



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

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA**  
**DE *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. FRENTE A *Neopestalotiopsis***  
**sp. EN FRUTILLA (*Fragaria ananassa* Duch.)**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:**

**JENNY MARIANELA ACOSTA GÓMEZ**

Riobamba - Ecuador

2022



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

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA**  
**DE *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. FRENTE A *Neopestalotiopsis***  
**sp. EN FRUTILLA (*Fragaria ananassa* Duch.)**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:** JENNY MARIANELA ACOSTA GÓMEZ

**DIRECTOR:** Ing. FERNANDO JOSÉ RIVAS FIGUEROA PhD.

Riobamba - Ecuador

2022

© 2022, Jenny Mariana Acosta Gómez

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

Yo, Jenny Marianela Acosta Gómez, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que proviene de otras fuentes están debidamente citadas y referenciados.

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

Riobamba, 29 de marzo del 2022



**Jenny Marianela Acosta Gómez**

**180443211-8**

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE *Trichoderma spp.* y *Clonostachys spp.* FRENTE A *Neopetalotiopsis sp.* EN FRUTILLA (*Fragaria ananassa Duch.*)** realizado por la señorita: **JENNY MARIANELA ACOSTA GÓMEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA



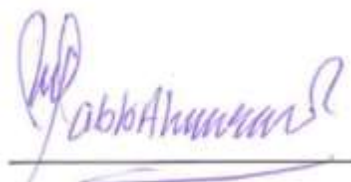
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

2022-03-29



Ing. Fernando José Rivas Figueroa PhD.  
**DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

2022-03-29



Ing. Pablo Israel Álvarez Romero  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

2022-03-29

## **DEDICATORIA**

Mi trabajo de tesis está dedicado a la memoria de mi padre **Jaime Ruperto Acosta Gómez**, quien siempre estuvo para mí sujetando mi mamón en cada paso, supo guiarme en la vida y su ejemplo me mantuvo soñando cuando quise rendirme. A mi madre **Delia Ernestina Gómez Pico** quien confió en mí y por darme su infinito amor incondicional.

**Jenny**

## **AGRADECIMIENTO**

A mi Dios quien me hizo valiente en todas las situaciones que se presentaron. A mis padres que con su amor y trabajo me educaron y apoyaron en toda mi formación profesional. A mis hermanos queridos, que de una u otra forma a lo largo de nuestras vidas han estado en mi vida, para reír, llorar y solidarizarnos. A mis compañeros que supieron aceptarme para complementarnos con nuestras debilidades y fortalezas y me brindaron su amistad. A mis maestros por sus enseñanzas su tiempo y paciencia. A todos ustedes MUCHAS GRACIAS.

**Jenny**

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1

## CAPÍTULO I

<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Frutilla (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.) .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Cultivo de frutilla .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Cultivo de frutilla y su importancia en el Ecuador .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Origen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4. Taxonomía .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.5. Requerimientos bioecológicos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.6. Descripción botánica .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Pudrición de la corona en frutilla .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1. <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....</b>	<b>6</b>
1.2.1.1. Taxonomía .....	6
1.2.1.2. Sintomatología .....	6
<b>1.3. Hongos Antagonistas.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 <i>Trichoderma</i> spp.....</b>	<b>6</b>
1.3.1.1 Taxonomía.....	7
1.3.1.2. Características culturales y morfológicas del género <i>Trichoderma</i> spp.....	7
1.3.1.3. Sistemática del género <i>Trichoderma</i> .....	7
1.3.1.4. Especies de interés dentro de algunos clados .....	12
1.3.1.5. Mecanismo de acción.....	14
<b>1.3.2 <i>Clonostachys</i> spp.....</b>	<b>16</b>
1.3.2.1. Taxonomía.....	16



1.3.2.2.	<i>Características culturales y morfológicas del género Clonostachys spp.</i> .....	16
1.3.2.3.	<i>Mecanismos de acción</i> .....	17
<b>1.4.</b>	<b>Identificación molecular de microorganismos fúngicos</b> .....	18
<b>1.4.1.</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	18

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	19
<b>2.1.</b>	<b>Características del Lugar</b> .....	19
<b>2.2.</b>	<b>Materiales y equipos</b> .....	19
<b>2.2.1.</b>	<i>Material biológico</i> .....	19
<b>2.2.2.</b>	<i>Medios de cultivo</i> .....	19
<b>2.2.3.</b>	<i>Equipos de laboratorio</i> .....	20
<b>2.2.4.</b>	<i>Materiales de laboratorio</i> .....	20
<b>2.2.5.</b>	<i>Insumos de laboratorio</i> .....	20
<b>2.2.6.</b>	<i>Materiales y equipos de escritorio</i> .....	21
<b>2.3.</b>	<b>Metodología</b> .....	21
<b>2.3.1.</b>	<i>Caracterización cultural y morfológica</i> .....	21
2.3.1.1.	<i>Cultivo monospórico</i> .....	21
2.3.1.2.	<i>Caracterización cultural</i> .....	21
2.3.1.3.	<i>Caracterización morfológica</i> .....	21
<b>2.3.2.</b>	<b>Caracterización Molecular</b> .....	22
2.3.2.1.	<i>PCR</i> .....	23
<b>2.3.3.</b>	<b>Pruebas de Antagonismo</b> .....	24
2.3.1.1	<i>Trichoderma spp. frente a Neopestalotiopsis spp.</i> .....	24
2.3.1.2.	<i>Clonostachys spp. frente Neopestalotiopsis spp.</i> .....	25
<b>2.3.4.</b>	<b>Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial</b> .....	25
<b>2.3.5.</b>	<b>Micoparasitismo del Antagonista frente al Patógeno</b> .....	25
<b>2.3.6.</b>	<b>Análisis de datos</b> .....	26

## CAPÍTULO III

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>3.1.</b>	<b>Caracterización morfológica y molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Clonostachys</i> sp.</b> .....	27
<b>3.1.1.</b>	<b>Caracterización morfológica</b> .....	27

