laminar.

#### *2.3.3.2 Montaje de placas*

En la placa porta objeto se colocó una gota de lactoglicerol, seguidamente con ayuda de una cinta scotch se tomó una pequeña cantidad de micelio de la caja y luego se procedió a colocar la cinta en la placa para su posterior observación bajo el microscopio.

#### *2.3.3.3 Conservación de los hongos antagonistas*

Se procedió a la conservación de los hongos, mediante la colocación de discos de micelio en microtubos con agua estéril (Método de Castellani). Se cortó discos de 7 mm con la ayuda de sorbetes y luego se colocaron dentro de los tubos.

### 2.3.4 **Identificación molecular de las cepas obtenidas mediante PCR.**

#### 2.3.4.1 *Obtención de micelio para extracción de ADN genómico*

Después de obtener los aislados puros se caracterizaron y se seleccionaron. La biomasa de los hongos filamentosos se obtuvo utilizando un medio líquido descrito a continuación, para ello, se tomó discos de micelio de 7 mm y se sembró en tubos de ensayo y cajas Petri con medio líquido (**Tabla 4-2**). Los tubos fueron incubados a  $\pm 25^{\circ}$  durante 336 h.

**Tabla 4-2:** Composición del medio líquido

MEDIO LÍQUIDO		
COMPONENTE	CANTIDAD	UNIDAD
Sacarosa	10	g/L
Asparagina	2	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,44	mg/L
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,48	mg/L
MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,36	mg/L
Agar	0,25	g/L

Fuente: (Samuels et al., 2015)

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

#### 2.3.4.2 *Extracción del ADN genómico*

Se realizó la extracción del ADN genómico para la caracterización molecular de *Trichoderma* spp. con la ayuda del Kit Promega Wizard® de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

Se tomó una pequeña cantidad de micelio macerado del tubo y se transfirió a microtubos de 1,5 mL. Posteriormente se adicionaron 600  $\mu$ L de solución de lisis nuclear y se agitó en el vórtex por 3 s y después se incubó a 65  $^{\circ}$ C por 15 min, invirtiendo los tubos cada 5 min.

Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L solución de precipitación de proteína, colocando en el vórtex por 20 s, seguido se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. Con el precipitado de proteínas se formó un pellet, seguidamente se traspasó el sobrenadante (600  $\mu$ L) conteniendo ADN para un nuevo microtubo (1,5 mL), se agregaron 600  $\mu$ L de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1) se colocó en el vórtex por 20 s. Luego se centrifugó por 8 min a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante ( $\pm$  600  $\mu$ L) conteniendo el ADN para un nuevo microtubo.

Después se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío cuidadosamente mezclando la solución invirtiendo los tubos. Luego se dejó la solución en el congelador por 10 min, finalmente se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 10 min.

Observando que existió la formación del pellet se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Seguidamente se procedió a realizar dos lavados con etanol al 70% frío, en los dos lavados se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min.

Seguidamente se desechó el etanol y se dejaron los tubos con la tapa abierta y de forma horizontal sobre el papel toalla para el secado del pellet.

Finalmente, después de casi 15 horas, se resuspendió el pellet con 50  $\mu\text{L}$  de TE y 2  $\mu\text{L}$  de RNasa en cada tubo, se incubó a 37° C por 5 horas y se almacenó el ADN a -20°C hasta su posterior uso.

#### 2.3.4.3 PCR

Para la identificación molecular de los diferentes morfotipos obtenidos, se empleó la técnica de amplificación cadena del ADN polimerasa (PCR), con los primers descritos a continuación:

**Tabla 5-2:** Primers utilizados en la PCR

Nombre	Gen Amplificado	Secuencia
Forward 10 $\mu\text{M}$ frbp25f	RNA Polimerasa subunidad 2	5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3'
Reverse 10 $\mu\text{M}$ 7CR	(Rpb2)	3'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-5'

Fuente: (Samuels et al., 2015)

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Para la elaboración del mix de la reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

6,25  $\mu\text{L}$  GoTaq® Colorless Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  (pmol) primer forward (frbp25f), 1  $\mu\text{L}$  (pmol) primer reverse (7CR) y 2,25  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura estéril. Para realizar la PCR las muestras se prepararon con el proceso expuesto a continuación:

Se colocó en tubos de 0,2 mL un volumen del mix de 11,5  $\mu\text{L}$  más 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico, dando un volumen total de 12,5  $\mu\text{L}$  por cada reacción de PCR, el control negativo de la PCR se lo realizó sustituyendo el ADN por agua ultra pura estéril y se colocaron los tubos en el termociclador EPPENDORF modelo vapo.protect con el siguiente programa:

- a. Desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min.
- b. 38 ciclos de:
  - Desnaturalización 95 °C por 1 min.
  - Alineación 53 °C por 2 min.
  - Extensión 72 °C por 2 min.
- c. Extensión final 72 °C por 10 min.

Finalmente, se almacenó los productos de PCR a -40°C en el ultracongelador.

#### *2.3.4.4 Electroforesis*

Para comprobar la amplificación de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1%, adicionando el agente intercalante de ADN UniSafe Dye Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (5 µL en 100 µL de agarosa) en el gel, usando Tris borato EDTA (TBE) a una concentración 1X en agua destilada estéril.

Se procedió a verter la solución en la cuba para la formación del gel, además se colocó las vinchas para que se formaran los pocillos. Una vez gelificada la solución se vertió la solución buffer TBE y luego las muestras de los productos de PCR fueron cargadas en los pocillos en un volumen de 2 µL con 3 µL de buffer de carga. Después de la electroforesis los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador marca Fisher Scientific 88A.

#### *2.3.4.5 Secuenciación.*

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados usando la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN KOREA.

#### *2.3.4.6 Análisis de secuencias*

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas 2.6.6 y BLASTn del NCBI. Primero, se verificó la calidad de las secuencias por revisión de los cromatogramas en el programa Chromas 2.6.6. Aquellas de buena calidad se depuraron eliminando los extremos y los fragmentos que presentaban ruido. Para la confirmación de la identidad de cada especie, con las secuencias depuradas se realizaron alineamientos de nucleótidos mediante el algoritmo BLASTn del NCBI, considerando los siguientes parámetros: % de identidad, % de cobertura, E-value contra las secuencias reportadas en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (sus siglas en inglés NCBI).

#### 2.3.4.7 *Análisis Filogenéticos*

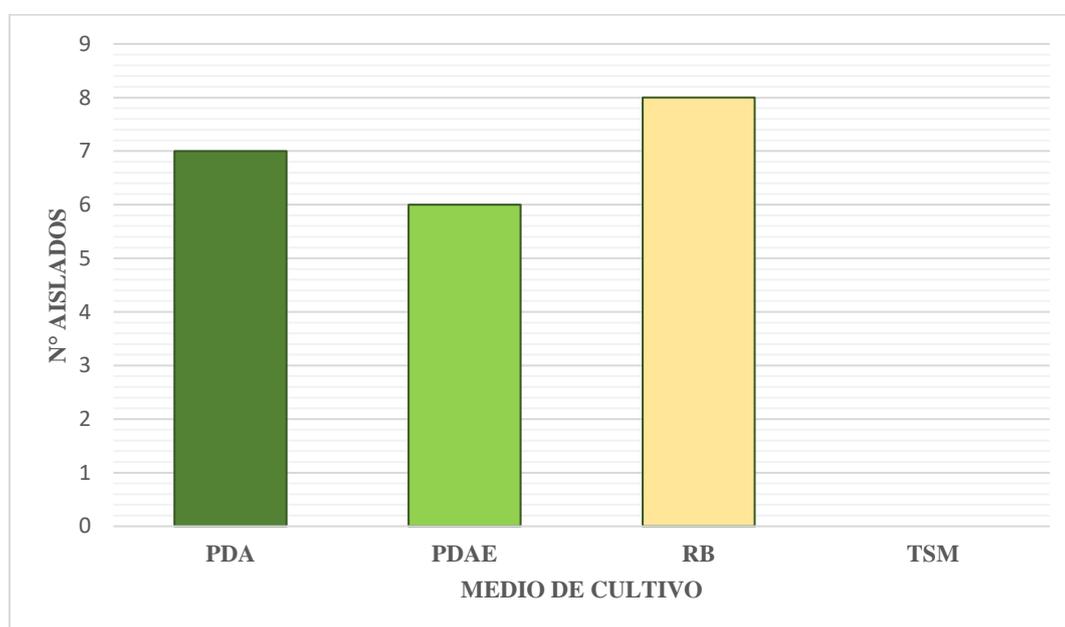
Los análisis filogenéticos empleando el gen Rpb2 fueron ejecutados con base en secuencias de especies conocidas. Se utilizó el programa MEGA 10.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), todas las secuencias recuperadas fueron alineadas con las secuencias de los aislados fúngicos empleando el software Muscle® (Kumar *et al.*, 2017: pp.454-458). Todas las filogenias fueron realizados a través de la interfaz online del CIPRES Science Gateway (Miller, 2010). Los árboles resultantes fueron observados en el software FigTree y editados en el programa gráfico Inkscape 0.92.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

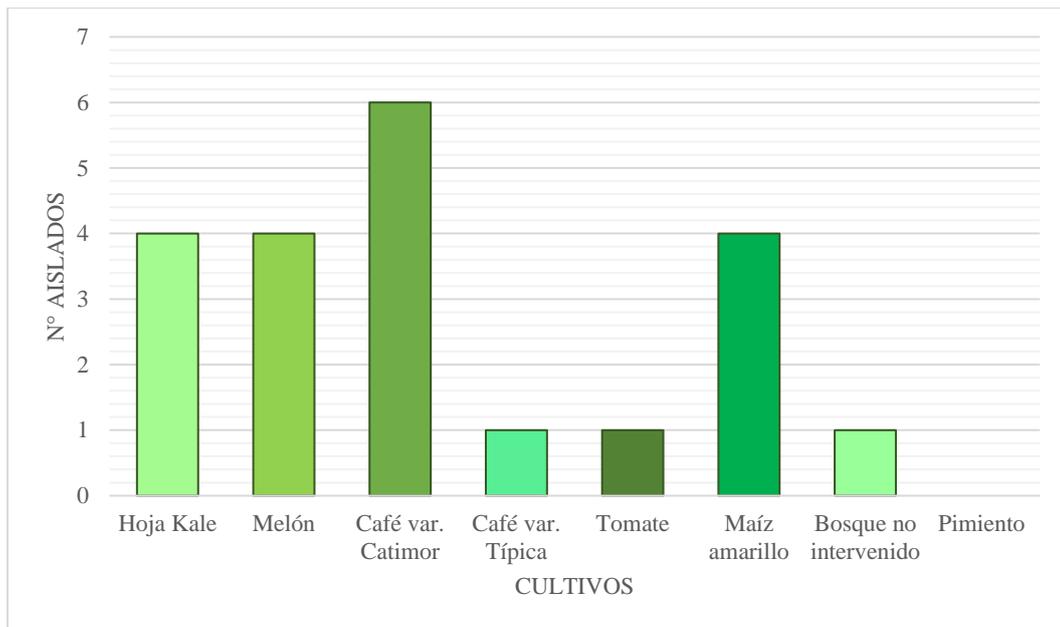
De las siembras realizadas a partir de las muestras de suelo recolectadas en los suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos, se obtuvieron en el medio PDA 7 aislados, en PDAE 6 aislados y en RB 8 aislados de *Trichoderma*, a diferencia del TSM en dónde no se obtuvo ningún aislado (**Gráfico 1-3**).



**Gráfico 1-3.** Número de aislados de *Trichoderma* por cada medio de cultivo utilizado: PDA, PDAE, RB y TSM

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

De los 21 aislados de *Trichoderma* que se obtuvieron de las siembras realizadas a partir de las muestras de suelo recolectadas en los suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos, 4 fueron en el cultivo de Hoja de Kale, 4 en melón, 6 en café *var. catimor*, 1 en Café *var. Típica*, 1 en tomate, 4 en maíz amarillo, 1 en bosque no intervenido y 0 en pimiento (**Gráfico 2-3**).



**Gráfico 2-3.** Número de aislados de *Trichoderma* por muestra según cultivo.

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2 Caracterización morfológica y molecular de las cepas de *Trichoderma* spp.

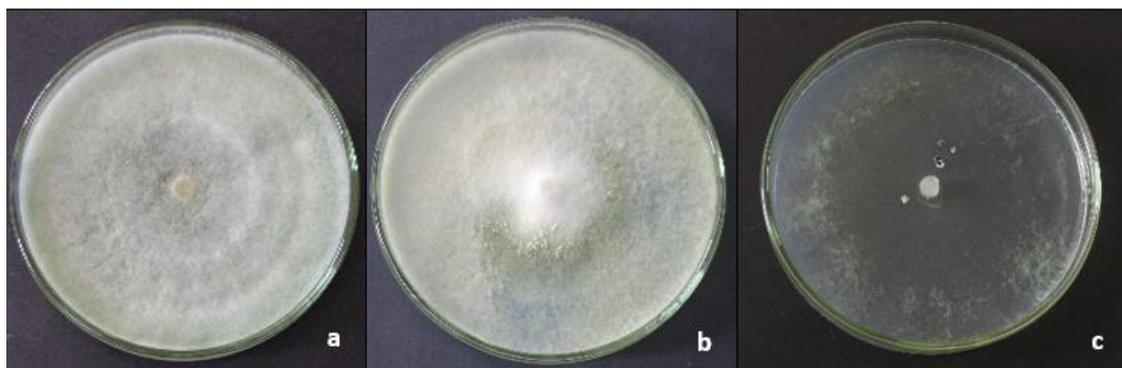
Se realizó la identificación morfológica de las 21 cepas a nivel género, basándose en las claves taxonómicas de Samuels et al., (2015). Las características observadas para los 21 aislados correspondieron a las reportadas para el género *Trichoderma*. Se observó la presencia de hifas hialinas septadas colonias con pigmentación verde, conidióforos ramificados, fiálides en forma de botella y verticiladas, conidios redondos y ovalados de color verde. De igual forma, se evaluó la tasa de crecimiento micelial en (mm/día) cada 24 horas durante 4 días en tres medios de cultivo (PDA, SNA y AHM) y el color de la colonia.

El medio de cultivo PDA fue el que presentó un rápido desarrollo yendo desde los 3 a 5 días, en este medio las colonias de *Trichoderma* revelaron una apariencia de tipo algodonosa. Al privar al micelio de luz se obtuvo una coloración blanca algodonosa y al exponerlo a la presencia de luz se observó un color verde claro hasta un verde oscuro en su esporulación, dando paso a la formación de anillos concéntricos.

### 3.2.1 Caracterización morfológica

#### 3.2.1.1 *Trichoderma* spp. cepa R1 M1A PDAE (A)

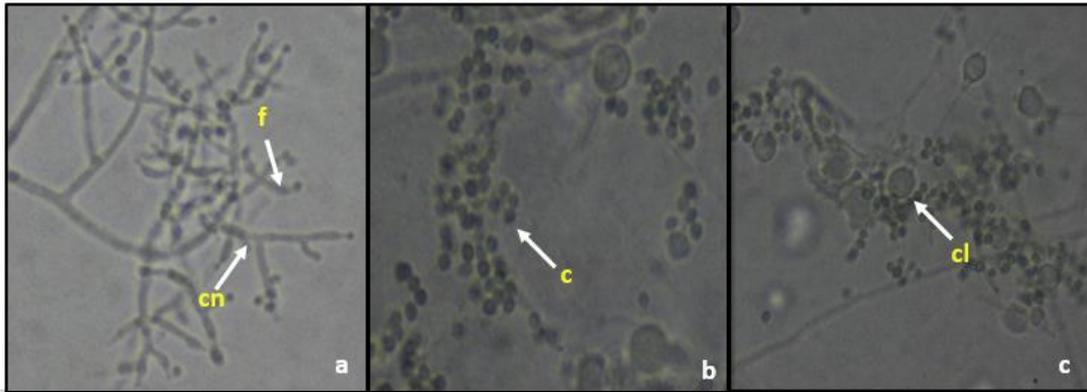
La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M1A PDAE (A) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma circular y rápida a  $25\text{ °C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 23,89 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca (Pantone, 1994. p 9) de textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso (Pantone, 1994. p 9), se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 2-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 2-3.** Características culturales de la cepa (A) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de  $90^\circ$  con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. En cuanto a las fiálides se observaron similar a la forma de botella (más anchas en el centro y a medida que se acerca a la punta se reducen) midiendo  $10,0\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 3-3 a**). Se presentaron conidios lisos de apariencia ovalada, con una tonalidad verde oscuro midiendo  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $1\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 3-3 b**). Sus clamidosporas redondas mostraron una tonalidad verde claro midiendo  $8,8\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $8,8\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 3-3 c**). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6.3**).

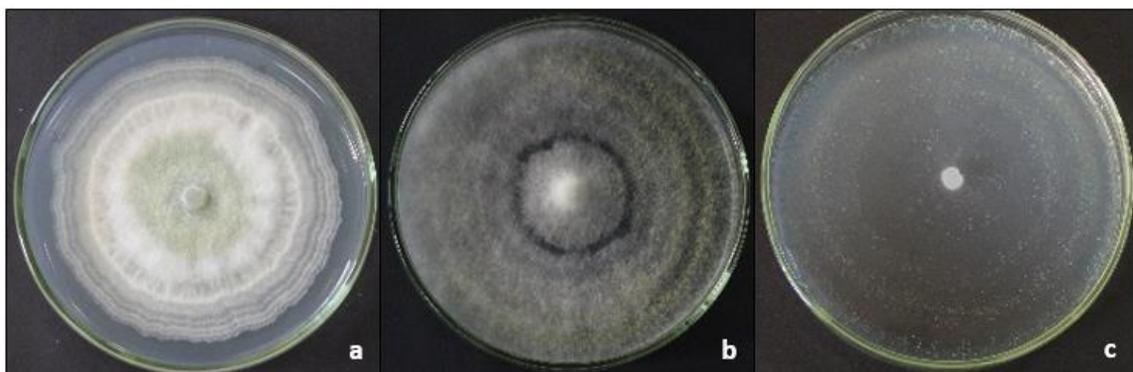


**Figura 3-3.** Características morfológicas cepa (A) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f), conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.2 *Trichoderma* spp. cepa R3 M3 PDAE (B)

La cepa de *Trichoderma* spp. R3 M3 PDAE (B) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a 25 °C ± 1 en comparación con los medios SNA (b) y AHM (c), con una tasa de crecimiento micelial de 17,54 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura poco lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde-grisácea y formación de anillos concéntricos (**Figura 4-3 a, b**). Dichas características son propias del género *Trichoderma*.

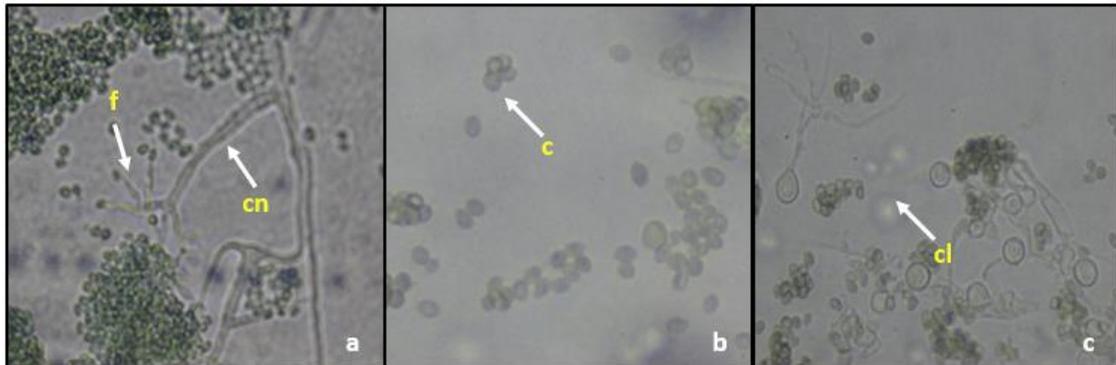


**Figura 4-3.** Características culturales cepa (B) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos ramificados y largos, las fiálides verticiladas midiendo 11,3 µm de largo x 2,5 µm de ancho (**Tabla 6-3**). Se presentaron conidios lisos de apariencia redonda, con una tonalidad verde claro midiendo 2,5 µm de largo x 2,5 µm de ancho (**Tabla 6-3**). Sus clamidosporas de forma redonda mostraron tonalidad verde claro midiendo 8,8 µm de largo x 8,8

µm de ancho (**Tabla 6-3**). Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998).

