



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

**EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA
DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp.
OBTENIDAS DE ECOSISTEMAS FORESTALES**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTOR:

DINA ANABEL GONZÁLEZ MARISCAL

Riobamba – Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

**EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA
DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp.
OBTENIDAS DE ECOSISTEMAS FORESTALES**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTOR: DINA ANABEL GONZÁLEZ MARISCAL

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

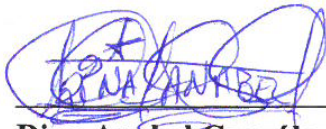
© 2022, **Dina Anabel González Mariscal**

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

Yo, Dina Anabel González Mariscal, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular 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 autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 03 de agosto de 2022



Dina Anabel González Mariscal

172478572-8

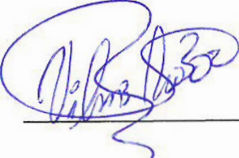
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular: Tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp. OBTENIDAS DE ECOSISTEMAS FORESTALES**, realizado por la señorita: **DINA ANABEL GONZÁLEZ MARISCAL**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

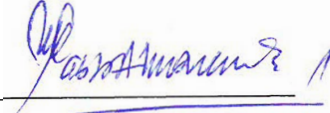
FECHA

Ing. Vilma Fernanda Noboa Silva M.Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



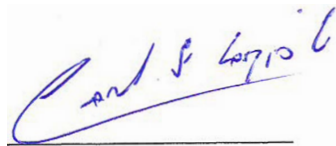
2022-08-03

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D.
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
INTEGRACIÓN CURRICULAR**



2022-08-03

Ing. Carlos Francisco Carpio Coba M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



2022-08-03

DEDICATORIA

La familia es uno de los pilares fundamentales que el ser humano tiene para alcanzar el éxito en su vida, por lo que dedico este trabajo a mis padres Rosa y Vicente, a mis hermanos, hermana y al resto de mi familia que siempre estuvieron ahí para mí en todo momento, también se lo dedico a Gustavo quien estuvo conmigo en las buenas y malas, apoyándome en todo momento hasta el final. A más de eso quiero dedicarlo a una persona que fue parte de mi formación quién me incitó a realizar cosas nuevas y aprender temas nuevos Ing. Hugo Rodríguez donde quiera que este gracias por todo.

DINA

AGRADECIMIENTOS

La fe mueve montañas, quiero agradecer a Dios por guiarme a lo largo de este hermoso camino que entre altos y bajos me permitió culminar una meta más en mi vida. Agradecer a mis queridos padres Rosa y Vicente quienes han sido los héroes de toda mi vida, quienes me han apoyado a cada paso que he dado, a mi madre quien me ha aconsejado y ha estado ahí todo el tiempo, gracias, mamá por ayudarme a cumplir mis sueños, a mis hermanos y hermana por apoyarme a su manera y al resto de mi familia. Agradezco también a Gustavo quien estuvo ahí desde el inicio de este camino hasta el final del mismo apoyándonos mutuamente, gracias por cuidar de mi todo este tiempo.

No hubiese logrado este sueño sin ayuda de mis queridos profesores a quienes agradezco mucho por impartirme sus conocimientos y ayudarme a ser mejor persona cada día, Ing. Hugo Rodríguez, Ing. Pablo Álvarez, Ing. Carlos Carpio, Ing. Juan Guerra a ustedes gracias por todo el apoyo y porque jamás me dejaron sola en el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos por el apoyo que siempre me brindaron, por estar ahí cuando necesitaba y cuando no, gracias.

DINA

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Hongos benéficos del género <i>Trichoderma</i>.....	4
1.1.1. <i>Características</i>	4
1.1.2. <i>Principales especies del género Trichoderma</i>	5
1.1.3. <i>Mecanismos de acción de Trichoderma spp.</i>	5
1.1.3.1. <i>Competencia</i>	6
1.1.3.2. <i>Micoparasitismo</i>	6
1.1.3.3. <i>Crecimiento quimiotrófico</i>	6
1.1.3.4. <i>Reconocimiento</i>	6
1.1.3.5. <i>Adhesión y enrollamiento</i>	7
1.1.3.6. <i>Actividad lítica</i>	7
1.1.3.7. <i>Antibiosis</i>	7
1.1.4. <i>Características culturales</i>	8
1.1.5. <i>Sistemática del género Trichoderma</i>	8
1.2. Clados de interés.....	12
1.2.1. <i>Clado Harzianum</i>	12
1.2.2. <i>Clado Longibrachiatum</i>	12
1.3. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR).....	13
1.4. Marcadores moleculares como herramientas en la discriminación de organismos.....	13
1.5. Regiones y genes usados para la identificación de <i>Trichoderma</i>.....	14
1.5.1. <i>La región del espaciador transcrito interno o Internal Transcribe Space (ITS)</i>	14
1.5.2. <i>Factor de alargamiento 1-a o elongation factor (EF 1a)</i>	15

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	16
2.1.	Caracterización del lugar	16
2.1.1.	<i>Localización</i>	16
2.1.2.	<i>Ubicación geográfica</i>	16
2.2.	Materiales y equipos	16
2.2.1.	<i>Materiales de oficina</i>	16
2.2.2.	<i>Materiales de laboratorio</i>	16
2.2.3.	<i>Equipos de laboratorio</i>	17
2.2.4.	<i>Reactivos e insumos</i>	17
2.2.5.	<i>Medios de cultivo</i>	18
2.2.6.	<i>Material biológico</i>	19
2.3.	Metodología	21
2.3.1.	<i>Reactivación de muestras en PDA y Agar avena</i>	21
2.3.2.	<i>Extracción y maceración de micelio</i>	22
2.3.3.	<i>Extracción de ADN</i>	22
2.3.4.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	23
2.3.5.	<i>Electroforesis</i>	24
2.3.6.	<i>Análisis de datos</i>	25

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADO	27
3.1.	Caracterización molecular	27
3.1.1.	<i>Marcadores moleculares para género <i>Trichoderma</i> spp.</i>	27
3.1.2.	<i>Marcadores moleculares para la especie <i>Trichoderma harzianum</i> (TEF1)</i>	29
3.1.3.	<i>Marcadores moleculares para la especie <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TEF1)</i>	32
3.2.	Discusión de resultados	35
	CONCLUSIONES	37
	RECOMENDACIONES	38

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Cepas reactivadas del género <i>Trichoderma</i> spp, <i>Fusarium</i> spp. y <i>Penicillium</i> , de la colección existente en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, ESPOCH.	19
Tabla 2-2: Información de las cepas utilizadas como control negativo.	21
Tabla 3-2: Información de las cepas utilizadas como control positivo de <i>Trichoderma</i> (caracterizadas previamente, mediante secuenciamiento).	21
Tabla 4-2: Conjuntos de primers utilizados en PCR.	23
Tabla 5-3: Muestras que amplificaron para género <i>Trichoderma</i> spp. en la región ITS.	28
Tabla 6-3: Muestras que amplificaron para la especie <i>Trichoderma harzianum</i> (TEF1).	30
Tabla 7-3: Muestras de la especie <i>Trichoderma harzianum</i> (TEF1) secuenciadas en MACROGEN COREA y alineadas con el método BLAST.	31
Tabla 8-3: Muestras que amplificaron para la especie <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TEF1).....	33
Tabla 9-3: Muestras de la especie <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TEF1) secuenciadas en MACROGEN COREA y alineadas con el método BLAST.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Árbol filogenético de máxima verosimilitud con las secuencias parciales de rpb2 de varios aislados representativos del género <i>Trichoderma</i> spp.	11
Figura 2-2: Gel de la cuba con los pocillos y orden de las muestras.	25
Figura 3-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para el género <i>Trichoderma</i> spp. (ITS).	27
Figura 4-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para la especie <i>Trichoderma harzianum</i> (TEF1).....	29
Figura 5-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para la especie <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TEF1).	32

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PROCESO QUE SE UTILIZÓ PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEI-
NUCLEICOS PARA UTILIZAR EN PCR.
- ANEXO B:** PROCESO QUE SE REALIZÓ PARA PCR.
- ANEXO C:** PROCESO QUE SE REALIZÓ PARA LA ELECTROFORESIS.
- ANEXO D:** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN SIN DILU-
IR.
- ANEXO E:** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DILUIDO.
- ANEXO F:** SECUENCIAS DE CEPAS TRABAJADAS.
- ANEXO G:** IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp. ALI-
NEADOS CON EL MÉTODO BLAST.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar los diferentes marcadores moleculares para la discriminación de especies de *Trichoderma* obtenidas de ecosistemas forestales, por lo que se tuvo que reactivar 43 cepas, luego extraer el micelio. Para el proceso de extracción de ADN se siguió el protocolo del kit de *Wizard. Genomic DNA Purification (Promega Corporation)*, una vez obtenido el ADN se realizó los procesos de PCR tomando como base el protocolo de Zhou et al, 2021 que fue el siguiente: para ITrichF/ITrichR (ITS): 96°C por 1:30 minutos, 35 ciclos, 96°C por 35 segundos, 53°C por 55 segundos, 72°C por 1:30 minutos, 72 °C por 10 minutos. Los primers utilizados fueron: para la región ITS en género *Trichoderma* fueron ITricF/ITricR con un tamaño aproximado de los productos de PCR de 103 a 113 pb, para especie se utilizó el del gen TEF1, para *T. harzianum* los primers fueron EHarF2/EHarR2 y para *Trichoderma longibrachiatum* los primers utilizados fueron T1F/T1R con un tamaño aproximado de los productos de PCR de 253 pb y 452 pb respectivamente, luego se realizó las electroforesis. Se escogió 7 aislados para verificar si amplificaron según la especie estudiada y fueron enviados a MACROGEN COREA, se alinearon los resultados con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica mediante la utilización del método BLAST. De las 43 cepas estudiadas se identificaron usando diferentes marcadores moleculares a 31 de estas dentro del género *Trichoderma*, para *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* y se identificaron 17 y 12 cepas respectivamente. De las 7 muestras identificadas se obtuvo una cobertura 100% en su mayoría e identidad del 100% . Se concluye que los primers utilizados efectivamente funcionan para la discriminación de especies en *Trichoderma*. Se recomienda replicar este estudio utilizando los protocolos que mejor funcionaron en un número mayor de aislados.

Palabras clave: <AMPLIFICACIÓN>, <ITS>, <PCR>, <PRIMERS>, <SECUENCIACIÓN>, <TEF1>, <(Trichoderma harzianum)>, <(Trichoderma longibrachiatum)>

D.B.R.A.J.
Trichoderma Castillo



SUMMARY

This study aimed to evaluate the different molecular markers for the discrimination of *Trichoderma* species obtained from forest ecosystems. 43 strains had to be reactivated, then the mycelium was extracted. The *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation) kit protocol was followed for the DNA extraction process. Once the DNA was obtained, the PCR processes were performed based on the protocol of Zhou et. It means that for ITrichF/ITrichR (ITS): 96°C for 1:30 minutes, 35 cycles, 96°C for 35 seconds, 53°C for 55 seconds, 72°C for 1:30 minutes, 72°C for 10 minutes. The primers used for the ITS region in the genus *Trichoderma* were ITricF/ITricR with an approximate size of the PCR products from 103 to 113 bp, for the species the TEF1 gene was used, the primers were EHarF2/EHarR2 for *T. harzianum* and the primers used for *Trichoderma longibrachiatum* were T1F/T1R with an approximate size of the PCR products of 253 bp and 452 bp respectively, then the electrophoresis was performed. 7 isolates were chosen to verify whether they amplified according to the species studied and were sent to MACROGEN KOREA, the results were linked to the database of the National Center for Biotechnology Information using the BLAST method. 43 strains were studied, 31 of these ones within the genus *Trichoderma*. 17 and 12 strains were identified using different molecular markers for *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* respectively. 100% coverage and identity were obtained of the 7 identified samples. It was concluded that the primers used effectively work for the discrimination of species in *Trichoderma*. It is recommended to replicate this study using the protocols that worked best in a larger number of isolates.

Keywords: <AMPLIFICATION>, <ITS>, <PCR>, <PRIMERS>, <SEQUENCE>, <TEF1>, <(Trichoderma harzianum)>, <(Trichoderma longibrachiatum)>

Riobamba, September 7, 2022

Translated by:



PhD. Dennys Tenelanda López

ID number: 0603342189

Professor of EFL

INTRODUCCIÓN

Los hongos provienen desde el inicio de los tiempos, prácticamente desde que se creó el planeta, por lo que es uno de los habitantes más longevos, suelen habitar en casi todos los lugares que componen el planeta tierra (Herrera Ruiz, 2012, pp.1-5), con la aparición del hombre y la evolución de este se ha ido estudiando de a pocos a estos seres que incluso algunas especies son comestibles y no dañinos para el hombre, claro está que hay otros que causan daño incluso la muerte al ser humano (Barbado, 2003: p.11).

Con el avance, desarrollo de la ciencia y la curiosidad del hombre por conocer más se han realizado un sin número de estudios tratando de entender a los hongos, saber cómo diferenciarlos unos de otros, codificarlos y así clasificarlos por familias, genero, etc. (Montes et al., 2003, p.213). Por otro lado, debido a la agricultura y a la alimentación que es un ámbito en donde constantemente están realizando estudios debido a que las plántulas son atacadas por hongos dañinos que incluso son resistentes a ciertos químicos (Pineda y Calderón, 2020: p.24-25), buscan la manera más natural de combatirlos tratando de disminuir el impacto de este en las plántulas y en el suelo.

Es el caso del género *Trichoderma* el cual es conocido como un hongo benéfico, debido a los tantos estudios realizados con este género se ha llegado a entender que este hongo tiende a propagarse fácilmente en el suelo, su capacidad de ataque es muy efectivo para que neutralice a su oponente y permite que las plántulas puedan crecer y desarrollarse de la mejor manera posible (Galarza, 2011. p.6). Por otro lado, este género ha sido estudiado a tal punto que existen ya productos de uso agrícola que lo contienen (Chiriboga et al., 2015, p.1-9).

El hecho de que *Trichoderma* sea más accesible se han realizado estudios donde la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian satisfactoriamente las especies en el género. En la actualidad el desarrollo de técnicas moleculares resulta decisivo en la identificación y clasificación de los organismos. En este sentido se utiliza PCR específica de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, así como la secuenciación de estas para su comparación con las secuencias depositadas en GenBank, TrichoBlast y en otras bases de datos, lo que facilita la identificación del hongo (Martínez et al., 2013, p.2).

Importancia

El suelo tratado con *Trichoderma* ha mejorado notablemente el desarrollo y crecimiento de las plantas de manera significativa ya que el mecanismo de acción de *Trichoderma* evita que diferentes fitopatógenos que están en el suelo dañen la planta (Bettiol et al, 2014: pp.30-31), pero la identificación de este género tiende a ser un poco difícil debido a las características morfológicas comunes entre las diferentes especies es por ello que en la actualidad se está realizando la identificación mediante características morfológicas y moleculares, pero en nuestro país son escasos los estudios con marcadores específicos como se está proponiendo en este estudio, esto ayudará y dará facilidad de identificación a las diferentes especies de *Trichoderma* de forma segura.

Problema

Trichoderma es un microorganismo ampliamente utilizado, puede usarse no solo para la producción de enzimas industriales, sino también para controlar las enfermedades de las plantas y promover el crecimiento de estas. La identificación correcta de las especies de *Trichoderma* es un requisito previo para el uso de *Trichoderma*. Es difícil identificar especies de *Trichoderma* exclusivamente por características morfológicas, debido a la similitud de la morfología entre las diferentes especies. El método actual de identificación de *Trichoderma* es principalmente una combinación de características morfológicas y moleculares. No existen estudios sobre la evaluación de marcadores moleculares específicos para la discriminación de especies de *Trichoderma* obtenidas de ecosistemas forestales en nuestro país.

Justificación

En el presente trabajo se propone evaluar diferentes marcadores moleculares para la discriminación de especies de *Trichoderma* ssp. obtenidas de ecosistemas forestales. Sabiendo que es un género de suma importancia forestal y agrícola ya que *Trichoderma* mejora de forma muy significativa el suelo, el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este trabajo representa una gran oportunidad para facilitar el reconocimiento de algunas especies de *Trichoderma* ya que se lo realizará en el gen del factor de elongación de traducción TEF1 y la región del espaciador transcrito interno ITS.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar diferentes marcadores moleculares para la discriminación de especies de *Trichoderma* obtenidas de ecosistemas forestales.

Objetivos Específicos

- Analizar la eficiencia de primers específicos basados en la región ITS en la identificación del género *Trichoderma*.
- Verificar la capacidad de primers específicos basados en los genes TEF1 de discriminar diferentes especies de *Trichoderma*.

HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

Ninguno de los marcadores moleculares evaluados permite discriminar las diferentes especies de *Trichoderma* obtenidas de ecosistemas forestales.

Hipótesis Alterna

Al menos uno de los marcadores moleculares evaluados permite discriminar las diferentes especies de *Trichoderma* obtenidas de ecosistemas forestales.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Hongos benéficos del género *Trichoderma*

Taxonomía general (NIH, 2021, p.1).

Super reino: Eucariota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

1.1.1. Características

Se dice que *Trichoderma* es un tipo de hongo que se lo puede encontrar de forma natural en varios suelos agrícolas, incluso en otros tipos de medios como la madera decadente. Sin embargo, a este hongo se lo puede encontrar ampliamente distribuido alrededor de todo el mundo como lo menciona Galarza (2011. p. 6) y suele presentarse en diferentes zonas y hábitats en especial en aquellos que contiene algún tipo de materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, incluso en los mismos residuos de los cultivos especialmente en los que han sido atacados por alguna especie de hongo. El desarrollo que este presenta es por la alta densidad de raíces en donde tienden a habitar y colonizar de una forma muy rápida. La capacidad de rápida adaptación a una gran variedad de medioambientes y sustratos permiten a *Trichoderma* la oportunidad de que se lo utilice en suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos como lo menciona (Harman y Björkman, 1998: pp.229-265; citado en Galarza, 2011. p.6).

Dentro de los mecanismos de acción que *Trichoderma* presenta como agente antagonista son: ejercer biocontrol ante cualquier fitopatógeno debido a la competencia de nutrientes, espacio y con ellos modificando el ambiente, por otro lado, tienden a promover el crecimiento de las plantas y a su sistema defensivo esto quiere decir que este hongo ayuda a que las plantas mantengan su sistema mediante las sustancias que el hongo emite o si no pueden efectuar micoparasitismo. La importancia en el biocontrol dependerá siempre de la cepa que allí se encuentre como lo menciona Harman y Björkman (1998: pp.229-265; citado en Galarza, 2011. p.6).