3.1.1.1.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (1) .....	27
3.1.1.2.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (2) .....	29
3.1.1.3.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (3) .....	30
3.1.1.4.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (4) .....	32
3.1.1.5.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (5) .....	33
3.1.1.6.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (6) .....	34
3.1.1.7.	<i>Trichoderma</i> spp. cepa MT (7).....	36
3.1.1.8.	<i>Clonostachys</i> spp. cepa C(5).....	37
<b>3.1.2.</b>	<b>Caracterización molecular</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2.</b>	<b>Pruebas de antagonismo</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2.1.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (7) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (2) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (3) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (4) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.5.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (5) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.6.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (6) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.7.</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp. MT (7) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. Np (1) .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.8.</b>	<b><i>Clonostachys</i> spp. C (5) frente a la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. Np (1) .....</b>	<b>57</b>
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>59</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>60</b>
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Clasificación taxonómica de la frutilla.....	4
<b>Tabla 2-1:</b>	Requerimientos bioecológicos de la frutilla ( <i>Fragaria ananassa</i> Duch.).....	4
<b>Tabla 3-1:</b>	Clasificación taxonómica de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	6
<b>Tabla 4-1:</b>	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.....	7
<b>Tabla 5-1:</b>	Mecanismos responsables de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp....	15
<b>Tabla 6-1:</b>	Clasificación taxonómica de <i>Clonostachys</i> sp. ....	16
<b>Tabla 1-2:</b>	Cepas reactivadas del género <i>Trichoderma</i> spp., <i>Clonostachys</i> sp. y <i>Neopestalotiopsis</i> sp, de la colección existentes en el laboratorio .....	19
<b>Tabla 2-2:</b>	Conjuntos de primers para las reacciones de PCR. ....	23
<b>Tabla 3-2:</b>	Escala de Bell et al (1982: pp. 379-382), para evaluar el micoparasitismo.....	26
<b>Tabla 1-3:</b>	Identificación Morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Clonostachys</i> spp. de las cepas de acuerdo con las medidas largo y ancho de conidios y fiálides.....	39
<b>Tabla 2-3:</b>	Identificación molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Clonostachys</i> spp. alineados con las especies mantenidas en la base de datos del BLAST.....	41
<b>Tabla 3-3:</b>	Tasa de crecimiento micelial, clasificación del antagonismo y porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Clonostachys</i> spp. y <i>Neopestalotiopsis</i> spp...	45
<b>Tabla 4-3</b>	Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Clonostachys</i> spp. y <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	46
<b>Tabla 5-3:</b>	Test de Tukey al 0,05 de la tasa de crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Clonostachys</i> spp. y <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	46
<b>Tabla 6-3:</b>	Análisis de varianza de Tasa de crecimiento micelial de la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. Np (1) en confrontación con <i>Trichoderma</i> spp. ....	48
<b>Tabla 7-3:</b>	Test de Tukey (0,05) de la tasa de crecimiento micelial de la cepa de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. Np (1) en confrontación con <i>Trichoderma</i> spp. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1:** Árbol filogenético de máxima verosimilitud con secuencias parciales de rpb2 de aislados representativos de *Trichoderma* spp.....11
- Figura 1-3:** Características culturales de la cepa MT 1 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas Conidióforos, Fiálides, conidios .... 27
- Figura 2-3:** Características culturales de la cepa MT 2 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas Conidióforos, Fiálides, conidios .... 29
- Figura 3-3:** Características culturales de la cepa MT 3 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas Conidióforos, Fiálides, conidios .... 30
- Figura 4-3:** Características culturales de la cepa MT 4 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia . Características morfológicas Conidióforos, Fiálides, conidios... 32
- Figura 5-3:** Características culturales de la cepa MT 5 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas. Conidióforos, Fiálides, conidios... 33
- Figura 6-3:** Características culturales de la cepa MT 6 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas. Conidióforos, Fiálides, Clamidosporas, conidios. .... 34
- Figura 7-3:** Características culturales de la cepa MT 7 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas. Conidióforos, Fiálides, conidios.. 36
- Figura 8-3:** Características culturales de la cepa C 5 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia. Características morfológicas. Conidióforos, Fiálides, conidios..... 37
- Figura 9-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (1) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso..... 49
- Figura 10-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (2) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.....50
- Figura 11-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (3) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.... 51
- Figura 12-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (4) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.... 52
- Figura 13-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.....53
- Figura 14-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (6) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.....54

**Figura 15-3:** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (7) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.....55

**Figura 16-3:** Confrontación de la cepa *Clonostachys* spp. C (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso, reverso.... 57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3:** Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. y *Neopestalotiopsis* spp. .... 45
- Gráfico 2-3:** Tasa de crecimiento micelial en de la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en confrontación con *Trichoderma* spp. MT (1 -7) y *Clonostachys* spp. C (5). ... 47

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

- ANEXO A:** PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA PRUEBAS PCR.
- ANEXO B:** PROCEDIMIENTO PARA PRUEBAS PCR
- ANEXO C:** CULTIVOS MONOSPÓRICOS PARA CARACTERÍSTICAS CULTURALES Y MORFOLÓGICA
- ANEXO D:** PRUEBAS DE ANTAGONISMO
- ANEXO E:** SECUENCIAS DE HONGOS EN ESTUDIO
- ANEXO F:** ÁRBOL FOLOGÉNÉTICO REGIÓN Rpb2

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PDA	Potato dextrosa agar
SNA	Spezieller Nährstoffarmer Agar
AA	Agar Agua
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ITS	Espacios Internos Transcritos
TEF	Factor de Elongación y Traducción
Rpb2	RNA Polimerasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDA	Diseño Experimental Completamente al Azar.
cn	conidióforo
f	fiálide
cl	clamidosporas



## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. frente a *Neopestalotiopsis* sp. en frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.). Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la técnica de cultivo dual en cajas de Petri con medio PDA en donde se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del antagonista y del patógeno, para esto se reactivó cepas de *Trichoderma* spp., una cepa de *Clonostachys* spp. y una cepa de *Neopestalotiopsis* spp., de la colección existentes en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH. En la caracterización macroscópica se registraron características culturales como: el color del anverso, reverso, margen, textura, pigmentación del medio; la caracterización microscópica se realizó mediante la técnica de placas, por consiguiente, se registraron datos de estructuras fúngicas y para la caracterización molecular se realizó la extracción de ácidos nucleicos mediante el siguiente proceso: extracción de micelio, lisis física, lisis química, PCR, electroforesis y secuenciación. Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. fueron identificadas y caracterizadas morfológica y molecularmente correspondiendo a las siguientes especies: *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Clonostachys rosea*. Las tasas de crecimiento de las diferentes cepas fueron: para las *Trichoderma* spp. valores de 15,72 mm/día hasta 8,73 mm/día, para *Clonostachys* spp. un valor de 3,74 mm/día y para *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) un valor de 7,86 mm/día. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* sp. ejercida por las cepas de *Trichoderma* spp. fue entre 52,9% y 59,7%, mientras que para la cepa de *Clonostachys* sp. se obtuvo el 30,1%. Las cepas que presenten mayor eficacia antagonista frente a *Neopestalotiopsis* spp. fueron *Trichoderma* spp. MT (5) y MT (6) ya que cubrieron totalmente al patógeno, mismas que se recomiendan evaluar en campo.

**Palabras clave:** <ANTAGONISMO>, <MORFOLOGÍA.>, <*Trichoderma* spp.>, <*Clonostachys* spp.>, <*Neopestalotiopsis* spp.>



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

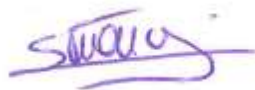


1313-DBRA-UTP-2022

## ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate *in vitro* the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. against *Neopestalotiopsis* sp. in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). The antagonism tests were carried out using the dual culture technique in Petri dishes with a PDA medium in which were placed a mycelium disc of 5 mm diameter for the antagonist and the pathogen. For this purpose, strains of *Trichoderma* spp., a strain of *Clonostachys* spp., and a strain of *Neopestalotiopsis* spp. were reactivated from the existing collection in the Phytopathology laboratory of the Faculty of Natural Resources of the ESPOCH. In the macroscopic characterization, cultural characteristics were registered, such as the color of the obverse, reverse, margin, texture, and pigmentation of the medium. Microscopic characterization was performed using the plate technique; therefore, data on fungal structures were registered. Finally, for molecular characterization, nucleic acids were extracted using the following process: mycelium extraction, physical lysis, chemical lysis, PCR, electrophoresis, and sequencing. The strains of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. were identified and characterized morphologically and molecularly, corresponding to the following species: *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, and *Clonostachys rosea*. The growth rates of the different strains were for *Trichoderma* spp. values from 15.72 mm/day to 8.73 mm/day, for *Clonostachys* spp. a value of 3.74 mm/day, and for *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) a value of 7.86 mm/day. The percentage inhibition of mycelial growth of *Neopestalotiopsis* sp. exerted by the *Trichoderma* spp. strains were between 52.9% and 59.7%, while 30.1% was obtained for the *Clonostachys* sp. strain. The strains with the highest antagonistic efficacy against *Neopestalotiopsis* spp. were *Trichoderma* spp. MT (5) and MT (6), since they completely covered the pathogen, which is recommended for field evaluation.

**Keywords:** <ANTAGONISM>, <MORPHOLOGY>, <*Trichoderma* spp.>, <*Clonostachys* spp.>, <*Neopestalotiopsis* spp.>



**Silvana Patricia Celleri Quinde**

**C.C. 0602669830**

## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el consumo local y la demanda internacional de la frutilla ha sido la base para definir la importancia económica en el país, debido a su gran número de variedades se determina que su producción es completamente rentable para los agricultores; quienes, realizan distintos tipos de manejo del cultivo lo que ha conllevado en la última década al desarrollo en el ámbito tecnológico y científico del manejo de la frutilla, aportando al cuidado del medio ambiente (Agromar, 2010; citado en Raura, 2017, p.4).