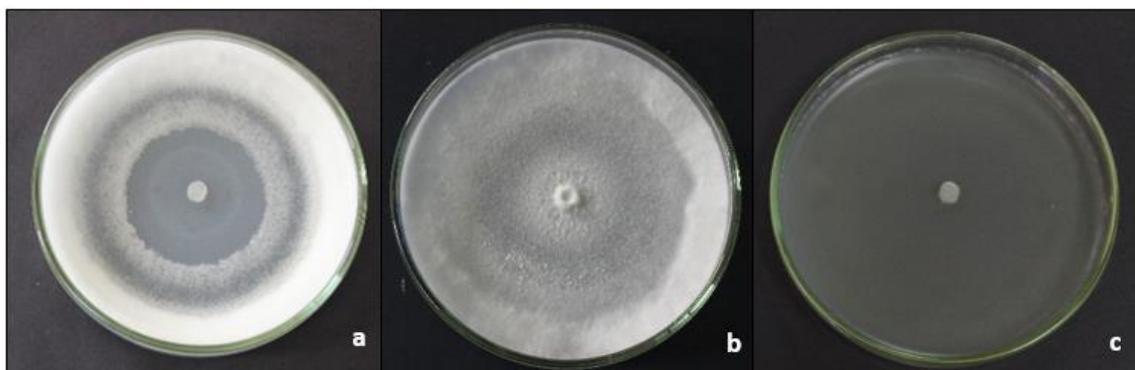


**Figura 5-3.** Características morfológicas cepa (B) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.3 *Trichoderma* spp. cepa R1 M1A RB (C)

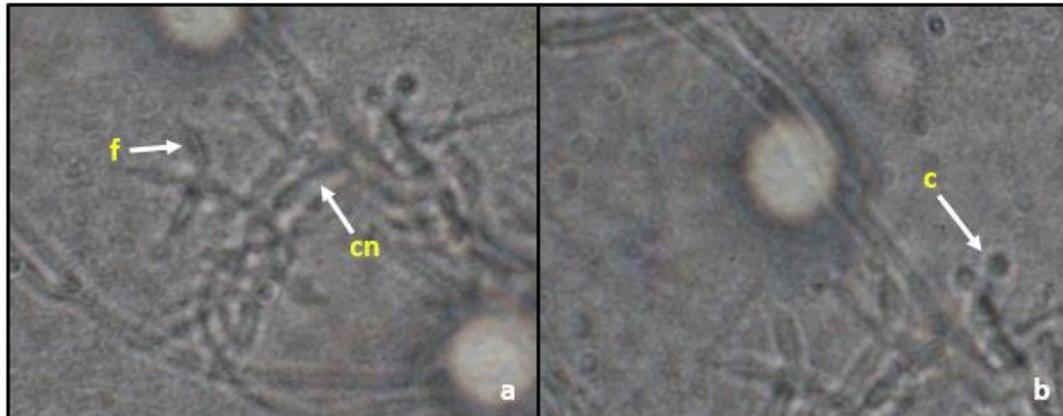
La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M1A RB (C) creció en medio de cultivo PDA(a) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 24,58 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso (Pantone, 1994. p 9), se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 6-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 6-3.** Características culturales cepa (C) desarrollada en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos ramificados y largos con fiálides verticiladas midiendo 8,8  $\mu\text{m}$  de largo x 2  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 7-3 a**). Conidios con una coloración verde claro, lisos y redondos midiendo de 2,4  $\mu\text{m}$  de largo x 2,4  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 7-3 b**). Sin presencia de clamidosporas.

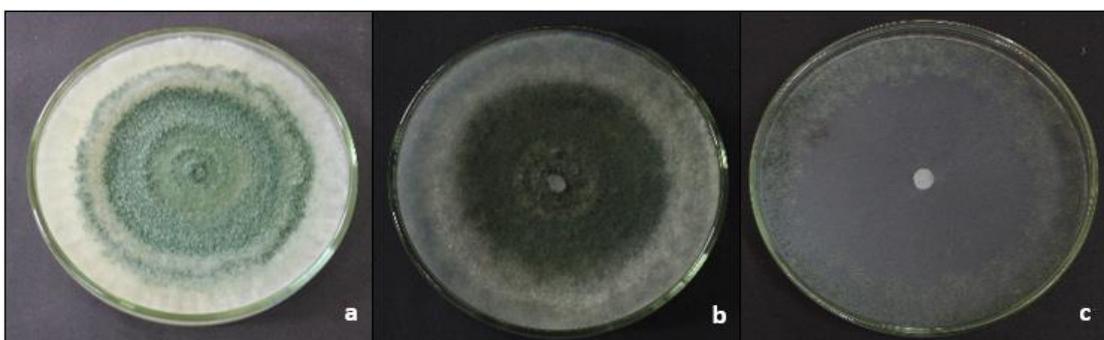


**Figura 7-3.** Características morfológicas cepa (C) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

#### 3.2.1.4 *Trichoderma* spp. cepa R1 M3 RB (D)

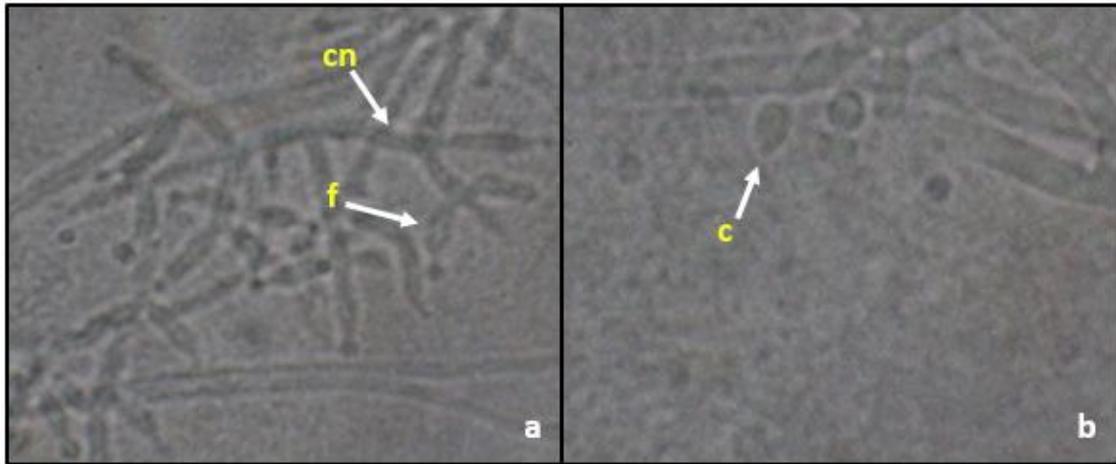
La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M3 RB (D) creció en medio de cultivo PDA(a) de forma rápida a 25 °C  $\pm$  1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 20,24 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso (Pantone, 1994. p 9), se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 8-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 8-3.** Características culturales cepa (D) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos gruesos, simétricos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de 90° con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. Las fiálides presentan una forma lageniforme midiendo 8,8 µm de largo x 2,6 µm de ancho (**Figura 9-3 a**). Conidios con una coloración verde claro, lisos y globosos midiendo de 2,5 µm de largo x 2,5 µm de ancho (**Figura 9-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).

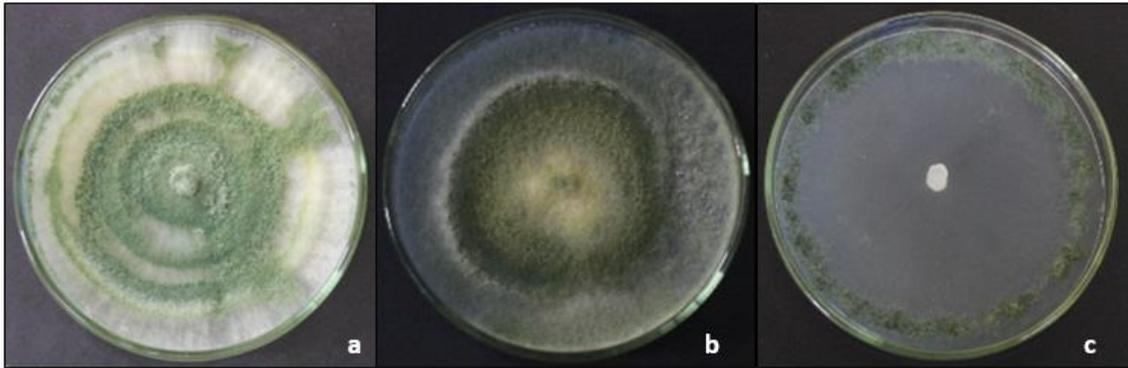


**Figura 9-3.** Características morfológicas cepa (D) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.5 *Trichoderma* spp. cepa R1 M2A-D PDA (E)

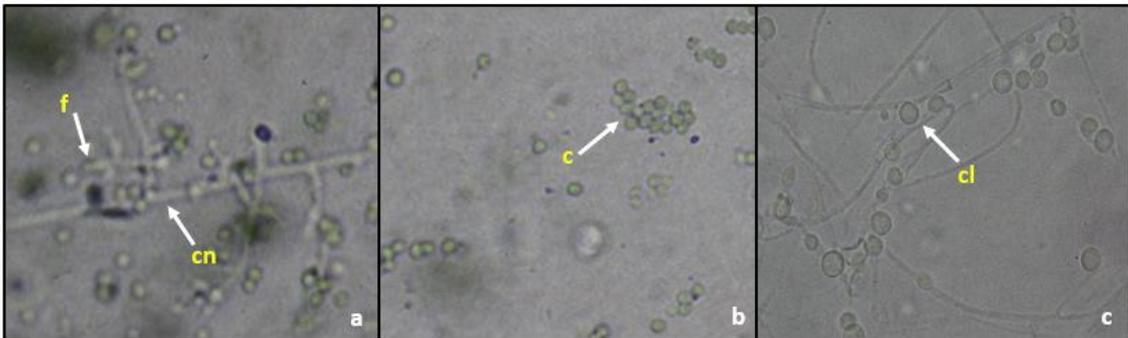
La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M2A-D PDA (E) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 22,08 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca-amarillosa de textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde oscuro con formación de anillos concéntricos los mismos que son característicos del género *Trichoderma* (**Figura 10-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Sánchez et al., (2021), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 10-3.** Características culturales cepa (E) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos simétricos con ramificaciones cortas, las fiálides con forma lageniforme midiendo  $8,8 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 11-3 a**). Conidios con una coloración verde claro, lisos y de forma globosa o subglobosa midiendo  $2,5 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 11-3 b**). Sus clamidosporas globosas presentaron una tonalidad verde claro midiendo  $10 \mu\text{m}$  de largo x  $10 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 11-3 c**). Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998), las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).



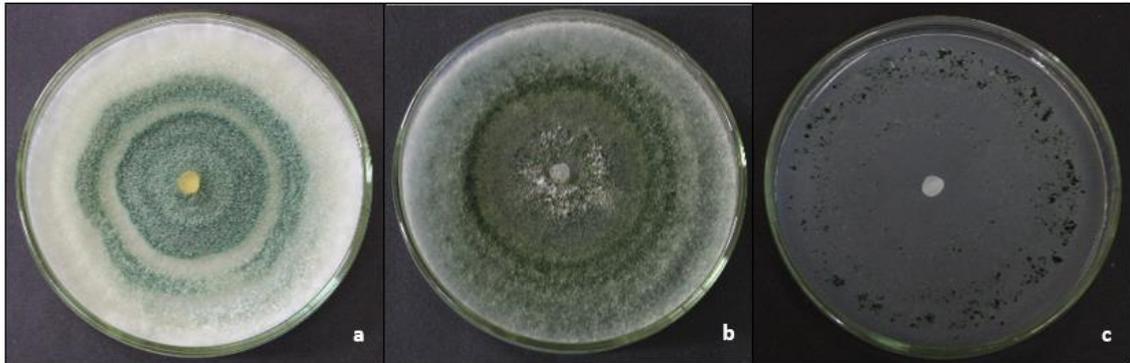
**Figura 11-3.** Características morfológicas cepa (E) crecida en SNA a  $25^\circ\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.6 *Trichoderma* spp. cepa R1 M3 PDAE (F)

La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M3 PDAE (F) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25^\circ\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de  $16,28 \text{ mm/día}$  (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-

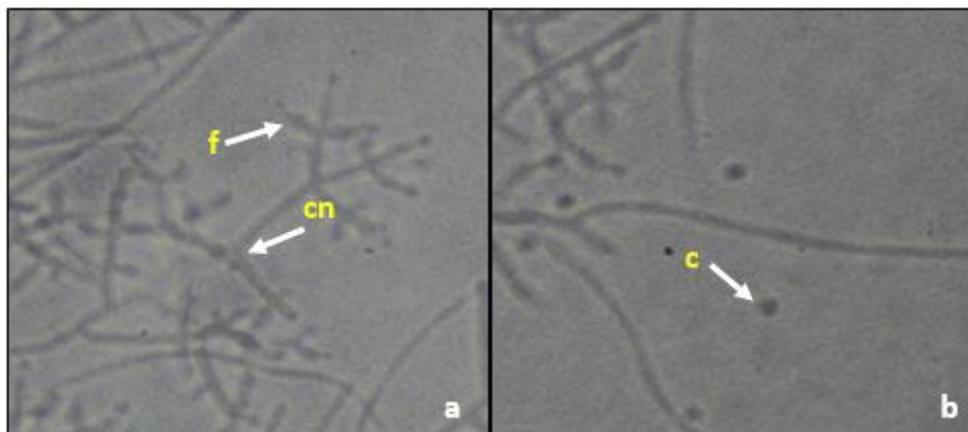
verdoso (Pantone, 1994. p 9), se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 12-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 12-3.** Características culturales cepa (F) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos simétricos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de  $90^\circ$  con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. En cuanto a la forma de las fiálides se observaron similares a una botella (más amplias en el centro y a medida que se aproximan a la punta se reducen) midiendo  $10\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,4\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 13-3 a**) Conidios con una coloración verde claro, lisos y globosos midiendo de  $2,5\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,5\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 13-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6.3**).

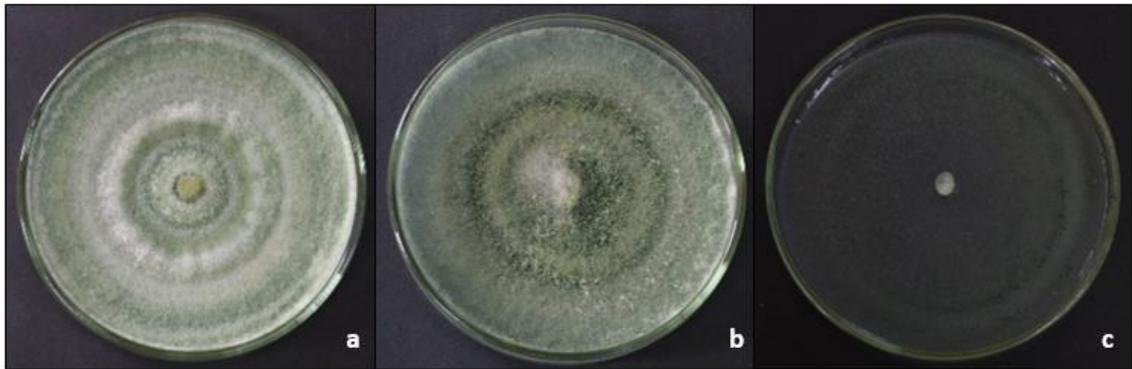


**Figura 13-3.** Características morfológicas cepa (F) crecida en SNA a  $25^\circ\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.7 *Trichoderma* spp. cepa R1 M5-D RB (G)

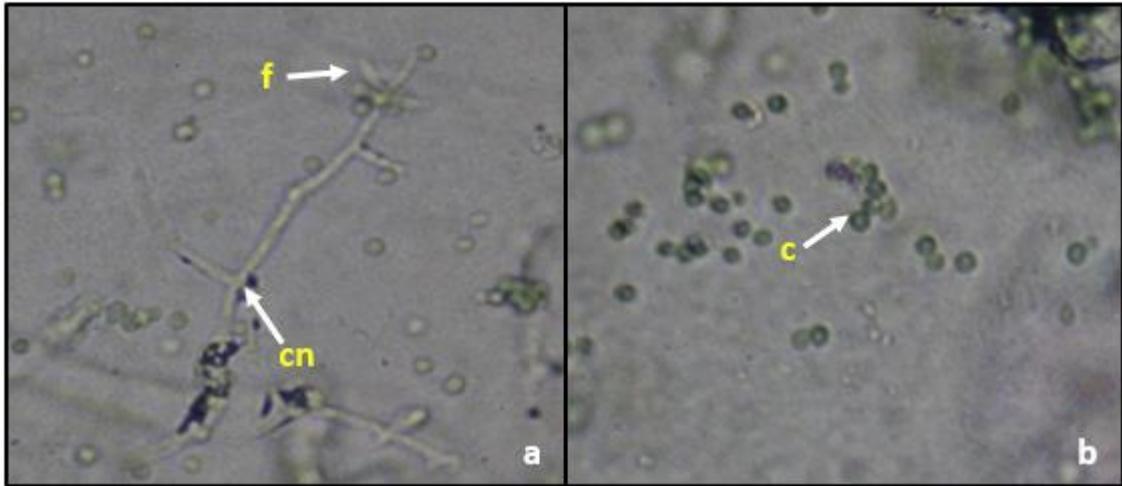
La cepa de *Trichoderma* spp. R1 M5-D RB (G) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 24,44 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca-verdosa (Pantone, 1994. p 9) de textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde oscuro, con formación de anillos concéntricos los mismos que son característicos del género *Trichoderma* (**Figura 14-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Sánchez et al., (2021), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 14-3.** Características culturales cepa (G) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos simétricos con ramificaciones cortas, las fiálides con forma lageniforme en verticilos de 3-4 midiendo  $8,8\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,8\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 15-3 a**). Conidios con una coloración verde claro, lisos y de forma globosa o subglobosa midiendo  $3,8\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $3,8\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 15-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dicha descripción con lo descrito por Kubicek et al., (1998). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).

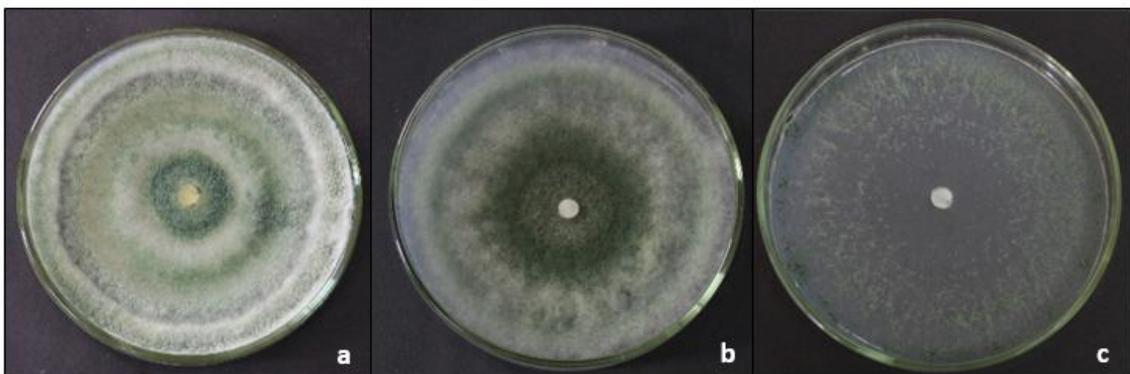


**Figura 15-3.** Características morfológicas cepa (G) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.8 *Trichoderma spp. cepa R1 M2A RB (H)*

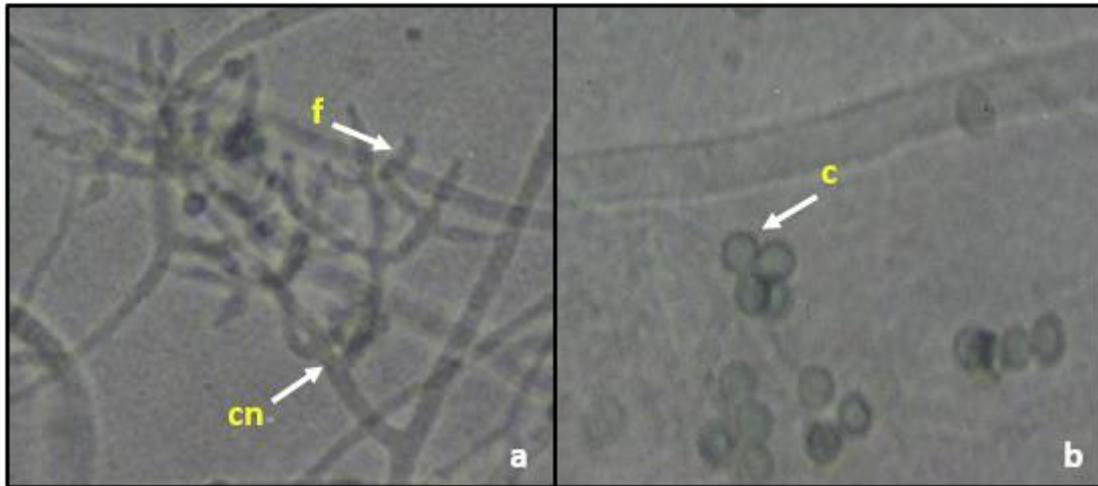
La cepa de *Trichoderma spp.* R1 M2A RB (H) creció en medio de cultivo (PDA) (a) creció en medio de cultivo PDA(a) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 20,99 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca-verdosa (Pantone, 1994. p 9) de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde-oscuro, se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 16-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 16-3.** Características culturales cepa (H) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y medio AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones muy distanciadas conformadas de 3 a 4 fiálides, se presentaron fiálides que median 8,8  $\mu\text{m}$  de largo x 2,3  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 17-3 a**). Se presentaron conidios lisos y de apariencia redonda con una tonalidad verde claro, midiendo de 2,5  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 17-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).