1.1.2. Principales especies del género *Trichoderma*

En un estudio realizado por Samuels (2005, p.196) nos dice que se han identificado y nombrado aproximadamente 89 especies de *Trichoderma*, a más de eso varias especies de *Hypocrea* se han visto relacionadas con anamorfos de *Trichoderma* sin nombre. Sin embargo, hay ochenta y tres taxones de *Trichoderma* y sus teleomorfos, *Hypocrea* spp. Aquí se han incluido mediante análisis filogenético a once especies de *Hypocrea* con anamorfos de *Trichoderma* sin nombre. Por otro lado, al estudiar muchas especies ha quedado en evidencia los pocos caracteres morfológicos de anamorfos y teleomorfos han llegado a su límite y no permite identificar la especie entonces las técnicas basadas en ADN han desarrollado un papel muy importante ya que mediante ellas se han explorado nuevos nichos, como los troncos de árboles, otras ubicaciones geográficas, esto ha permitido un aumento sustancial de especies de *Trichoderma* (Martínez et al., 2013, p.2)..

Cabe mencionar que al adoptar la filogenia en el ámbito molecular para el estudio sistemático y taxonómico de *Trichoderma* los individuos descritos han ido en aumento de una manera notoria desde los años 2000, lo que permitió demostrar que la morfología simple de este género recubre una gran variedad de linajes filogenéticos, mismos que se habían separado muchos años atrás dando lugar a un gran número de especies que se adaptaron a la colonización de los más diferentes sustratos y hábitats de la Tierra (Druzhinina et al., 2011; citados en Conrado et al., 2019; p. 169). Según Druzhinina et al. (2006 ; citados en Conrado et al., 2019; p. 169), se dice que el número de especies definidas en base a la filogenia molecular alcanzó los 100 individuos en 2006 y acorde con Bissett et al., (2015; Plessis et al., 2018; Qin y Zhuang, 2016 ; citados en Conrado et al., 2019; p. 169) mencionan que en el presente el número de individuos se encuentra entre los 300 aproximadamente.

1.1.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Dentro de los diferentes mecanismos de acción bio-controladores que posee el género *Trichoderma* se encuentra el que regula el desarrollo de los diferentes hongos fitopatógenos, se puede decir que realiza este mecanismo debido a la competencia por el espacio, el alimento, la parasitación incluso la antibiosis que crea *Trichoderma* y la acción ante el patógeno como lo menciona Leal (2000; citado en Lorenzo, 2004, p.2; Infante et al., 2009: p.16). Los mecanismos antes mencionados se pueden ver favorecidos por la gran habilidad que poseen los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de las plantas.

Según Haram et al. (1996: pp. 980-981; citado en Zimand et al., 1996: pp. 1255-1260 y asu vez citado en Infante et al., 2009: pp.14-21), dice que hay otros autores que han sugerido varios mecanismos responsables

en la actividad biocontroladora como son la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores.

1.1.3.1. Competencia

Este mecanismo de antagonismo es probablemente uno de los más importantes ya que se define como aquel comportamiento desigual entre dos o más organismos con el objetivo de adquirir un mismo requerimiento como puede ser el sustrato o los nutrientes. Este mecanismo se presenta ante los organismos que disminuyen la cantidad o a su vez el espacio que se encuentra disponible, a más de eso, se puede decir que este mecanismo es una de las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, la velocidad de crecimiento, desarrollo y los factores externos como el suelo, pH, la temperatura, la humedad y otros como lo menciona Ahmad, y Baker (1986: pp.182-189; citado en Hjeljord y Tronsmo, 1998; pp.131-151 y a su vez citado en Infante, 2009, pp.14-21).

1.1.3.2. Micoparasitismo

Según Melgarejo et al. (1989: pp.83-87; Lorito et al., 1990: pp.10-77; Díaz, 1994; Ulloa, 1996: pp.234-238; citados en Infante, 2009, pp.14-21), lo define como una especie de simbiosis antagónica que se produce entre organismos en donde se encuentran involucradas las enzimas extracelulares como la quitinasas, celulasa y que corresponden a la composición, estructura de las paredes celulares que son parte de los hongos parasitados.

1.1.3.3. Crecimiento quimiotrófico

Como lo menciona Chet y Inbar (1994: pp.37-43; citado en Infante, 2009: pp.14-21), el quimiotropismo positivo es aquel crecimiento de forma directa de un estímulo químico, pero Infante (2009, pp.14-21) menciona que en la etapa de la localización del hospedante se ha podido demostrar que *Trichoderma* puede detectarlo a cierta distancia, también menciona que las hifas suelen crecer en dirección al patógeno como una especie de respuesta al estímulo químico.

1.1.3.4. Reconocimiento

De acuerdo con Barondes (1981; citado en Chet y Benhamou, 1998: pp.152-153; y a su vez citado en Infante 2009, pp.14-21), dice que el un reconocimiento se puede realizar mediante interacciones lectinas-carbohidratos, las lectinas son conocidas como proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas las cuales tienden a aglutinar células y se encuentran involucradas en las interacciones con los

componentes de la superficie de las células con el ambiente extracelular. Por su parte Chet y Inbar (1994: pp.37-43; Pérez, 2004, p.296; citados en Infante, 2009, pp: 16). Menciona que la producción de lectinas se a realizado una investigación en *R. solani* y *S. rolfsii* y en todos los casos se encontraron varias evidencias muy específicas de que las lectinas se encuentran involucradas con el micoparasitismo.

1.1.3.5. Adhesión y enrollamiento

Pérez (2004, p.296) menciona que cuando se da una respuesta de reconocimiento positiva, las hifas de *Trichoderma* tienden a adherirse a las del hospedante a través de la formación de las estructuras similares a ganchos y apresorios, tienden a enrollarse alrededor de las mismas y todo este proceso se encuentra medidado por los procesos enzimáticos. Según Chet y Elad (1983; citados en Martínez et al., 1994: p.54; y a su vez citados en Infante et al., 2009: pp.14-21), refiere a que esta adherencia ocurre cuando un azúcar del adversario se une con una proteína natural que se encuentra presente en la pared del patógeno (Infante et al., 2009: pp.14-21).

1.1.3.6. Actividad lítica

Aquí se producen las enzimas líticas extracelulares especialmente las quitinasas, las glucanasas y proteasas, las cuales tienden a degradar todas las paredes celulares facilitando así la entrada de las hifas como le mencionan Haram et al., (1996: pp. 2321-2331; citado en Infante et al., 2009: pp.14-21). Según las secciones contactadas donde se produce dicha ruptura se originan agujeros por donde se introducen las hifas. Cabe mencionar que se a estudiado a profundidad la actividad enzimática de este género al igual que las posibles funciones que tiende a desenvolver en el micoparasitismo (Infante et al., 2009: pp.14-21).

1.1.3.7. Antibiosis

Méndez y Mondino (1999: pp.1-10; citado en Infante et al., 2009: pp.14-21), mencionan que la antibiosis es una acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos que suelen producir un microorganismo sobre otro que es sensible a estos, por su parte algunos autores difieren ya que la antibiosis no debería ser el principal mecanismo de acción a nivel antagónico ya que se presentan muchos riesgos de aparición de varias cepas de patógenos que son resistentes al antibiótico.

1.1.4. Características culturales

Entre las características se incluye la velocidad de crecimiento, el olor y la apariencia de las colonias, dichas características han sido consideradas como características taxonómicamente útiles para *Trichoderma* (Samuels et al., 2002: pp.146-170; citado en Soo Park et al., 2005: pp.221-228).

Este género tiende a presentar una esporulación de color verde típica, otras especies pueden llegar a presentar un olor característico dulce o a “coco” esto se debe a un compuesto volátil biológicamente activo, mismo que se encuentra compuesto por (6-pentil- α -pirona), en cuanto a la naturaleza microparásita de *Trichoderma* y su potencial uso como agente de control biológico de hongos fitopatógenos ha sido reconocido desde hace más de seis décadas como lo menciona Brotman et al. (2010: p.1).

El desarrollo que presenta este género dentro de los 4 días a 30°C expuesto a la oscuridad, *Trichoderma* sp. puede llegar a formar uno o dos anillos concéntricos de producción de conidias además de la conidiación dispersa, tiende a presentar conidios uniformes en toda la placa sin formar pústulas. Los conidios de *T. harzianum* también se suelen dispersar de forma uniforme por toda la placa, en pústulas agregadas. Los conidios de *T. atroviride* se encuentran más o menos limitados a anillos concéntricos. *T. virens* tendía a formar pústulas en toda la superficie de la placa y pústulas planas concentradas cerca del margen de la placa (Soo Park et al., 2005: pp.221-228).

1.1.5. Sistemática del género *Trichoderma*

Se debe mencionar que, se denominaba *T. viride* a finales del siglo XIX a todos los hongos que formaban colonias con el aspecto representativos del género, de hecho, no importaba si el aislado fuese de una muestra de suelo, restos vegetales u adquiridos de ascosporas aisladas de peritecios de diferentes especies de *Hypocrea*. La situación tendía a variar según los géneros, incluso los géneros importantes como *Fusarium* del cual ya se habían descrito varias cadenas y formas de este género allá en los años 1930. Debido a la simplicidad taxonómica que le género *Trichoderma* presentaba, había generado poco interés por que el género presentaba aislamientos con las mismas características (Samuels, 2006, pp.195-196).

Este comportamiento se denotó hasta finales de los años 1960, en donde por fin el género se pudo clasificar en nueve agregados de especie, los cuales habían sido reconocidos en base a las diferencias morfológicas en la fase asexual realizado en un cultivo puro como lo menciona Rifai (1969, pp.5-6). Cabe destacar que el término “agregados” definía a las diferentes especies que presentaban biología y morfología diferentes en la fase sexual podrían compartir una morfología

similar en la fase asexual, esto se debía a la simplicidad, sin embargo, los 9 agregados fueron ampliamente adoptados adoptado (Domsch et al., 2007: p.267) y aun se continúa utilizando para la caracterización de *Trichoderma* en morfotipos claro está sin utilidad taxonómica. A principios de los años 1990 se logró ampliar el esquema taxonómico, algunos de los agregados en torno a especie se ordenaron en cinco secciones dentro del género, en cuanto a las características en la fase sexual también se las consideraron en las descripciones morfológicas por ende el número de especies aumentó a 30 aproximadamente (Bissett, 1991; citado en Druzhinina et al., 2006: pp.55-64).

A partir del descubrimiento sobre filogenia molecular para los estudios sistemáticos y taxonómicos en cuanto al género, se puede decir que el número de especies que se describieron a partir de allí aumento significativamente a partir de los años 2000, quedando demostrado que la supuesta sencillez morfológica del género *Trichoderma* oculta una gran variedad de linajes filogenéticos, que a su vez divergieron hace bastante tiempo atrás lo que dio lugar a muchísimas especies que se adaptaron a diferentes sustratos y hábitats alrededor de la tierra (Druzhinina et al., 2011: pp. 749-759). Es importante recalcar que se había logrado definir 100 especies en base a la filogenia molecular en el 2006 (Druzhinina et al., 2006: pp.55-64). En la actualidad este número aumento acercándose a las casi 300 (Bissett et al., 2015: pp.263-295; Plessis et al., 2018: pp.559-583; Qin y Zhuang, 2016: pp.1-15).

Druzhinina et al (2006: pp.55-64), menciona que se puede evidenciar los resultados directos de los diferentes cambios que se han dado recientemente en la taxonomía ya que en su mayoría los nombres aplicados a los aislamientos de *Trichoderma* no hace mucho que fueron basados en la morfología no son los correctos.

Para definir una especie de hongo a partir de la filogenia se debe iniciar en la generación pasando por el análisis de los árboles genéticos que fueron contruidos con secuencias parciales de genes compartidos y de cierta forma conservados de entre todos los organismos en comparación, por ende, se puede decir que una especie filogenética se puede alcanzar a definir como el grupo monofilético más pequeño ya que se forma por nodos inferiores de donde se derivan las secuencias las cuales en un polimorfismo de ADN. En cuanto a la identificación de dicho nodo a veces no es claro por lo que la solución a esto es el uso de la secuencias de genes variados que sean independientes en el genoma, lo que permite analizarlos mediante un procedimiento denominado gen concordancia genealógica , aquí se analiza los genes combinados y se define los límites entre especies (Conrado et al., 2019: p.170).

La secuencias de los ITS 1, 2 y las regiones 5.8S se encuentran comprendidas dentro de las subunidades llamadas 18S y 28S pertenecientes a las regiones codificantes del RNA ribosomal,

presenta una fácil amplificación, cabe destacar que esta fue utilizada entre los primeros estudios de filogenia y caracterización molecular de hongos incluyendo a *Trichoderma* (Kindermann et al., 1998: pp.298-309; Kuhls et al., 1997: pp.25-33). Sin embargo, como lo menciona Schoch et al (2012: pp. 6241-6246), esta región se encuentra muy conservada y de cierta forma no ofrece una buena resolución en cuanto a la delimitación de especies muy próximas a *Trichoderma* y otros ascomicetos, pero se la considera como una región universal para la identificación de hongos. Sin embargo, para la identificación de especies filogenéticas no se podían separar solo por ITS a pesar de que había distintas especies filogenéticas que ya se conocía que pertenecían a grupos de importancia como los clados *viride* y *hamatum* según lo que explica Druzhinina et al.(2006: pp.55-64).

Existen genes que pueden codificar ciertas proteínas y enzimas con funciones conservadas en eucariotas conteniendo más polimorfismos, en especial en las regiones de intrones, estos permiten una mejor resolución en cuanto a la delimitación de especies. Claro está que luego de identificar especies filogenéticas a través del análisis multi-loci, aumenta la posibilidad de realizar un razonamiento inverso y verificar la existencia de este. Como lo menciona Conrado et al., (2019: p.171), este gen se puede definir como un código de barras para la identificación molecular de los aislados y mediante la alineación utilizando el método BLAST las secuencias de referencia de especies conocidas y disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

Se define la identificación molecular como un procedimiento que se debe adoptar en situaciones donde no ha sido posible obtener el 100% de identidad en la secuencia analizada en referencia a las secuencias que se encuentran registradas en la base de datos. En el caso de obtener valores de 99% en identidad para los genes *tef1* que correspondan a un solo nombre en la base de datos se la puede seguir considerando como una identidad positiva o aceptable, pero de tener un valor menor al 99% tanto en identidad como cobertura y un valor de E-value aproximado a cero, sumándole la conformación robusta de identificación se sugiere realizar un alineamiento múltiple con secuencias en factor de elongación de traducción (*tef1*) de los aislados a identificar y de los referentes obtenidas del resultado de GenBank, luego se debe realizar el respectivo análisis filogenético siguiendo los protocolos que normalmente se utilizan en la taxonomía de *Trichoderma* (Chaverri et al., 2015: pp.558-590).

Según lo que Jaklitsch y Voglmayr (2015: pp.1-87) menciona que *tef1* posee una mejor resolución en cuanto a separación de especies cercanas, lo complicado es que esta es una región no es fácil de alinear cuando se decide incluir especies muy divergentes dentro del mismo análisis.

Para una filogenia simplificada dentro de este género en la región rpb2 (Figura 1-1), donde se muestran los clados y las especies representativas que se han obtenido del suelo y plantas o han sido empleadas con frecuencia en el control biológico de enfermedades de las plantas (Magalhães, L. citado en Conrado et al., 2019: p.173).

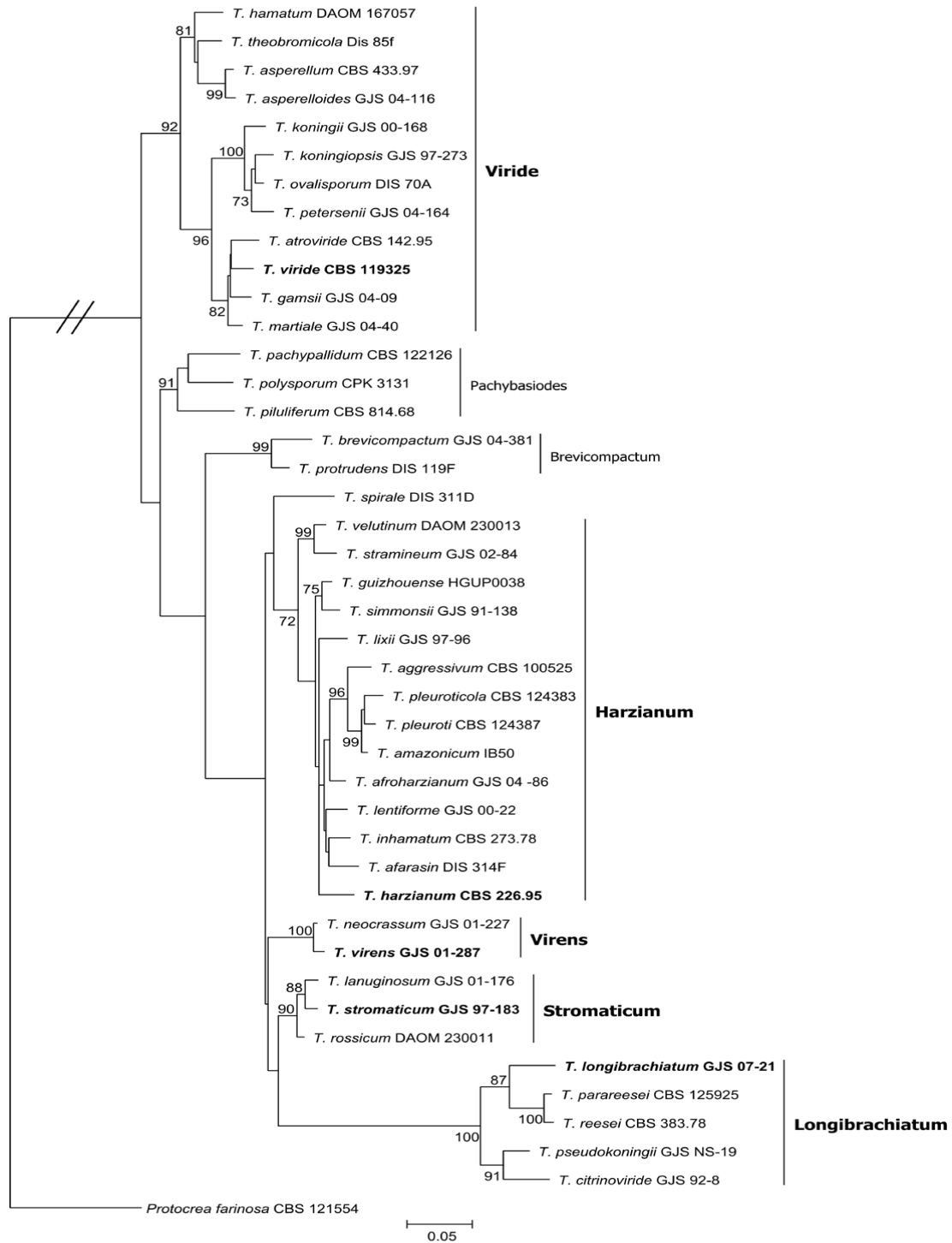


Figura 1-1: Árbol filogenético de máxima verosimilitud con las secuencias parciales de rpb2 de varios aislados representativos del género *Trichoderma* spp.