Uno de los aspectos importantes en la producción de frutilla es el manejo de problemas sanitarios como significa la pudrición de la corona que es producida por un complejo de agentes fitopatógenos del suelo (*Armillaria mellea*, *Macrophomina phaseolina*, *Coniothyrium fuckelii*, *C. fragariae*, *Rosellinia necatrix*, *Phoma lycopersici*, *Sclerotium rolfsii*, *F. oxysporum*, *P. cactorum*, *P. fragariae*, *Idriella lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae*) y se considera la enfermedad más destructiva de este cultivo debido a su incidencia, distribución y difícil control, provocando la muerte gradual de la planta (Ceja et al., 2008: pp. 451-461). Recientemente, Gilardino et al., (2018, pp. 6- 10), reportaron a especies de *Pestalotiopsis* como agentes causantes de podredumbre de corona en frutilla. Varias especies de *Pestalotiopsis* se transfieren a *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* (Maharachchikumbura, 2014, pp. 121-186).

El riesgo que representa *Neopestalotiopsis* spp. para cultivares susceptibles de frutilla, ha obligado a utilizar mecanismos de control químico, los cuales han alterado negativamente los ecosistemas agrícolas donde se producen frutilla. Esta situación ha conllevado a la búsqueda de nuevas alternativas de control. Desde 1980 hongos biocontroladores han sido investigados como posible alternativa de producción limpia. El empleo de agentes de control biológico (ACBs) ha permitido una reducción en la aplicación de fungicidas químicos y por lo tanto un control más eficiente de patógenos causantes de enfermedades, al ser incorporados a los programas de manejo integral. (Tovar, 2008). Investigaciones de especies de *Trichoderma* y *Clonostachys* muestran que tienen gran actividad antagónica sobre patógenos causantes de enfermedades importantes en cultivos. Sin embargo, hasta el momento no se conocen cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. para realizar control biológico del agente causal de la pudrición de la corona de la frutilla (*Neopestalotiopsis* spp.), motivo por el cual se realiza el presente trabajo de investigación.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. frente a *Neopestalotiopsis* spp. en frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.).

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar morfológica y molecularmente las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. en estudio.
- Medir la tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* sp. y *Neopestalotiopsis* sp.
- Establecer las formas de antagonismo que presenten las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* sp. frente a *Neopestalotiopsis* sp.
- Seleccionar las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* sp. que presenten mayor eficacia antagonista frente a *Neopestalotiopsis* sp.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.)

##### 1.1.1. Cultivo de frutilla

La frutilla es un cultivo que puede permanecer continuamente hasta por 3 años por lo cual es importante en el sector industrial, en cuanto a la producción de frutilla, debido a su gran número de variedades se determina que su producción es completamente rentable para los agricultores. En este cultivo se realizan distintos tipos de manejo, lo que ha conllevado en la última década al desarrollo en el ámbito tecnológico y científico del manejo de la frutilla, aportando al cuidado del medio ambiente (Aguirre, 2010; citado en Parra, 2018, p.7).

##### 1.1.2. Cultivo de frutilla y su importancia en el Ecuador

En el Ecuador el consumo local y la demanda internacional de la frutilla ha sido la base para definir la importancia económica en el país, por lo que los agricultores tratan de cultivar variedades que los ayuden a obtener altos rendimientos con bajos costos de producción. En las provincias de Imbabura, Tungurahua y Pichincha se concentra la mayor producción de frutilla con una superficie de siembra de 800 has produciendo 10.000 cajas por día de 3 a 5 Kg (Agromar, 2010; citado en Raura, 2017, p.4).

##### 1.1.3. Origen

El género *Fragaria* reúne más de 28 especies incluyendo varias subespecies. Hace más de 300 años especies como *F. chiloensis* (L.) Duch., *F. virginiana* Duch., *F. vesca* L. y *F. moschata* Duch. se cultivaron en todo el mundo para la producción de frutilla, estas especies fueron domesticadas las cuales se adaptaron a diferentes regiones climáticas. A principios del siglo XVI, *F. virginiana* tolerantes a temperaturas frías y a la sequía fue introducida a Europa procedente de América del Norte. En el siglo XVII en Chile se encontró una frutilla silvestre (*F. chiloensis*), que proporcionaba frutos grandes, pero no se adaptaba bien a los diferentes tipos de climas. En el Norte de Europa incluida Francia, se cultivaba la frutilla de bosque (*F. vesca*) y parte de Europa y Rusia se cultivaron por siglos frutillas aromatizadas (*F. moschata*) (Husaini, 2016).

En 1714, se introdujo plantas de *F. chiloensis* a Francia procedentes de Sudamérica. Un cruce espontáneo entre *F. chiloensis* y *F. virginiana* dio lugar a un híbrido natural que comprendía una planta resistente con frutos grandes, la cual fue descrita por Duchesne en el año de 1776 como *Fragaria x ananassa* (Duch.) (Husaini & Neri, 2016).

#### 1.1.4. Taxonomía

Según Hassler (2018), la frutilla tiene la siguiente clasificación taxonómica:

**Tabla 1-1:** Clasificación taxonómica de la frutilla.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	<i>Rosaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Fragaria</i>
<b>Especie</b>	<i>ananassa</i> Duch.

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

#### 1.1.5. Requerimientos bioecológicos

Según Ávila (2015), los requerimientos bioecológicos de la frutilla (*Fragaria ananassa* Duch) son:

**Tabla 2-1:** Requerimientos bioecológicos de la frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.)

<b>Temperatura</b>	20 °C. Etapa Vegetativa 25 – 26 °C. Fase de fructificación
<b>Humedad relativa</b>	65-70%
<b>Suelo</b>	arenosos o franco arenosos
<b>pH</b>	6-7
<b>Requerimiento hídrico (mm/año)</b>	400-600
<b>Altitud (msnm)</b>	1300 - 3200

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

### **1.1.6. Descripción botánica**

La frutilla es una planta perenne, con una altura hasta los 50 cm con hojas trilobuladas, con borde aserrado y de pecíolos largos, se originan en una corona o rizoma muy corto; en ellas se encuentran tres tipos de yemas; unas originan más tallos, que crecen junto al primero, otras los estolones que en contacto con el suelo forman raíces y el tercer tipo de yemas, forman los racimos florales. Las flores son hermafroditas que se agrupan en racimos (Barahona & Sancho, 1998; citado en Intriago, 2020, pp.4-5).

Posee una raíz fasciculada y superficial de 30 a 50 cm de profundidad (Bianchi, 2018; citado en Intriago, 2020, p. 5). El fruto es una infrutescencia, producto del engrosamiento del receptáculo floral, su semilla son pequeñas llamados aquenios. Son estos los que producen las hormonas que estimulan el engrosamiento del receptáculo floral (Barahona & Sancho, 1998; citado en Intriago, 2020, p. 5).

### **1.2. Pudrición de la corona en frutilla**

La pudrición de la corona en frutilla es considerada la enfermedad más destructiva de este cultivo debido a su incidencia, distribución y difícil control, que conlleva a la muerte gradual de la planta (Ceja et al., 2008, pp. 451-461).

La enfermedad se asocia a un complejo de fitopatógenos del suelo. Tanto Douglas y Converse (1993), como Maas (1998), mencionan a *Armillaria mellea*, *Macrophomina phaseolina*, *Coniothyrium fuckelii*, *C. fragariae*, *Rosellinia necatrix*, *Phoma lycopersici*, *Sclerotium rolfsii*, *F. oxysporum*, *P. cactorum*, *P. fragariae*, *Idriella lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae* como causantes de la secadera o pudrición de la corona en plantas de frutilla. Sin embargo, en varias investigaciones realizadas en diversos países alrededor del mundo se confirman estos fitopatógenos y se mencionan otros agentes etiológicos de la pudrición de la corona en frutilla.