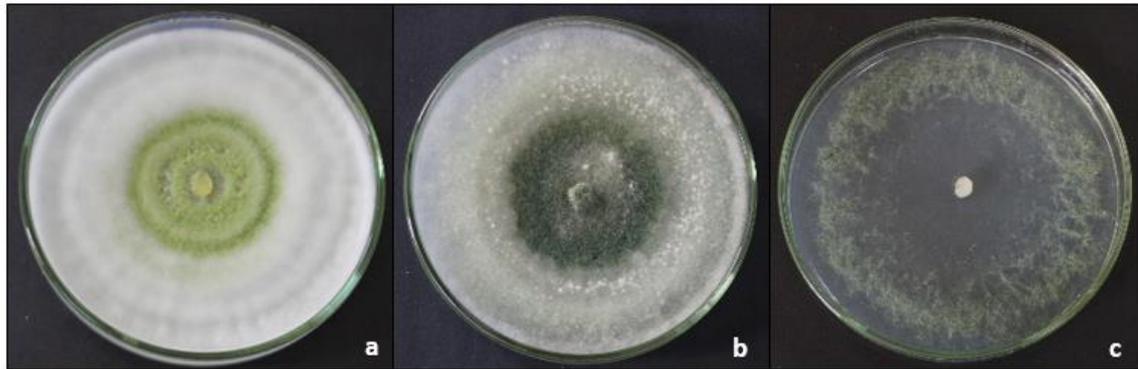


**Figura 17-3.** Características morfológicas cepa (H) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.9 *Trichoderma* spp. cepa R3 M3 PDA (I)

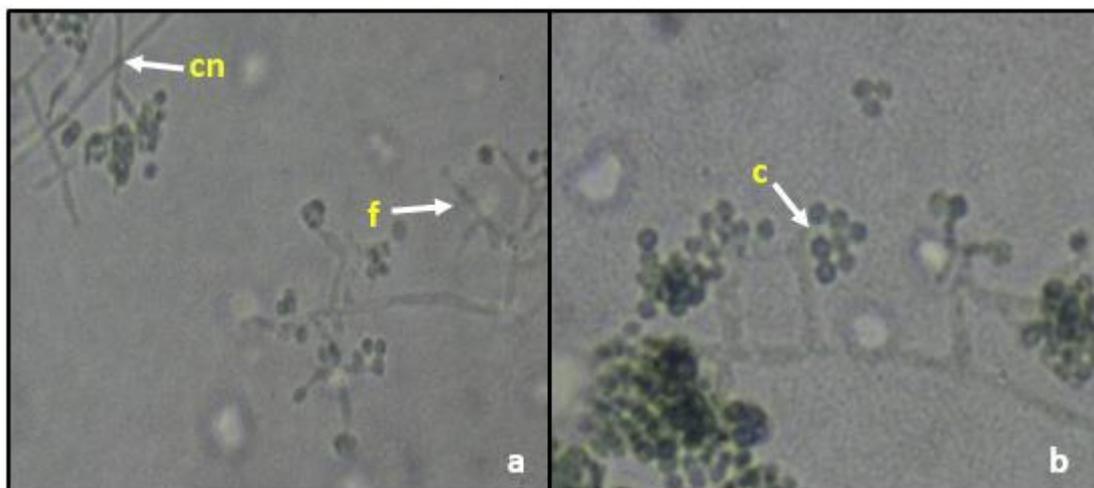
La cepa de *Trichoderma* spp. R3 M3 PDA (I) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C  $\pm$  1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 15,61 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso, se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 18-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 18-3.** Características culturales cepa (I) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de  $90^\circ$  con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. En cuanto a la forma de las fiálides se observaron similar a una botella (más amplias en el centro y a medida que se aproximan a la punta se reducen) midiendo  $8,1 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 19-3 a**). Se presentaron conidios lisos de apariencia redonda, con una tonalidad verde oscuro midiendo  $2,5 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 19-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6.3**).



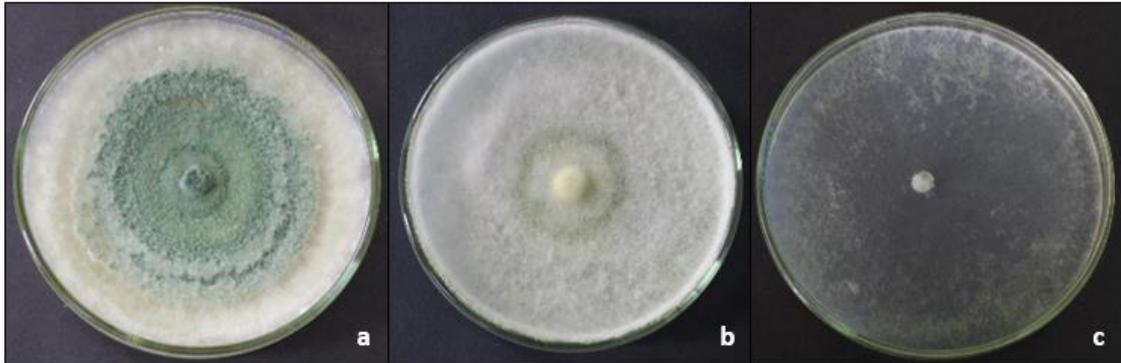
**Figura 19-3.** Características morfológicas cepa (I) crecida en SNA a  $25^\circ\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.10 *Trichoderma spp. cepa b. R2 M3 PDA (J)*

La cepa de *Trichoderma spp. b. R2 M3 PDA (J)* creció en medio de cultivo PDA de forma rápida en comparación con los medios SNA (b) y AHM (c), con una tasa de crecimiento micelial de

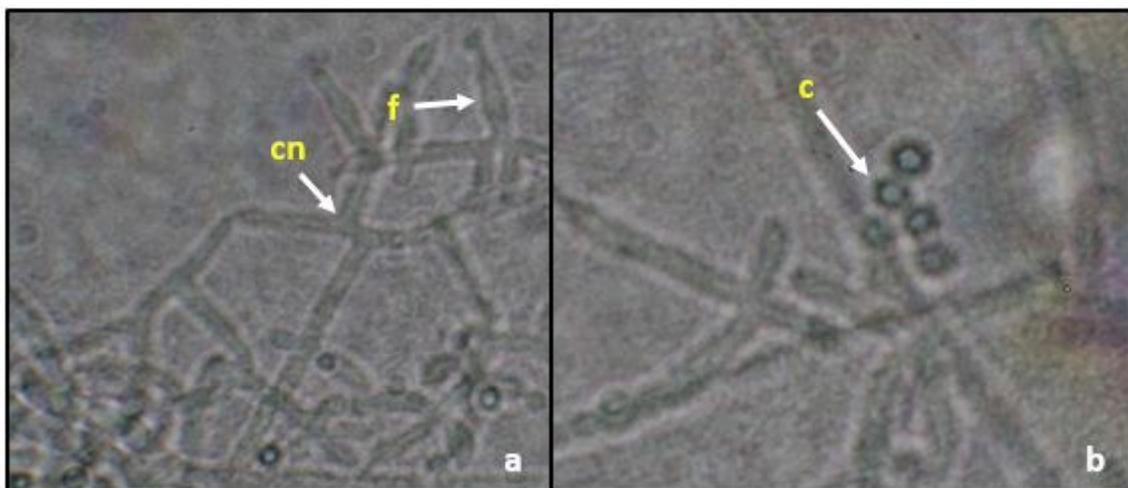
17,05 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde pálida con formación de anillos concéntricos (**Figura 20-3 a, b**). Dichas características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 20-3.** Características culturales cepa (J) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos pequeños y agrupados en penachos y gruesos con fiálides de apariencia lageniforme midiendo  $7,5 \mu\text{m}$  de largo x  $2,3 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 21-3 a**) Se presentaron conidios lisos con apariencia redonda, con una tonalidad verde claro midiendo  $2,5 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 21-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998).

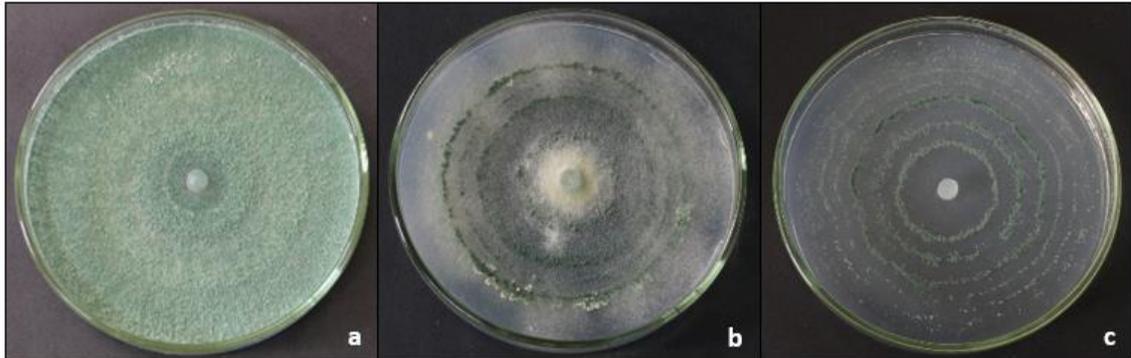


**Figura 21-3.** Características morfológicas cepa (J) crecida en SNA a  $25^{\circ}\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.11 *Trichoderma* spp. cepa a. R2 M3 PDA (K)

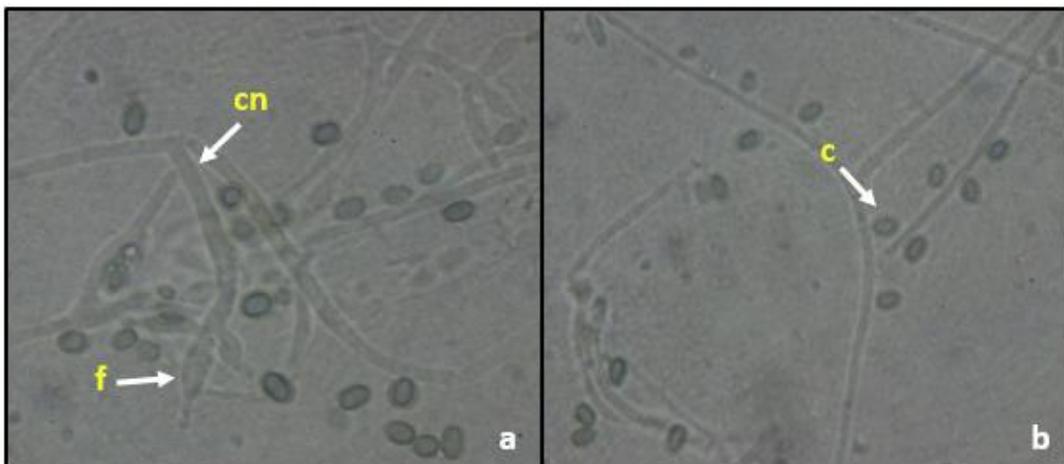
La cepa de *Trichoderma* spp. a. R2 M3 PDA (K) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida en comparación con los medios SNA (b) y AHM (c), con una tasa de crecimiento micelial de 27,67 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde pálida y formación de anillos concéntricos (**Figura 22-3 a, b**). Dichas características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 22-3.** Características culturales cepa (K) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos pequeños agrupados en penachos y gruesos con fiálides de apariencia lageniforme midiendo 8,8  $\mu\text{m}$  de largo x 2,9  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 23-3 a**). Se presentaron conidios lisos de apariencia redonda, con tonalidad verde claro midiendo 3,8  $\mu\text{m}$  de largo x 3,8  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 23-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998).

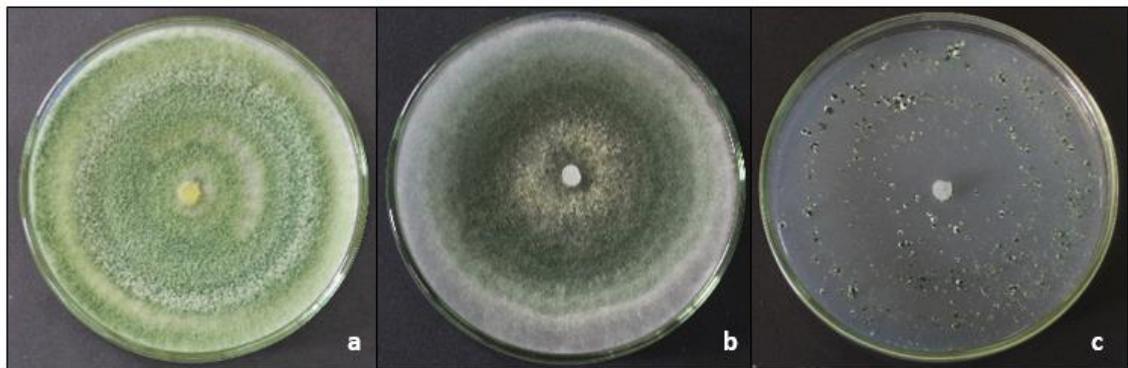


**Figura 23-3.** Características morfológicas cepa (K) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.12 *Trichoderma* spp. cepa R1 M2A PDA (M)

La cepa de *Trichoderma* spp. cepa R1 M2A PDA (M) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 23,21 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se mostró una tonalidad blanca-amarillosa de textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso (Pantone, 1994. p 9), se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 24-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 24-3.** Características culturales cepa (M) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de  $90^{\circ}$  con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. En cuanto a la forma de las fiálides se observaron similares a una botella (más amplias en el centro y a medida que se aproximan a la punta se reducen) midiendo  $11\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 25-3 a**). Se presentaron conidios lisos de apariencia redonda, con tonalidad verde claro midiendo  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 25-3 a**). Sus clamidosporas redondas mostraron una tonalidad verde claro midiendo  $8,8\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $8,8\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 25-3 c**). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).

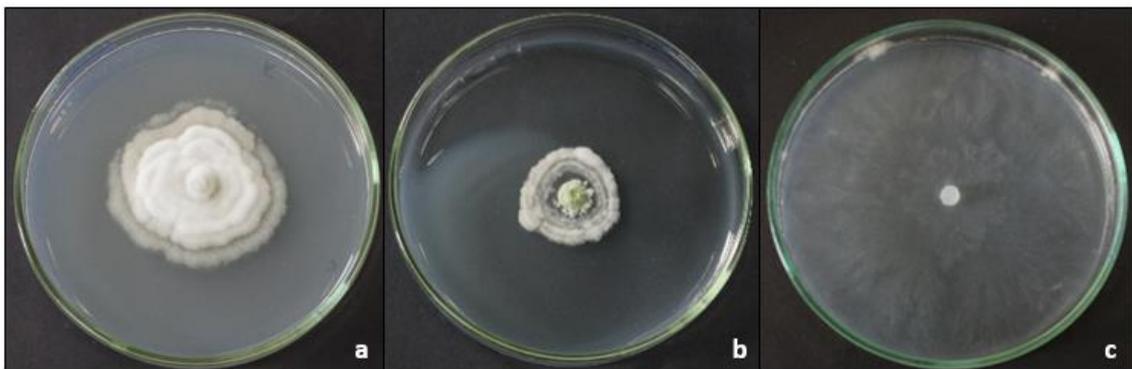


**Figura 25-3.** Características morfológicas cepa (M) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y clamidosporas (cl) (c).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.13 *Trichoderma* spp. cepa R2 6B PDAE (N)

La cepa de *Trichoderma* spp. R2 6B PDAE (N) creció en medio de cultivo AHM (c) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo PDA (a) (crecimiento máximo a los 6 días) y SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días), con una tasa de crecimiento micelial de 10,74 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca de textura algodonosa y posteriormente, se observó una tonalidad verde claro, además de presentar ondulado el borde de la colonia (**Figura 26-3 a**). Dichas características fueron comparadas con las descripciones realizadas por Samuels et al., (2015) que menciona son propias del género *Trichoderma*.

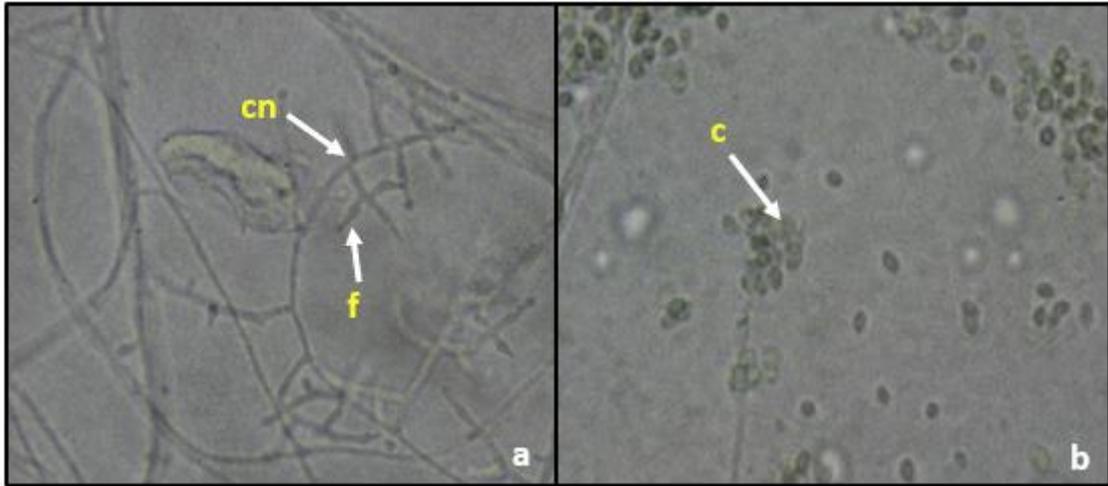


**Figura 26-3.** Características culturales cepa (N) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos ramificados, con ramas muy espaciadas formadas de 3 a 4 fiálides similar a un matraz ensanchado en el medio y estrecho en la punta midiendo 11,3 μm de largo x 3,1 μm de ancho (**Figura 27-3 a**). Se presentaron conidios de apariencia subglobosos a ovoides,

midiendo 2,5  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho de tonalidad verde claro (Tabla 8-3). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998).

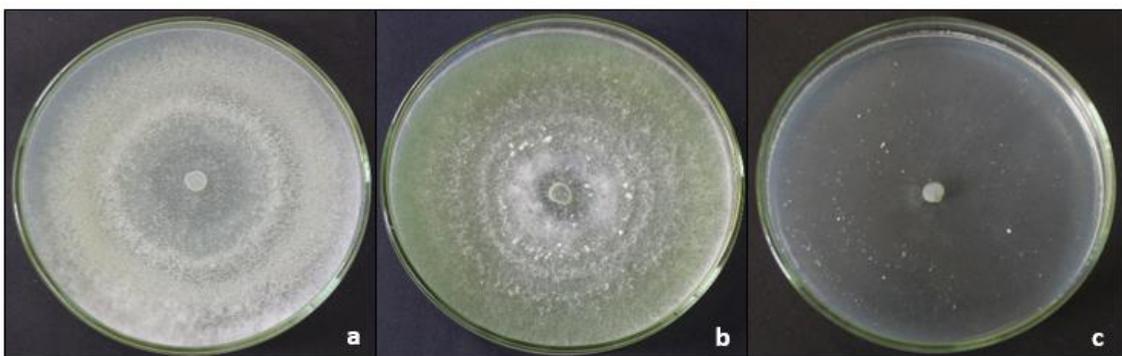


**Figura 27-3.** Características morfológicas cepa (N) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

#### 3.2.1.14 *Trichoderma* spp. cepa R3 6B PDA (O)

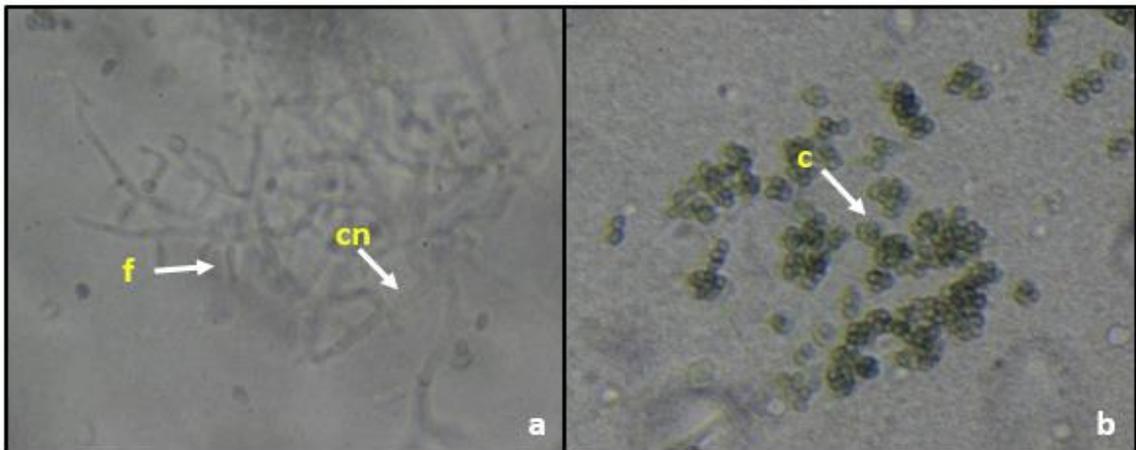
La cepa de *Trichoderma* spp. R3 6B PDA (O) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C  $\pm$  1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 24,99 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca-amarillosa de textura algodonada y posteriormente, mostró una tonalidad que paso de verde pálido a verde grisáceo y formación de anillos concéntricos (**Figura 28-3 a, b**). Dichas características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 28-3.** Características culturales cepa (O) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022

Se observaron conidióforos con ramificaciones largas y algunas cortas, fiálides solitarias lageniformes, de forma cilíndrica midiendo  $9,4 \mu\text{m}$  de largo x  $2,5 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 29-3 a**). Se presentaron conidios de apariencia lisa y de aspecto elipsoidal, con tonalidades verde claro midiendo de  $3,8 \mu\text{m}$  de largo x  $3,1 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 29-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998).