Fuente: Magalhães, L. citado en: (Conrado et al., 2019: p.173)

1.2. Clados de interés

1.2.1. Clado *Harzianum*

Se conoce a una morfoespecie que es muy utilizada para el control biológico en enfermedades de plantas, esta especie se llama *Trichoderma harzianum* (Woo et al., 2014: pp.71-126), a más de eso esta especie se ha mantenido dentro de los estudios de diversidad en suelos, resto de plantas en varias regiones del mundo como lo menciona Domsch et al. (2007: p.627). Esta especie engloba una gran variedad de especies filogenéticas dentro de las cuales algunas son verdaderamente cosmopolitas y otras con una distribución más restringida, pero se encuentran conformando el clado *Harzianum* (Chaverri et al., 2015: pp.558-590), por lo que muchos de los aislado que se han identificado dentro de la especie *T. harzianum* se los puede caracterizar como *T. harzianum* lato sensu, entendiendo como una amplia jerarquía taxonómica.

Se menciona que en el clado *Harzianum* posee poblaciones recombinantes, poblaciones clonales incluso algunos linajes filogenéticos solitarios indistintos del resto, esto dificulta la definición de especie (Druzhinina et al., 2011: pp. 749-759). Según Chaverri et al. (2015: pp.558-590) existe una reciente investigación taxonómica del clado *Harzianum* en donde se propuso el reconocimiento de decenas de especies delimitadas en base a la concordancia genealógica de genes y a partir de allí se han descrito nuevas adiciones (Jaklitsch y Voglmayr, 2015: pp.1-87; Montoya et al., 2016: pp.633-651). Un grupo monofilético contiene el material biológico que fue utilizado como neotipo especie (Gams y Meyer, 1998: pp.904-915) de la especie logró mantener el nombre de *T. harzianum* stricto sensu, pero se designaron nombres a las especies restantes. Chaverri et al., (2015: pp.558-590), menciona un estudio echo con casi doscientas muestras del clado *Harzianum* obtenidos de varios sustratos y regiones, algunos fueron identificados por patrones biogeográficos.

1.2.2. Clado *Longibrachiatum*

Dentro del clado *longibrachiatum* las especies formaron un grupo cerrado dentro de la filogenia de este clado, estas tienden a compartir ciertas características morfológicas como los conidióforos, las fiálides y ramas. Se puede mencionar a la especie *Trichoderma reesei* misma que es una especie saprofita que posee una gran capacidad para degradar sustratos celulósicos. Por otro lado, desde mediados del siglo XX uno de los aislados de dicha especie se utiliza para producir enzimas celulíticas de forma industrial como lo menciona Martínez et al., (2008: pp.53-60; Bischof et al., 2016: pp. 1-13). Cabe mencionar que las especies de este clado son mesófilas, lo que quiere decir que son capaces de crecer muy rápido, e incluso esporular a 40° C, por lo que, tiende a generar infecciones

donde no debe, como es el caso de *T. bissetii*, *T. citrinoviride* y *T. longibrachiatum* stricto sensu, así lo menciona Druzhinina et al., (2008: pp.3447-3459; Sandoval-Denis et al., 2014: pp.2112-2125).

1.3. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

Acorde con Ranjbar R, et al. (2014) quien fue citado por (Angarita Merchán et al., 2017, p.5). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta aprovechada en la biología molecular al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis.

Para Espinosa Asuar (2007, p.517), la PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa, se basa en la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa. Al realizar la PCR se simula lo mismo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, se coloca en un tubo todos los ingredientes necesarios: la polimerasa, el ADN del organismo en estudio el cual contiene el fragmento que se desea sintetizar, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl).

Acorde con Boureghda et al. (2008) quién fue citado por (Hernández-Fernández et al., 2018, p.60) las herramientas moleculares que se utilizan en la identificación basada en la secuenciación del ADN son los marcadores ITS1- 5,8S – ITS2, la cual se trata de una secuencia parcial de las proteínas que codifican la traducción del gen del factor de elongación (EF-1 α) y la ARN polimerasa subunidad II (RPB2) estos han permitido disuadir la confusión en la taxonomía de *Trichoderma*. Cabe destacar que se ha utilizado esta técnica para el análisis filogenético del género *Trichoderma*, utilizando el análisis de la secuencia de la región ITS1 del ADNr (Kindermann et al., 1998, pp.298-309; citado en Hernández-Fernández et al., 2018, p.60).

1.4. Marcadores moleculares como herramientas en la discriminación de organismos

Gracias al descubrimiento de los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido explorar diferentes regiones del genoma, esto se basa en el grado de polimorfismo que se encuentra presente naturalmente en el material genético que se emplea para estudiar la diversidad genética a nivel inter e intraespecíficos (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2011, pp.303-320; citados en Sosa et al., 2014, pp.42-51). Pero en el caso de *Trichoderma* / *Hypocrea* el cual es

un género muy diverso y la identificación que se realiza a las cepas a nivel de especie mediante caracteres morfológicos es difícil y confusa, debido a la complejidad del género (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2011: pp.303-320), se optó por el empleo de los marcadores moleculares y el análisis de secuencias nucleotídicas específicas, incrementando así la correcta ubicación filogenética, identificación y caracterización de la diversidad de las especies que lo conforman (Druzhinina et al., 2011: pp.749-759; citados en Sosa et al., 2014: pp.42-51).

Sin embargo, algunas secuencias ITS no logran una identificación definitiva, debido a la falta de polimorfismo en las especies, por lo que en estos casos se opta por utilizar otras secuencias como la del factor de elongación de la traducción 10 (Tef1) la cual es usada para obtener datos sobre la distancia genética más adecuada entre la especie objetivo y sus parientes más cercanos en niveles intercalado del género *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2001: pp.401-406; citados en Valiente y Pavone, 2013: p.5).

1.5. Regiones y genes usados para la identificación de *Trichoderma*

Los aislados seleccionados representativos de diferentes regiones geográficas también se caracterizaron a nivel molecular mediante secuenciación de múltiples genes (Mohiddin et al., 2021: pp.1-20), se utiliza el ADN genómico, incluso se debe usar la amplificación PCR donde se utiliza genes como ITS (*International Transcribe Space*), EF (*Elongation Factor*), RPB2 (*ARN Polymerase B gene*) y TEF1-alfa (*Translation elongation factor-1-alfa*) permiten la identificación de los géneros y especies (Mohiddin et al, 2021: pp.1-20).

1.5.1. La región del espaciador transcrito interno o *Internal Transcribe Space (ITS)*

Se puede definir como regiones no codificante de secuencias de ADN que separan los genes que codifican para los ARN ribosomales los cuales, con altamente conservados a lo largo de las taxas, mientras que los nucleótidos entre ellos pueden ser específicos a nivel de especie. Los ITS son algunos de los marcadores de ADN utilizados para la identificación molecular, al conservar los genes ARNr permite el paso a las regiones ITS utilizando primers versátiles al momento de realizar la PCR. La variación entre los espaciadores es una herramienta muy utilizada para la distribución entre la amplia diversidad de taxa que son difíciles de identificar. Para la detección de los ITS se hace uso de los primers en regiones conservadas de los genes de ARNr 28S, 5.8S y 18S (White et al, 1990, pp.315-322; citados en Suárez-Contreras, 2015, p.52).

1.5.2. Factor de alargamiento 1-a o elongation factor (EF 1 α)

Se puede decir que este factor de alargamiento es un gen que codifica una proteína altamente conservada la cual posee un importante papel en el ciclo de alargamiento y síntesis de la proteína en las células eucariotas como lo detallo (Merrick, 1992; citado en Chi-Chim, 2013, p.14). En eucariotas el EF-1 α es la segunda proteína más abundante después de la actina, constituyendo del 1 al 2% del total de la proteína en el crecimiento normal de la célula (Condeelis, 1995; citado en Chi-Chim, 2013, p.14). Por otro lado, las bandas cargadas de moléculas de RNA^t transportan hacia los lugares donde se receptan los ribosomas adyacentes a una cadena polipeptídica en crecimiento. El gen EF puede presentarse en múltiples copias en algunos *Ascomycota* y *Zygomycota* (Chi-Chim, 2013, p.14).

De acuerdo con Acevedo (2013; citado en Umaña-Castro, 2018, pp. 26-27), quien menciona que (TEF1) se considera como un gen esencial en el análisis multigénico debido a varios motivos: La presencia de una única copia en el genoma de los eucariotas, la no detección de copias ortólogas, su riqueza de regiones intrónicas, su alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y la posibilidad de generar cebadores universales que ayuden a realizar estudios a través de los límites filogenéticos de hongos. Además, la gran utilidad de la secuencia del (TEF1) es debida principalmente a que de los 656 nucleótidos que lo componen en promedio 39 de ellos son considerados cladísticamente significativos.” Por lo tanto, el gen del factor de elongación será de utilidad para tratar de encontrar posibles similitudes de las cepas con los datos de la herramienta BLAST (Acevedo, 2013; citado en Umaña-Castro, 2018, pp. 26-27). De acuerdo con Zhou et al. (2021: pp.5), los primers específicos para especie los diseñaron en función de los datos de secuencias de los genes *tef1*, las secuencias *tef1* de referencia de 80 especies diferentes de *Trichoderma*, por otro lado, los primers específicos de género de *Trichoderma* se diseñaron en función de las secuencias de ADN región ITS.

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Caracterización del lugar

2.1.1. Localización

El presente trabajo se lo desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) localizado en la Panamericana Sur km 1 ½, en el Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

2.1.2. Ubicación geográfica

Coordenadas UTM

X: 757775

Y: 9817313

Altitud: 2622 msnm

2.2. Materiales y equipos

2.2.1. Materiales de oficina

- Cuaderno, lápiz, computador, hojas, impresora, marcador permanente

2.2.2. Materiales de laboratorio

- Puntas de micropipetas (1000, 100, 10 µL)
- Cajas de petri de vidrio (80mm Ø)
- Matraz Erlenmeyer (500 mL)
- Vaso de precipitación (100 mL)
- Probeta graduada (500 mL)
- Mortero y pistilo

2.2.3. Equipos de laboratorio

- Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450)
- Autoclave (BKQ-B100II)
- Destilador de agua (BOECO WS 8000)
- Balanza de precisión
- Secador de vidrio (SELECTA 2000381)
- Incubadora (J.P.SELECTA 2001249)
- Baño María (CENCO 97013-6)
- Cámara de flujo (BIOBASE BSC-1500IIA2-X)
- Termociclador (EPPENDORF)
- Digital Vortex Mixer (FISHER SCIENTIFIC)
- Centrífuga 5424 (EPPENDORF)
- Electrophoresis Systems (FICHER BIOTECH FB-SB-710)
- Transiluminador (FISHER SCIENTIFIC)
- Micropipeta (1000,100,10 µL)

2.2.4. Reactivos e insumos

- Alcohol al 75 %
- Microtubos (1,5 y 0,2 mL)
- Lacto glicerol
- Sulfato de estreptomicina al 1%
- Cloranfenicol al 5 %
- Solución de lisis nuclear (PROMEGA ©)
- Solución de precipitación de proteínas (PROMEGA ©)
- Cloroformo-Alcohol-Isoamílico (24:1)
- Isopropanol (frío)
- Solución de rehidratación de AND (PROMEGA ©)
- RNase (PROMEGA ©)
- Mix GoTaq Green Master Mix, 2x (PROMEGA ©)
- Primers: *Trichoderma_spp.*ITrichF/ ITrichR, *T. harzianum_rpb2_Th1F/ Th1R*, *T. harzianum.tef1.EHarF2/ EHarR2*, *T.longibrachiatum_tef1_T1F/ T1R* (Exxtend Biotecnologia© San Pablo-Brasil)
- Agua libre de nucleasas
- Tris-Borate- EDTA buffer 10x (PROMEGA ©)

- Agua destilada estéril
- Agarosa CSL-AG100 (Cleaver Scientific)
- Agente intercalante UniSafe DYE (20.000X)
- Agente intercalante Diamond TM Nucleic: Acid Dye (PROMEGA ©)
- Gel Loading buffer Blue Juice 10x
- Marcador molecular DNA leader Bench Top
- Nitrógeno líquido
- Cinta parafilm
- Fundas ziploc (25x25 cm)
- Tarrina plástica gris
- Palillos
- Sorbetes
- Sobres de manila
- Papel toalla
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva

2.2.5. Medios de cultivo

- Papa Dextrosa Agar al 3,9% (PDA Difco TM)
- Agar-Avena al 4%
- Medio mínimo
- Para preparar un litro de medio mínimo:
- 10 g Sacarosa
- 2 g Asparagina
- 1 g KH_2PO_4
- 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,44 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,48 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,36 mg $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0,25 g Agar

2.2.6. Material biológico

Tabla 1-2: Cepas reactivadas del género *Trichoderma* spp, *Fusarium* spp. y *Penicillium*, de la colección existente en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, ESPOCH.

N° de cepas utilizadas	Género	Código	Lugar	Aislado	Año	Técnica
36	<i>Trichoderma</i> spp.	A	Chambo-Chimborazo	Raíz	2019	Inclusión directa de fragmento de raíz
		B	San Juan-Chimborazo	Raíz	2019	Inclusión directa de fragmento de raíz
		C	Palmira-Chimborazo	Raíz	2019	Inclusión directa de fragmento de raíz
		D	El Altar-Chimborazo	hoja	2020	Fragmento de nomofilo
		E.	Maldonado-Chimborazo	Suelo	2019	Dilución seriada
		F	Maldonado-Chimborazo	Suelo	2019	Dilución seriada
		G	Sibamba-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		H	Sibamba-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		I.	Huigra-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		J	Huigra-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		K	Huigra-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		L	Huigra-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		M	Huigra-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		N	Santa Rosa-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		O	Santa Rosa-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		P	Chambo	Suelo	2019	Dilución seriada
		Q	Machay	Suelo	2020	Dilución seriada
R	Santa Fe de Galan	Suelo	2019	Dilución seriada		
S	El Altar-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada		

		T	San Juan-Chimborazo	Suelo	2019	Dilución seriada
		U+	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		V.	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		W.	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		X	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		Y	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		Z	Gonzol-Chimborazo	Suelo	2020	Dilución seriada
		A1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		B1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		C1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		K1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		L1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		M1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		N1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		O1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		P1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		Q1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
	6	D1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		E1.	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		F1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		G1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		H1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
		I1	Chimborazo	Desc.	s.f.	Desc.
1	<i>Penicillium</i> sp.	J1	Maldonado-Chimborazo	Suelo	2019	Dilución seriada

Fuente: Guerra, 2019: p.70.

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Fueron 43 cepas en total con las que se trabajó en el presente ensayo, pertenecientes al proyecto “Estudio de *Trichoderma* spp. en viveros forestales en la provincia de Chimborazo y Suelos Agrícolas en Santa Cruz, Islas Galápagos”.

2.3. Metodología

2.3.1. Reactivación de muestras en PDA y Agar avena

La reactivación de muestras se realizó a partir de micelio esporulado de *Trichoderma* spp, *Fusarium* spp, y *Penicillium* spp. en donde se extrajo dichas muestras con ayuda de palillos, repicando a las cajas Petri de vidrio que contenían agar de papa al 3,9% más el antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más cloranfenicol al 5%), luego se incubó a 25°C ± 1 durante 7 días. Pasado este tiempo se procedió a cortar discos de micelio de un tamaño de 5 mm de diámetro, este corte se colocó en cajas de Petri nuevas que contenían agar avena al 4% con antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Cloranfenicol al 5%) lo que permitió inducir el crecimiento del micelio aéreo, luego se embolsó los bordes de las cajas Petri con papel film para evitar que se contamine, finalmente se dejó incubar a 25°C ± 1 durante 7 días en condiciones de oscuridad.

Tabla 2-2: Información de las cepas utilizadas como control negativo.

Código original	Código ensayo	Especie
MTST2(1)	J1	<i>Penicillium</i> sp.
FCP3	F1	<i>Fusarium</i> sp.
FCR1	G1	<i>Fusarium</i> sp.
FCR2	H1	<i>Fusarium</i> sp.
FCR3	I1	<i>Fusarium</i> sp.

Fuente: Guerra, 2019: p.70.

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Se utilizó 5 cepas como controles negativos pertenecientes al género *Fusarium* sp. (4) y *Penicillium* sp. (1) para corroborar la validación de los primers de *Trichoderma* spp.

Tabla 3-2: Información de las cepas utilizadas como control positivo de *Trichoderma* (caracterizadas previamente, mediante secuenciamiento).

Código original	Código ensayo	Longitud secuencia	Resultado
P3a	B	213	<i>Trichoderma harzianum</i>
MTST2R1(1)	F	524	<i>Trichoderma harzianum</i>
MTST2R3(1)	E.	434	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
h329 (cedro)	D	1773	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

Fuente: Guerra, 2019: p.70.

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Para controles positivos se utilizó 4 cepas ya secuenciadas y verificadas en años anteriores, 2 muestras pertenecientes a *Trichoderma harzianum* como se observa en la Tabla 3-2 y 2 muestras pertenecientes a *Trichoderma longibrachiatum*.

2.3.2. Extracción y maceración de micelio

Se realizó la extracción de micelio de las cepas de *Trichoderma* spp., *Fusarium* sp. y de *Penicillium* sp. mediante el siguiente proceso:

Se inició con el raspado de micelio de las cajas Petri, se colocó sobre papel filtro estéril, luego se cubrió con papel aluminio, después se colocó en sobres manila y a su vez dentro de fundas ziploc. Seguido se procedió a etiquetar y se almacenó en un ultracongelador a -40°C.