Recientemente, Gilardino et al., (2018, pp. 6- 10), reportaron a especies de *Pestalotiopsis* como agentes causantes de podredumbre de corona en frutilla. Varias especies de *Pestalotiopsis* se transfieren a *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* (Maharachchikumbura, 2014, pp. 121-186).

### 1.2.1. *Neopetalotiopsis* spp.

#### 1.2.1.1. Taxonomía

Según Obregón et al., (2018), la clasificación taxonómica del género *Neopetalotiopsis* spp. es:

**Tabla 3-1:** Clasificación taxonómica de *Neopetalotiopsis* spp.

<b>Reino:</b>	Fungi
<b>Filo:</b>	Ascomycota
<b>Clase:</b>	Deuteromycetes
<b>Orden:</b>	Amphisphaeriales
<b>Familia:</b>	Pestalotiopsidaceae
<b>Género:</b>	<i>Neopetalotiopsis</i>

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

#### 1.2.1.2. Sintomatología

Reportes en Argentina de síntomas observados en plantas de frutilla presentan hojas necróticas rojizas en zonas internas de las nervaduras, con áreas de color oxido en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo toda la hoja a medida que se desarrolla la enfermedad, áreas necróticas y decoloración de las raíces y la corona, casando la muerte de la planta (Obregón et al., 2018, p. 18-56).

### 1.3. Hongos Antagonistas

En la rizósfera crecen varios grupos de hongos antagonistas que son aprovechados en el control biológico (Almaraz et al, 2012; citado en Arbito, 2017, p. 26). Dichos microorganismos presentan efectos de control sobre fitopatógenos de interés, lo que les confiere su reconocido uso en el control de enfermedades agrícolas (Hernández et al., 2007; citado en Arbito, 2017, p. 26).

#### 1.3.1 *Trichoderma* spp.

El hongo se lo puede encontrar fuera como dentro de la rizósfera; es en la rizósfera donde puede colonizar y proteger las raíces de las plantas, varios autores han señalado el incremento en peso de las plantas que se desarrollan en presencia de este hongo. Por ejemplo, aumento en peso de las plantas de fríjol; del peso de los brotes de plántulas de trigo, plántulas de manzanas más largas y vigorosas, incremento en la tasa de germinación y el peso seco de brotes y guías de



plantas de tomate, en el aumento del crecimiento del sistema radical de plantas mejoradas de maíz dulce (Smith et al., 1990; citado en Agamez et al., 2009: pp. 3-11).

### 1.3.1.1 Taxonomía

Según Schoch CL et al., (2020), clasifica al género *Trichoderma* spp. de la siguiente manera:

**Tabla 4-1:** Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

<b>Reino:</b>	Fungi
<b>Filo:</b>	Ascomycota
<b>Clase:</b>	Deuteromycetes
<b>Orden:</b>	Hypocreales
<b>Familia:</b>	Hypocreaceae
<b>Género:</b>	<i>Trichoderma</i>

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

### 1.3.1.2. Características culturales y morfológicas del género *Trichoderma* spp.

La morfología al microscopio corresponde a hifas hialinas septadas, conidióforos, fiálides y conidios. Los conidióforos son hialinos, generalmente ramificados, las hifas se forman en un ángulo de 90° y en ocasiones llegan a tener disposición piramidal. Las fiálides son hialinas, en forma de matraz, pueden ser solitarias o dispuestas en racimos y producen los conidios en el extremo. Los conidios son de forma redonda o elipsoidal de aproximadamente 3 µm y poseen un color verdoso (Kubicek & Harman, 1998; citado en Sánchez, 2009, pp 3-6).

En medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) presenta un crecimiento colonial rápido de 3 a 5 días dependiendo de cada especie a 25 °C en este medio las colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. En ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso y en ausencia de luz se observa esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos concéntricos, al reverso de la caja se observa un color pálido y en ocasiones una pigmentación amarillenta (Windham et al., 1986; citado en Sánchez, 2009, pp 3-6).

### 1.3.1.3. Sistemática del género *Trichoderma*

Desde finales del siglo XIX, el nombre *Trichoderma viride* se aplica a todos los hongos formadores de colonias con un aspecto típico del género, independientemente de que hayan sido aislados de muestras de suelo y restos vegetales u obtenidos de ascosporas aisladas de peritecios

de diferentes especies de *Hypocrea*. Esta situación era bastante diferente a la de otros géneros más importantes, como *Fusarium*, donde ya se describieron decenas de especies y formas en la década de 1930. La simplicidad taxonómica en *Trichoderma* fue producto del poco interés por el género fuera de la disciplina de la micología y el consenso general de que, microscópicamente, todos los aislamientos tenían “la misma cara” (Samuels, 2006).

Esta situación duró hasta finales de la década de 1960, cuando el género se clasificó en nueve “agregados de especies”, reconocido por diferencias morfológicas de la fase asexual en cultivo puro (Rifai, 1969). El término “agregados” se usó para indicar que especies con biología y morfología distintas en la fase sexual podrían compartir la misma morfología en la fase asexual, debido a su relativa simplicidad, el sistema taxonómico de nueve “especies” fue ampliamente adoptado (Domsch et al., 2007) y todavía se usa para la caracterización de *Trichoderma* en morfotipos, aunque no tiene utilidad taxonómica. El esquema taxonómico se amplió a principios de la década de 1990 y algunos agregados de especies se formalizaron en cinco secciones dentro del género; las características de la fase sexual también fueron consideradas en las descripciones morfológicas y el número de especies aumentó a aproximadamente 30 (Bissett, 1991; Druzhinina; Kubicek, 2005).

Con la adopción de la filogenia molecular para el estudio sistemático y taxonómico del género, el número de especies descritas aumentó considerablemente a partir de la década de 2000, demostrando que la aparente sencillez morfológica de *Trichoderma* esconde una gran diversidad de linajes filogenéticos, que divergieron hace algún tiempo y dio lugar a cientos de especies adaptadas a diferentes sustratos y hábitats de la Tierra (Druzhinina et al., 2011). El número de especies definidas en base a la filogenia molecular llegó a 100 en 2006 (Druzhinina et al., 2006) y actualmente se acerca a las 300 (Bissett et al., 2015).

Un resultado directo de los cambios recientes en la taxonomía es la comprensión de que la mayoría de los nombres aplicados a los aislamientos de *Trichoderma* hasta hace poco, basados en gran medida en la morfología, no son correctos (Druzhinina & Kubicek, 2005).

La definición de especies filogenéticas en hongos se realiza a partir de la generación y análisis de árboles filogenéticos, contruidos con secuencias parciales de genes compartidos y relativamente conservados entre todos los organismos comparados. En este contexto, una especie filogenética puede definirse como el grupo monofilético más pequeño (grupo formado por un nodo interno y las secuencias que se derivan de él) caracterizado por un conjunto fijo de polimorfismos de ADN dentro de la región secuenciada. En la práctica, la identificación del nodo que delimita especies filogenéticas cercanas no siempre es clara, y la solución encontrada

es el uso de secuencias de varios genes independientes en el genoma, analizados en combinación para definir los límites entre especies, en un procedimiento denominado gen concordancia genealógica (Conrado et al., 2019, p. 170).