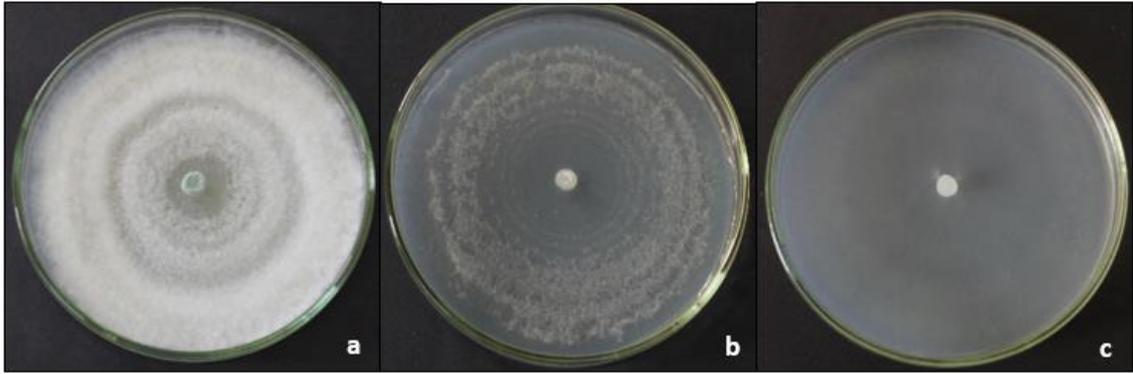


**Figura 29-3.** Características morfológicas cepa (O) crecida en SNA a  $25^{\circ}\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

#### 3.2.1.15 *Trichoderma* spp. cepa R2 6B PDA (P)

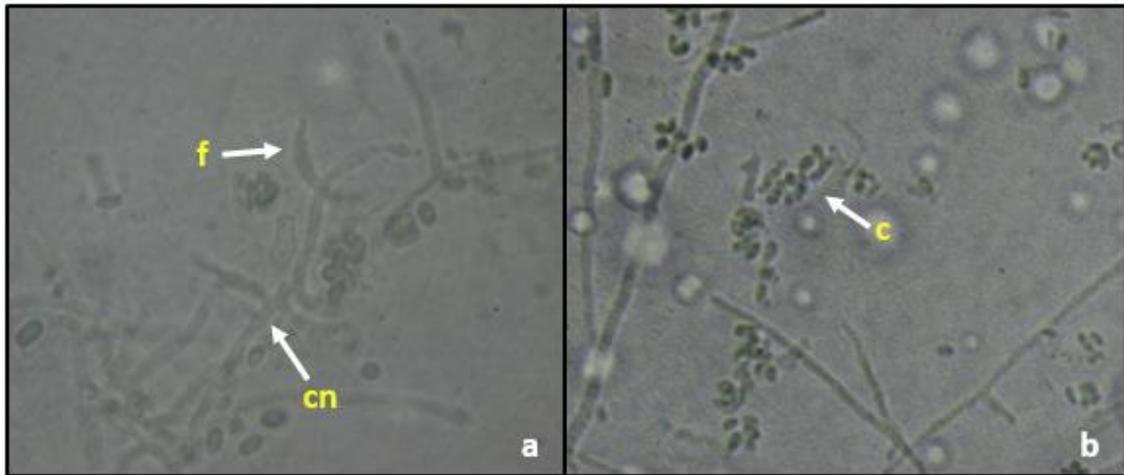
La cepa de *Trichoderma* spp. R2 6B PDA (P) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de  $18,55 \text{ mm/día}$  (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca de textura algodonosa y posteriormente, se observó una tonalidad verde claro, además de presentar ondulado el borde de la colonia y formación de anillos concéntricos (**Figura 30-3 a**). Dichas características fueron comparadas con las descripciones realizadas por Samuels et al., (2015) que menciona que estas características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 30-3.** Características culturales cepa (P) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones largas y delgadas, fiálides lageniformes, midiendo 10  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 31-3 a**). Se presentaron conidios de apariencia lisa y de aspecto redondo a elipsoidal, con tonalidades verde claro midiendo 2,5  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 31-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998), las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6-3**).



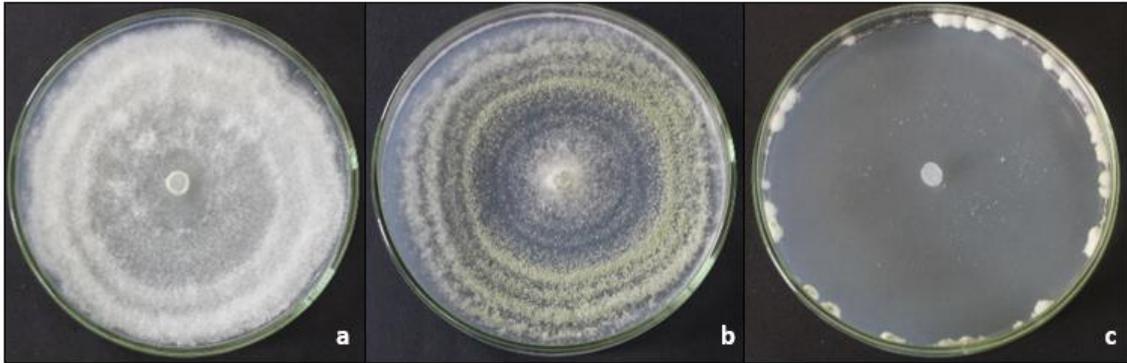
**Figura 31-3.** Características morfológicas cepa (P) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.16 *Trichoderma* spp. cepa R2 M4 RB (R)

La cepa de *Trichoderma* spp. R2 M4 RB (R) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C  $\pm$  1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 17,42 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca con textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde claro,

además de presentar ondulado el borde de la colonia y anillos concéntricos (**Figura 32-3 a**). Dichas características fueron comparadas con las descripciones realizadas por Samuels et al., (2015) que menciona que las características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 32-3.** Características culturales cepa (R) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones largas y delgadas, fiálides solitarias lageniforme, midiendo  $10\ \mu\text{m}$  de largo x  $3,1\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 33-3 a**). Se presentaron conidios lisos de forma subglobosos a ovoides, con tonalidades verde claro midiendo  $3,8\ \mu\text{m}$  de largo x  $3,8\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 33-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998).

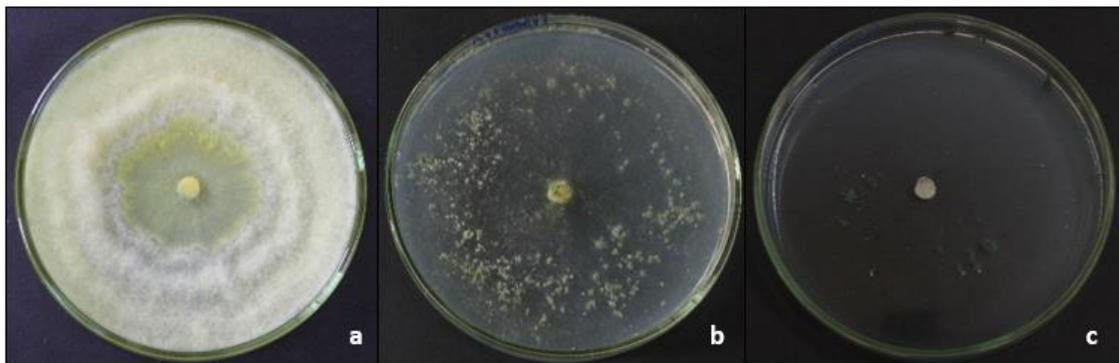


**Figura 33-3.** Características morfológicas cepa (R) crecida en SNA a  $25^{\circ}\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.17 *Trichoderma spp. cepa R2 M1A RB (S)*

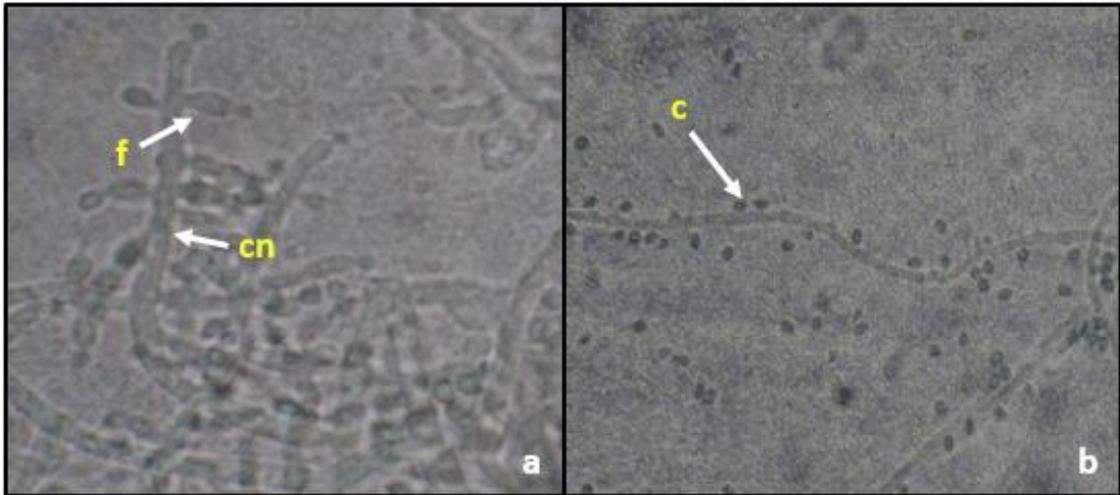
La cepa de *Trichoderma spp.* R2 M1A RB (S) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 18,01 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad amarillo claro con textura algodonosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde claro (**Figura 34-3 a, b**). Dichas características fueron comparadas con las descripciones realizadas por Samuels et al., (2015) que menciona que las características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 34-3.** Características culturales cepa (S) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos pequeños agrupados en penachos y gruesos con fiálides de apariencia lageniforme midiendo  $10\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 35-3 a**). Se presentaron conidios de apariencia lisa y de aspecto elipsoidal, midiendo de  $3,8\text{ }\mu\text{m}$  de largo x  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 35-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma spp.*, con las descritas por Kubicek et al., (1998). Las medidas pueden ser observadas en la (**Tabla 6-3**)

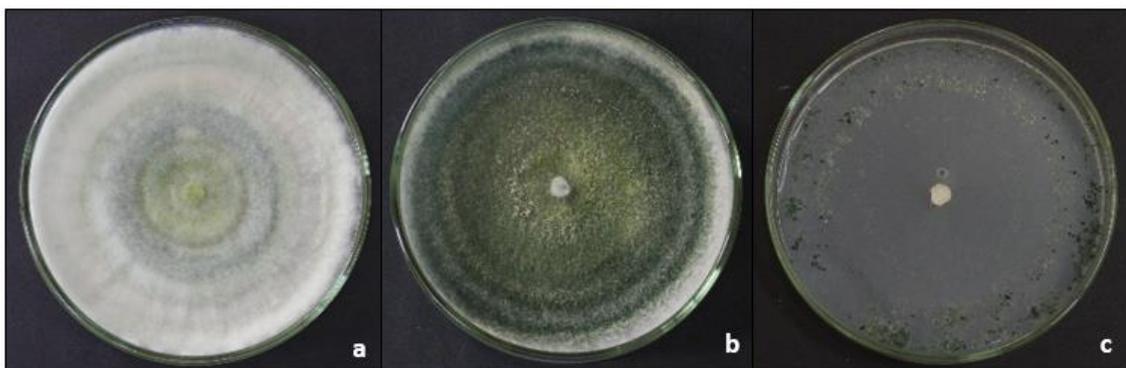


**Figura 35-3.** Características morfológicas cepa (S) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.18 *Trichoderma* spp. cepa R3 M2A PDAE (U)

La cepa de *Trichoderma* spp. R3 M2A PDAE (U) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 20,97 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca con una textura lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad blanco-verdoso, se observaron anillos concéntricos los cuales son propios del género *Trichoderma* (**Figura 36-3 a, b**). Las descripciones elaboradas por Acurio et al., (2017), así como también las realizadas por Samuels et al., (2015), fueron la base fundamental con las cuales se comparó las características descritas anteriormente.



**Figura 36-3.** Características culturales cepa (U) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones piramidales, con ramas más largas cerca del eje principal, dicha descripción coincide con la realizada por Kubicek et al., (1998), quien afirma que se forma un ángulo de 90° con las ramas que se encuentran más cercanas a las puntas. En cuanto a la forma de las fiálides se observaron similares a una botella (más amplias en el centro y a medida que se aproximan a la punta se reducen) midiendo 7,5 µm de largo x 2,5 µm de ancho (**Figura 37-3 a**). Se presentaron conidios de aspecto elipsoidal a redondo, con una tonalidad verde claro midiendo 3,8 µm de largo x 3,8 µm de ancho (**Figura 37-3 b**). Sus clamidosporas redondas presentaron una tonalidad verde claro midiendo 10 µm de largo x 10 µm de ancho (**Figura 37-3 c**). Las medidas se pueden observar en la (**Tabla 6.3**).

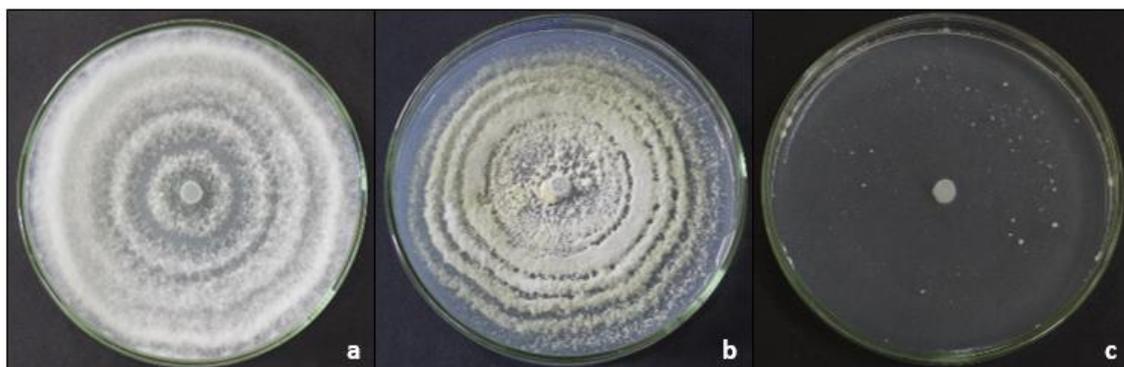


**Figura 37-3.** Características morfológicas cepa (U) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b) y Clamidosporas (cl) (c).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

#### 3.2.1.19 *Trichoderma spp. cepa R2 6B-D RB (V)*

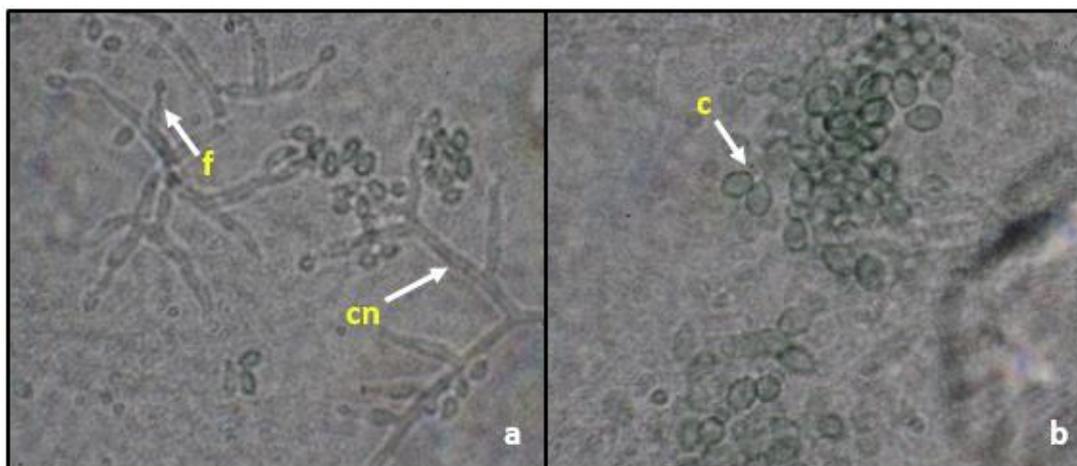
La cepa de *Trichoderma spp.* R2 6B-D RB (V) creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a 25 °C ± 1 (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de 20,19 mm/día (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se apreció tonalidades amarillo claro con textura lanosa y posteriormente, se observó una tonalidad verde claro, además de presentar ondulado el borde de la colonia y anillos concéntricos (**Figura 38-3 a, b**). Dichas características fueron comparadas con las descripciones realizadas por Samuels et al., (2015) que menciona que las características son propias del género *Trichoderma*.



**Figura 38-3.** Características culturales cepa (V) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones muy distanciadas, conformadas de 3 a 4 fiálides de forma lageniforme midiendo  $10\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,8\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 39-3 a**). Conidios de forma subglobosa a ovoide, con tonalidades verde claro y lisos midiendo  $2,5\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,5\ \mu\text{m}$  de ancho. Sin presencia de clamidosporas. (**Figura 39-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características con las descritas por Kubicek et al., (1998).



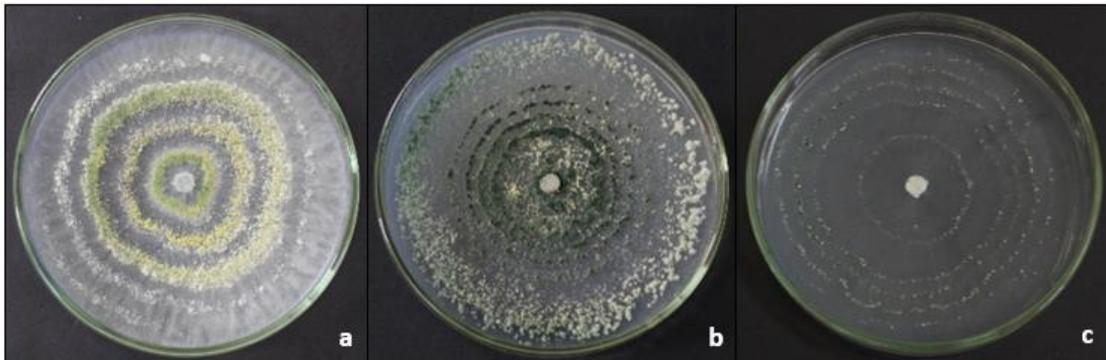
**Figura 39-3.** Características morfológicas cepa (V) crecida en SNA a  $25^\circ\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.20 *Trichoderma spp. cepa R3 7A PDAE (X)*

La cepa de *Trichoderma spp. R3 7A PDAE (X)* creció en medio de cultivo PDA (a) de forma rápida a  $25\ ^\circ\text{C} \pm 1$  (crecimiento máximo a los 4 días), en comparación a los medios de cultivo SNA (b) (crecimiento máximo a los 6 días) y AHM (c) (crecimiento máximo a los 5 días), con una tasa de crecimiento micelial de  $18,80\ \text{mm/día}$  (**Tabla 7-3**). A comienzos del crecimiento se presentó una tonalidad blanca de textura poco lanosa y posteriormente, se observó una tonalidad

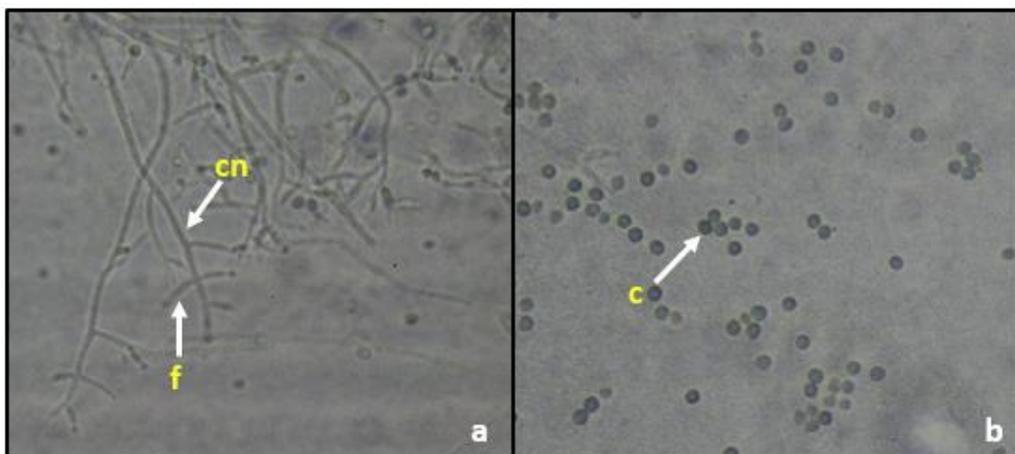
verde claro (**Figura 40-3 a, b**). Dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, coincidieron con las expuestas por Samuels et al., (2015).



**Figura 40-3.** Características culturales cepa (X) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones largas y delgadas, fiálides solitarias lageniforme, midiendo 10  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Tabla 7-3**). Los conidios presentaron una forma elipsoidal o redonda, con tonalidades verde claro y lisos midiendo 2,5  $\mu\text{m}$  de largo x 2,9  $\mu\text{m}$  de ancho. Sin presencia de clamidosporas (**Figura 41-3 a, b**). Dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, se compararon con las expuestas por Kubicek et al., (1998).



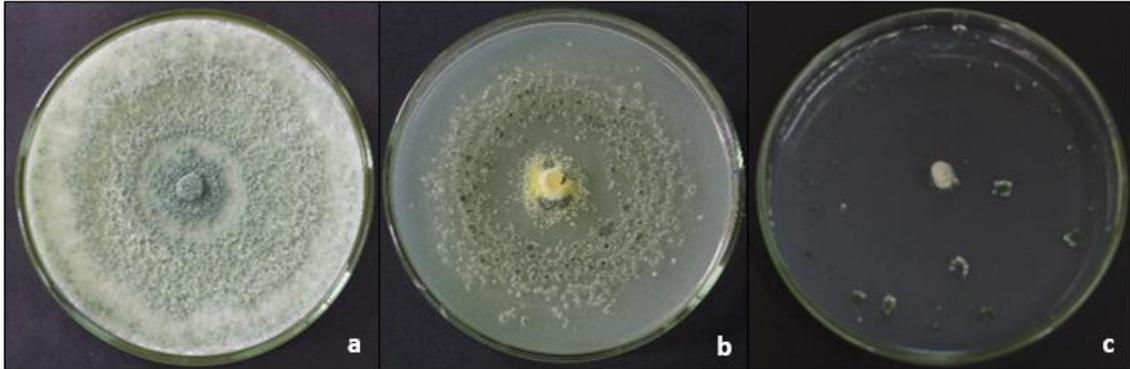
**Figura 41-3.** Características morfológicas cepa (X) crecida en SNA a 25°C/5 días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.1.21 *Trichoderma* spp. cepa R3 M1A RB (Y)

La cepa de *Trichoderma* spp. R3 M1A RB (Y) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida en comparación con los medios SNA (b) y AHM (c), con una tasa de crecimiento micelial de 23,11 mm/día (**Tabla 7-3**). Se presentó una tonalidad blanca al inicio del crecimiento, con una

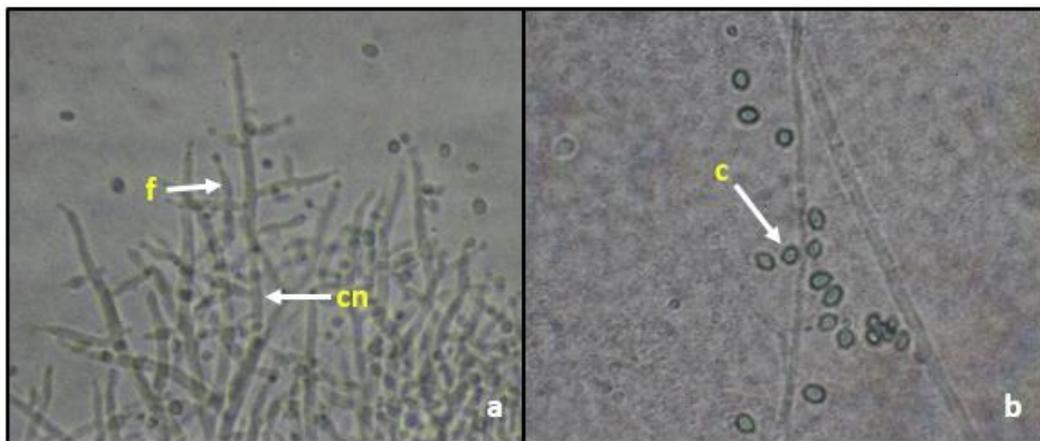
textura poco lanosa y posteriormente, presentó una tonalidad verde grisáceo (**Figura 42-3 a, b**). Dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, coincidieron con las expuestas por Samuels et al., (2015).