Después se procedió con la lisis física, iniciando con la maceración del micelio de cada una de las muestras con ayuda de una cucharita de plástico, mortero, pistilo y 100mL de nitrógeno líquido aproximadamente. El producto obtenido de este proceso el micelio macerado (polvo) fue transferido con ayuda de una cucharita de plástico a microtubos *ependorf* de 2mL, finalmente se almacenó en el ultracongelador a -40 °C.

2.3.3. Extracción de ADN

Al realizar el proceso de lisis química se siguió el protocolo para la extracción de ADN de acuerdo con el kit de *Wizard. Genomic DNA Purification (Promega Corporation)* (PROMEGA ©), con algunas modificaciones, se realizó los siguientes pasos:

- 1.- Utilizando los microtubos y el producto obtenido en la extracción y maceración de micelio se procedió a adicionar 600 µL de solución de lisis nuclear (PROMEGA ©), luego se pasó al vortex por 3 segundos, seguido se envió a incubar a baño maría a 65°C por 15 minutos invirtiendo la gradilla cada 5 minutos.
- 2.- Después se adicionó 200 µL de solución de precipitación de proteínas (PROMEGA ©), se pasó al vortex por 20 segundos, se envió a la centrifuga por un tiempo de 10 minutos a 14000 rpm. Como resultado se obtuvo un pellet. Luego transfirió el sobrenadante (600 µL) que contenía el ADN para un tubo nuevo de 1,5 mL. Luego se adicionó 600 µL de cloroformio-alcohol-isoamílico, se pasó por el vortex durante 20 segundos y centrifugó por 8 minutos a 14000 rpm. Se transfirió el sobrenadante (+/- 600 µL) conteniendo el ADN para un nuevo tubo.

- 3.- Luego se agredó 600 µL de isopropanol frío, seguido con mucho cuidado se entrevero la solución invirtiendo dichos tubos hasta que se observó una especie de masa de ADN (hilos pequeño). Después se conservó dicha solución en un ultracongelador por un tiempo de 10 minutos, seguido se centrifugó a 14000 rpm por un tiempo de 10 minutos.
- 4.- Luego se visualizó la formación de un pellet localizado en el fondo de los tubos. Con mucho cuidado se procedió a descartar el sobrenadante, evitando perder el pellet. Luego se, realizó dos lavados con la solución de etanol. Cabe mencionar que en cada lavado se adicionó 600 µL de la solución de etanol al 70% frío y se envió a la centrifuga a 14000 rpm por un tiempo de 5 minutos.
- 5.- Después con cuidado se eliminó el etanol. Luego se conservó los tubos en ambiente limpio, se debe mencionar que estos tubo se colocaron en posición horizontal y con la tapa abierta, se los puso sobre papel toalla para que el pellet se pueda secar durante 24 horas.
- 6.- Transcurrido 24 horas se procedió a suspender el pellet con la solución *buffer* (TE). Seguido se añadió 50 µL de la solución de rehidratación de ADN y 2 µL de la solución de RNasa (PROMEGA ©) en cada tubo. Luego se incubó en baño maría a 37°C por aproximadamente por 3 horas. Finalmente se almacenó en el ultracongelador a -40 °C.

2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En este proceso se utilizaron para las reacciones de PCR dos conjuntos de primers, para identificación de género y especie, los primers utilizados fueron sintetizados en la empresa *Exxtend Biotecnologia* de San Pablo Brasil.

Tabla 4-2: Conjuntos de primers utilizados en PCR.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Gen Amplificado	Tamaño (pb)
<i>Trichoderma_spp</i> .ITrichF	GAACCCCTCCGGGGGGHC	Factor de Elongación de Traducción (ITS)	103-113
<i>Trichoderma_spp</i> .ITrichR	TGTGCAAACACTACTGCACAKGA		103-113
<i>T. harzianum</i> .tef1.EHarF2	TCTGCTTCGCTCTTACTGC	Factor de Elongación de Traducción (TEF1)	253
<i>T. harzianum</i> .tef1. EHarR2	TGTGTGAAGTTGATGGAAAG		253
<i>T.longibrachiatum</i> _tef1_T1F	CCGTGAGTACACACCGAGCTT	Traducción (TEF1)	452
<i>T.longibrachiatum</i> _tef1_T1R	CGGCTTCCTGTTGAGGGGA		452

Fuente: Zhou et al., 2021: p.5; Prabhakaran et al., 2014: p.4.

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Para la preparación de las muestras para PCR se realizó el siguiente proceso:

Primero se realizó la rehidratación de los primers que se utilizaron, se colocó 180 μL de agua ultra pura y 20 μL de cada primer F/R, luego se envió a la centrifuga por 5 minutos a 8000 rpm. Después se realizó la preparación de un mix con las cantidades de los siguientes reactivos:

- 2 μL de ADN de cada muestra
- 6,25 μL de Mix Go TaqR Green Master Mix 2x
- 1 μL de primer forward detallados en la tabla 5-2.
- 1 μL de primer reverse detallados en la tabla 5-2.
- 2,25 μL de agua libre de nucleasas.

Después se colocó en los tubos de 0,2 mL la cantidad de 10,5 μL del mix más 2 μL de ADN, con un volumen total de 12,5 μL . Además de eso se preparó un control negativo dentro de las muestras la cual contenía agua ultrapura estéril en vez de ADN, con el objetivo de verificar que las muestras no se encuentren contaminadas de alguna manera.

Seguido, se colocó todas las muestras envueltas en papel film en el termociclador (EPPENDORF), finalmente se lo programó bajo los siguientes parámetros: para los primers ITrichF/ ITrichR factor de elongación (ITS) fue de 96°C por 1 minuto, 30 segundos, seguido por 35 ciclos de 96°C por 35 segundos, 53°C por 55 segundos, 72°C por 1 minuto, 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Para EHartF2/ EHartR2 y T1F/ T1R (TEF1) fue de 96°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por el tiempo de 5 minutos. Finalmente se conservó dichas muestras en un ultracongelador a -40 °C.

2.3.5. Electroforesis

Se debe mencionar que con este proceso se observó las amplificaciones de los diferentes aislado. En este proceso se utilizó el *buffer* Tris-Borate-EDTA *buffer* (TBE) a una concentración de 1X en agua destilada estéril, para el gel de 1% se utilizó CSL-AG 100 LE *Agarose Multi-Purpose Agarose* en una concentración de 1X en agua destilada estéril. Se procedió a colocar el agente intercalante *nucleic Acid staining Solution 20000x* o *nucleic Acid Dye Diamond* (5 μL por cada 100 mL de solución de agarosa) en el gel. Luego se vertió dicha mezcla en la cuba, se colocó los peines para que se formen los pocillos, se cubrió la cuba para evitar que el agente intercalante se degrade, y se esperó 20 minutos aproximadamente para la formación del gel.

Después se procedió a cubrir la superficie del gel y un poco más con el TBE. Se cargo las muestras como se visualiza en la figura 1-2. Estas muestras contenían: 3 μ L de *Gel Loading Buffer Blue Juice* 10x (PROMEGA ©) más 2 μ L de ADN realizado PCR con anterioridad, y dos muestras más una que contenía 3 μ L de *DNA Leadder Bench Top* (PROMEGA ©) como marcador molecular y la segunda muestra con 2 μ L agua ultra pura. Por último, se envió a correr las muestras a 120 amperios(A), a 80 V por un tiempo de 60 minutos, luego se procedió a retirar el gel de la cuba y se colocó el mismo en el transiluminador (FISHER SCIENTIFIC) para verificar las amplificaciones logradas con los productos de PCR.

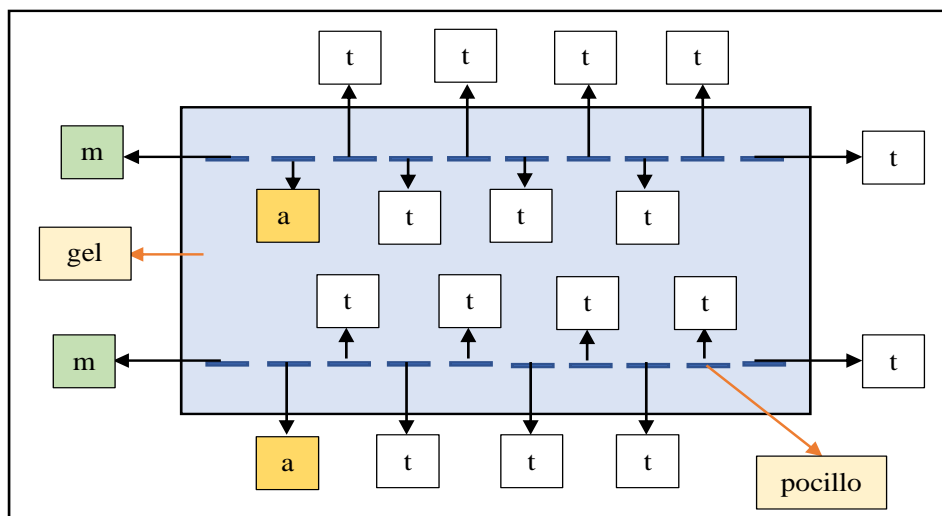


Figura 2-2: Gel de la cuba con los pocillos y orden de las muestras.

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

A más de ello, algunas de las muestras que amplificaron fueron enviados a un laboratorio llamado MACROGEN ubicado en Corea. Los resultados obtenidos del laboratorio fueron analizados mediante el programas *Chromas* versión 2.6.6 con él se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de las muestras, luego se las alinea con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica a través del método BLAST para la respectiva corroboración.

2.3.6. *Análisis de datos*

El análisis que se realizó dentro del alineamiento de las muestras enviadas a secuenciar en el laboratorio MACROGEN Corea para conocer la especie de las muestras, se utilizó el programa *Chromas* que permite cortar las secciones de mala calidad de la cadena de ADN quedando así la fracción de la cadena que posee mejor calidad. Para obtener la secuencias de la sección de la cadena de buena calidad se utilizó el programa Notepad++. Para el alineamiento y corroboración

de la especie se subió la secuencia en la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica donde mediante el método BLAST se logró constatar la especie de las muestras.

Los parámetros que se consideraron para identificar la especie luego de realizar la alineación fueron: en cuanto a porcentaje de identidad y cobertura se tomó en consideración desde el 99% al 100% como lo explica Chaverri et al (2015: pp.558-590), ya que dentro de estos parámetros se puede considerar una identificación positiva.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADO

3.1. Caracterización molecular

3.1.1. Marcadores moleculares para género *Trichoderma* spp.

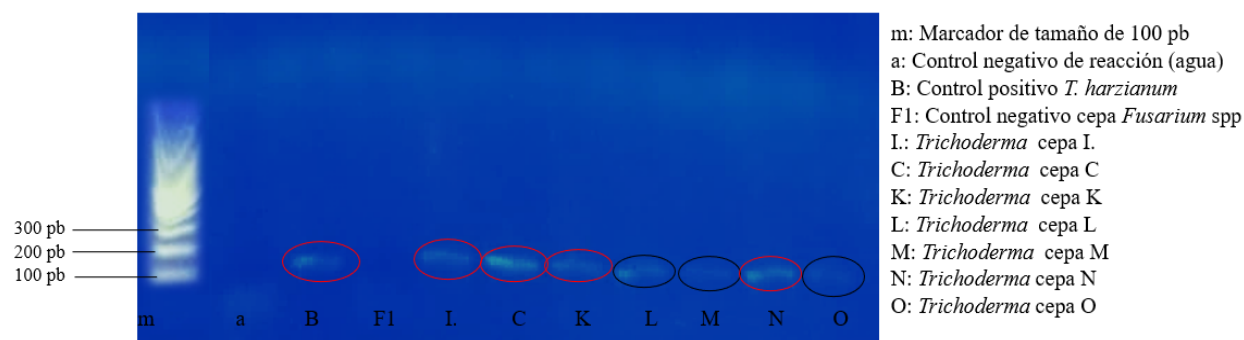


Figura 3-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para el género *Trichoderma* spp. (ITS).

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Dentro del análisis realizado se utilizó el primer para género *Trichoderma* spp. (ITrichF/ITrichR) mismo que se basa en la región ITS la cual permite la identificación de las cepas a nivel de género, este primer fue diseñado por Zhou et al, (2021: p.5), el cual permite amplificar productos de PCR con un tamaño de entre 103 a 113 pares de bases aproximadamente. El protocolo para PCR que se utilizó para la amplificación que se muestra en la presente figura fue de: primera desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos, una segunda desnaturalización a 95°C por 1 minuto, un anelamiento de 55°C por 1 minuto, una extensión de 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 V por 60 minutos, dando como resultado el gel (Figura 1-3) donde se puede observar patrones electroforéticos en los pocillos B, I, L, C, K, L, M, N, O cabe mencionar que el control positivo utilizado B (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) amplificó y los controles negativos F1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2) y el pocillo a (agua) no amplificaron lo que permite decir que se corroboró los resultados obtenidos. Por otro lado, las cepas amplificadas se muestran dentro del rango de 100pb a 200pb lo que esta aproximado al tamaño del primer (ITrichF/ITrichR) según Zhou et al, (2021: p.5).

Tabla 5-3: Muestras que amplificaron para género *Trichoderma* spp. en la región ITS.

Región	Protocolo PCR	Controles		Código cepas amplificadas			N° de cepas amplificadas
		positivos	negativos				
ITS	96°C por 1:30 s, 35 ciclos, 96°C por 35 s, 53°C por 55 s, 72°C por 1:30 s, 72 °C por 10 min.	B (<i>T. harzianum</i>)	F1 (<i>Fusarium</i> sp.)	B	C	F	31
				L1			
	95°C por 5 min, 40 ciclos, 95°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min, 72 °C por 5min.	F (<i>T. harzianum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.)	C	F	G	
				J	N	P	
				Q	Z	B1	
	95°C por 2 min, 40 ciclos, 95°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C por 1min, 72 °C por 5min.	B (<i>T. harzianum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.)	B	A	C	
				D	E.	F	
				G	H	I.	
		E. (<i>T. longibrachiatum</i>)	F1 (<i>Fusarium</i> sp.)	J	K	L	
				M	N	O	
				P	Q	R	
				S	U	V.	
				W.	X	Y	
				Z	B1	L1	
	F (<i>T. harzianum</i>)	G1 (<i>Fusarium</i> sp.)	M1	N1	O1		
Q1							

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Las cepas amplificadas en la región ITS fueron 31 muestras de un total de 43 (Tabla 1-3), es decir un 72% del total. En los análisis realizados se cambiaron los protocolos por lo que el primer análisis se dio de la siguiente forma: 96°C por 1:30 s, 35 ciclos, 96°C por 35 s, 53°C por 55 s, 72°C por 1:30 s, 72 °C por 10 min, en donde se utilizó el control positivo B (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) y un control negativo F1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2) en este caso amplificaron cuatro muestras. El segundo análisis fue con un protocolo de 95°C por un tiempo de 5 min, a 40 ciclos, 95°C por un tiempo de 1min, 54°C por un tiempo de 1min, 72°C por un tiempo de 1min, 72 °C por un tiempo de 5min, amplificaron seis muestras y se utilizó F (*Trichoderma*

harzianum) como control positivo (Tabla 3-2) y J1 (*Penicillium* sp.) (Tabla 2-2) como control negativo. Finalmente se realizó un tercer análisis con el siguiente protocolo: 95°C por un tiempo de 2 min, a 40 ciclos, 95°C por un tiempo de 1min, 55°C por un tiempo de 1min, 72°C por un tiempo de 1min, 72 °C por un tiempo de 5min, aquí se utilizó como controles positivos (Tabla 3-2) a: B, F (*Trichoderma harzianum*) y E. (*Trichoderma longibrachiatum*), como controles negativos fueron (Tabla 2-2): J1 (*Penicillium* sp.), F1, G1 (*Fusarium* sp.), amplificaron 31 muestras, siendo este protocolo el que mejores resultados arrojó. Cabe mencionar que todos los controles positivos utilizados amplificaron en cada uno de los análisis realizados en especial la cepa B, en cuanto a los controles negativos al igual que la muestra de agua que se utilizó no amplificaron corroborando así los análisis realizados.

3.1.2. Marcadores moleculares para la especie *Trichoderma harzianum* (TEF1)

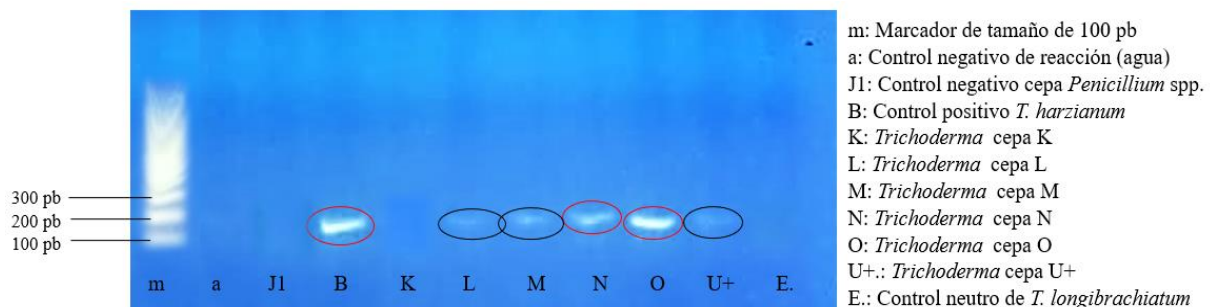


Figura 4-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para la especie *Trichoderma harzianum* (TEF1).

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

En la verificación de la capacidad de primers específicos basados en los genes TEF1 para el caso de *Trichoderma harzianum* se utilizó el primer EHarF2/EHarR2 el cual fue realizado por Zhou et al (2021: p.5), este primer amplifica un producto de PCR con un tamaño de 253 pb aproximadamente. Las condiciones de PCR que se utilizaron fueron: primera desnaturalización a 96°C por un tiempo de 1minuto 30 segundos, seguido de 35 ciclos, segunda desnaturalización de 96°C por un tiempo de 35 segundos, el anelamiento de 53°C por un tiempo de 55 segundos, la extensión a una temperatura de 72°C por el tiempo de 1minuto 30 segundos y una última extensión de 72 °C por 10 min. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 V por 60 minutos arrojando como resultado la presente figura donde se puede observar patrones electroforéticos en los pocillos B, L, M, N, O, U+, se utilizó como control positivo B (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) y como controles negativos J1 (*Penicillium* sp.) (Tabla 2-2) y el pocillo a (agua) que no amplificaron lo que permite decir que se corroboró los resultados obtenidos. A más de eso se puede decir que el tamaño de las muestras amplificadas se encuentra entre los rangos de 100 a

250 pares de bases aproximadamente lo que esta aproximado al tamaño del primer (EHarF2/EHarR2) que tiene según Zhou et al, (2021: p.5).