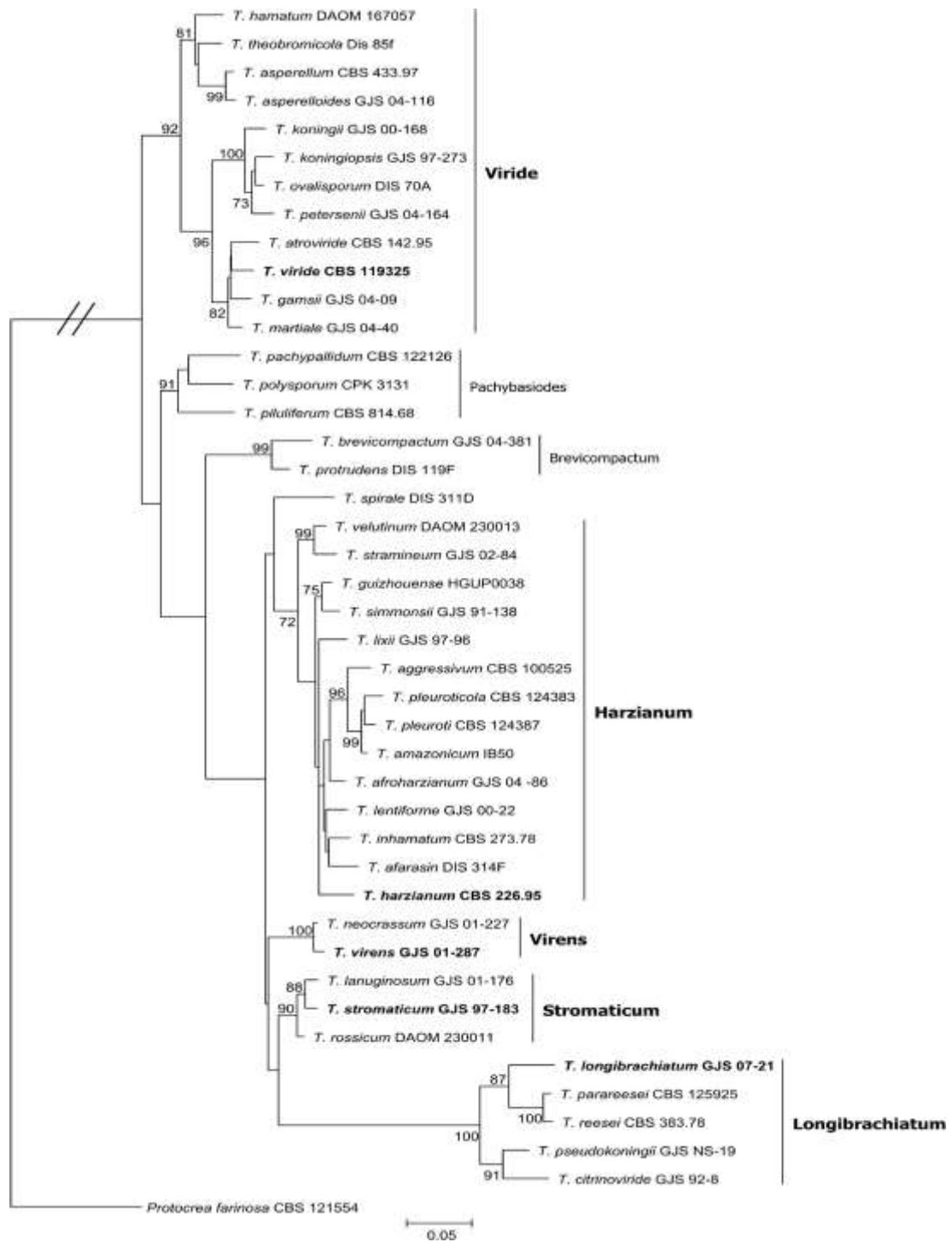
La secuencia de los espaciadores internos transcritos 1 y 2 y la región 5.8S o secuencia ITS, comprendida entre las regiones codificantes de las subunidades 18S y 28S del ARN ribosomal, es de fácil amplificación y fue utilizada en los primeros estudios de filogenia y caracterización molecular de hongos, incluido *Trichoderma* (Kindermann et al., 1998; Kuhls et al., 1997). Esta región, sin embargo, está muy conservada y no ofrece suficiente resolución para la delimitación de especies muy próximas de *Trichoderma* y otros ascomicetos, aunque se considera la región de código de barras universal para la identificación de hongos (Schoch et al., 2012).

A pesar de que ya se reconocía distintas especies filogenéticas pertenecientes a grupos de especies de importancia, como las de los clados *viride* y *hamatum*, no podían separarse solo por ITS (Druzhinina et al., 2006). Los genes que codifican proteínas y enzimas con funciones conservadas en eucariotas contienen más polimorfismos, principalmente en regiones de intrones, y ofrecen una mejor resolución para la delimitación de especies. Luego de definir especies filogenéticas mediante análisis multi-loci, es posible realizar el razonamiento inverso y verificar si existe, entre los genes utilizados para la filogenia, alguno que sea capaz de delimitar todas o la mayoría de las especies que fueron identificadas en el análisis conjunto de varios genes. Este gen puede adoptarse luego como un código de barras para la identificación molecular de aislados, mediante la comparación con secuencias de referencia de especies ya conocidas y disponibles en bases de datos públicas como lo es GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica, utilizando la herramienta BLAST (Conrado et al., 2019 p. 171).

Una pregunta sobre identificación molecular es un procedimiento para adoptar cuando no es posible obtener el 100% de identidad de la secuencia de interés con alguna secuencia de referencia en la base de datos. Los valores de identidad en el rango del 99% para *tef1* y *rpb2*, y correspondientes a un solo nombre en la base de datos, aún pueden considerarse una identificación positiva. En el caso de valores inferiores al 99% de identidad (asumiendo que hay una buena cobertura de la secuencia objetivo y un valor estimado del parámetro E-value cercano a cero), y cuando el investigador quiere tener una confirmación más robusta de la identificación, se sugiere la composición de un alineamiento múltiple con secuencias *tef1* y/o *rpb2* de los aislados a identificar y de aislados de referencias de especies cercanas a las obtenidas en el resultado del GenBank, seguido de la realización de análisis filogenéticos con protocolos comúnmente utilizados en la taxonomía de *Trichoderma* (Chaverri et al., 2015).

La región rpb2 carece de intrones en el rango generalmente secuenciado, se alinea fácilmente y, por lo tanto, se usa para inferir filogenias globales, con especies de los diferentes clados en un árbol. Por otro lado, tef1, tiene una mejor resolución para separar especies muy cercanas, pero no es una región fácil de alinear cuando se incluyen especies muy divergentes en el mismo análisis (Jaklitsch & Voglmayr, 2015).

Una filogenia simplificada del género *Trichoderma*, basada en secuencias de la región rpb2, se presenta en la **(Figura 1-1)** y contiene clados con representantes de especies comúnmente aisladas del suelo y restos de plantas, así como aquellas empleadas con frecuencia en el control biológico de enfermedades de las plantas.



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

Fuente: (Magalhães de Abreu citado Conrado et al., 2019, p. 173).

#### 1.3.1.4. Especies de interés dentro de algunos clados

- Clado *harzianum*

*Trichoderma harzianum* es la “morfoespecie” más comúnmente empleada en el control biológico de enfermedades de las plantas en el mundo (Woo et al., 2014), y prevalece en estudios de diversidad de especies en suelos y restos de plantas en varias regiones geográficas (Domsch et al., 2007). Sin embargo, el concepto de esta especie, tal como se define tradicionalmente, engloba una variedad de especies filogenéticas, algunas verdaderamente cosmopolitas y otras de distribución más restringida, que conforman el clado *harzianum*. Así, muchos de los aislamientos identificados como *T. harzianum* en la literatura pueden caracterizarse mejor como *T. harzianum lato sensu*, es decir, en un sentido amplio, utilizando la jerga taxonómica (Chaverri et al., 2015).