**Figura 42-3.** Características culturales cepa (Y) crecida en 3 medios de cultivo: PDA (a) (8 días), SNA (b) (15 días) y AHM (c) (15 días).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

Se observaron conidióforos con ramificaciones muy separadas conformadas de 3 a 4 fiálides de forma lageniforme midiendo  $10\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,5\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 43-3 a**). Se presentaron conidios de apariencia lisa y de aspecto elipsoidal a redondo, con una tonalidad verde claro midiendo  $3,8\ \mu\text{m}$  de largo x  $3,8\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 43-3 b**). Sin presencia de clamidosporas. Se realizó la comparación de dichas características de la cepa de *Trichoderma* spp, con las descritas por Kubicek et al., (1998).



**Figura 43-3.** Características morfológicas cepa (Y) crecida en SNA a  $25^{\circ}\text{C}/5$  días. Fiálides (f) y Conidióforos (cn) (a), conidios (c) (b).

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

**Tabla 6-3:** Identificación morfológica de las cepas de *Trichoderma* spp. con las medidas largo y ancho de fiálides, conidios y clamidosporas

Cepa  CODIGO TRABAJO	Fiálides						Conidios						Clamidosporas					
	Longitud (µm)			Ancho (µm)			Longitud (µm)			Ancho (µm)			Longitud (µm)			Ancho (µm)		
	Máx	Mín	$\bar{x}$	Máx	Mín	$\bar{x}$	Máx	Mín	$\bar{x}$	Máx	Mín	$\bar{x}$	Máx	Mín	$\bar{x}$	Máx	Mín	$\bar{x}$
A	12,5	7,5	10,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,5	0,5	1,0	10,0	7,5	8,8	10,0	7,5	8,8
B	15,0	7,5	11,3	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8	12,5	7,5	10,0	12,5	7,5	10,0
C	12,5	5,0	8,8	2,5	1,5	2,0	2,5	2,3	2,4	2,5	2,3	2,4						
D	12,5	5,0	8,8	3,0	2,3	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
E	10,0	7,5	8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	12,5	7,5	10,0	12,5	7,5	10,0
F	15,0	5,0	10,0	2,8	2,0	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
G	12,5	5,0	8,8	3,0	2,5	2,8	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8						
H	12,5	5,0	8,8	2,5	2,0	2,3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
I	11,3	5,0	8,1	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
J	10,0	5,0	7,5	2,5	2,0	2,3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
K	12,5	5,0	8,8	3,8	2,0	2,9	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8						
M	12,5	10,0	11,3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	10,0	7,5	8,8	10,0	7,5	8,8
N	15,0	7,5	11,3	3,8	2,5	3,1	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
O	12,5	6,3	9,4	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	3,8	3,8	2,5	3,1						
P	12,5	7,5	10,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
R	12,5	7,5	10,0	3,8	2,5	3,1	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8						
S	12,5	7,5	10,0	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	3,8	2,5	2,5	2,5						
U	10,0	5,0	7,5	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8	12,5	7,5	10,0	12,5	7,5	10,0
V	12,5	7,5	10,0	3,0	2,5	2,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5						
X	12,5	7,5	10,0	2,5	2,5	2,5	3,3	2,5	2,9	3,3	2,5	2,9						
Y	12,5	7,5	10,0	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	3,8	5,0	2,5	3,8						

$\bar{x}$ = Promedio de 15 estructuras

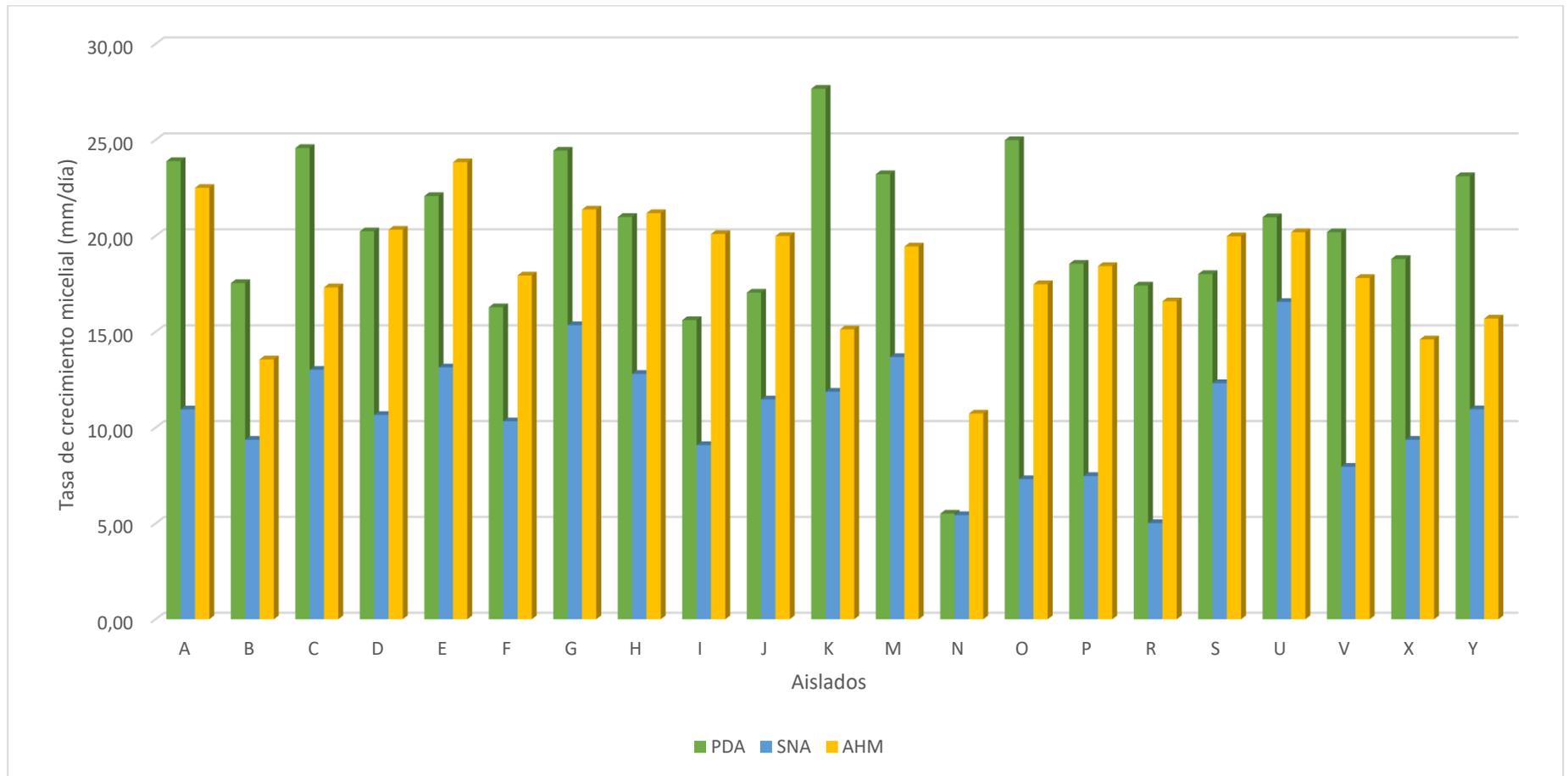
**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

La tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de las cepas de *Trichoderma* spp fue desarrollada en 3 medios de cultivo PDA, SNA y AHM, con el registro de datos durante 5 días, dando como resultado un rápido crecimiento de micelio en el medio de cultivo PDA (**Tabla 7-3**).

**Tabla 7-3:** Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de cepas de *Trichoderma* spp. en 3 medios de cultivo: PDA, SNA y AHM.

	Código	Tasa de crecimiento micelial en PDA (mm/día)	Tasa de crecimiento micelial en SNA (mm/día)	Tasa de crecimiento micelial en AHM (mm/día)
A	R1_M1A_PDAE	23,89	10,95	22,50
B	R3_M3_PDAE	17,54	9,37	13,56
C	R1_M1A_RB	24,58	13,02	17,32
D	R1_M3_RB	20,24	10,66	20,32
E	R1_M2A-D_PDA	22,08	13,15	23,84
F	R1_M3_PDAE	16,28	10,33	17,94
G	R1_M5-D_RB	24,44	15,35	21,37
H	R1_M2A_RB	20,99	12,81	21,19
I	R3_M3_PDA	15,61	9,09	20,10
J	b. R2_M3_PDA	17,05	11,47	19,99
K	a. R2_M3_PDA	27,67	11,88	15,13
M	R1_M2A_PDA	23,21	13,68	19,45
N	R2_6B_PDAE	5,51	5,44	10,74
O	R3_6B_PDA	24,99	7,31	17,48
P	R2_6B_PDA	18,55	7,48	18,43
R	R2_M4_RB	17,42	5,02	16,59
S	R2_M1A_RB	18,01	12,32	19,98
U	R3_M2A_PDAE	20,97	16,56	20,19
V	R2_6B-D_RB	20,19	7,96	17,81
X	R3_7A_PDAE	18,80	9,37	14,61
Y	R3_M1A_RB	23,11	10,96	15,69

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.



**Gráfico 3-3.** Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de cepas de *Trichoderma* spp. en 3 medios de cultivo: PDA, SNA y AHM.

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

### 3.2.2 Caracterización molecular

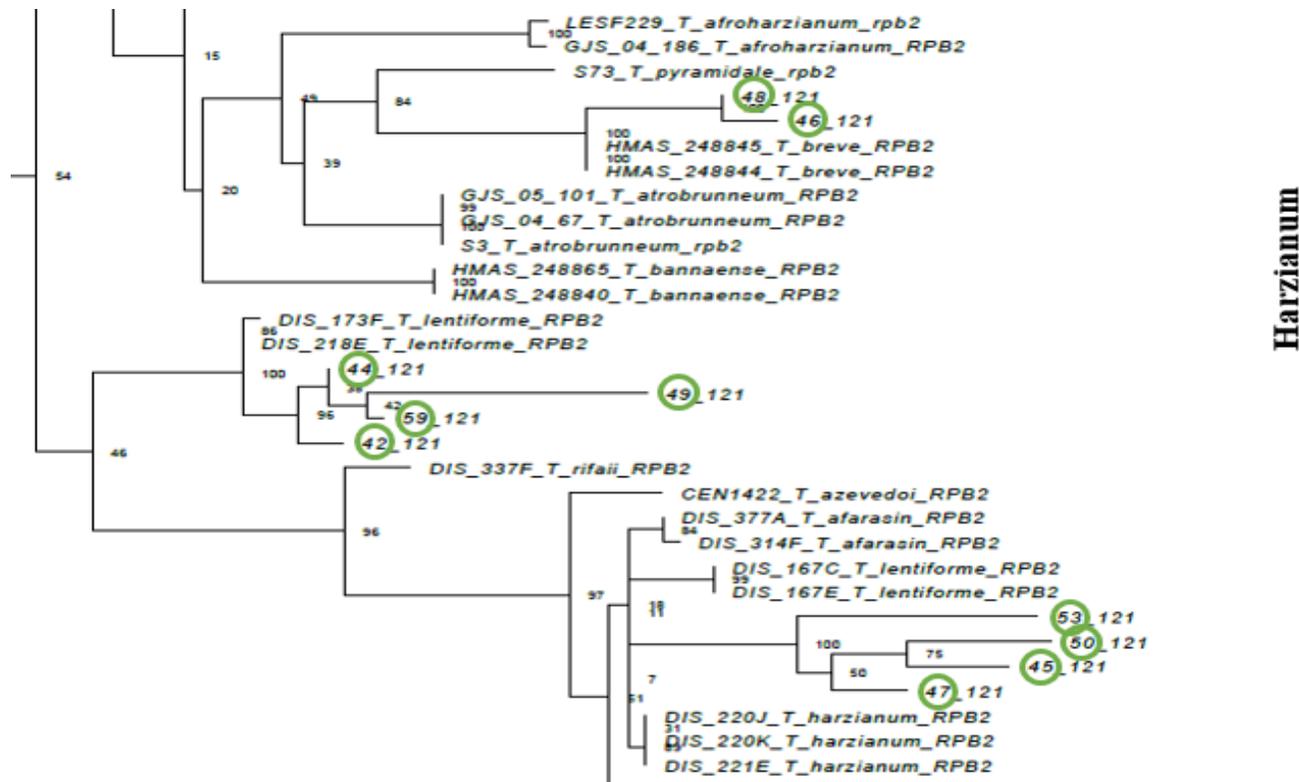
De acuerdo a la PCR realizada con el gen amplificado Rpb2 en la base de datos del NCBI se obtuvo que la cepa R1\_M1A\_PDAE (A) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 99,88% de identidad, la cepa R1\_M1A\_RB (C) corresponde a la especie *Trichoderma lentiforme* con un 99,89% de identidad, la cepa R1\_M3\_RB (D) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 99,58% de identidad, la cepa R1\_M2A-D\_PDA (E) corresponde a la especie *Trichoderma breve* con un 100% de identidad, la cepa R1\_M3\_PDAE (F) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 99,67% de identidad, la cepa R1\_M5-D\_RB (G) corresponde a la especie *Trichoderma breve* con un 99,78 % de identidad, la cepa R1\_M2A\_RB (H) corresponde a la especie *Trichoderma lentiforme* con un 100% de identidad, la cepa R3\_M3\_PDA (I) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 99,54% de identidad, la cepa R1\_M2A\_PDA (M) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 99,54% de identidad, la cepa R2\_6B\_PDAE (N) corresponde a la especie *Trichoderma sp.* con un 99,06% de identidad, R3\_6B\_PDA (O) corresponde a la especie *Trichoderma orientale* con un 99,45% de identidad, la cepa R2\_6B\_PDA (P) corresponde a la especie *Trichoderma sp.* con un 98,72% de identidad, la cepa R2\_M4\_RB (R) *Trichoderma sp.* con un 99,17% de identidad, la cepa R2\_M1A\_RB (S) corresponde a la especie *Trichoderma reesei* con un 99,9% de identidad, la cepa R3\_M2A\_PDAE (U) corresponde a la especie *Trichoderma harzianum* con un 100% de identidad, la cepa R2\_6B-D\_RB (V) corresponde a la especie *Trichoderma sp.* con un 99,21% de identidad y la cepa R3\_M1A\_RB (Y) corresponde a la especie *Trichoderma reesei* con un 99,49% de identidad. El rango de porcentaje de cobertura fue de 98,72% a 100%, por lo tanto, se puede decir que presentaron una cobertura satisfactoria (**Tabla 7-3**).

De las cepas R3\_M3\_PDAE (B), b. R2\_M3\_PDA (J), a. R2\_M3\_PDA (K), R3\_7A\_PDAE (X) no se logró realizar la caracterización molecular debido a que el secuenciamiento de esos aislados no fue de buena calidad.

**Tabla 8-3:** Identificación molecular mediante análisis BLASTn de cepas de *Trichoderma* spp. alineadas con especies de la base de datos del NCBI

Código		Gen amplificado	Número de nucleótidos	Especies identificadas	Accesión	Porcentaje de identidad	Porcentaje de Cobertura	Origen geográfico
A	R1_M1A_PDAE	RNA Polimerasa sub unidad II (Rpb2)	812	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675860.1</a>	99,88	100	Brasil
C	R1_M1A_RB		892	<i>Trichoderma lentiforme</i>	<a href="#">FJ442793.1</a>	99,89	100	Ecuador
D	R1_M3_RB		948	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675853.1</a>	99,58	100	Brasil
E	R1_M2A-D_PDA		776	<i>Trichoderma breve</i>	<a href="#">KY687984.1</a>	100	99	China
F	R1_M3_PDAE		905	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675853.1</a>	99,67	100	Brasil
G	R1_M5-D_RB		912	<i>Trichoderma breve</i>	<a href="#">MN080533.1</a>	99,78	100	Taiwan
H	R1_M2A_RB		837	<i>Trichoderma lentiforme</i>	<a href="#">FJ442793.1</a>	100	100	Ecuador
I	R3_M3_PDA		867	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675876.1</a>	99,54	100	Brasil
M	R1_M2A_PDA		868	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675876.1</a>	99,54	100	Brasil
N	R2_6B_PDAE		962	<i>Trichoderma</i> sp.	<a href="#">JN175532.1</a>	99,06	100	Arabia Saudita
O	R3_6B_PDA		903	<i>Trichoderma orientale</i>	<a href="#">JQ685884.1</a>	99,45	100	Austria
P	R2_6B_PDA		1041	<i>Trichoderma</i> sp.	<a href="#">JN175532.1</a>	98,72	97	Arabia Saudita
R	R2_M4_RB		959	<i>Trichoderma</i> sp.	<a href="#">JN175532.1</a>	99,17	100	Arabia Saudita
S	R2_M1A_RB		957	<i>Trichoderma reesei</i>	<a href="#">CP017984.1</a>	99,9	99	Guayana Francesa
U	R3_M2A_PDAE		912	<i>Trichoderma harzianum</i>	<a href="#">MZ675860.1</a>	100	100	Brasil
V	R2_6B-D_RB		889	<i>Trichoderma</i> sp.	<a href="#">JN175532.1</a>	99,21	99	Arabia Saudita
Y	R3_M1A_RB		973	<i>Trichoderma reesei</i>	<a href="#">JN175549.1</a>	99,49	100	México

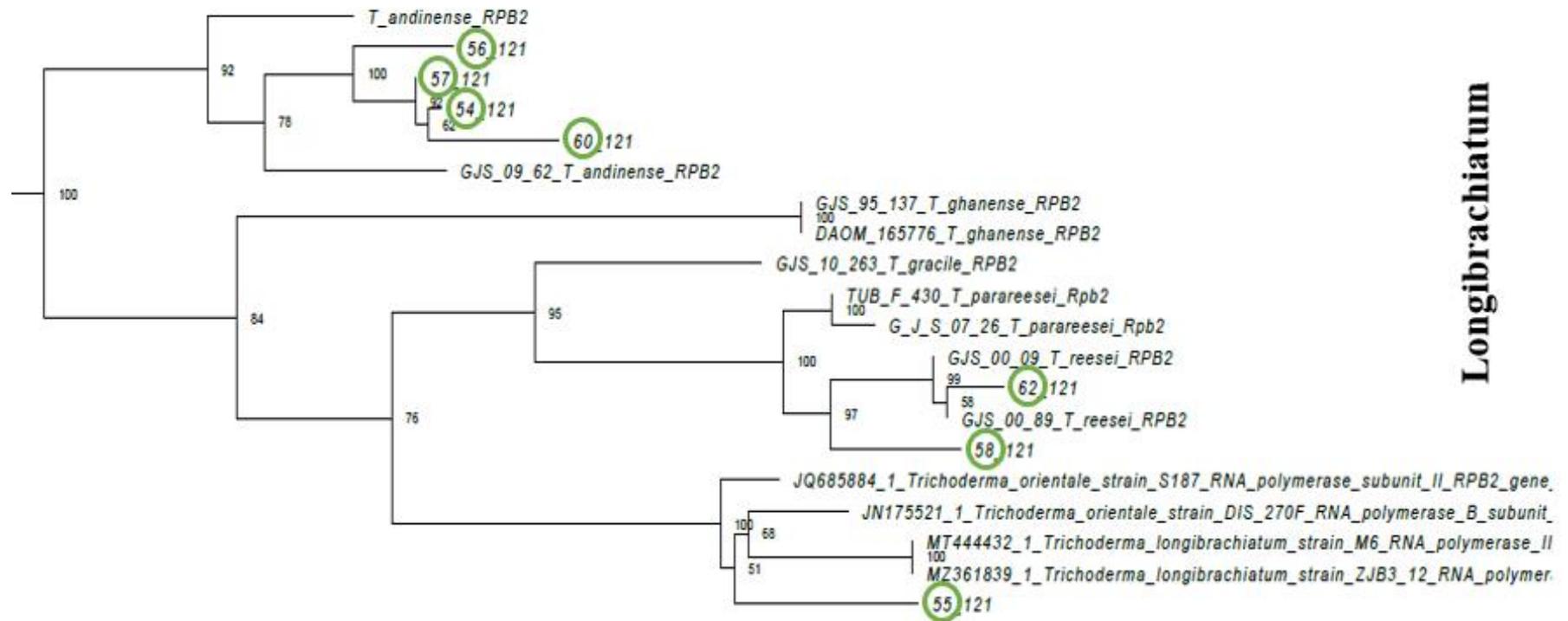
Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.



**Figura 44-3.** Árbol filogenético inferido a partir del alineamiento de las secuencias (Rpb2) de *Trichoderma* spp.

**Realizado por:** Del Rosario Romero, María, 2022.

De acuerdo al análisis filogenético se obtuvo que las cepas R1\_M1A\_PDAE (A), R1\_M1A\_RB (C), R1\_M2A\_RB (H) y R3\_M2A\_PDAE (U) corresponden a la especie *Trichoderma lentiforme*, las cepas R1\_M3\_RB (D), R1\_M3\_PDAE (F), R3\_M3\_PDA (I) y R1\_M2A\_PDA (M) corresponden a la especie *Trichoderma harzianum*, y las cepas R1\_M2A-D\_PDA (E) y R1\_M5-D\_RB (G) corresponden a la especie *Trichoderma breve*, y estas especies pertenecen al clado *Harzianum*, además de comprobar que existe similitud entre los estudios con los datos del NCBI y el análisis filogenético.



**Figura 45-3.** Árbol filogenético inferido a partir del alineamiento de las secuencias (Rpb2) de *Trichoderma* spp.

Realizado por: Del Rosario Romero, María, 2022.