Tabla 6-3: Muestras que amplificaron para la especie *Trichoderma harzianum* (TEF1).

Región	Protocolo PCR	Controles		Código cepas amplificadas			N° de cepas amplificadas
		positivos	negativos				
TEF1	96°C por 5 min, 40 ciclos, 96°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, 72 °C por 5 min.	B (<i>T. harzianum</i>)	F1 (<i>Fusarium</i> sp.)	B	F	N	17
		F (<i>T. harzianum</i>)	H1 (<i>Fusarium</i> sp.)	N1			
	95°C por 5 min, 40 ciclos, 95°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min, 72 °C por 5 min.	B (<i>T. harzianum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.)	B	F	Z	
		F (<i>T. harzianum</i>)	F1 (<i>Fusarium</i> sp.)	N	N1		
	96°C por 1:30s, 35 ciclos, 96°C por 35 s, 53°C por 55 s, 72°C por 1:30 s, 72 °C por 10 min.	B (<i>T. harzianum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.)	B	V.	Y	
				Z	F	H	
F (<i>T. harzianum</i>)		H1 (<i>Fusarium</i> sp.)	N	O	M		
			A	C	G		
			U+	I	J		
			L				

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

El análisis para la verificación del primer arrojó los siguientes resultados de 31 cepas que amplificaron para el género *Trichoderma* spp. en la región ITS (Tabla 1-3), hubo 17 muestras que amplificaron mediante el gen específico llamado TEF1 (Tabla 2-3), se identificaron como especie *Trichoderma harzianum*, es decir el 55% de las cepas se encuentran dentro de esta especie. En cuanto a las condiciones de temperatura de PCR variaron algunas temperaturas tiempos que se presentan a continuación: el primer análisis se realizó bajo la siguiente condiciones térmicas: 96°C por 5 minutos, 40 ciclos, 96°C por 1 minutos, 52°C por 1 minutos, 72°C por 1 minutos, 72 °C por 5 minutos, en donde amplificaron 4 muestras, aquí se tomó como controles positivos B y F (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) y controles negativos F1 y H1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2). Para el segundo análisis se optó por el siguiente protocolo: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos, 95°C por 1minuto, 54°C por 1minuto, 72°C por 1minuto, 72 °C por 5 minutos, en donde se utilizó como controles positivos B y F (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) y controles negativos J1

(*Penicillium* sp.) y F1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2), en esta ocasión amplificaron cinco cepas. Por último, se aplicó el siguiente protocolo:

96°C por 1 minuto 30 segundos, con 35 ciclos, 96°C por 35 segundos, 53°C por 55 segundos, 72°C por 1 minuto 30 segundos y 72 °C por 10 minutos, en este caso se utilizó los controles positivos B y F (*Trichoderma harzianum*) (Tabla 3-2) y controles negativos J1 (*Penicillium* sp.) y H1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2), se obtuvo un total de 16 muestras amplificadas, siendo este protocolo el que mayor número de amplificaciones arrojó. Es importante mencionar que los controles positivos utilizados en este análisis amplificaron, en el caso de los controles negativos y el agua utilizada en uno de los pocillo no amplificaron lo que nos permitió corroborar los análisis realizados.

Tabla 7-3: Muestras de la especie *Trichoderma harzianum* (TEF1) secuenciadas en MACROGEN COREA y alineadas con el método BLAST.

Código	# Nucleótidos	Especie	% identidad	% cobertura
N	189	<i>T. harzianum</i>	100,00%	100%
Z	181	<i>T. harzianum</i>	100,00%	100%

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

A partir de las muestras amplificadas en la Tabla 2-3 se seleccionaron dos cepas de este grupo para ser enviadas a Corea y sean secuenciadas en el laboratorio MACROGEN para así verificar, validar la especie y con ello los primers utilizados, con los resultados obtenidos de dicho laboratorio se realizó las respectivas alineaciones a través de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica mediante la utilización del método BLAST. Las sepas seleccionadas fueron N debido a que esta muestra amplificó tanto para *T. harzianum* como para *T. longibrachiatum* y Z, acorde con los resultados obtenidos del alineamiento (Tabla 3-3) se puede decir que ambas muestras pertenecen a la especie *Trichoderma harzianum* con una identidad del 100% y una cobertura del 100%, como lo explica Chaverri et al (2015: pp.558-590), él dice que los porcentajes que se tiene en identidad están entre el 99% para tef1, y contenga un solo nombre en la base de datos, todavía se puede considerar una identificación positiva y en el caso de poseer valores menores a 99% de identidad recomienda realizar una composición de alineamiento múltiple con secuencias tef1 de los aislados que se quiere identificar y de los aislados de referencias que se tenga de las especies cercanas en referencias a las obtenidas como resultado por lo que se debe optar por análisis filogenéticos con algunos protocolos que han sido utilizados en la taxonomía de *Trichoderma*. Entonces esto quiere decir que con los resultados de los aislados de la tabla 3-3 la identificación es viable y se puede decir que efectivamente pertenecen a la especie de *Trichoderma harzianum*.

3.1.3. Marcadores moleculares para la especie *Trichoderma longibrachiatum* (TEF1).

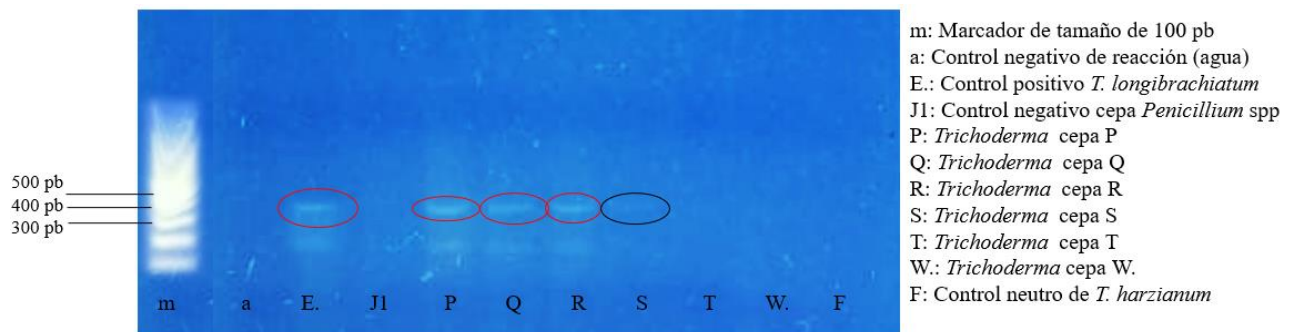


Figura 5-3: Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados para la especie *Trichoderma longibrachiatum* (TEF1).

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

El análisis realizado para la verificación de la capacidad de primers específicos basado en los genes TEF1, en el caso de *Trichoderma longibrachiatum* se utilizó el primer T1F/T1R, mismo amplifica un producto de PCR de tamaño aproximado de 452 pares de base (pb), este primer fue diseñado por Prabhakaran et al. (2014: p.4), las condiciones que se utilizó para PCR con este primer fue de 96°C por 1 minuto 30 segundos para la desnaturalización inicial seguido de 35 ciclos, luego una segunda desnaturalización a 96°C por 35 segundos, un anelamiento de 53°C por 55 segundos, también una extensión de 72°C por 1 minuto 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos, en cuanto a las condiciones de la electroforesis se la realizó a 80 V por 60 minutos lo que mostro un resultado donde se pudo observar patrones electroforéticos en los pocillos E., P, Q, R, S. Aquí se utilizó como control positivo E. (*Trichoderma longibrachiatum*) (Tabla 3-2) y como controles negativos J1 (*Penicillium* sp.) (Tabla 2-2) y el pocillo a (agua) que ninguno amplificó, por lo que se puede decir que se corroboró los resultados obtenidos. Por otro lado, se puede decir que el tamaño de los aislado que amplificaron se encuentra entre los rangos de 400 a 500 pares de bases lo que concuerda con el tamaño que el primer (T1F/T1R) tiene según Prabhakaran et al. (2014: p.4).

Tabla 8-3: Muestras que amplificaron para la especie *Trichoderma longibrachiatum* (TEF1).

Región	Protocolo PCR	Controles		Código cepas amplificadas			N° de cepas amplificadas
		positivos	negativos				
TEF1	96°C por 5 min, 40 ciclos, 96°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, 72 °C por 5 min.	E. (<i>T. longibrachiatum</i>)	F1 (<i>Fusarium</i> sp.) II. (<i>Fusarium</i> sp.)	M1	B1	O1	12
				L1	N	E.	
				S			
	95°C por 5 min, 40 ciclos, 95°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min, 72 °C por 5 min.	E. (<i>T. longibrachiatum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.) F1 (<i>Fusarium</i> sp.)	B1	S	O1	
				M1	K	L1	
				E.			
	96°C por 1:30s, 35 ciclos, 96°C por 35 s, 53°C por 55 s, 72°C por 1:30 s, 72 °C por 10 min.	E. (<i>T. longibrachiatum</i>) D (<i>T. longibrachiatum</i>)	J1 (<i>Penicillium</i> sp.) H1 (<i>Fusarium</i> sp.)	E.	D	P	
				Q	R	S	

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

Dentro de la verificación del primer se realizó el siguiente análisis donde se muestra los siguientes resultados de las 31 muestras amplificadas dentro del género *Trichoderma* spp. basado en la región ITS (Tabla 1-3), se obtuvo 12 muestras amplificadas basándose en el gen específico TEF1 (Tabla 4-3), es decir el 39% del total de las muestras, lo que quiere decir que estas fueron identificadas como especies de *Trichoderma longibrachiatum*. Por otro lado, las condiciones de PCR que se utilizaron para este análisis variaron de cierta forma en tiempo y temperatura, el primer protocolo probado fue de: 96°C por 5 minutos, 40 ciclos, 96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 72 °C por 5 minutos, se utilizó como control positivo E. (*Trichoderma longibrachiatum*) (Tabla 3-2) y dos controles negativos F1 y II. (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2), en este caso amplificaron 7 muestras. El segundo análisis se manejó con el siguiente protocolo: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos, 95°C por 1minuto, 54°C por 1minuto, 72°C por 1minuto, 72 °C por 5 minutos, aquí se utilizó como control positivo E. (*Trichoderma longibrachiatum*) (Tabla 3-2) y dos controles negativos J1 (*Penicillium* sp.) y F1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2), en este caso amplifico 7 muestras. El ultimo análisis se lo realizó bajo los siguientes parámetros: 96°C por 1minuto 30 segundos, 35 ciclos, 96°C por 35 segundos, 53°C por 55 segundos, 72°C por 1minuto 30 segundos, 72 °C por 10 minutos, para este caso amplificaron 6 muestras, se utilizaron como

control positivo E. y D (*Trichoderma longibrachiatum*) (Tabla 3-2) y dos controles negativos J1 (*Penicillium* sp.) y F1 (*Fusarium* sp.) (Tabla 2-2). Se puede decir que los dos primeros análisis fueron los que más aislado amplificaron, por otro lado, cabe mencionar que en el caso de los controles positivos si amplificaron, pero no con mucha claridad, en el caso de los controles negativos y el pocillo que se utilizó para el agua no amplificaron lo que permitió corroborar los resultados obtenidos.

Tabla 9-3: Muestras de la especie *Trichoderma longibrachiatum* (TEF1) secuenciadas en MACROGEN COREA y alineadas con el método BLAST.

Código	# Nucleótidos	Especie	% identidad	% cobertura
R	355	<i>T. longibrachiatum</i>	100,00%	100%
P	349	<i>T. longibrachiatum</i>	100,00%	100%
Q	358	<i>T. longibrachiatum</i>	100,00%	99%
B1	352	<i>T. longibrachiatum</i>	100,00%	100%
C1	355	<i>T. longibrachiatum</i>	100,00%	100%

Realizado por: González Mariscal, Dina, 2022

En base a las muestras amplificadas en la Tabla 4-3 se seleccionaron cinco cepas que fueron enviadas a Corea para ser secuenciadas en el laboratorio MACROGEN, para así verificar, validar la especie y con ello los primers utilizados, los resultados obtenidos de este laboratorio permitieron realizar las alineaciones mediante la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica a través de la utilización del método BLAST. Los aislados seleccionados fueron R, P, Q, B1, C1, la selección fue indistinta. Luego de las alineaciones se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5-3): las cinco muestras son identificadas como *Trichoderma longibrachiatum*, cuatro de ella R, P, B1, C1, mostraron 100% de identidad y 100% de cobertura, mientras que Q mostró 100% de identidad y 99% de cobertura lo que muestra que pertenece a la especie y como lo menciona Chaverri et al (2015: pp.558-590), él dice que los porcentajes que se tiene en identidad están entre el 99% para el gen *tef1*, y contenga un solo nombre en la base de datos, todavía se puede considerar una identificación positiva y en el caso de poseer valores menores a 99% de identidad recomienda realizar una composición de alineamiento múltiple con secuencias *tef1* de los aislados que se quiere identificar y de los aislados de referencias que se tenga de las especies cercanas en referencias a las obtenidas como resultado por lo que se debe optar por análisis filogenéticos con algunos protocolos que han sido utilizados en la taxonomía de *Trichoderma*. Esto permite entender que los resultados de los aislados de la tabla 5-3 poseen una identificación viable y se puede decir que efectivamente los cinco aislados pertenecen a la especie de *Trichoderma longibrachiatum*.

3.2. Discusión de resultados

Desde hace varias décadas atrás se ha intentado identificar morfológicamente al género *Trichoderma*, lo cual ha sido un tanto difícil ya que las características culturales que presenta son algo ambiguas, así como lo menciona Castillo-González (2020, p. 18) en su estudio, por otro lado, debido a estos factores se introdujeron diferentes técnicas moleculares las cuales han facilitado desde hace algún tiempo atrás el reconocimiento e identificación de este y varios géneros más con mayor precisión según Castillo-González (2020, p. 18), logrando así estandarizar estas técnicas para la identificación del género *Trichoderma*.

En el presente estudio se realizaron varias pruebas para corroborar la eficiencia de primers específicos basados en la región ITS para la identificación del género *Trichoderma*, el primer que se utilizó fue ItricF/ITricR el cual fue elaborado por Zhou et al. 2021; p.5. Se utilizaron 43 aislados de los cuales amplificaron 31 aislados dentro del género, es decir un 72%, a más de eso, se puede decir que este primer solo amplifica este género más no con otros como lo menciona Zhou et al. 2021; p.6., nos dice que se diseñaron primers ItricF/ITricR de acuerdo con la región ITS que pueden amplificar todas las especies de *Trichoderma*, pero ningún otro género, esto se rectificó ya que en las pruebas realizadas se colocaron como controles negativos a especies de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. de los cuales en ninguna prueba amplificaron corroborando así la eficiencia de los primers en la identificación específica del género en estudio.

En el análisis para la verificación de la capacidad de discriminación de los primers basados en los genes TEF1 se realizaron varios estudios utilizando las muestras que amplificaron para el género *Trichoderma*, se lograron identificar mediante PCR que es una herramienta popular y económica para cuantificar microorganismos en muestras (Zhou et al. 2021; p.6). y electroforesis a 17 aislados dentro de la especie *Trichoderma harzianum*, es decir un 55% del total de las muestras, utilizando el primer EHarF2/EHarR2 elaborado por Zhou et al. 2021; p.5, a más de eso él nos dice que los cebadores específicos de especie EHarF2/EHarR2 pueden cumplir el requisito de identificación rápida de *T. harzianum*. Por otro lado, el tamaño de estos primers es de 253 pb aproximadamente (Zhou et al. 2021; p.5), y las muestras que se enviaron a secuenciar y fueron alineadas mediante el método BLAST se aproximaron a ese tamaño mostrando para N 189 pb y para Z 181 pb. Cabe mencionar que en el análisis de estos primers se utilizaron controles negativos de los cuales en ninguno de los casos amplificaron incluso se incluyó un aislado de la especie *T. longibrachiatum* el cual tampoco amplificó lo que quiere decir que fue discriminado por estos primers, corroborando así lo dicho por Zhou et al. (2021; p.6).

Para el caso de *Trichoderma longibrachiatum*, se puede decir que se han desarrollado cebadores específicos de especie para la identificación de *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* y *T. virens* con base en el gen TEF1 como lo menciona Prameeladevi et al. , (2012: pp. 15150-15160), en este caso se utilizó los primers TIF/T1R elaborados por Prabhakaran et al. (2014: pp. 1-6). Como el mismo lo menciona poseen un tamaño de 452 pb y ayudarán a la identificación rápida de la especie en cuestión. En este estudio se obtuvieron 12 aislados reconocidos como *T. longibrachiatum* de un total de 31 muestras representando el 39% del total de las muestras, se enviaron a secuenciar y se alinearon 5 aislados de los cuales se puede decir que los tamaños (ANEXO G) son aproximados al mencionado por Prabhakaran et al. (2014: pp. 4), lo antes mencionado permite corroborar la capacidad del primer utilizado. En el desarrollo de las PCR y electroforesis se colocó controles negativos los cuales no amplificaron y un control de la especie *T. harzianum* la cual tampoco amplificó permitiendo decir que el primer es viable para la discriminación de las diferentes especies del género *Trichoderma*.

Es importante mencionar que hubo un aislado de codificación N que amplificó varias veces para *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* por lo que se la envió a secuenciar para verificar la especie (ANEXO G). Se cree que este incidente se puede deber a que al variar la temperatura en el proceso de PCR los resultados no sean tan claros o específicos como lo menciona Zhou et al. (2021: p.5). por otro lado, se recomienda realizar más estudio como lo mencionan Prameeladevi et al.(2018, p.1) en su estudio para confirmar la identificación.

Al analizar los porcentajes de identidad y cobertura obtenidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica en su mayoría arrojaron 100% en identidad (ANEXO G) y 100% en cobertura a excepción de una muestra la cual presenta un 99% en cobertura pero como lo menciona Chaverri et al (2015: pp.558-590), dice que los porcentajes que se tiene en identidad están entre el 99% para el gen *tef1*, y contenga un solo nombre en la base de datos, todavía se puede considerar una identificación positiva, por lo que se puede decir que todos los aislados secuenciados efectivamente pertenecen a la especie identificada tanto en PCR, electroforesis como en la secuenciación.