El clado *harzianum* contiene poblaciones recombinantes, es decir, especies biológicas, así como poblaciones claramente clonales, además de algunos linajes filogenéticos solitarios que divergen de los demás, lo que dificulta la aplicación de un único concepto para definir especies (Druzhinina et al., 2011). Una reciente revisión taxonómica del clado *harzianum* propuso el reconocimiento de decenas de especies, delimitadas según criterios de concordancia genealógica de genes (Chaverri et al., 2015), y desde entonces se han descrito nuevas adiciones (Montoya et al., 2016). El grupo monofilético que contiene el material biológico utilizado como neotipo de la especie mantuvo el nombre *T. harzianum stricto sensu* (en sentido estricto), y se asignaron otros nombres a las restantes especies filogenéticas. En un muestreo de casi doscientos aislamientos del clado *harzianum*, de varios sustratos y regiones, se identificaron algunos patrones biogeográficos (Chaverri et al., 2015).

*Trichoderma harzianum stricto sensu* es una especie poco común con una distribución predominante en el hemisferio norte. Las especies *T. afroharzianum* y *T. guizhouense* tienen una distribución cosmopolita y predominancia en suelos. *T. afarasin* y *T. lentiforme* ocurren comúnmente como endófitos, pero también como habitantes del suelo, en África y América tropical, respectivamente. Algunas especies son aparentemente endófitas, mientras que otras son predominantemente micoparásitos, incluidas especies como *T. pleurotum* y *T. aggressivum*, aisladas como parásitos agresivos en sistemas de producción de hongos comestibles. Los aislamientos que componen dos productos de control biológico vendidos en Europa y EE. UU. han sido reidentificados como *T. afroharzianum*, incluido el famoso aislado T-22, desarrollado a partir de la fusión de protoplastos y ampliamente comercializado para el control biológico y la promoción del crecimiento de las plantas (Harman et al., 2010).

Los aislados de otros tres productos disponibles en el hemisferio norte se volvieron a identificar como pertenecientes a dos especies del clado *harzinaum*: *T. guizhouense* y *T. simonsii* (Chaverri et al., 2015).

- Clado *virens*

La especie cosmopolita *Trichoderma virens* y algunas especies relacionadas forman el clado *virens*, que es filogenéticamente cercano al clado *harzianum*. Previamente clasificada en el género *Gliocladium*, la especie *T. virens* tiene una morfología de fácil diagnóstico, caracterizada por la producción de conidióforos con fiálides agregadas convergentemente, adquiriendo una apariencia penicilada, diferente al patrón divergente típico de *Trichoderma*. Los conidios son verdes, pero comúnmente están sumergidos en gotitas cristalinas y no se agregan en masa. *T. virens*, un habitante común del suelo, también se encuentra en nidos de hormigas cortadoras de hojas en Brasil (Montoya et al., 2016). Los aislados de *T. virens* son antagonistas de otros hongos y se han utilizado durante décadas en el control biológico de enfermedades causadas por patógenos del suelo, incluidos principalmente hongos y Oomycetes (Howell, 2006).

- Clado *stromaticum*

*Trichoderma stromaticum* es una especie restringida a América tropical, asociada con el cacao y un parásito de *Moniliophthora perniciosa*, un patógeno de la escoba de bruja del cacao (Samuels et al., 2000). El hongo se encuentra generalmente en ramas muertas y retamas, frutos momificados y hojarasca. Se realizaron descripciones de las fases asexual y sexual de *T. stromaticum* a partir de materiales aislados de regiones productoras de cacao en Brasil (Samuels et al., 2000, Bezerra et al., 2003), y el uso de esta especie para el manejo del cacao. *T. stromaticum* y algunas especies estrechamente relacionadas forman el clado *stromaticum*, sin embargo, a pesar de la proximidad filogenética, ninguna otra especie de este clado parece ser común en las regiones neotropicales (Samuels et al., 2012).

- Clado *viride, hamatum* y *koningii*

La especie *Trichoderma viride* stricto sensu se inserta en un gran clado compuesto por decenas de especies con diferentes patrones morfológicos, incluido el patrón *viride* con conidióforos piramidales, conidios globosos y de paredes rugosas, el patrón *koningii* con conidios oblongos a elipsoidales, y el patrón *hamatum* con fiálides subglobosas en agregados compactos y conidióforos con terminaciones estériles alargadas. Debido a la gran cantidad de especies

filogenéticas presentes en el clado *viride*, se puede separar en diferentes subclados, cada uno con docenas de especies, como los subclados *viride*, *viridescens*, *koningii* y *hamatum* (Samuels et al., 2006, Jaklitsch et al., 2013).

*Trichoderma atroviride* es una especie situada entre los subclados *viride* y *koningii* y utilizada como modelo en el estudio genómico del fenotipo micoparasitario, la mayor parte de la diversidad de especies descrita en los subclados *viride*, *viridescens* y *koningii* proviene de colectas realizadas en Europa y Estados Unidos, por lo que se considera común en el hemisferio norte. Una de las excepciones a este patrón es *T. koningiopsis*, que tiene una amplia distribución y prevalencia en los trópicos, donde se encuentra en muestras de suelo, hojarasca y como endófitos. *T. ovalisporum* es otra especie del subclado *koningii* con ocurrencia neotropical y hábito típicamente endófito (Samuels et al., 2006).

En el subclado *hamatum* se encuentran las especies: *T. asperellum* y *T. asperelloides*, dos especies filogenéticamente hermanas, con la misma morfología, pero patrones moleculares y fisiológicos distintos (Samuels et al., 2010). Estas especies son habitantes comunes del suelo en el Neotrópico micoparásitos agresivos y pueden inducir resistencia sistémica en plantas (Shoresh et al., 2005).

- Clado *longibrachiatum*

Las especies del clado *longibrachiatum* forman un grupo compacto dentro de la filogenia del género y comparten características morfológicas que incluyen la formación de conidióforos con ramas dispersas y disposición irregular de fiálides a lo largo del eje principal y las ramas. *Trichoderma reesei* es una especie saprofita con gran capacidad para degradar sustratos celulósicos. Un aislado de esta especie ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas celulolíticas, a escala industrial, desde mediados del siglo XX (Martínez et al., 2008). Las especies de este clado son mesófilas, capaces de crecer rápidamente y esporular incluso a 40° C. Debido a esta característica, los aislamientos de algunas especies de este clado pueden iniciar infecciones oportunistas en individuos inmunodeprimidos, especialmente *T. bissettii*, *T. citrinoviride* y *T. longibrachiatum* stricto sensu (Druzhinina et al., 2008, Sandoval-Denis et al., 2014).

#### 1.3.1.4. Mecanismo de acción.

*Trichoderma* spp. ejerce mecanismos de control mediante: competencia directa (por espacio y nutrientes), producción de metabolitos antibióticos, la inactivación de enzimas del agente patógeno, modificación de las condiciones ambientales, producción de sustancias promotoras



del crecimiento vegetal y por micoparasitismo. A continuación, se describen los tres principales:

**Tabla 5-1:** Mecanismos responsables de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp.

Mecanismo	Definición	Referencias
Antibiosis	Producción de metabolitos secundarios (compuesto volátiles y no volátiles) o antibióticos con actividad antifúngica, estos metabolitos inhiben a otros microorganismos sin la necesidad de establecer un contacto físico.	(Martínez et al., 2013; citado en Arbito, 2017: pp. 30-31).
Competencia	Ocurre cuando diferentes microorganismos necesitan de un mismo recurso para sobrevivir sea nutrientes, espacio físico, luz, oxígeno etc.	(Villaruel, 2015; citado en Arbito, 2017: p. 31).
Micoparasitismo	Proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno. Ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica. La última etapa consiste en la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de <i>Trichoderma</i> spp.	(Villaruel, 2015; citado en Arbito, 2017: p. 31).

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

Además de los mencionados en la **Tabla 5-1**, se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta (Ahmed et al., 2000, Sid Ahmed et al., 2003; citados en García, 2014, p. 17).

Entre estos se pueden mencionar los que “elicitan” o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Resistencia Sistémica Inducida), con la destoxicación de toxinas excretadas por patógenos, la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección y la solubilización de elementos nutritivos. La inducción de estos mecanismos ha mostrado un efecto protector contra diversos hongos fitopatógenos en muchos cultivos, incluyendo al Oomycete *Phytophthora* (Elad & Baker, 1985; citados en García, 2014, p. 17-18).