De acuerdo al análisis filogenético se obtuvo que las cepas R2\_6B\_PDAE (N), R2\_6B\_PDA (P), R2\_M4\_RB (R) y R2\_M1A\_RB (V) corresponden a la especie *Trichoderma andinense*. Las cepas R2\_M1A\_RB (S) y R3\_M1A\_RB (Y) corresponden a la especie *Trichoderma reesei* y la cepa R3\_6B\_PDA (O) corresponde a la especie de *Trichoderma longibrachiatum* (*T. orientale* según los datos del NCBI), además se comprobó que las cepas mencionadas pertenecen al clado *Longibrachiatum* y existe similitud entre los estudios con los datos del NCBI y el análisis filogenético.

Este es uno de los estudios pioneros que tuvo como objetivo estudiar los antagonistas cultivables que puedan ser utilizados específicamente del género *Trichoderma* en el control biológico de los diferentes cultivos que se están desarrollando en los suelos agrícolas del Cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos.

En el año de 1794 Persoon describió a *Trichoderma* spp., además se ha encontrado en todas las latitudes, a partir de zonas polares hasta la zona ecuatorial, haciéndose presente en una extensa diversidad de ambientes. Es un hongo sencillo de detectar, principalmente en lugares que están compuestos por materia orgánica y desechos de origen vegetal en descomposición (Infante *et al.* 2009). A nivel morfológico, se vuelve muy confusa la identificación de las especies, ya que existe una similitud de su morfología y evolución de dichas especies. Al observar en el microscopio la morfología, se presentan hifas hialinas septadas, fiálides, conidios y conidióforos. Los conidióforos se presentan son hialinos y por lo general presentan ramificaciones con las hifas en un ángulo de 90° y algunas veces llegan a presentar una disposición piramidal. Las fiálides son hialinas, presentan forma de matraz, se fijan a los conidióforos por la sección más espaciosa y algunas veces se presentan de manera solitarias o algunas veces en disposición de racimos con conidios en el extremo. Los conidios son unicelulares ya sea de forma elipsoidal o redonda con tonalidad verdosa. Dependiendo de las condiciones sobre las cuales se desarrollen, algunas especies de *Trichoderma* pueden presentar clamidosporas. En la presente investigación las 21 cepas obtenidas reúnen las características propuestas por Infante *et al.*, (2019).

De acuerdo a Conrado *et al.*, (2019) existen 5 clados del género *Trichoderma*: *Harzianum*, *Virens*, *Stromaticum*, *Viride* y *Longibrachiatum*, de los cuales el clado que contiene mayor cantidad de especies es el clado *Viride*, que se haya compuesto por docenas de especies con diferentes patrones de morfología y por su alto número de especies filogenética se lo puede dividir en diferentes subclados. En este estudio los clados que fueron hallados son: el clado *Harzianum* abarca poblaciones de especies biológicas como clonales, también ciertos linajes filogenéticos solitarios que difieren de otros, debido a esto se vuelve más trabajosa la aplicación de un solo concepto para definir las especies, *Trichoderma harzianum stricto sensu* es una especie escasa que posee una distribución dominante en el hemisferio norte, *T. lentiforme* se encuentra comúnmente como habitante del suelo en América tropical. Estos patrones de distribución se pueden tener en cuenta en la búsqueda de aislamientos de *T. harzianum* para el control biológico, con la expansión del muestreo a otros sustratos, no solo el suelo. En un reciente estudio de muestras del clado *Harzianum*, originario de varios sustratos y regiones, se identificaron algunos patrones biogeográficos. En el presente estudio desarrollado en los suelos agrícolas de las Islas Galápagos se obtuvieron 21 aislados del género *Trichoderma* de los cuales se identificaron 6 especies: *T. harzianum*, *T. lentiforme*, *T. breve*, *T. andinense*, *T. longibrachiatum* y *T. reesei*. Las

3 primeras especies corresponden con un 58,8% al clado *harzianum*, la morfoespecie *T. harzianum* que de acuerdo con la literatura posee una amplia distribución es más frecuente encontrarla. Además, es empleada en el biocontrol de enfermedades de las plantas a nivel mundial (Woo *et al.*, 2014), y la más destacada según los estudios sobre la diversidad de especies en suelos y restos de plantas en varias regiones geográficas. Las especies *T. andinense*, *T. longibrachiatum* y *T. reesei* corresponden con el 41,2% al clado *Longibrachiatum*, dentro de la filogenia de género, se encuentran especies que conforman un grupo sólido, que tienen en común cualidades que abarcan la formación de conidióforos con limitadas ramas y en cuanto a las fiálides presentan disposición irregular a lo largo del eje principal y ramificaciones.

Según Benítez (2004), las especies de *Trichoderma* más eficaces como agentes antagonísticos son *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*, mientras que *T. reesei* se considera un organismo modelo debido a los métodos biológicos moleculares establecidos para esa especie y a las cepas recombinantes disponibles. Para Druzhinina *et al.*, (2008) *T. reesei* posee gran capacidad para degradación de sustratos celulósicos. Las especies de este clado son mesófilas, aptas para crecer de manera acelerada y esporular a temperaturas de hasta 40 °C, además de presentar hifas algodonosas de color blanco y conidios en diferentes tonalidades. Es por ello, que cepas de este clado logran producir infecciones oportunistas en individuos con inmunosupresión, con énfasis en *T. longibrachiatum stricto sensu*. El género *Trichoderma* spp. morfológicamente, en su fase de crecimiento inicial, muestra tonalidades que van desde blanco a un verde oscuro y algunas veces se presenta un color amarillento, su esporulación suele presentarse de manera densa y en cuanto a las estructuras ésta posee dimensiones muy variables (Mello *et al.*, 2007).

Según Carvalho *et al.*, (2014) afirma que *Trichoderma* se destaca como herramienta biológica para el manejo de enfermedades y aumento de la productividad agrícola. Las especies de hongos de este género exhiben una amplia gama de estilos de vida e interacciones con otros hongos, animales y plantas. Debido a su capacidad para antagonizar hongos fitopatógenos y para estimular el crecimiento y defensa de las plantas, algunos aislados de *Trichoderma* se utilizan para el control biológico de enfermedades de las plantas, con una gran cantidad de productos comerciales. Además, tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, una mayor productividad de los cultivos, una mayor absorción de nutrientes. El hongo del género *Trichoderma*, se destaca entre los agentes de biocontrol, ya que ha sido utilizado como ingrediente activo en varios productos agrícolas vendidos a nivel mundial (Woo *et al.*, 2014), ya que produce múltiples efectos benéficos en las plantas, entre que la reducción de estrés abiótico y el biocontrol de enfermedades. Además, según investigaciones realizadas por Harman *et al.*, (2018) afirman que el uso de *Trichoderma* mejora el desarrollo de las plantas, aumenta la tasa de emergencia de plántulas, sistema de raíces, brotes, contenido de clorofila, la productividad, así como también el tamaño y

número de flores, aumenta el área de absorción favoreciendo así la asimilación y translocación de nutrientes, lo que en consecuencia intensifica la biomasa vegetal.

De los 8 cultivos muestreados, el que presentó una mayor cantidad de aislados de *Trichoderma* fue el cultivo de café *var. catimor* con 6 aislados (con la especie *T. harzianum*), seguido por los cultivos de Hoja de Kale con 4 aislados (especies *T. lentiforme* y *T. reesei*), cultivo de melón con 4 (especies *T. breve*, *T. lentiforme* y *T. harzianum*), cultivo de Café *var. Típica* con 1 (especie *T. andinense*), cultivo de tomate con 1 (especie *T. breve*), cultivo de maíz amarillo con 4 (especies *T. andinense* y *T. longibrachiatum*), bosque no intervenido con 1 (especie no identificada) y en el cultivo de pimiento 0 aislados de *Trichoderma*. Existe una gran variedad de medios de cultivos que se utilizan para el aislamiento de *Trichoderma* entre los cuales se hallan: Agar bajo en nutrientes (SNA) que inicialmente fue descrito para caracterizar especies de *Fusarium*, luego fue utilizado para la caracterización morfológica y para medir la tasa de crecimiento del hongo. Papa Dextrosa Agar (PDA) que de acuerdo a Jaklitsch (2009) afirma que existen diferentes marcas las cuales proporcionan diferentes resultados, pero no es recomendable para almacenar cultivos de *Trichoderma* por mucho tiempo. Agar harina de maíz (AHM) es un medio muy adecuado para almacenar cultivos en tubos con tapa rosca. Rosa de bengala (RB) este medio es apropiado para realizar la caracterización cultural y morfológica. Papa Dextrosa Agar enmendado (PDAE) este medio es selectivo para aislar especies de *Trichoderma* del suelo, siendo superior al TSM (Gil *et al.*, 2009). Medio selectivo de *Trichoderma* (TSM) que fue desarrollado para aislar específicamente especies de *Trichoderma*. En este estudio el medio de cultivo que presentó mejores resultados en el aislamiento fue el medio Rosa de bengala (RB) con 8 aislados, seguido del medio PDA con 7 aislados, en PDAE 6 aislados y finalmente el medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) en donde no se obtuvo ningún aislado. No está claro por qué siendo un medio selectivo para *Trichoderma* no se obtuvieron aislados de este género, los resultados observados en este estudio son similares a los descritos por Malymon, (2018) en el cual solo se lograron aislar 5 géneros de hongos y cuyas colonias se identificaron como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mortierella*, *Acremonium* y *Alternaria*, y cero aislados del género *Trichoderma*, además la literatura afirma que adicionando 50% de captan es efectivo el aislamiento de *Trichoderma* en suelos que poseen alta concentración de especies de *Fusarium*, probablemente esta podría ser una de las causas para que no se haya obtenido ni un aislado con este medio de cultivo. Para observar el crecimiento de las colonias de *Trichoderma* el medio de cultivo que mejores resultados proporcionó fue el medio PDA, en el cual se pudo observar su aspecto algodonoso, la presencia de anillos concéntricos cuando su desarrollo fue alternado con periodos de luz y oscuridad. Se observó un color blanco algodonoso cuando el crecimiento era en ausencia de luz y tonalidades verdosas con presencia de luz (Jaklitsch, 2011). Entre las técnicas de aislamiento tradicionalmente utilizados se encuentran: siembra por estría, siembra por extensión en placa, estrías continuas, dilución y centrifugación. Pero cabe

recalcar que en este estudio se utilizó la técnica de extensión en placa ya que es la que mejores resultados brinda cuando se busca seleccionar una cepa a partir de una mezcla con varios tipos de microorganismos en ambientes diversos como el suelo (Santana, 2020).

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 21 cepas de *Trichoderma* a partir de las 8 muestras de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos que corresponden a los cultivos de: Kale (4 cepas), melón (4 cepas), café *var. Catimor* (6 cepas), café *var. Típica* (1 cepa), tomate (1 cepa), maíz Amarillo (4 cepas), bosque no intervenido (1 cepa) y pimiento (0 cepas).
  
- Se caracterizó cultural, morfológica y molecularmente los antagonistas fungosos nativos, cultivables de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos obteniendo como resultado de las 21 cepas, 2 clados y 6 especies en el análisis filogenético las cuales fueron: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lentiforme* y *Trichoderma breve* que son pertenecientes al clado *harzianum*, y las especies *Trichoderma andinense*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma reesei* que pertenecen al clado *longibrachiatum*.
  
- Se determinó que la técnica más apropiada de las estudiadas para el aislamiento de antagonistas fungosos de suelos agrícolas del cantón Santa Cruz, parroquia Bellavista de la provincia de Galápagos fue la siembra por el método de dilución y extensión en placa en el medio de cultivo Rosa de bengala (RB), debido a que se recuperaron el mayor número de aislados del género *Trichoderma* (se recuperó 8 aislados de *Trichoderma*) en relación a los medios PDA (7 aislados), PDAE (6 aislados) y TSM (0 aislados).

## RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar pruebas de antagonismo con las 21 cepas de *Trichoderma* obtenidas para conocer su capacidad antagonista frente a agentes fitopatógenos habitantes del suelo.
- Se recomienda repetir los estudios de las cepas R3\_M3\_PDAE (B), b. R2\_M3\_PDA (J), a. R2\_M3\_PDA (K), R3\_7A\_PDAE (X) para completar la identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. obtenidas mediante PCR y secuenciadas con el gen amplificado Rpb2.
- Se sugiere utilizar el método de aislamiento por extensión en placa con el medio de cultivo Rosa de bengala (RB) para la obtención de aislados de *Trichoderma* spp.
- Se recomienda experimentar con otras variantes del medio TSM para conocer la eficiencia que puede tener para el aislamiento de *Trichoderma*.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**ADN:** Sigla de ácido Desoxirribonucleico, es un compuesto orgánico cuyas moléculas contienen las instrucciones genéticas que coordinan el desarrollo y funcionamiento de todos los seres vivos y algunos virus, y que transmiten las características hereditarias de cada ser vivo (Márquez et al., 2011: p.1).

**Agar:** Sustancia similar a la gelatina obtenida de algas marinas y utilizadas para solidificar medios de cultivo en los que se cultivan y estudian los microorganismos (Márquez et al., 2011: p.1).

**Agua destilada:** Agua obtenida por destilación es decir por condensación de vapor de agua obtenido por la ebullición o evaporación (Márquez et al., 2011: p.2).

**Agua esterilizada:** Agua libre de cualquier tipo de organismo vivo, cuya eliminación es obtenida por autoclavado (en autoclave) (Márquez et al., 2011: p.2).

**Aislado:** Una sola espora o cultivo y los cultivos que se derivan de ellos. Se utiliza para indicar las colecciones de un microorganismo obtenidas a diferentes tiempos (Márquez et al., 2011: p.1).

**Aislamiento:** Proceso que se sigue para la obtención de un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa et al., 2006: p.14).

**Anillo:** Es una estructura circular alrededor de un estípite. Corresponde al velo parcial que protege las lamelas cuando están jóvenes (Márquez et al., 2011: p.2).

**Antagonismo:** Relación entre dos especies de organismos contrarios, en la cual uno de los dos afecta la vida del otro, ya sea inhibiendo parcialmente o totalmente su crecimiento o incluso matándolo (Ulloa et al., 2006: p.26).

**Antagonista:** Organismo que causa daño significativo a otro organismo (Márquez et al., 2011: p.4).

**ARN:** Sigla de Ácido Ribonucleico. El ácido ribonucleico es un tipo de ácido nucleico, una molécula polimérica lineal formada por unidades más pequeñas llamadas nucleótidos. Interviene en varias funciones biológicas importantes, como la codificación genética y la decodificación durante la traducción de proteínas, la regulación y la expresión de genes (Márquez et al., 2011: p.5).

**ARN mensajero (ARNm):** Es una molécula de ARN de cadena simple, complementaria a una de las cadenas de ADN de un gen. El ARNm es una versión del ARN del gen que sale del núcleo celular y se mueve al citoplasma donde se fabrican las proteínas (Márquez et al., 2011: p.5).

**Caracterización:** La caracterización es un tipo de descripción cualitativa que puede recurrir a datos o a lo cuantitativo con el fin de profundizar el conocimiento sobre algo. Para cualificar ese algo previamente se deben identificar y organizar los datos; y a partir de ellos, describir (caracterizar) de una forma estructurada; y posteriormente, establecer su significado (sistematizar de forma crítica) (Márquez et al., 2011: p.6).

**Clado:** Formas prefijadas empleadas a menudo en botánica para dar idea a algo en que interviene la rama como en el género (Pío Font Quer, 2010: p. 228).

**Clamidosporas:** Espora asexual en reposo de pared gruesa o de doble pared formada a partir de células hifas (terminales o intercalares) o por transformación de células conidiales que pueden funcionar como una etapa de hibernación (D'Arcy et al., 2001: p.1).

**Conidio:** Es una spora fúngica asexual nucleada, inmóvil que se desarrolla externamente o se libera de la célula que la formó (D'Arcy et al., 2001: p.1).

**Conidióforo:** Hifa simple o ramificada, que esta morfológicamente y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios; estos generalmente se encuentran sobre células conidiógenas especializadas, las cuales se pueden disponer de diversas maneras (Ulloa et al., 2006: p.121).

**Cosmopolita:** De especies animales y vegetales aclimatadas a todos los tipos de clima y que tienen una distribución muy amplia (Cortes, 2019).

**Desnaturalización:** Proceso por el cual una enzima pierde la conformación que le permite tener actividad (Ulloa et al., 2006: p.122).

**Divergente:** Tipo de rama himenífera en el que hay una zona central de hifas (capa media) de la que divergen oblicuamente dos hileras de células (los estratos laterales) (Ulloa et al., 2006: p.164).  
**Elicitar:** Se refiere al traspaso de información de forma fluida (Cortes, 2019).

**Endófito/ta:** Hongo que vive dentro de tejidos vegetales sin mostrar signos externos de su presencia, como ciertos parásitos fúngicos de pastos, los cuales son tóxicos para los alimentos que se alimentan (Ulloa et al., 2006: p.77).

**Enzimas:** Sustancia proteínica que actúa como catalizador de procesos metabólicos (Cortes, 2019).

**Especie:** Es la limitación de lo genérico en un ámbito morfológicamente concreto. La determinación de los límites específicos es puramente subjetiva y, por tanto, expuesta a las modalidades de la interpretación personal (Pío Font Quer, 2010: p.405).

**Esporular:** Acción de producir esporas (Márquez et al., 2011: p.13).

**Espora:** Pequeña unidad de propagación, unicelular o multicelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que es capaz de originar un nuevo individuo (Ulloa et al., 2006: p.202).

**Fiálides:** Tipo de célula conidiógena, de forma de botella que producen conidios blásticos (fialoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta a partir de un locus (monofiálide; con una abertura) o varios loci (polifiálide) sin que haya aumento de la longitud de la fiálide misma (Ulloa et al., 2006: p.236).

**Hialino:** Transparente o casi; translúcido; utilizado a menudo en el sentido de incoloro (D'Arcy et al., 2001: p.2).

**Hifa:** Filamento tubular que representa la unidad estructural (Talo) de la mayoría de los hongos (Ulloa et al., 2006: p.286).

**Identificación:** Proceso que determina a cuál grupo taxonómico pertenece el organismo o el aislamiento en cuestión (Márquez et al., 2011: p.19).

**Incubación:** Adjetivo del período durante el cual una infección es invisible. Comienza con la invasión del organismo hospedero y termina con la aparición de los síntomas (Márquez et al., 2011: p.19).

**Inóculo:** Patógeno o sus partes que pueden causar infección; la porción de patógenos individuales que entran en contacto con el hospedador (Márquez et al., 2011: p.20).

**Inoculación:** Llegada o transferencia de un patógeno a un huésped (Márquez et al., 2011: p.20).

**Inocular:** Poner un patógeno en contacto con una planta huésped o un órgano vegetal (Márquez et al., 2011: p.20).

**Lageniforme:** en forma de frasco o redoma, elíptico y con un cuello largo.

**Marcador molecular:** Una característica molecular (un punto de referencia) en un fragmento de ADN que se puede usar para comparar ese ADN en grados de similitud con los de otros microorganismos (Márquez et al., 2011: p.22).

**Medio de cultivo:** Un sustrato de una composición química definida empleado en el laboratorio para cultivar hongos u otros microorganismos. Los medios son líquidos o gelificados con agar (Márquez et al., 2011: p.22).

**Micelio:** Conjunto o masa de hifa que constituye el cuerpo vegetativo o talo del hongo (Ulloa et al., 2006: p.364).

**Micoparasitismo:** Proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno (Márquez et al., 2011: p.24).

**Morfotipo:** En las especies polimorfas, cualquier estado morfológico determina sus características formales (Pío Font Quer, 2010: p. 735).

**Patógeno:** Agente capaz de provocar enfermedades (Márquez et al., 2011: p.26).

**Reacción en cadena de la polimerasa:** técnica que permite una amplificación (multiplicación) casi infinita de un segmento de ADN para el que se dispone de un cebador (un fragmento corto de ese ADN) (Márquez et al., 2011: p.28).

**Ribonucleasa (RNasa):** Enzima que descompone el ARN (Márquez et al., 2011: p.29).

**Secuenciación del genoma:** Uno o varios procesos de laboratorio que determina la secuencia completa de ADN en el genoma de un organismo. Esto supone la secuenciación de todos los cromosomas de un organismo con ADN, así como el contenido en el de mitocondrias y, para las plantas, en cloroplastos (Márquez et al., 2011: p.31).

**Septo:** La pared transversal de una hifa, formada después de una división nuclear separando núcleos hijos. Normalmente tiene un poro en su centro (Márquez et al., 2011: p.31).

**Sintomatología:** Parte de la patología vegetal que estudia los síntomas de las enfermedades, así como la etiología estudia sus causas (Pío Font Quer, 2010: p.1003).

**Verticilado/da:** Tipo de ramificación en el que las ramas (pedicelos, métulas, fiálides, etc.) nacen un mismo nivel en la hifa o soporte (esporangióforo, conidióforo, etc.) y crecen oblicuamente hacia arriba con respecto al eje central (Ulloa et al., 2006: p.352).

## BIBLIOGRAFÍA

**ACURIO, R.; & ESPAÑA, C.** Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. [En línea] 2017, 25(1), pp. 53-61. [Consulta: 04 marzo 2022]. ISSN:1390-3799; eISSN:1390-8596

**ALFENAS, Acelino.** Métodos em Fitopatologia. ALFENAS. 2a ed. [En línea] 2016. Minas Gerais-Brazil: UFV. [Consulta: 01 marzo 2022]. 8572695591.

**AMOBONYE, Ayodeji.** Potencial biotecnológico de *Beauveria bassiana* como fuente de nuevos biocatalizadores y metabolitos. *Revisiones críticas en biotecnología*. [En línea] 2020, 40(7), pp. 1019-1034. [Consulta: 04 abril 2021]. DOI: 10.1080 / 07388551.2020. 1805403. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2020.1805403?scroll=top&needAccess=true>.