CONCLUSIONES

- Al realizar el análisis de eficiencia de primers específicos basados en la región ITS para la identificación del género *Trichoderma* se puede decir que efectivamente posee una eficiencia alta, ya que de las 43 muestras con las que se trabajó en el presente trabajo se logró identificar 31 cepas que pertenecen al género en mención, es decir el 72% del total. A más de eso, se debe mencionar que, los controles positivos, siempre amplificaron unos mejor que otros como es el caso de los aislados B y E., por otro lado, los controles negativos utilizados de las cepas de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. y agua desionizada no amplificaron dentro del análisis lo que permite concluir una vez más que el primer es eficiente al momento de la identificación.
- En la verificación de la capacidad de discriminación de diferentes especies de *Trichoderma* que poseen los primers específicos basados en los genes TEF1 se puede mencionar que se logró identificar 17 muestras dentro de la especie *Trichoderma harzianum* representando el 55% de un total de 31 muestras (género), y en el caso de *Trichoderma longibrachiatum* se identificó 12 muestras es decir el 39% del total de 31 muestras (género), solo 2 muestras quedaron sin identificación por especie representando el 6% del total, entonces esto quiere decir que los primers son viables en su capacidad de discriminación de especie ya que el 94% de los aislados fueron identificados por separado, incluso en el análisis de los geles se colocó una muestra contraria de especie (control negativo) y como esta no amplificó se validó una vez más los primers, a más de eso se colocó controles positivos que amplificaron y agua desionizada que no amplificaron lo permitió rectificar el resultado de los primers una vez más.
- Las muestras obtenidas de dichos análisis de especies tanto de *Trichoderma harzianum* como de *Trichoderma longibrachiatum* fueron enviadas para secuenciar en el laboratorio MACROGEN COREA, fueron alineadas con el método BLAST lo que permitió conocer que efectivamente las 7 muestras presentaron un 100% de identidad y entre el 99% y 100% de cobertura, lo que permite corroborar la veracidad de los resultados obtenidos en este estudio, permitiendo mencionar que no solo uno si no los 3 primers utilizados en el presente trabajo permitieron discriminar las diferentes especies de *Trichoderma* obtenida de ecosistemas forestales.

RECOMENDACIONES

- En la verificación del primer para género de debería realizar este mismo estudio con un número mayor de cepas y en un tiempo más prolongado para así ampliar un poco más el alcance de estos, y adquirir mejores resultados.
- Para los productos que ingresan para PCR se recomienda probar nuevas cantidades de soluciones tanto del mix, primers, ADN y ya que estas variaciones pueden mejorar el producto y con ello los resultados.
- Definitivamente los protocolos del termociclador deben variar ya que en este estudio se evidencio que la variabilidad de la temperatura y el tiempo puede ayudar a mejorar los resultados a obtener.
- En cuanto al aislado N que amplifico tanto para *T. harzianum* como para *T. longibrachiatum* se recomienda realizar más estudios con primers que sean específicos en otros genes como rpb2.
- En el caso de los alineamientos en cuanto a porcentaje de identidad y cobertura posees un resultado menos del 99% se recomienda hacer filogenia para verificar la especie.

GLOSARIO

Clado: son ciertas formas prefijadas que generalmente se emplean a menudo en el área de la botánica para hacer alusión o dar idea a algo en que interviene en la rama como en el género. (Pío Font Quer, 2010, p. 228).

Desnaturalización: se la llama así a la modificación no hidrolítica (sin afectar enlaces peptídicos) de la estructura de una proteína nativa, lo cual afecta sus propiedades químicas físicas y biológicas. Existen cambios en el ambiente de la proteína como pH, calentamiento, enfriamiento, presurización y agentes que conducen a su desnaturalización (Neurath et al, 1944; citados en Vascones-Bermúdez, 2017, p.19).

Electroforesis: es una técnica analítica utilizada para separar fragmentos de ADN por tamaño y carga generalmente en esta práctica se utiliza gel de agarosa en diferentes porcentajes de concentración (Douglas, 2018).

Filogenia: es aquella que estudia la génesis de los fílums o troncos del mundo orgánico, la derivación probable de unos organismos a partir de otros, para construir a modo o forma de un árbol genealógico de cuantos seres vivos existen o han existido en la tierra, por otro lado también estudia el origen y desarrollo de los diversos órganos de los animales y plantas a través de una serie filogenética, y aun del desenvolvimiento de un proceso fisiológico en los diversos organismos concatenados filogenéticamente (Pío Font Quer, 2010, p. 472).

ITS: llamados espaciadores internos de transcritos en español son regiones no codificantes de la secuencia de ADN que separan los genes que codifican para los ARN ribosomales, altamente conservados a lo largo de los taxa, mientras que los nucleótidos entre ellos pueden ser específicos a nivel de especie (Suárez-Contreras, 2015, p.52).

Lisis: se conoce así a una solución que permite realizar la lisis celular, proceso por el cual se produce la ruptura de las membranas celulares donde se liberan los ácidos nucleicos sin causal algún tipo de daño al ADN (Schwechheimer, 2015; citado en Polo-Álvarez, 2018, p.3).

Micelio: es la parte vegetativa de un hongo, es decir, el cuerpo orgánico que por lo general no se ve en un ambiente natural debido a que reside mayormente bajo la superficie (Castro-Armendáriz, 2021, p.33). También se puede decir que es una vasta red de filamentos microscópicos individuales, llamados hifas, que nacen a partir de las esporas fúngicas y se van entrelazando progresivamente

entre sí, formando un sistema colectivo por lo general subterráneo, realmente extenso y resistente (Civallero, 2020, p.3).

Morfoespecie: Especie que no presenta una identificación taxonómica, por lo que se le otorga un nombre temporal para que pueda ser diferenciada de otras especies similares (Pérez, 2022).

Primers: un oligo (cebador o primer) es una secuencia corta de nucleótidos que hibrida gracias a su secuencia con una zona específica del ADN objetivo, de forma que es posible mediante el uso de otro oligo de sentido contrario, amplificar una zona delimitada del ADN mediante una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Ayala-Suárez, 2015, p.2).

PCR: la reacción de cadena de polimerasa es una estrategia basada en amplificar o sintetizar varias veces un fragmento específico de DNA con la habilidad de la enzima polimerasa (Camacho-Gutiérrez, 2017, pp. 2-3).

Secuenciación: generalmente de ADN, este proceso de laboratorio que se usa para conocer la secuencia exacta (orden) de los cuatro bloques o bases que conforman el ADN. La información se almacena en el ADN en un código que resulta de la disposición de las cuatro bases (identificadas por las letras A, C, G, y T) en diferentes órdenes. La secuenciación de ADN se puede utilizar para encontrar mutaciones (cambios) en el ADN que pueden causar enfermedades, tales como cáncer (NIH, 2022, p.1).

TEF 1- α : Este factor de alargamiento es un gen que codifica una proteína altamente conservada que posee un importante papel en el ciclo de alargamiento y síntesis de la proteína en las células eucariotas como lo detallo (Merrick, 1992; citado en Chi-Chim, 2013, p.14).

Termociclador: es un equipo utilizado para realizar una técnica de biología molecular denominada PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que tiene como objetivo aislar y amplificar fragmentos de ADN objetivo. El equipo funciona realizando ciclos de temperatura variable (Corte, 2016, pp.15-18).

Transiluminador: puede ser ultravioleta y es un equipo que tiene una fuente de luz ultravioleta con distintas longitudes de onda para observar, analizar y sacar fotos de los geles de ácidos nucleicos y proteínas (Bakartxo, 2017, p.3).

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, Jaleed S.; & BAKER, Ralph. “Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*”. *The American Phytopathological Society* [en línea], 1986, (Estados Unidos) 77(2), pp. 182-189. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n02_182.PDF

ANGARITA MERCHÁN, Maritza.; et al. “Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura”. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [en línea], 2017, (Colombia) 16(5), pp. 1-11. [Consulta: 30 noviembre 2021]. ISSN 1729-519X. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651/1867>

AYALA SUÁREZ, Rubén. Diseño de cebadores degenerados para la amplificación del gen de prolactina en peces preciformes (Trabajo de titulación) (Biotecnología). [en línea] Universidad de Cádiz. (Cádiz-España). 2015. pp. 1-44 [Consulta: 03 febrero 2022]. Disponible en: <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/17723/Ayala%20Su%C3%A1rez%2C%20Rub%C3%A1n.%20TFG%20Biotecnolog%C3%ADa..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BAKARTXO, O. “Transiluminador manual de uso”. *Auxilab*. s.n. (2017), (Estados Unidos) pp. 1-6.

BARBADO, J.L. *Microemprendimientos-Hongos comestibles-su empresa de fungicultura* [en línea]. Buenos Aires-Argentina: Albatros Saci, 2003. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=qPykPt-eTTkC&oi=fnd&pg=PA11&dq=hongos+comestibles&ots=_8B0dzG2vx&sig=VPAwvVbSq-DLRhVVXmMmdrfN0n8&redir_esc=y#v=onepage&q=hongos%20comestibles&f=false

BENÍTEZ, T; et al. “Biocontrol mechanisms”. *International Microbiology*, [en línea], 2004, (España) 7, p. 250 [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 950-24-1034-3. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=qPykPt-eTTkC&oi=fnd&pg=PA11&dq=hongos+comestibles&ots=_8B0dzG2vx&sig=VPAwvVbSq-DLRhVVXmMmdrfN0n8&redir_esc=y#v=onepage&q=hongos%20comestibles&f=false

BETTIOL, Wagner; et al (ed.). *Control Biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*. Ciudad de Buenos Aires-Argentina. Universidad de la Republica, 2014. ISBN 978-9974-0-1091-8, pp.1-404.

BISCHOF, Roberto; et al. “Celulasas y más allá: los primeros 70 años del productor de enzimas *Trichoderma reesei*”. *Microbial Cell Factories* [en línea], 2016, (Austria) 15(106), pp. 1-13. [Consulta: 03 febrero 2022]. ISSN 1475-2859. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>

BISSETT, J.; et al. “Nombres de *Trichoderma* aceptados en el año 2015”. *IMA Fungus* [en línea], 2015, (Estados Unidos) 6, pp. 263-295. [Consulta: 03 febrero 2022]. ISSN 2210-6359. Disponible en: <https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.5598/imafungus.2015.06.02.02#citeas>

BROTMAN, Yariv.; et al. “*Trichoderma*”. *Current Biology* [en línea], 2010, (Estados Unidos) 20(9), p. 1. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN MA 01655. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/82359831.pdf>

CAMACHO GUTIÉRREZ, S. “Diagnóstico molecular en microbiología clínica”. *Pediatrika* [en línea], 2017, (México) s.n. (1), pp. 2-3. [Consulta: 02 marzo 2022]. ISSN: 2007-4247. Disponible en: <https://www.beneficenciaespanola.com.mx/wp-content/uploads/2017/07/PEDIATRIKA-ENE-MAR-2017.pdf>

CASTILLO GONZÁLEZ, Daniela. Determinación de la variabilidad genética de *Trichoderma* nativo de Nicaragua mediante el uso de rep-PCR y su potencial in vitro como antagonista de *Fusarium* spp. Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA-CNIA. 2018-2020 [en línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Managua, Nicaragua. 2020. pp. 1-62. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: <https://repositorio.unan.edu.ni/13806/1/Castillo%20Gonz%C3%A1lez%20Daniela%20Mar%C3%ADa.pdf>

CASTRO ARMENDÁRIZ, Gerardo Alexander. Bovedilla de micelio: una alternativa ecológica para la construcción de losas aligeradas con materiales de rápida renovación. (Trabajo de titulación). (Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Aguas Calientes, Aguas Calientes, México. 2021. p. 33. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/2188/454369.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CHAVERRI, P.; et al. “Sistemática del complejo de especies de *Trichoderma harzianum* y la reidentificación de cepas comerciales de control biológico”. *Mycologia* [en línea], 2015, (Costa Rica) 107(3), pp. 558-590. [Consulta: 03 febrero 2022]. DOI: <https://doi.org/10.3852/14-147>

CHET, Ilan.; & INBAR, Jacob. “Biological control of fungal pathogens” . *Applied Biochemistry and Biotechnology* [en línea], 1994 (Inglaterra) 48, pp. 37-43. [Consulta: 20 de noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02825358>

CHET, Ilan; & BENHAMOU, SH. *Mycoparasitism and lectin enzymes. In: Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications.* 2ª ed. [ed.] GE HARMAN y CP KUBICE. London-Inglaterra: Taylor & Francis Ltd., 1998. pp.152-153.

CHI CHIM, Wilbert Antonio. Análisis flogenético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. 2013. p.15. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12290/TESIS%20WILBERT%20CHI.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

CHIRIBOGA, Hernán; et al. *Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades* [en línea]. Paraguay: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. s.l. : IICA, 2015. pp. 1-28. [Consulta: 30 noviembre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=8E61E0F1BE2BA86AC7509C4A42BA432A?sequence=1>

CIVALLERO, E. *La biblioteca como micelio* [en línea]. Buenos Aires-Argentina: pre-print, 2020. [Consulta: 02 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.academica.org/edgardo.civallero/277.pdf>

CONRADO, Mauricio; et al.(ed). *Tichoderma uso na agricultura.* Brasilia, DF-Brasil: Embrapa Soja, 2019. ISBN 978-85-7035-943-8, pp. 1-538

CORTE, Angélico. Sistema de control para termociclador. (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Vale do Rio dos Sinos-UNISINOS, São Leopoldo, Brasil. 2016. pp. 15-18. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: http://www.repositorio.jesuita.org.br/bitstream/handle/UNISINOS/5998/Ang%c3%a9lico%20Corte_.pdf?sequence=1&isAllowed=y

DÍAZ, J. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol (Trabajo de titulación).(Ingeniería) Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba. 1994.

DOMSCH, KH., et al. “Compendium of soil fungi”. *IHW-Verlang and Verlagsbuchhandlung*, s.n (2007), (Alemania) pp. 627.

DOUGLAS, Wilkin. 2018. *ck-12*. [blog]. 29 de junio, 2018. [Consulta: 02 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.ck12.org/book/ck-12-biology-advanced-concepts/section/9.2/>.

DRUZHININA, I.; et al. “*Hypocrea flaviconidia*, a new species from Costa Rica with yellow conidia”. *Studies in mycology* [en línea], 2001, (Austria) 50, pp: 401-406. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: https://studiesinmycology.org/sim/Sim50/039-Hypocrea_flaviconidia,_a_new_species_from_Costa_Rica_with_yellow_conidia.pdf

DRUZHININA, I.; et al. “The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data”. *Mycoscience*, n° 47 (2006), (Austria) pp. 55-64

DRUZHININA, I.; et al. “Estrategias reproductivas alternativas de *Hypocrea orientalis* y *Trichoderma longibrachiatum* genéticamente cercanas pero clonales ambas capaces de causar micosis invasivas en humanos”. *Microbiology* [en línea], 2008, (Austria) 154(11), pp. 3447-3459. [Consulta: 03 febrero 2022]. DOI 10.1099/mic.0.2008/021196-0. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/021196-0?crawler=true#header>

DRUZHININA, I.; et al. “*Trichoderma*: the genomics of opportunistic success”. *Nature reviews Microbiology* [en línea], 2011, (Austria) 9(10), pp. 749-759. [Consulta: 21 noviembre 2021]. ISSN 21921934. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2637>. DOI: 10.1038/nrmicro2637

ESPINOSA ASUAR, L. *Guía práctica sobre la técnica de PCR-Ecología molecular*. [aut. libro] Luis E. Eguarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre [en línea]. México D.F.-México: CONABIO, 2007. p. 517 [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/294935120>

GALARZA, Luis. Aislamiento e identificación molecular de *Trichoderma* spp [en línea]. (Trabajo de titulación) (magister) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 2011. Pp. 229-265. [Consulta: 21 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30239>

GAMS, W.; & **MEYER, W.** “What exactly is *Trichoderma harzianum*?”. Mycología [en línea]. 1998, (Países Bajos) 90(5), pp. 904-915. [Consulta: 03 febrero 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026984>. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1998.12026984>

GUERRA, Juan. Caracterización de mecanismos biocontroladores de *Trichoderma* spp y evaluación del efecto protector en aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en vivero [en línea]. (Trabajo de titulación) (ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2019. Pp. 70-71. [Consulta: 21 noviembre 2021]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/14337/1/33T00236.pdf>

HARAM, S.; et al. “Differential Expression of *Trichoderma harzianum* Chitinases During Mycoparasitism”. *The American Phytopathological Society* [en línea], 1996, (Israel) 86(9), pp: 980-985 [20 noviembre 2021] Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n09_980.PDF

HARAM, S.; et al. “Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*”. *Microbiology*, vol. 142 (1996), (Israel) pp: 2321-2331.

HARMAN, Gary. “Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22”. *Plant disease* [en línea]. 2000, (Estados Unidos) 84(4), pp. 377-393.[Consulta: 03 febrero 2022]. ISSN 0191-2917. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377> Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>

HARMAN, Gary; et al. “*Trichoderma*-not just for biocontrol anymore”. *Phytoparasitica* [en línea]. 2011, (Estados Unidos) 39, pp. 103-108. [Consulta: 02 marzo 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0151-y>. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12600-011-0151-y#citeas>

HARMAN, Gary; & BJÖRKMAN, Thomas. *Potential and existing uses of Trichoderma and Gliocladium for plant disease control and plant growth enhancement.* [aut. libro] CP KUBICEK y GE HARMAN. [ed.] CP KUBICEK y GE HARMAN. *Trichoderma and Gliocladium.* 2ª ed. London-Inglaterra: Taylor and Francis, 1998, pp. 229-265.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Javier.; et al. “Identificación y evaluación de actividad celulolítica en aislamientos nativos de *Trichoderma* spp obtenidos de biomasa de palma de aceite”. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2018, (Colombia) 20(1), p. 60 [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 0123-3475. Disponible en: DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73693

HERRERA RUÍZ, J. *Viaje al asombroso mundo de los hongos.* [en línea]. México D.F.-México: fondo de cultura economica, 2012. pp. 1-5. ISBN 978-607-16-0384-5. [Consulta: 30 noviembre 2021]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=sAWh5cTxMWEC&oi=fnd&pg=PT8&dq=origen+de+los+hongos+con+el+hombre&ots=IUZncG5Rsu&sig=AEoSIZOuI7uREe7xb2ciVc9iCOc#v=onepage&q=origen%20de%20los%20hongos%20con%20el%20hombre&f=false>

HJELJORD, L; & TRONSMO, A. *Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview.* In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications.* 2ª [ed.] Gary HARMAN y C.P KUBICEK. Inglaterra-London: Taylo & Francis eBooks, 1998, pp. 131-151.