### 1.3.2 *Clonostachys* sp.

Es un hongo cosmopolita, habitante del suelo con elevado potencial antagónico que coloniza las plantas vivas, que en ciertos hospederos puede permanecer por periodos prolongados dentro de sus tejidos como endófito o epífito (Hoopen et al, 2003: pp. 587-595), digiere el material en el suelo como saprófito y también es conocido como un parásito de otros hongos y nematodos (Rodríguez & Chico 2013: pp. 42-49).

#### 1.3.2.1. Taxonomía

Según Schoch CL et al., (2020), clasifica al género *Clonostachys* sp. de la siguiente manera:

**Tabla 6-1:** Clasificación taxonómica de *Clonostachys* sp.

<b>Reino:</b>	Fungi
<b>Filo:</b>	Ascomycota
<b>Clase:</b>	Sordariomycetes
<b>Orden:</b>	Hypocreales
<b>Familia:</b>	Bionectriaceae
<b>Género:</b>	<i>Clonostachys</i>

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

#### 1.3.2.2. Características culturales y morfológicas del género *Clonostachys* spp.

*Clonostachys* spp. presenta conidióforo erecto o sub-erecto, hifa aérea, septado, hialino, ramificado en el ápice con tendencia penicilada, fiálides agrupadas en forma de botella, frecuentemente convexo en un lado, fialosporas hialinas o pigmentadas, no septadas, de forma ovoide o aplanada (Lübeck et al., 2002, pp. 815-826).

Las colonias son de color blanco a salmón pálido, el micelio es de aspecto tomentoso a granuloso, como resultado de la formación de conidióforos con masas de conidios, son más abundantes en el centro que en los bordes de la colonia. Los conidióforos verticilados son los primeros en formarse con fiálides largas y divergentes, mientras que en los penicilados las fiálides son de menor tamaño y convergentes, los conidios son hialinas, lisas, ligeramente curvadas con un lado poco aplanado miden entre 4,2-6,5 por 2,1-3,3  $\mu\text{m}$  (Piontelli & Guisiano, 2003; citado en Santa Cruz, 2017, pp. 12-13). Los conidióforos pueden ser de dos tipos: verticilados y

penicilados que producen la mayor cantidad de conidias (Sutton et al., 1997; citado en Santa Cruz, 2017, pp. 12-13).

### 1.3.2.3. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción del género *Clonostachys* sp., no han sido completamente estudiados, pero se cree que ejercen mecanismo de control mediante: competencia por sustrato, micoparasitismo, antibiosis y resistencia sistémica inducida (Sutton et al., 1997; citado en Santa Cruz, 2017, p. 13).

Según Rodríguez y Chico (2013, pp. 42-49), en su trabajo de investigación “Efecto Antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinérea*” menciona que los mecanismos de biocontrol atribuidos a *Clonostachys rosea* son: micoparasitismo, competencia por nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo, este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células causándole un daño extensivo alterando y degradando su pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma.

Al respecto Flores et al., (2015, pp. 34-42), manifiesta que se toma en cuenta que el micoparasitismo es un proceso complejo de quimiotropismo cuya acción antifúngica específica es desconocida, sin embargo, se ha propuesto una serie de etapas por la que *Clonostachys* sp. lleva el antagonismo las cuales son:

**a. Reconocimiento:** Durante la etapa de reconocimiento se lleva a cabo un proceso de quimiotropismo el cual es mediado por el reconocimiento de lectinas que se encuentra incorporadas en el hongo fitopatógeno, y cuando el micoparásito reconoce al hongo las hifas lo atrapan y lo rodean formando estructuras apresoras.

**b. Penetración de la hifa:** En cuanto a la penetración de la hifa esta se realiza mediante la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno por medio de la secreción de enzimas que actúan sinérgicamente, y a las que se denominan en conjunto con las enzimas degradadoras de la pared celular, conformado por  $\beta$ -1,3- glucanasas, quitinasas y proteasas las cuales se inducen por presencia de las paredes celulares de hongos fitopatógenos.

**c. Invasión y secreción de enzimas hidrolíticas:** Este último es de mayor interés ya que no se ha determinado con exactitud el mecanismo mediante el cual se controla la expresión de cada una de las enzimas involucradas, así como su orden.

## **1.4. Identificación molecular de microorganismos fúngicos**

El desarrollo de técnicas moleculares, sobre todo con el descubrimiento de Kary Banks Mullis en 1986 de la PCR, ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, lo que ha revolucionado la sistemática de hongos. Las aplicaciones de la técnica PCR son muy amplias. En la actualidad, la PCR se utiliza en la detección e identificación de microorganismos como virus, bacterias y hongos (Aguín et al., 2001; citado en Avilés & Granja, 2014, p. 31).

### **1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN específico de un ADN molde determinado. Además del ADN molde, se necesitan dos oligonucleótidos o primers de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria al ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la Taq polimerasa. La secuencia entre las dos regiones complementarias a los primers es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie de temperaturas, donde el ADN es desnaturalizado, los primers se alinean, y se lleva a cabo la polimerización de la secuencia específica o amplificación (Rodríguez, 2006, p.104).

La nueva secuencia sintetizada ya es ahora disponible como ADN molde para el siguiente ciclo. Es así que teóricamente, por cada ciclo ocurrido, la concentración del ADN amplificado se duplica y pasados 30 ciclos, el rendimiento de la amplificación de una secuencia específica es de  $1 \times 10^9$  copias. La PCR alcanza estos resultados debido al hecho de que la reacción en cadena requiere el alineamiento específico. Un alineamiento inespecífico de los primers al ADN molde no causará el crecimiento exponencial de la secuencia específica sino más bien una amplificación lineal (Bailey & Jeger, 1992; citados en Rodríguez, 2007, p. 20).

Según Yuan et al., (2006, p.85), menciona que una PCR tiene tres fases: La fase exponencial es la, en la cual el producto incrementa exponencialmente desde que los reactivos no sean limitantes. La fase lineal se caracteriza por un incremento lineal en el producto a medida que los reactivos de la PCR se vuelven limitantes. La PCR alcanzará la fase de platea durante los últimos ciclos y la cantidad de producto no cambiará debido a que varios reactivos se han agotado.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Características del Lugar

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicado en la Panamericana Sur km 1 1/2, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

#### 2.2. Materiales y equipos

##### 2.2.1. Material biológico

**Tabla 1-2:** Cepas reactivadas del género *Trichoderma* spp., *Clonostachys* sp. y *Neopestalotiopsis* sp, de la colección existentes en el laboratorio de Fitopatología de la FRN-ESPOCH.

Nº de cepas utilizadas	Género	Código	Lugar	Aislado	Año
7	<i>Trichoderma</i> spp.	MT(1)	Chambo	Suelo	1996
		MT(2)	Chambo	Suelo	1996
		MT(3)	Chambo	Suelo	1996
		MT(4)	ESPOCH	Suelo	2019
		MT(5)	ESPOCH	Suelo	2019
		MT(6)	San Juan	Suelo	1996
		MT(7)	San Juan	Suelo	1996
1	<i>Clonostachys</i> spp.	C(5)	ESPOCH	Suelo	2019
1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	Np (1)	Yaruquíes	Fracción radical	2020

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

##### 2.2.2. Medios de cultivo

Potato Dextrosa Agar al 3,9% (PDA Difco™), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), Agua-Agar al 2,8% (AA BIOCEN), Agar-Avena al 4%, Medio mínimo

#### 2.2.2.1. *Materiales para un litro de medio mínimo*

10 g Sacarosa, 2 g Asparagina, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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.