**ÁVILA, AGUILAR, CARREÓN, LÓPEZ, VALENCIA, MEDINA, REZA.** Manual de prácticas de microbiología. *Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. [En línea], (México) 2014. [Consulta: 01 abril 2021]. Disponible en: [http://bios.biologia.umich.mx/obligatorias/botanica/man\\_microbiologia\\_25septiembre2014.pdf#page=22](http://bios.biologia.umich.mx/obligatorias/botanica/man_microbiologia_25septiembre2014.pdf#page=22).

**BAHENA, Anahid.** Actividad antagonica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa (Trabajo de titulación). Universidad autónoma del estado de México. Tenancingo-México. 2020. pp 8-9 [Consulta: 20 de Febrero de 2022].

**BENÍTEZ, A.; LIMÓN C.; & CODÓN A.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. [En línea] 2004, 7(4), pp 110-115. [Consulta: 12 de Abril de 2021.] ISSN: 1139-6709 Disponible en; [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sci_arttext&tlng=pt). 1139-6709.

**BENÍTEZ, Tahía.; RINCÓN, Ana.; LIMÓN, Carmen.; & A CODÓN, Antonio.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. [En línea] 2004. [Consulta: 12 de Abril de 2021.] Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sci_arttext&tlng=pt). 1139-6709.

**CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G. J.** Systematics of the *Trichoderma* harzianum species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 2015 107(3) pp. 558-590.

**CONDALAB.** *Agar Rosa de Bengala: Recuento de hongos filamentosos y levaduras.* [blog] 2019. [Consulta: 30 de marzo de 2021]. Disponible en: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1081\\_es\\_1.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1081_es_1.pdf).

**CONRADO, M.; MAZARO, S.; & DA SILVA, J.** *Trichoderma* uso na agricultura. (Brasilia, DF) Embrapa, 2019. [Consulta: 14 de marzo de 2022]. pp 538. ISBN: 978-85-7035-943-8

**CORTES, Francisco.** Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. Universidad de Salamanca, España 2019. ISBN: 8478005722, [Consulta: 5 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://dicciomed.usal.es/bibliografia>

**DRUZHININA, I. S.; KOMOŃ-ZELAZOWSKA, M.; KREDICS, L.; HATVANI, L.; ANTAL, Z.; BELAYNEH, T.; KUBICEK, C. P.** Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 2008. 154(11), pp. 3447-3459.

**D'ARCY, C. J.; EASTBURN, D. M.; & SCHUMANN, G. L.** “Illustrated Glossary of Plant Pathology”. The Plant Health Instructor. *The American Phytopathological Society (APS).* 2001, pp.1-6. [Consulta: 26 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/default.aspx>

**ENRIQUEZ, Martha.** ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO A PARTIR DE QUINUA, *Chenopodium quinoa*, PARA LA PRODUCCIÓN DEL HONGO *Lentinus* spp. [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Central Del Ecuador, Facultad de Ingeniería Químicas, Escuela de Ingeniería Química. (Quito-Ecuador), 2016. pp. 5-8. [Consulta: 01 abril 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8014/1/T-UCE-0017-0038-2016.pdf>

**FERNÁNDEZ, Carlos.** Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* [En línea] 2013, 65(3), pp. 361-369. [Consulta: 04 abril 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v65n3/mtr09313.pdf>

**FERNÁNDEZ, Orietta.** Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos.* [En línea] 2001, pp 96-100. [Consulta: 10 de Diciembre de 2021.] Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6578/A2120e.pdf?sequence=1>.

**FUENTES, Adrian.** *La centrifugación.* [Blog]. 2015, [Consulta: 01 abril 2021]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/procedimientos-basicos-de-laboratorio/centrifugacion.html#:~:text=La%20Centrifugaci%C3%B3n%20es%20un%20m%C>

3% A9todo,de% 20una% 20centrifuga% 20de% 20laboratorio.&text=Cuanto% 20mayor% 20sea% 20el% 20tama% C3%.

**GLARE, Travis.** Diversidad de los hongos patógenos de insectos del género *Metarhizium* en Nueva Zelanda. [En línea] 2021, pp 440-456. [Consulta: 05 de noviembre 2021]. Disponible en: . <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0028825X.2021.1890155>.

**GONZÁLEZ, Andrés.** Cálculo del balance hídrico a nivel del suelo en la zona agrícola de la cuenca Pelikanbay en la Isla Santa Cruz-Galápagos, Ecuador. [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental. Quito-Ecuador, 2013. pp 32-42. [Consulta: 30 marzo 2021]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/6219/1/CD-4843.pdf>

**GUÉDEZ C.; CAÑIZÁLEZ L.; CASTILLO C.; & OLIVAR R.** Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. [En línea] 2009, (Venezuela) 29(1) [Consulta: 12 de Abril de 2021.] ISSN: 1315-2556 Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562009000100007&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562009000100007&script=sci_arttext&tlng=en)

**GUERRERO, Raquel.** Selección y efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). (Trabajo de titulación) (Maestría). [En línea]. Universidad Nacional de La Plata; Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. (La Plata- Argentina), 2016. pp 20-25. [Consulta: 29 marzo 2021]. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/53414/Documento\\_completo\\_\\_\\_.pdf-PDFA.pdf?sequence=5&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/53414/Documento_completo___.pdf-PDFA.pdf?sequence=5&isAllowed=y).

**HARMAN, Gary.** Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. [En línea] Cornell University (Geneva-Estados Unidos). 2016. [Consulta: 12 de Abril de 2021]. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0190 Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0190>

**HARRIS, JAMES.** Modified Method for Fungal Slide Culture. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. [En línea] 1986, Texas. 24(3) [Consulta: 23 de diciembre de 2021] American Society for Microbiology. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jcm.24.3.460-461.1986>

**HERNÁNDEZ, Ana.; BAUTISTA, Silvia.; VELÁZQUEZ, Miguel.; & HERNÁNDEZ, Annia.** Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. Revista Mexicana de Fitopatología. [En línea] 2007, (México) 25(1), pp. 79-93. [Consulta: 30 marzo 2021]. ISSN 2007-8080. Disponible en:

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000100009#:~:text=Los%20microorganismos%20antagonistas%20\(bacterias%2C%20levaduras,Wisniewski%20y%20Wilson%2C%201992\).](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009#:~:text=Los%20microorganismos%20antagonistas%20(bacterias%2C%20levaduras,Wisniewski%20y%20Wilson%2C%201992).)

**INFANTE, Danay.; GONZÁLEZ, Noyma.; & REYES, Yusimy.** Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*. [En línea] 2015, (Cuba) 24(1), pp 87-92. [Consulta: 29 marzo 2021]. ISSN 2224-4697. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002#:~:text=Estas%20especies%20presentan%20diferentes%20modos,%2C%20resistencia%20inducida%2C%20entre%20otros.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002#:~:text=Estas%20especies%20presentan%20diferentes%20modos,%2C%20resistencia%20inducida%2C%20entre%20otros.)

**JAKLITSCH, W. M.** European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, 2009. 63(1), pp 1-91. [Consulta: 29 marzo 2021].

**JAKLITSCH, W. M.** European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal diversity*, 2011. 48(1), pp 1-250. [Consulta: 23 marzo 2022]. DOI: 10.1007/s13225-011-0088-y

**KUBICEK, Christian & HARMAN, Gary.** *Trichoderma & Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. 1998, (1), pp 3-25. [Consulta: 23 febrero 2022]. ISBN 0-7484-0572-0.

**KUMAR, M.; ASHRAF.** Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. *Probiotics and Plant Health*. [En línea] 2017, pp 497-506. Springer, Singapurpp. [Consulta: 12 de Abril de 2021.] ISBN: 978-981-10-3473-2 Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-3473-2\\_23](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-3473-2_23). 978-981-10-3473-2.

**KUMAR, S.; et al.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* [en línea], 2016, 33 (7), pp. 1870 - 1874. [Consulta: 26 marzo 2022]. Disponible en: <https://academic.oup.com/>

**MALYMON, Y.** Aislamiento de especies de *Trichoderma* en suelos dedicados al cultivo de arroz en España. (Trabajo de titulación) Universidad de Zaragoza (España) 2018. [Consulta: 12 de marzo de 2022.] Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/77954/files/TAZ-TFG-2018-1741.pdf>;

**MARÍN, Sebastián.** Caracterización del archivo de investigación: Un estudio de caso. *Memoria Académica*. [En línea] 2016, (Argentina) 5(2), pp. 3-8. [Consulta: 29 marzo 2021]. ISSN 1853-9912 Disponible en: [http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art\\_revistas/pr.7368/pr.7368.pdf](http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art_revistas/pr.7368/pr.7368.pdf).

**MÁRQUEZ, Kadir.; VEGA, Liliana.; & ALVAREZ, Luisa.** *Glosario de Términos Agronómicos*. Depósito Legal de la Biblioteca Nacional del Perú. [En línea] Marzo de 2021.

[Consulta: 8 de Febrero de 2022.] Disponible en: <https://www.unheval.edu.pe/portal/wp-content/uploads/2021/03/Libro-GLOSARIO-DE-TERMINOS-AGRONOMICOS.pdf>.

**MARTÍNEZ, B.** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. [En línea] Enero de 2013. [Consulta: 05 de Diciembre de 2021.] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001.1010-2752](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001.1010-2752).

**MARTÍNEZ, B., INFANTE, D., & REYES, Y.** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 2013. 28(1), pp 1-11. [Consulta: 8 de Febrero de 2022.]

**MELLO, M. S. C., ÁVILA, R. Z., BRAÚNA, L. M., PÁDUA, R. R., & GOMES, D.** Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 2007 11(1), p 39. [Consulta: 27 de Febrero de 2022.]

**MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; & SILVA, J.C.** *Trichoderma*: uso na agricultura. [En línea] 2019, (Brasil) Embrapa. [Consulta: 09 abril 2021]. ISBN 978-85-7035-943-8. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/208230/1/livro-Trichoderma-online-06.01.20.pdf>

**MILLER, M.** *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. Gateway computing environments workshop (GCE), 2010. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>

**NAVARRO, Karla.** *Metarhizium anisopliae; El hongo que controla plagas de insectos*. [Blog] 2018. [Consulta: 1 abril 2021]. Disponible en: <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/mundo-vivo/21272-Metarhizium-hongo-microbiologia-cicese>

**NEGRETE, José, & ARÉBALO, Miguel.** Anuario climatológico. Estación agrometeorológica 2014. [Consulta: 5 marzo 2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/ANUARIOZ2014.pdf>

**NUÑO, Santiago.** *Agar papa dextroza. Insumolab*. [Blog] 2015. [Consulta: 1 abril 2021]. Disponible en: [https://www.insumolab.cl/descargas/industria/placas\\_90mm/ficha\\_tecnica/02.pdf](https://www.insumolab.cl/descargas/industria/placas_90mm/ficha_tecnica/02.pdf).

**PADILLA, Michael.** Agrobacterium-Mediated Co-transformation of Multiple Genes in *Metarhizium robertsii*, *Mycobiology*. [En línea] 2018, 45(2), pp 84-89. [Consulta: 2 abril 2021].

DOI: 10.5941/MYCO.2017.45.2.84. Disponible en:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5941/MYCO.2017.45.2.84>

**PÍO FONT QUER.** *Diccionario de Botánica*. 2a Ed. Balderas, México D.F.: Ediciones Península S.A., 2010. ISBN: 968186283X, pp.1-1124.

**ROBLEDO, Antonio.** *Control Biológico*. [Blog] 2016. [Consulta: 1 abril 2021]. Disponible en:  
[https://www.ecured.cu/Control\\_biol%C3%B3gico#:~:text=Es%20un%20m%C3%A9todo%20de%20control,control%20biol%C3%B3gico%20es%20muy%20rara.](https://www.ecured.cu/Control_biol%C3%B3gico#:~:text=Es%20un%20m%C3%A9todo%20de%20control,control%20biol%C3%B3gico%20es%20muy%20rara.)

**ROJAS, Gustavo.** Sensibilidad in vitro de cinco aislados de *Trichoderma* spp. a fungicidas. Repositorio UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO. [En línea] Marzo de 2020. [Consulta: 17 de Febrero de 2022]. Disponible en:  
[https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/109309/TESIS-GUSTAVO%20ROJAS%20TAPIA-18062020.pdf?sequence=1&isAllowed=y.](https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/109309/TESIS-GUSTAVO%20ROJAS%20TAPIA-18062020.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**ROMERO, Celia.** Efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia en la preservación en frío y en la criopreservación. (Trabajo de titulación) (Maestría). [En línea] Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. (Ensenada-México) 2015. pp 30-34. [Consulta: 2 abril 2021]. Disponible en:  
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/82/1/242981.pdf>

**SAMANIEGO.** Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Protección Vegetal. [En línea] 2018, (Cuba) 33(3). [Consulta: 2 abril 2021]. ISSN 2224-4697. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522018000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000300003)

**SAMUELS, G. & HEBBAR, P.** *Identification and Agricultural Applications*. The American Phytopathological Society. U.S.A. 2015 pp 35-160. [Consulta: 24 febrero 2022] ISBN: 9780890544846

**SAMUELS, G.; Chaverri, D.; Farr, & McCray, E.** *Trichoderma* Online: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. (A. U. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Productor). *Trichoderma* Online: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. 2015. [Consulta: 25 febrero 2022] Disponible en:  
[http://taxadescriptions/keys/Trichoderma Index.cfm](http://taxadescriptions/keys/Trichoderma%20Index.cfm)

**SÁNCHEZ, Alexander.** *Manual de redacción académica e investigativa: cómo escribir, evaluar y publicar artículos* [en línea]. Medellín-Colombia: Católica del Norte Fundación Universitaria, 2011, pp. 180-189. [Consulta: 28 mayo 2021]. ISBN: 9789589905913. Disponible en:

<https://www.ucn.edu.co/institucion/sala-prensa/documents/manual-de-redaccion-mayo-05-2011.pdf>

**SÁNCHEZ, María.; MORENO, Luis, & PÁRAMO, Leandro.** Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *El Higo-Revista de Ciencia y Tecnología*. [En línea] 2021, 11(1), pp 26-42 [Consulta: 10 de marzo de 2022.] ISSN-E: 2413 1911.

**SANTANA, Marisela.** *Microbiología: Técnicas y tipos de sembrado en placa y tubo*. Wix [blog] 2020. [Consulta: 25 marzo 2021] Disponible en: <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/t-cnicas-y-tipos-de-sembrado>

**SISTEMA DE INFORMACIÓN DE BIODIVERSIDAD.** Taxonomía para *Trichoderma*. SIB. [En línea] 2017. [Consulta: 09 de Abril de 2021]. Disponible en: <https://sib.gob.ar/taxonomia/genero/Trichoderma>

**SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I.** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 2005. 95(1), pp. 76-84, [Consulta: 23 marzo 2022] DOI: 10.1094/PHYTO-95-0076

**STAMATAKIS, A.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics Applications* [en línea], 2014, 30 (9), pp. 1312 - 1313. [Consulta: 26 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**STOCCO, M.; MÓNACO, C.; LAMPUGNANI, G.; ABRAMOFF, N.; CONSOLO, F.; & CORDO, C.** Reservorio fenotípico de cepas de *Trichoderma* spp con capacidad biocontroladora: su aporte para un manejo agroecológico de enfermedades. *Congreso Latinoamericano de Agroecología*. [En línea] 2015, (Argentina), pp 2-4. [Consulta: 28 marzo 2021] ISBN 978-950-34-1265-7. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52686/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52686/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**TRAVIS, Glare, SCHOLTE, Yvonne.; CUMMINGS, Nicholas.; RIVAS, Federico.; TRACEY, Nelson & ZIMMERMANN, Gisbert.** Diversity of the insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* in New Zealand, *New Zealand Journal of Botany*. [En línea] (Nueva Zelanda) 2021. [Consulta: 30 marzo 2021]. DOI: 10.1080/0028825X.2021.1890155 Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0028825X.2021.1890155>.

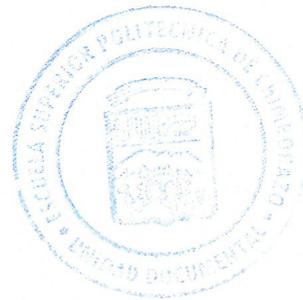
**ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard.** *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Saint Paul, Minnesota-United States of America: The American Phytopathological Society, 2006. [Consulta: 9 marzo 2022] ISBN: 9780890543412, pp.1-237

**URZÚA, Carmen.** *Siembra por vertido en placa*. [Blog] 2014. [Consulta: 25 marzo 2021]. Disponible en: <http://mediacampus.cuaed.unam.mx/node/4254>.

**VIDAL, Nayelli.** Microorganismos antagonistas: una alternativa para el control biológico de enfermedades fúngicas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica*L.). Fundación Dialnet . [En línea] 2021, pp 214-226. [Consulta: 10 de diciembre de 2021]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/111377/2021%20ITEA%20CAF%20c3%89%20117-3%20214-226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 1699-6887.

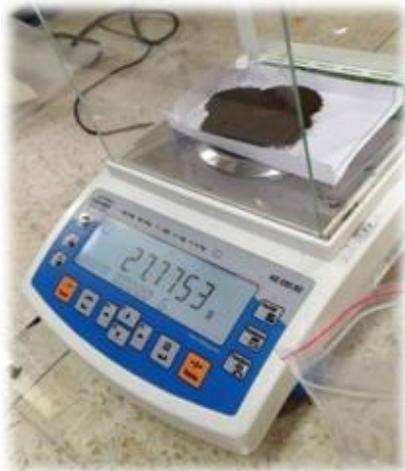
**WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; LORITO, M.** *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal, 2014 8(1). [Consulta: 23 marzo de 2022].

  
Ing. Cristian Castillo



## ANEXOS

### ANEXO A: AISLAMIENTO DE HONGOS ANTAGONISTAS



Pesaje de muestras de suelo



Preparación de medios de cultivo.



Desinfección del área de trabajo.



Colocación de solución madre



Incubación de la siembra.

**ANEXO B: OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS**

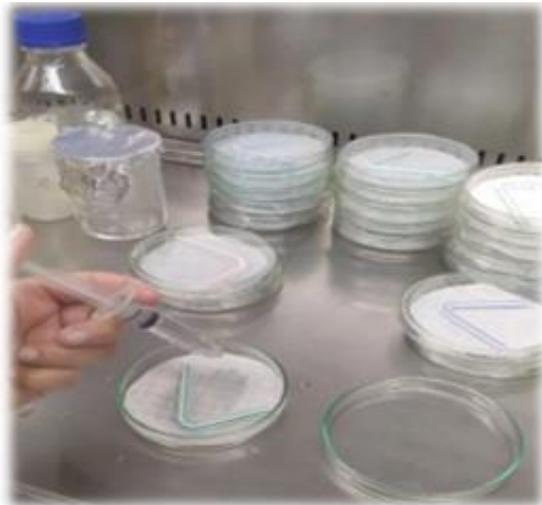


Crecimiento de colonias

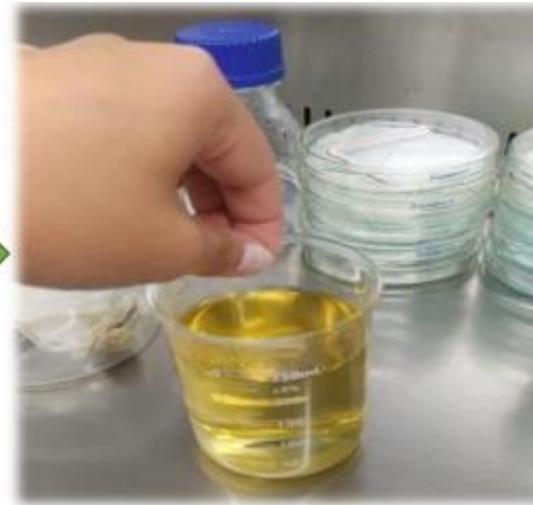


Selección de una espora

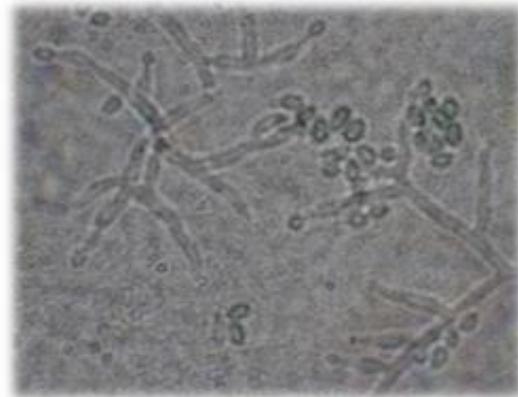
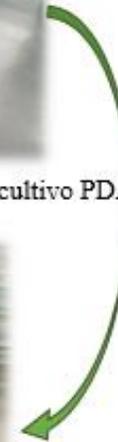
## ANEXO C: PREPARACIÓN DE MICROCULTIVOS DE LOS AISLADOS OBTENIDOS



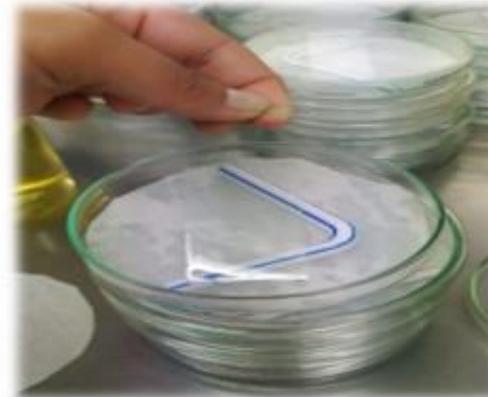
Humedecimiento del papel toalla con agua destilada estéril



Sumergimiento del portaobjeto en el medio de cultivo PDA



Montaje y vista al microscopio del morfotipo.