HOYOS-CARVAJAL, Lilliana; & BISSETT, John. *Biodiversity of Trichoderma in Neotropics.* [ed.] Oscar GRILLO y Gianfranco VENORA. *The Dynamical Processes of Biodiversity-Case Studies of Evolution and Spatial Distribution.* intechOpen. Colombia-Bogotá : Universidad Nacional del Colombia, 2011, pp. 303-320. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en : doi:10.5772/23378

INFANTE, Danay.; et al. “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos”. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], 2009, (Cuba) 24 (1), p:16. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 1010-2752. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

JAKLITSCH, W.M., & VOGLMAYR, H. “Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia”. *Studies in Mycology* [en línea], 2015, (Austria) 80, pp. 1-87. [Consulta: 03 marzo 2022]. IDO: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001> Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000505>

KINDERMANN, J.; et al. “Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster”. *Fungal Genetics and Biology* [en

línea], 1998, (Austria) 24(3), pp. 298-309. [Consulta: 21 noviembre2021]. ISSN 9756711. Disponible en: doi:10.1006/fgbi.1998.1049

KUHLS, K.; et al. “Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences”. *Mycologia*, n° 89 (1997), (Estados Unidos) pp. 442-460

KULLNIG, Cornelia.; et al. “Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya”. *The British Mycological Society* [en línea], 2000, (Austria) 104(9), pp: 1117-1125. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/mycological-research/article/abs/molecular-identification-of-trichoderma-species-from-russia-siberia-and-the-himalaya/7E12B77B578C46E73DCD3707BD4119E8>

LORENZO, María E. “Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp”. *Fitosanidad* [en línea], 2004, (Cuba) 8(1). [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209117836021.pdf>

LORITO, M.; et al. “Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning”. *Phytopathol*, vol. 82, n° 10 (1990), pp. 10-77.

MARTÍNEZ, B; et al. “Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco”. *Cultivos tropicales*, vol. 15, (1994), p.54.

MARTÍNEZ, D.; et al. “. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)”. *Nat Biotechnol*, vol. 26, n°5 (2008), (Estados Unidos) pp. 53-60

MARTÍNEZ, B.; et al. “*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos”. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], 2013 (Cuba) 28(1), pp. 1-11. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 1010-2752. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001

MELGAREJO, P.; et al “Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture”. *Canadian Journal of Botany*. vol. 67, n°1 (1989), (Canada) pp. 83-87. ISSN 0008-4026.

MÉNDEZ, Silvana.; & MONDINO, Pedro. “Control biológico postcosecha en Uruguay”. *Horticultura Internacional*[en línea], 1999, (Uruguay) 7(26), pp. 1-10. [Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/MIE/CBiologico1.htm>.

MOHIDDIN, Fayaz.; et al. “Phylogeny and Optimization of *Trichoderma harzianum* for Chitinase Production: Evaluation of Their Antifungal Behaviour against the Prominent Soil Borne Phyto-Pathogens of Temperate India”. *Microorganisms* [en línea], 2021, (India) 9, pp. 1-20. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 2076-2607. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091962>

MONTES, Beatriz.; et al.”Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica”. *Biomédica* [en línea], 2003, (Colombia) 23(2), pp. 213-224. [Consulta: 30 noviembre 2021]. ISSN 0120-4157. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/843/84323212.pdf>

MONTOYA, Q.; et al. “Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa”. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol.109, n° 5 (2016), (Brasil) pp. 633-651.

National Center for Biotechnology Information. *Trichoderma*. 2021.[Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=5543&utm_source=gquery&utm_medium=referral&utm_campaign=KnownItemSensor:taxname.

NIH. *Secuenciación del ADN* [blog]. Estados Unidos. [Consulta: 03 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/secuenciacion-del-adn>

PARAMEELADEVI, T.; et al. “Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens”. *Fr J Biotechnol*. 1185, (Indian) pp. 15150-15160

PARAMEELADEVI, T.; et al. “*Trichoderma pseudokoningii* identified based on morphology was re-identified as *T. longibrachiatum* through molecular characterization”. *Indian Phytopathology* [en línea], 2018, (India) 71, pp. 579-587. [Consulta: 10 febrero 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0067-2>.

PÉREZ, Alvaro. *Morfoespecie* [blog]. [Consulta: 03 febrero 2022]. Disponible en: <https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/Glosario/Definicion/979>

PÉREZ, Nilda. *Manejo ecológico de plagas* [en línea]. La Habana-Cuba : CEDAR, 2004.[Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 959-246-083-3. Disponible en: <https://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecoplagas/Bibliografia.pdf>

PINEDA, Juan Manuel; & CALDERÓN QINTERO, Agustín. *Guía ilustrada de enfermedades y patógenos en cultivos hortícolas*. [ed.] Jairo Castaño Zapata. Julio [en línea]. Caldas-Colombia: Universidad de Caldas, 2020. [Consulta: 21 noviembre 2021]. ISSN 978-958-759-210-8. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XdMDEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA23&dq=plantas+de+sembrios+atacadas+por+hongos&ots=MUo_NX9VSB&sig=MrsMjcbst7D6iP6okN6SEJgmYQ4#v=onepage&q&f=false

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

POLO ÁLVAREZ, A. “Extracción de ADN bacteriano kit de Promega MOD”. ACADEMIA [en línea], 2018, (Colombia) s.n., p. 3. [Consulta: 02 marzo 2022]. Disponible en: https://www.academia.edu/44922525/EXTRACCI%C3%93N_DE_ADN_BACTERIANO_KIT_DE_PROMEGA_MOD?auto=citations&from=cover_page

PLESSIS, Ihan.; et al. “La diversidad de especies de *Trichoderma* del suelo en Sudáfrica, con cinco nuevas incorporaciones”. *Micología* [en línea], 2018, (Sudáfrica) 110(3), pp. 559-583. [Consulta: 03 febrero 2022]. DOI: 10.1080/00275514.2018.1463059. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/00275514.2018.1463059?scroll=top&needAccess=true>

PRABHAKARAN, N.; et al. “Multiplex PCR for detection and differentiation of diverse *Trichoderma* species”. *Annals of Microbiology* [en línea], 2014, (India) 65(3), pp. 1-6. [Consulta: 03 febrero 2022]. DOI: 10.1007/s13213-014-0998-5. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/268517523_Multiplex_PCR_for_detection_and_differentiation_of_diverse_Trichoderma_species

QIN, Wen Tao; & ZHUANG, Wen Ying. “Siete especies nuevas del género *Trichoderma* (Fungi, Ascomycota) que habitan en la madera en el clado Viride”. Informe científico [en línea],

2016, (China) 6(27074), pp. 1-15. [Consulta: 03 febrero 2022]. IDO: <https://doi.org/10.1038/srep27074>. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep27074#change-history>

RIFAI, Mien A. “A revision of the genus *Trichoderma*”. *Mycological paper*, n° 116 (1969), (Estados Unidos) pp. 1-56

RIFAI, Mien Achmad. *A revision of the genus Trichoderma*. Oxon-Estados Unidos: Wallingford, 1996, pp. 1-56. ISSN 708561336.

SAMUELS, G J.; et al. “*Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*”. *Mycologia* [en línea], 2002, (Estados Unidos) 94(1), pp. 146-170. [Consulta: 30 noviembre 2021]. ISSN 66044-8897. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/49681882_Trichoderma_Species_Associated_with_the_Green_Mold_Epidemic_of_Commercially_Grown_Agaricus_bisporus

SAMUELS, G J. “*Trichoderma* : sistemática, estado sexual y ecología”. *Phytopathology* [en línea], 2005, (Estados Unidos) 96(2), p. 196. [Consulta: 30 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>

SAMUELS, GJ. “*Trichoderma*: sustematics, the sexual state, and ecology”. *Phytopathology* [en línea], 2006, (Estados Unidos) 96(1), pp.195-206. [Consultado: 03 febrero 2022]. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0195>

SANDOVAL-DENIS, M.; et al. “Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities”. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 52, (2014), (España) pp. 2112-2125.

SCHOCH, C.L.; et al. “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode maker for Fungi”. *Proceeding of the National Academi of Sciences*. vol. 109, n° 16 (2012), (Estados Unidos) pp. 6241-6246.

SOO PARK, Myung.; et al. “Morphological and cultural characteristics of *Trichoderma* spp. Associated with Green Mold of Oyster mushroom in Korea”. *Plant Pathol Journal* [en línea], 2005, (Korea) 21(3), pp. 221-228.[Consulta: 20 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200504840764771.pdf>

SOSA, D.; et al. “Diversidad genética de *Trichoderma* spp. en Venezuela, determinada mediante análisis combinado ITS-AFLP”. *Protección Vegeta* [en línea], 2014, (Venezuela) 29(1), pp: 42-51. [Consulta: 21 noviembre 2021]- ISSN 2224-4697. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/260137173_Evaluacion_de_la_diversidad_de_Trichoderma_sp_mediante_marcadores_AFLP

SUÁREZ CONTRERAS, L. “ Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia”. *Scielo Acta Agronómica* [en línea], 2015, (Colombia) 65(1), p. 52. [Consulta: 02 marzo 2022]. ISSN 0120-2812. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v65n1/v65n1a08.pdf>

UMAÑA CASTRO, J. Relaciones genéticas y características fisiológicas de especies promisorias de *Trichoderma* como agentes biocontroladores de *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium carotovorum*, patógenos de la piña (*Ananas comosus*) [en línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Universidad Nacional, Heredia, Cost Rica. 2018. pp. 1-65. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: <https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/14183/Tesis%20Josue%206.2018..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VALIENTE, Marwi.; & PAVONE, Domenico. “Identificación de cepas de hongo *Trichoderma* spp. por métodos moleculares”. *FARAUTE de ciencia y tecnología* [en línea], 2013, (Venezuela) 8(2), pp: 5-9. [Consulta: 20 noviembre 2021] ISSN 1698-7418. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316605282_Identificacion_de_cepas_del_hongo_Trichoderma_spp_por_metodos_moleculares

VASCONES BERMÚDEZ, María Fernanda. Desnaturalización de proteínas séricas de leche bovina por termosonicación y su aplicación en queso fresco [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2017. p. 19. [Consulta: 2022-03-02]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/470>.

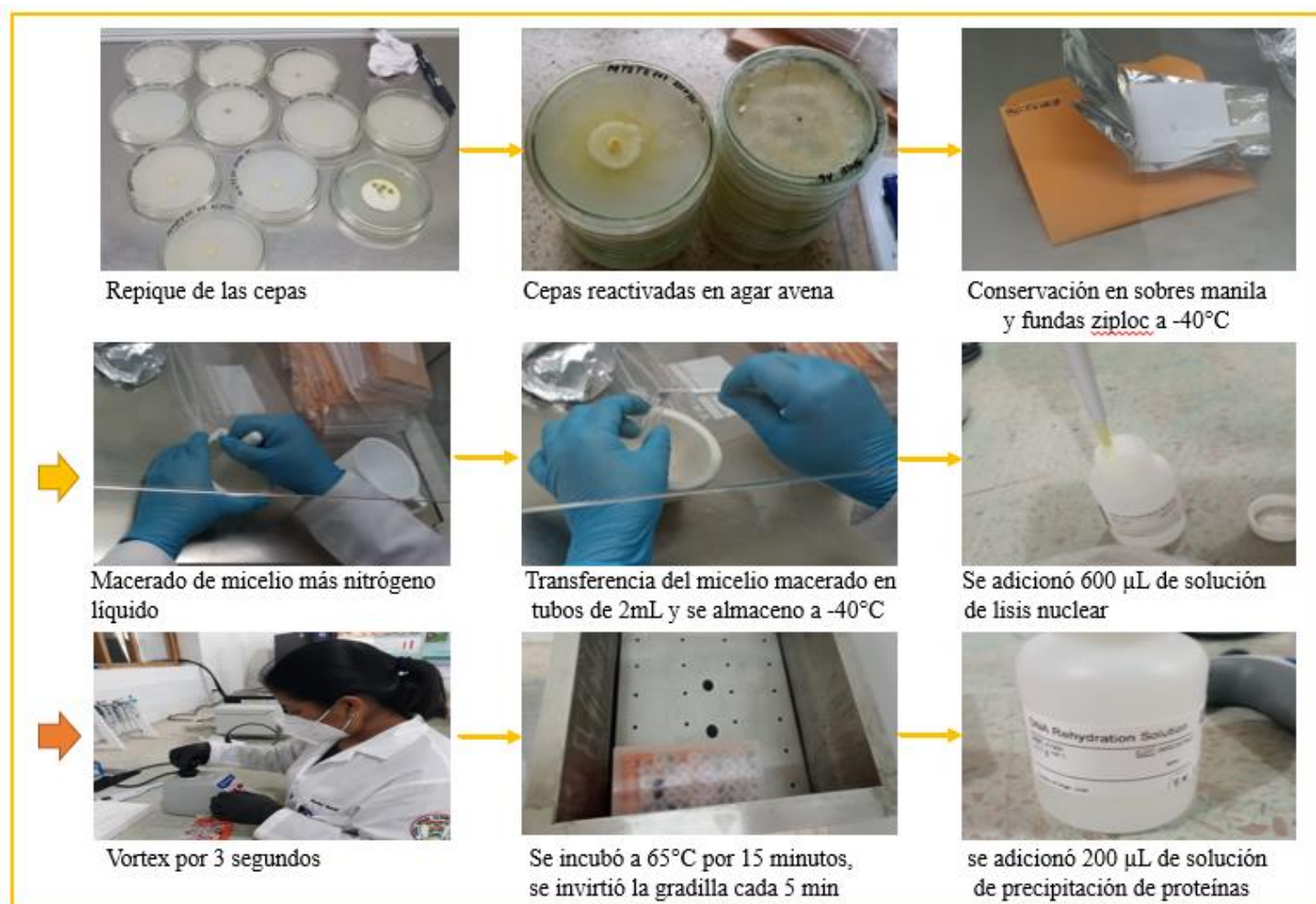
WOO, Sheridan; et al. “*Trichoderma*.based products and their widespread use in agriculture”. *The Open Mycology Journal*. vol. 8, n°1 (2014), (Italia) pp. 71-126. 2021, (China) 1 (1), pp. 1-12. [Consulta: 03 marzo 2022]. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-139038/v1>. Disponible en: <https://www.researchsquare.com/article/rs-139038/v1>

ZHOU, You; et al. “Development of species/genus specific primers for identification of three *Trichoderma* species and for detection of *Trichoderma* genus”. *Research Square* [en línea],

ZIMAND, G.; et al. "Effect of *Trichoderma harzianum* on Botrytis cinerea Pathogenicity. *The American Phytopathological Society* [en línea], 1996, (Israel) 86(11), pp: 1255-1260. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 1996-0930-02r. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n11_1255.PDF

ANEXOS

ANEXO A: PROCESO QUE SE UTILIZÓ PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA UTILIZAR EN PCR.

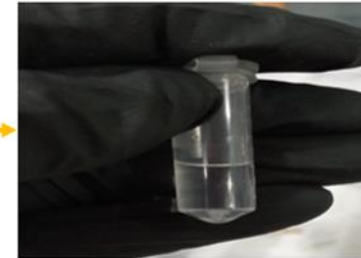




Vortex por 20 segundos



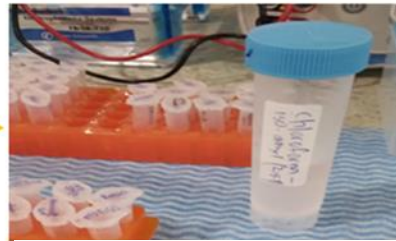
Se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm.



Se formó un pellet.



Se transfirió el sobrenadante (600 μ L) conteniendo ADN a un nuevo tubo (1,5 mL).



Se adicionó 600 μ L de cloroformo -alcohol-isoamilico



vortex durante 20 segundos



Se centrifugó por 8 minutos a 14000 rpm.



Se transfirió el sobrenadante (+/- 600 μ L) conteniendo el ADN para un nuevo tubo



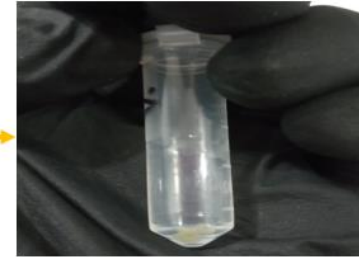
Se adicionó 600 μ L de isopropanol frío



Se invirtió los tubos, se observó una masa de ADN, se colocó en el ultracongelador x 10 min



Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos



Formación de pellet



Se descartó el sobrenadante



Se realizó dos lavados con etanol.
Se adicionó 600 μ L de etanol al 70% frío



Se centrifugó a 14000 rpm x 5 min.



Se descartó el etanol y se dejó los tubos de forma horizontal, con tapa abierta x 24 h.

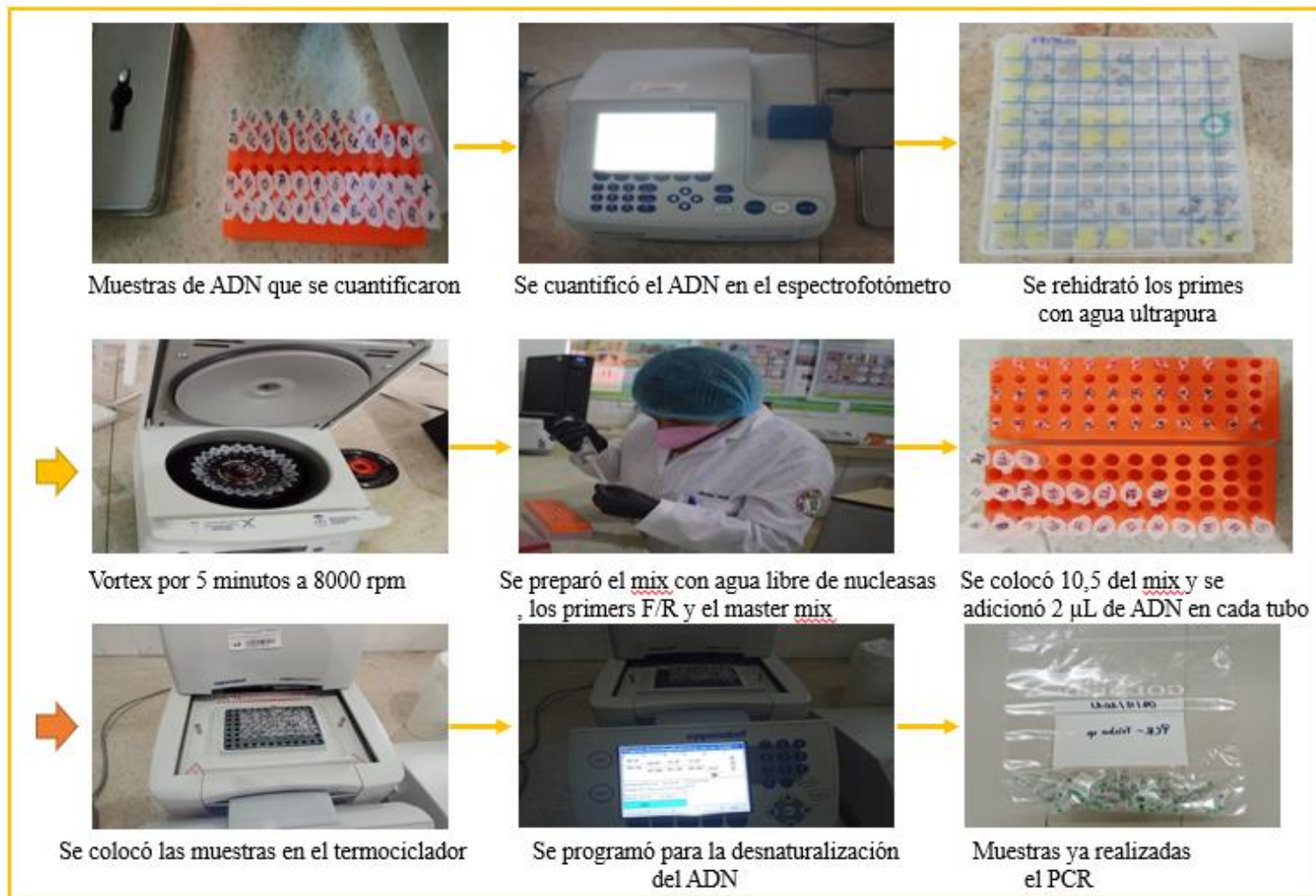


Se adicionó 50 μ L de solución de rehidratación de ADN y 2 μ L de RNasa

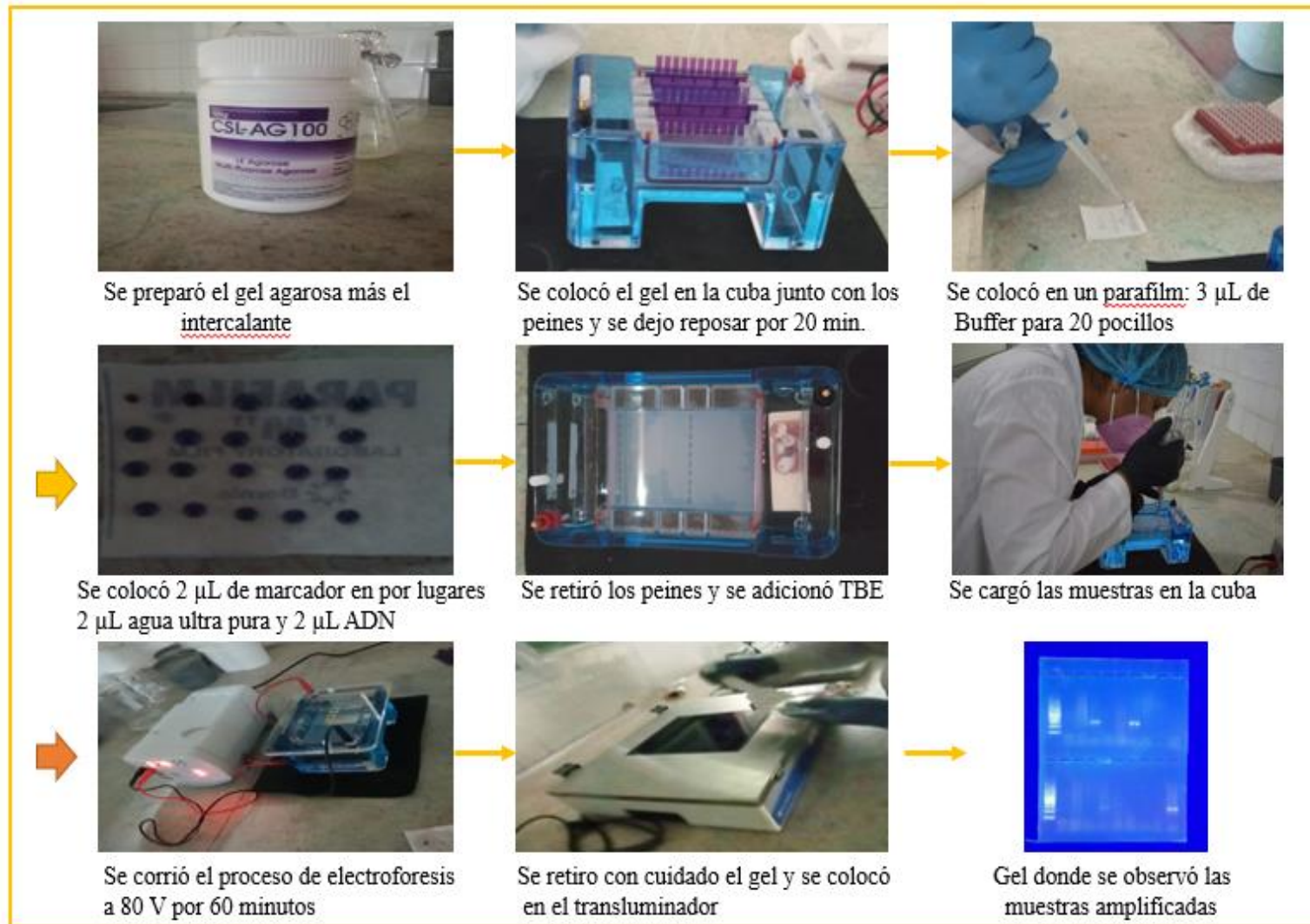


Se incubó en baño maría a 37°C x 3h y se almacenó en el ultracongelador a -40 °C

ANEXO B: PROCESO QUE SE REALIZÓ PARA PCR.



ANEXO C: PROCESO QUE SE REALIZÓ PARA LA ELECTROFORESIS.



ANEXO D: RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN SIN DILUIR.

N°	CÓDIGO AISLADOS	NUEVO CÓDIGO	CANTIDAD CONCENTRACIÓN (ng/μL)	RELACIÓN	
				A260/A280	A260/A230
1	1MC8	A	<1000,00		
2	P3a	B	902,7	1,51	0,91
3	1MT8	C	557,3	1,67	1,21
4	h 329 (cedro)	D	884,2	1,73	1,10
5	MTST2R3(1)-TL	E.	212,7	2,04	1,89
6	MTST2R1(1)-TH	F	900,5	1,91	1,75
7	MT01	G	<1000,00		
8	MT05	J	1092,8	1,65	0,88
9	MT06	K	<1000,00		
10	MT08	L	1184,2	1,89	1,70
11	MT09	M	789,5	1,76	1,22
12	MT11	N	1448,9	1,62	-
13	MST01B	P	1252,6	1,94	1,64
14	MST02B	Q	1022,6	2,00	1,96
15	MST03B	R	997,4	1,76	1,46
16	PIR1R3C	S	166,4	1,65	0,97
17	MSTG1	U+	1389,4	1,88	1,72
18	MSTG4	Z	608,3	1,98	1,93
19	TR1CH	B1	382,3	1,90	1,79
20	T2	C1	885,1	2,08	1,92
21	FCP3	F1	648,8	1,49	0,96
22	FCR1	G1	257,1	1,43	0,78
23	FCR2	H1	373,3	1,86	1,38
24	FCR3	I1.	335,7	1,94	1,67
25	<i>Penicillium</i>	J1	929,8	2,02	1,88
26	<i>T. hamantum</i>	L1	609,4	2,04	1,82
27	<i>T. ressei</i>	M1	1206,4	1,94	1,69
28	<i>T. viride</i>	O1	353,8	2,01	1,96

ANEXO E: RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DILUIDO.

N°	CÓDIGO AISLADOS	NUEVO CÓDIGO	CANTIDAD CONCENTRACIÓN (ng/μL)	RELACIÓN	
				A260/A280	A260/A230
1	1MC8	A	87,6	1,78	3,30
2	P3a	B	48,6	1,49	2,20
3	1MT8	C	37,9	1,61	21,10
4	h 329 (cedro)	D	68,8	1,61	1,92
5	MTST2R3(1)-TL	E.	128,9	1,85	2,78
6	MTST2R1(1)-TH	F	75,2	1,88	5,07
7	MT01	G	168	1,75	2,25
8	MT05	J	68	1,61	1,77
9	MT06	K	133	1,67	1,73
10	MT08	L	87	1,77	3,26
11	MT09	M	66,5	1,73	2,42
12	MT11	N	123	1,61	1,36
13	MST01B	P	107,9	1,86	2,59
14	MST02B	Q	56,7	1,70	7,10
15	MST03B	R	90,5	1,70	2,26
16	PIR1R3C	S	115,1	1,30	1,33
17	MSTG1	U+	130,7	1,74	2,15
18	MSTG4	Z	82,5	1,60	2,52
19	TR1CH	B1	51,3	1,56	3,65
20	T2	C1	89,9	1,68	2,58
21	FCP3	F1	74,3	1,48	1,52
22	FCR1	G1	44,8	1,37	1,49
23	FCR2	H1	56,8	1,62	2,37
24	FCR3	I1.	52,2	1,58	3,15
25	<i>Penicillum</i>	J1	116,9	1,75	2,35
26	<i>T. hamantum</i>	L1	86,1	1,67	2,52
27	<i>T. ressei</i>	M1	185,5	1,61	1,55
28	<i>T. viride</i>	O1	47	1,73	64,40

ANEXO F: SECUENCIAS DE CEPAS TRABAJADAS.

CEPA	SECUENCIA	GEN AMPLIFICADO
N	>63_122 CACTTTCAGCGATGCTAACCACCTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCG AACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCT CAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTG GAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTCTTCCA	EF
Z	>64_122 GCGATGCTAACCACCTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGG CAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCC GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCG AGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTCTTCCA	EF
R	>65_123 ATGACGCAAGCGCCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCGG CAGAGGATAGTGGTTTGCTGGAGGTGCATCCCCACTAAAACCCGA AACGCAACAAAAAATTTGCGTCGCCCAAAGGAGGGGTAGGAG AAAGCGGGGTGGTGAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGGA AATCGTCCGAAAATTGAAGGGATCTCAAGCTTACCTTCTCGAACTT CTCAATGGTACGCTTGTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGA CCAGTCTGCAAGGCAACGTTAGCTGGCATGTTTCATCGCAGAGACG CCACGCGCAGGCCGTAGCTTGACGTGGACTGAAAGCTCGGT	EF
P	>66_123 ACGCAAGCGCCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCGGCAG AGGATAGTGGTTTGCTGGAGGTGCATCCCCACTAAAACCCGAAAC GCAACAAAAAATTTGCGTCGCCCAAAGGAGGGGTAGGAGAAA GCGGGGTGGTGAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGGAAAT CGTCCGAAAATTGAAGGGATCTCAAGCTTACCTTCTCGAACTTCTC AATGGTACGCTTGTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACC AGTCTGCAAGGCAACGTTAGCTGGCATGTTTCATCGCAGAGACGCC ACGCGCAGGCCGTAGCTTGACGTGGACTGAAAGCTC	EF
Q	>67_123 ATGACGCAAGCGCCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCGG CAGAGGATAGTGGTTTGCTGGAGGTGCATCCCCACTAAAACCCGA AACGCAACAAAAAATTTGCGTCGCCCAAAGGAGGGGTAGGAG AAAGCGGGGTGGTGAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGGA AATCGTCCGAAAATTGAAGGGATCTCAAGCTTACCTTCTCGAACTT CTCAATGGTACGCTTGTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGA CCAGTCTGCAAGGCAACGTTAGCTGGCATGTTTCATCGCAGAGACG CCACGCGCAGGCCGTAGCTTGACGTGGACTGAAAGCTCGGTTGG	EF
B1	>68_123 ATGACGCAAGCGCCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCGG CAGAGGATAGTGGTTTGCTGGAGGTGCATCCCCACTAAAACCCGA	EF

	AACGCAACAAAAAAAAATTTGCGTCGCCCAAAGGAGGGGTAGGAG AAAGCGGGGTGGTGAAAAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGGA AATCGTCCGAAAATTGAAGGGATCTCAAGCTTACCTTCTCGAACTT CTCAATGGTACGCTTGTGCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGA CCAGTCTGCAAGGCAACGTTAGCTGGCATGTTTCATCGCAGAGACG CCACGCGCAGGCCGTAGCTTGACGTGGACTGAAAGCTC	
C1	>69_123 GATGACGCAAGCGCCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCG GCAGAGGATAGTGGTTTGTGAGAGTGCATCCCCACTAAAACCCG AAACGCAACAAAAAAAAATTTGCGTCGCCCAAAGGAGGGGTAGGA GAAAGCGGGGTGGTGAAAAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGG AAATCGTCCGAAAATTGAAGGGATCTCAAGCTTACCTTCTCGAACT TCTCAATGGTACGCTTGTGCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTG ACCAGTCTGCAAGGCAACGTTAGCTGGCATGTTTCATCGCAGAGAC GCCACGCGCAGGCCGTAGCTTGACGTGGACTGAAAGCTCGG	EF
J	>70_124 CGGAATCGGTGACCTGATTCCAGAAGTCGGGTCCGAAGCCGACCG TCTGTCTCAGCCCTCCCTTCCCCCTTTTATTTTCTCAAGGCCTGCTA GTAGCTCGCGATCGCTTAGTTATTTCCAGATCAAATGATTACGAGA GACCTGAAGAAGCGACTGATAACCTCGTCGTGCACGGCATACTCA TTCTCAACCTATCTTGCAACCTTAGCACCCCCATTTCGTGCAGGCCA AGCGTCATCCAATCGACCTACCCTTGGTGCGCCAGTGCCTCAAAC TTGTGACCCCTGTCCGCTCCGGCCGGTGACCGGCCGATTCTGCGA TGCTGGTCCCAACGGCAACGCGCTTGTCTCAACCCAACCTCTC CTCGGACCATCCCGCCGGTGTATTGCCGTGCCCGCGGTCTTCGAG CGACAATGGCTATCAATCCCGCCCCATGGGCAACTGAGCCCGTTTG AAGATGCATCAAGGCCGTTGCCTGCTGGGGGGGGAACGAAGGTTG GAAAACCTCTGCAGAATGAATTTGTGGACCATAAGAGGCTCACC GCCAGCTTTATTCGCCCTATCGCCGTCATTACGAGCTGGGAAAAAC CGAGCGGAGCGAGAGGCCGTTACACGATTTGAAAACTAAAGACG CCAAAGGAGAACCCTGCACGTGCCGACGACCGCTGCTCGCTCGTC CACACTCAGGCCACAGATCAGGGCTCTGGTGAGGGCAGCGCTAAC AGGGTCGCTTCTTAGT	Rpb2
G	>71_124 GTTTCATATCCGAAGTCGGCTGACCTGATTCCAGAAGTCGGACCCG AAGCCGACGGTATGTCTCAGGCCTCCCTTCCCCCTTTTATTTTCTCA AAGCCTGCTAGTAGCTCGCTAACGCTTAGTTATTTCCAGATCAAAT GATTACGAGAGACCTGAAGAAGTCTACTGATAACCTCGTCGTGCA CGGCATACTATTCTCAATCTATCTTGCAACCTTAGCACCCCCATT CGCGCAGGCCAAGCGTCATCCAATAGACCTACCCTTGGTGCGCCC AGCGCCTCCAACTGTGACCCCTGTCCGCTCCGGACGCTGACCCGC CGATCTCTGCCATGTCTGGCCCCAACGGAGACGTGCTTGTTCAAA ACCCAACCTCTCCTCCCACCATCCCGCCGGTGTAAGTGCCGCACCC GCGTCTTCGAGCGTAAATGGCTCACAATCCCGCCCCAATAGTCACC	Rpb2

TGAGCGCGTTTGATATTTACAACGCCTGTTCTCTGCCAATTGGGA ACCCAGGGAGGATAACCTCATCCGTACATATTATGTTGACCATAAC ACTCGCACCAGTCGCTTTAATCGCCCGACGGGCAATCGTTTCATCT GGGAAAACCCGAAACGAGCGAGAGGTCCTTTACTCGGTTTGAAAA ACAAAAACGCCAAAAAGAAAACCTGCCCGAACATAGGACCTG GTCAACCCTCTCCCGCTCTCCAGGCCAACAATCGGGTTTTGGTGCG GGCAAGCAAAACAGGGCCCTTCTTTTTAAAACCTCCCTTGATCGAA AACCGGCC	
--	--

ANEXO G: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp. ALINEADOS CON EL MÉTODO BLAST.

Código	Gen amplificado	Número de nucleótidos	Especies identificadas	Número de acceso al Gen Bank	Porcentaje de identidad	Cobertura	Datos de las accesiones	
							Hospedero/Sustrato	Origen Geográfico
N	Factor de Elongación de Traducción (TEF)	189	<i>T. harzianum</i>	MT081434.1	100,00%	100%	Colección	China
Z		181	<i>T. harzianum</i>	MT081433.1	100,00%	100%	Colección	China
R	Factor de Elongación de Traducción (TEF)	355	<i>T. longibrachiatum</i>	MH208265.1	100,00%	100%	Colección	Turquía
P		349	<i>T. longibrachiatum</i>	MH208264.1	100,00%	100%	Colección	Turquía
Q		358	<i>T. longibrachiatum</i>	KF267252.1	100,00%	99%	Colección	Serbia
B1		352	<i>T. longibrachiatum</i>	MH208265.1	100,00%	100%	Colección	Turquía
C1		355	<i>T. longibrachiatum</i>	MH208264.1	100,00%	100%	Colección	Turquía



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: 12 / 09 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Dina Anabel González Mariscal
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Ingeniería Forestal
Título a optar: Ingeniera Forestal
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

1764-DBRA-UTP-2022



esPOCH

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: 12 / 09 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Dina Anabel González Mariscal
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Ingeniería Forestal
Título a optar: Ingeniera Forestal
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



DBRA
[Handwritten signature]
Ing. Cristhian Fernando Castillo

1764-DBRA-UTP-2022