Colocación y siembra en el portaobjeto para incubar en cámara de esporulación

**ANEXO D: MONTAJE DE PLACAS**

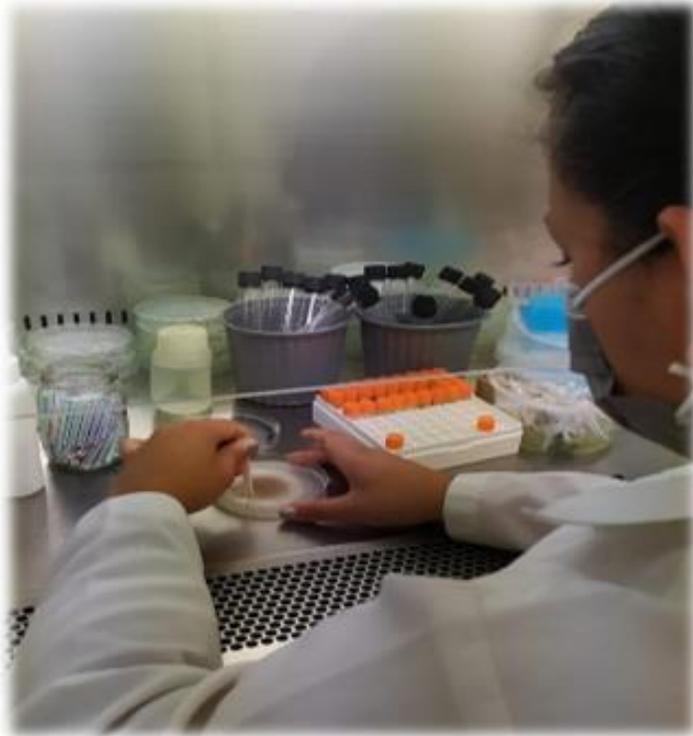


Colocación de una gota de lactoglicerol



Toma de micelio con la ayuda de la cinta scotch

**ANEXO E: CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Trichoderma* MEDIANTE EL MÉTODO DE CASTELLANI**



Cortes de discos de 7 mm de la colonia esporulada

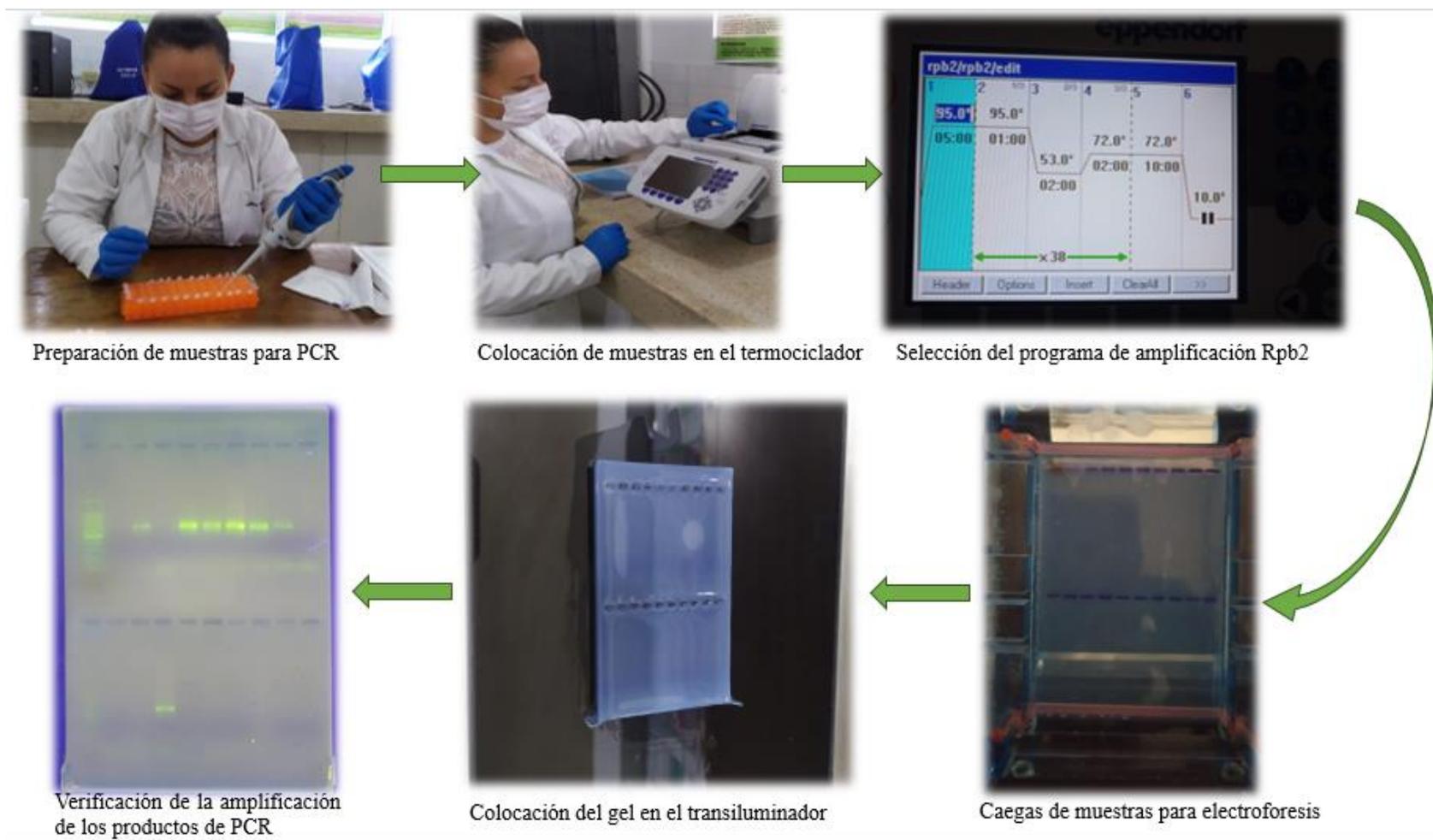


Conservación del aislados por el método Castellani

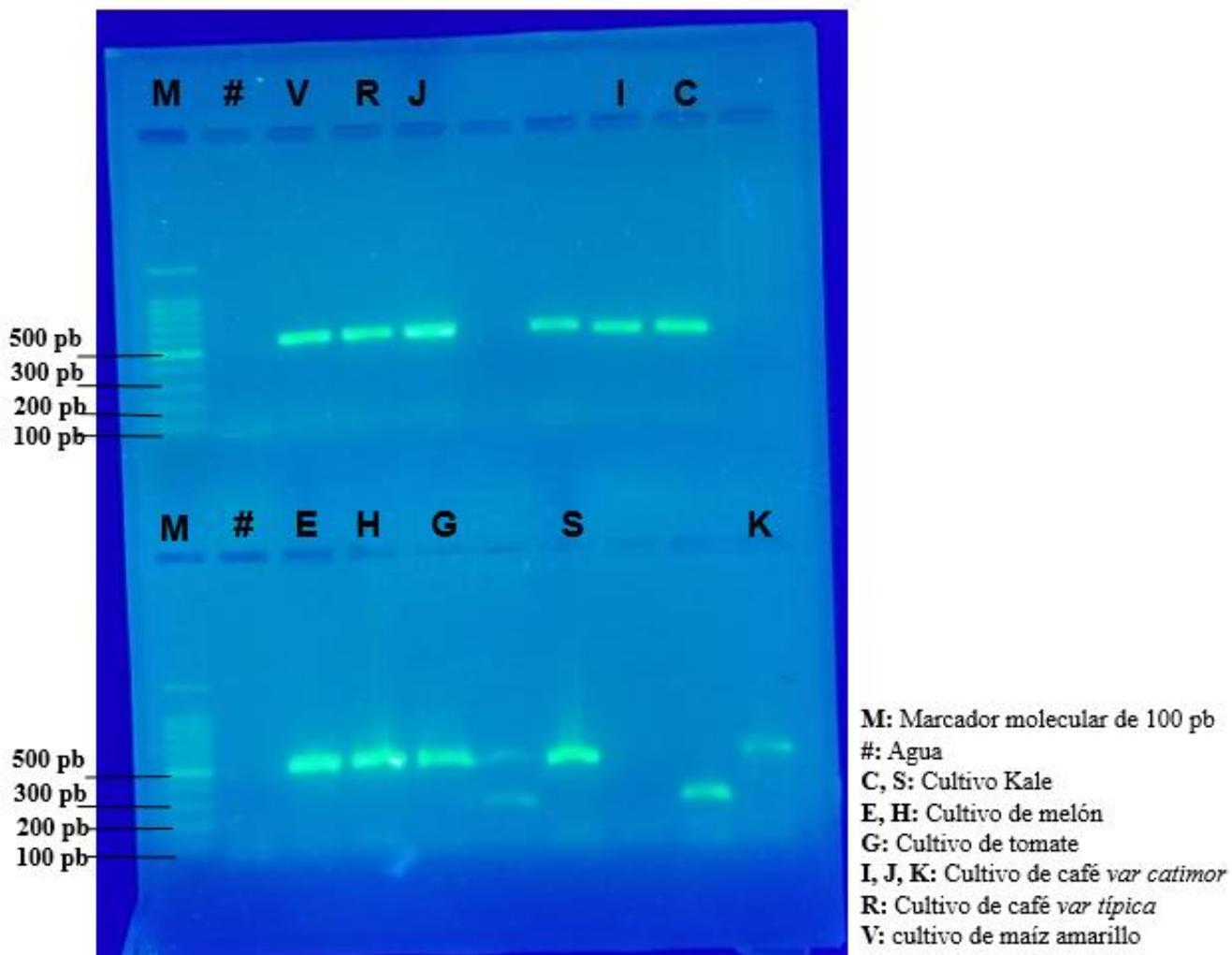
## ANEXO F: EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO



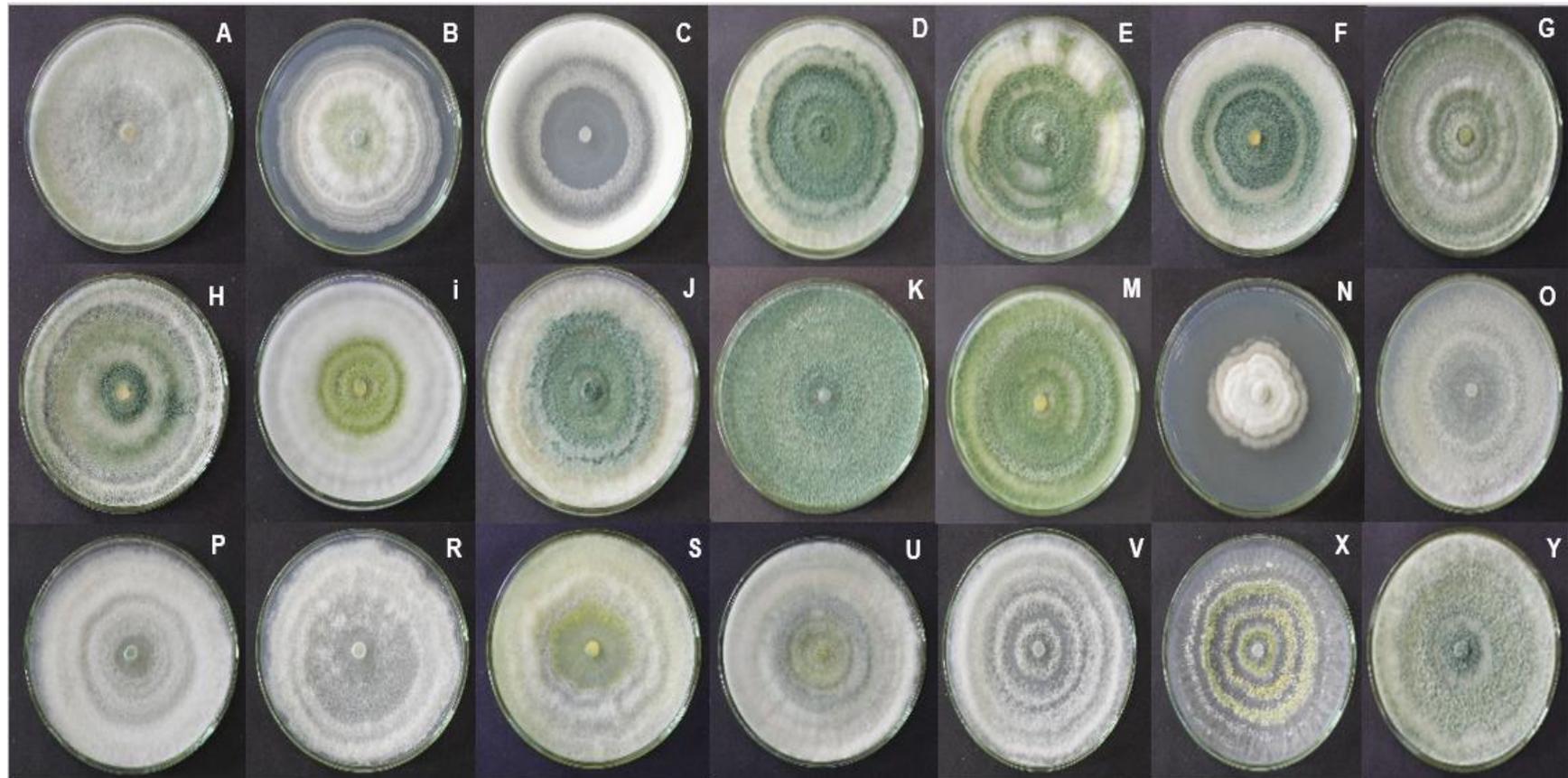
## ANEXO G: PROCEDIMIENTO PARA PRUEBAS PCR Y CONFIRMACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS



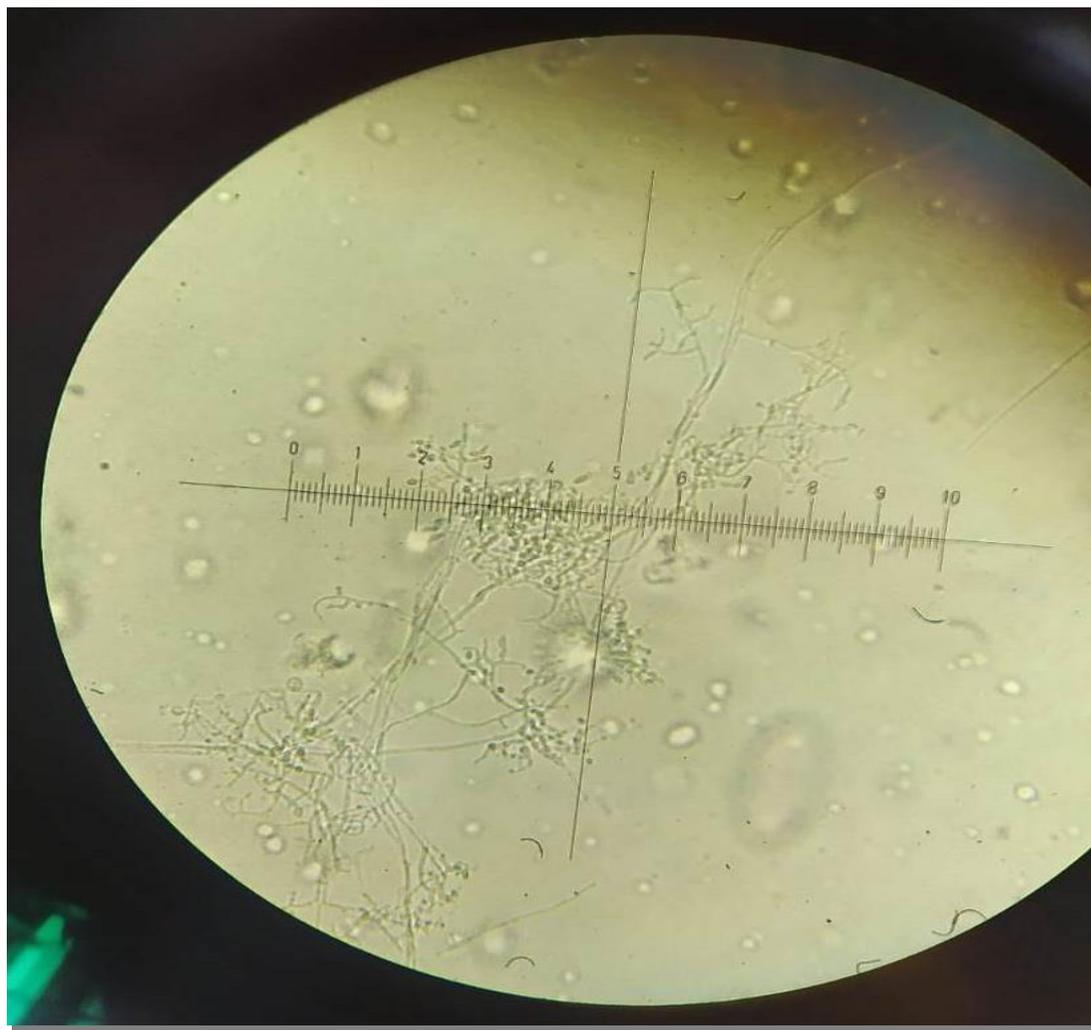
**ANEXO H: REVELADO DE GEL MEDIANTE EL TRANSILUMINADOR**



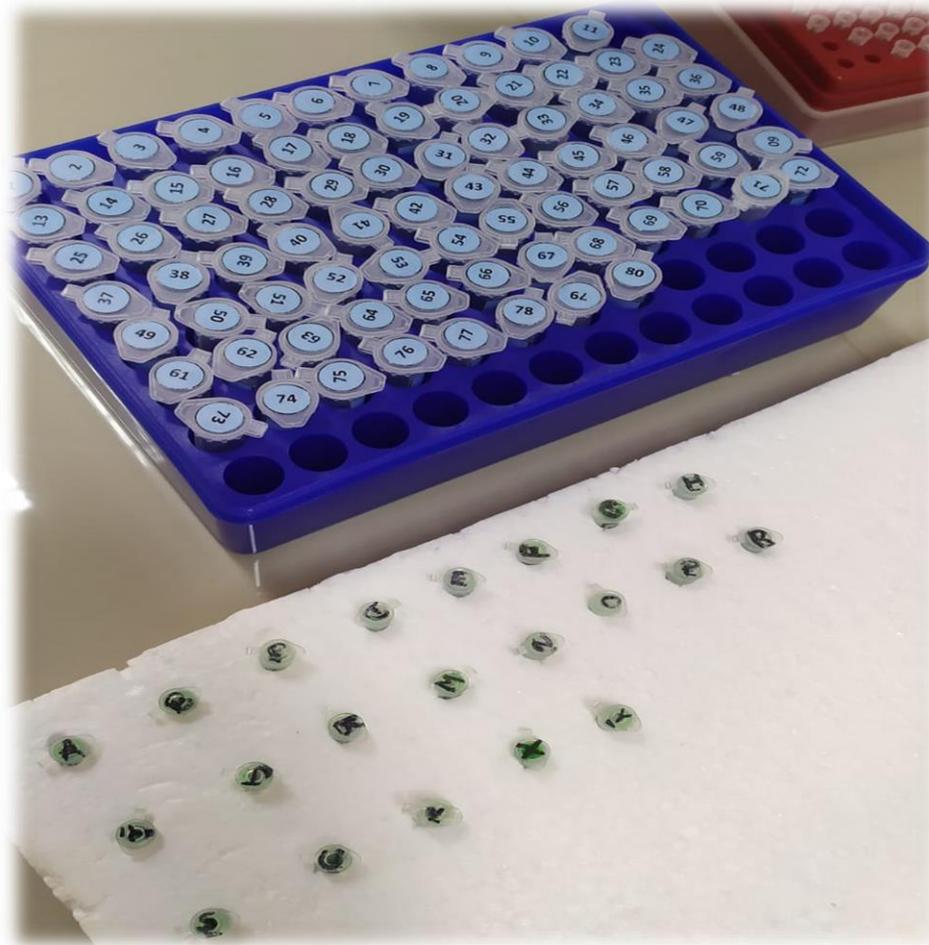
**ANEXO I: CRECIMIENTO MICELIAL DE AISLADOS DE *Trichoderma* EN MEDIO DE CULTIVO PDA**



**ANEXO J: MEDICIÓN DE FIÁLIDAS, CONIDIOS**



**ANEXO K: PREPARACIÓN DE CEPAS PARA ENVIAR A SECUENCIAR**



**ANEXO L: COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SNA**

<b>MEDIO SNA</b>		
<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>UNIDAD</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g/L
KNO <sub>3</sub>	1	g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	g/L
KCl	0,5	g/L
Glucosa	0,2	g/L
Sacarosa	0,2	g/L
Agar	25	g/L

Fuente: (Samuels et al., 2015)

**ANEXO M: COMPONENTES PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR-AVENA**

<b>AGAR-AVENA</b>		
<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>UNIDAD</b>
Avena	40	g/L
Agar	25	g/L

ANEXO N: CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma*

CODIGO_TRABAJO	CODIGO_ORIGINAL	CANTIDAD ng/ $\mu$ L	A260/A280	A260/A230
A	R1_M1A_PDAE	+1000		
B	R3_M3_PDAE	+1000		
C	R1_M1A_RB	744,5	1,85	1,76
D	R1_M3_RB	+1000		
E	R1_M2A-D_PDA	775,8	1,89	1,77
F	R1_M3_PDAE	+1000		
G	R1_M5-D_RB	790,9	1,78	1,82
H	R1_M2A_RB	+1000		
I	R3_M3_PDA	887,3	1,95	2,14
J	b. R2_M3_PDA	1128,4	1,96	2,01
K	a. R2_M3_PDA	639,9	1,87	1,62
M	R1_M2A_PDA	+1000		
N	R2_6B_PDAE	674,4	1,87	1,84
O	R3_6B_PDA	+1000		
P	R2_6B_PDA	98,7	1,57	1,08
R	R2_M4_RB	78,7	1,63	1,03
S	R2_M1A_RB	721,4	1,85	1,81
U	R3_M2A_PDAE	+1000		
V	R2_6B-D_RB	780,8	1,93	2,03
X	R3_7A_PDAE	6,5	1,02	0,24
Y	R3_M1A_RB	37,3	1,87	2,67

Elaborado por: Del Rosario Romero, María, 2022.



epoch

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 04 / 07 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> María Elena Del Rosario Romero
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Recursos Naturales
<b>Carrera:</b> Agronomía
<b>Título a optar:</b> Ingeniera Agrónoma
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



**D.B.R.A.I.**  
*Ing. Cristhian Castillo*



1293-DBRA-UTP-2022