#### 2.2.3. *Equipos de laboratorio*

Microscopio óptico (CARL ZEISS), 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), Estereoscopio (COMENTA- YVYMEN 5313309), Cámara de flujo (BIOBASE BSC-1500IIA2-X), Termociclador (EPPENDORF), Digital Vortex Mixer (FISHER SCIENTIFIC), Centrífuga 5424 (EPPENDORF), Electrophoresis Systems, Transiluminador (FISHER SCIENTIFIC), Cámara fotográfica (canon EOS REBEL T3i), Micropipeta (1000,100,10  $\mu\text{L}$ ).

#### 2.2.4. *Materiales de laboratorio*

Puntas de micropipetas (1000, 100, 10  $\mu\text{L}$ ), Cajas de Petri de plástico (80mm  $\varnothing$ ), Matraz Erlenmeyer (500 mL), Bisturí, Pinzas de laboratorio, Vaso de precipitación (100 mL), Probeta graduada (500 mL), Placas porta y cubre objeto, Mortero y pistilo, Colador plástico, Pie de rey, Tubos de ensayo

#### 2.2.5. *Insumos de laboratorio*

Alcohol al 75 % , Microtubos (1,5 y 0,2 mL), Lacto glicerol, Sulfato de estreptomicina al 1%, Chloranfenicol al 5 % , Solución de lisis nuclear (PROMEGA ©), Solución de precipitación de proteínas (PROMEGA ©), Clorofórmio-Alcohol-Isoamílico (24:1), Isopropanol (frío), Etanol 70% (frío), Solución de rehidratación de AND (PROMEGA ©), RNase (PROMEGA ©), Enzima GoTaq Colorless Master Mix, 2x (PROMEGA ©), Primers: Forward 10  $\mu\text{M}$  EF<sub>1</sub> – 728F, Reverse 10  $\mu\text{M}$  EF<sub>2</sub>, Forward 10  $\mu\text{M}$  frbp25f, Reverse 10  $\mu\text{M}$  7CR (PROMEGA ©), Agua libre de nucleasas, Tris-Borate- EDTA buffer 10x, Agua destilada estéril, Agarosa CSL-AG100, Agente intercalante UniSafe DYE (20.000X), Gel Loading buffer, Marcador molecular, Cinta Parafilm, Fundas ziploc (25x25 cm), Tarrinas plásticas transparentes, Palillos , Sorbetes, Sobres de manila, Algodón, Papel toalla, Papel filtro, Papel aluminio, Cinta adhesiva.

## **2.2.6. *Materiales y equipos de escritorio***

Laptop, Tarjeta de memoria y Papelería y útiles de oficina

## **2.3. *Metodología***

### **2.3.1. *Caracterización cultural y morfológica***

#### **2.3.1.1. *Cultivo monospórico***

El cultivo monospórico se realizó a partir de micelio esporulado de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. obtenidos en cajas Petri con medio PDA al 3,9%. En tubos de ensayo con 10 mL con agua destilada estéril se suspendieron las esporas y se agito manualmente durante 20 s, la suspensión se colocó en cajas Petri con medio Agua-Agar al 2,8% y se eliminó el exceso de la suspensión por decantación. Las cajas Petri se colocaron en posición vertical y se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 24 h. Posteriormente con el estereoscopio se observaron y se tomaron con una aguja de disección conidios individuales germinados que fueron transferidos a cajas Petri con medio de cultivo PDA al 3,9% más antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5 %), e incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

#### **2.3.1.2. *Caracterización cultural***

Para la caracterización cultural se partió de los cultivos monospóricos, se realizó cortes de discos de micelio de 5 mm de diámetro y se transfirió a cajas Petri con medio PDA al 3,9 % más antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5%), se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Así como también se evaluó la velocidad de crecimiento micelial (mm/día) cada 24 h, la textura de la colonia, el color de la colonia (anverso y reverso), pigmentación del medio y características de los bordes de la colonia.

#### **2.3.1.3. *Caracterización morfológica***

Para la caracterización morfológica se partió de los cultivos monospóricos, se realizó cortes de discos de micelio de 5 mm de diámetro y se transfirió a cajas Petri con medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) y Agar-Avena al 4% más antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5%) para inducir la formación de estructuras reproductivas, se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . En condiciones estériles se utilizó cinta adhesiva transparente y se realizó una impronta en el medio de cultivo, se transfirió a un porta-objeto que contenía una

gota de lacto-glicerol y observó al microscopio (CARL ZEISS) lente 100X, se caracterizó la forma de las siguientes estructuras: fiálides, conidios, clamidosporas y conidióforos; posteriormente se midieron el ancho y largo con el ocular micrométrico 20 conidios y fiálides. Se comparó los datos obtenidos de forma y medida con las claves taxonómicas de Samuels et al., (2015) y Sharma et al., (2014).

### **2.3.2. Caracterización Molecular**

Se realizó la extracción de ácidos nucleicos para la caracterización molecular de cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* sp. en estudio mediante el siguiente proceso:

Se colocó en un Erlenmeyer con 15 mL de medio mínimo un disco de micelio de 5 mm de diámetro de los antagonistas de cultivos monospóricos, se incubó a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 168 h, posterior se filtró el micelio dejándolo secar durante 24 h, finalmente se realizó el raspado de micelio en seco sobre papel filtro estéril, se cubrió con papel aluminio, se colocó en sobres de manila y en fundas ziploc, se etiquetó y se lo almacenó en el ultracongelador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Después se realizó la lisis física para lo cual se maceró el micelio en Nitrógeno líquido utilizando un pistilo y mortero. Se transfirió el micelio macerado a microtubos de 1,5 mL y se lo almacenó en el ultracongelador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se realizó una lisis química adicionando 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis nuclear (PROMEGA ©), vórtex por 3 s, se incubó a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min en Baño María, se invirtió los tubos cada 5 min.

Se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de solución de precipitación de proteínas (PROMEGA ©), vórtex por 20 s. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. El precipitado de proteínas formó un pellet. Se transfirió el sobrenadante (600  $\mu\text{L}$ ) conteniendo el ADN a un nuevo tubo (1,5 mL). Se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-alcohol-isoamílico. Vórtex por 20 s. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante (+/- 600  $\mu\text{L}$ ) conteniendo el ADN. Se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, cuidadosamente se mezcló la solución invirtiendo los tubos hasta observar una masa vesível de ADN (hilos pequeños). Se dejó la solución en el ultracongelador por 10 min y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min.

Se observó la formación del pellet en el fondo de los tubos. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante. Se precedió a dos lavados con etanol, para esto, en cada lavado, se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min.



Cuidadosamente se descartó el etanol. Se colocó en ambiente estéril los tubos en posición horizontal con la tapa abierta sobre papel toalla para el secado del pellet durante 24 h. Después de aproximadamente 24 h se suspendió el pellet con solución buffer (TE). Finalmente se adicionó 50 µL de solución de rehidratación de ADN y 2 µL de RNasa (PROMEGA ©) en cada tubo. Se incubó a 37 °C en Baño María por aproximadamente 3 h. Se almacenó el ADN en el ultracongelador a -40 °C.

### 2.3.2.1. PCR

Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 conjuntos de primers detallado en la siguiente tabla:

**Tabla 2-2:** Conjuntos de primers para las reacciones de PCR.

Nombre	Gen Amplificado	Secuencia
Forward 10 µM EF <sub>1</sub> – 728F	Factor de Elongación y Traducción	5'CATCGAGAAGTTCGAGAAGG3'
Reverse 10 µM EF <sub>2</sub>		3'GGARGTACCAGTSATCATGTT5'
Forward 10 µM frbp25f	RNA Polimerasa 2	5'GAYGAYMGWGATCAYTTYGG3'
Reverse 10 µM 7CR		3'CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT5'
Forward 10 µM ITS 1F	Espacios Internos Transcritos	5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3'
Reverse 10 µM ITS 4R-		3'TCCTCCGCTTATTGATATGC5'

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

Se realizó la preparación de las muestras para PCR mediante el siguiente proceso:

Se preparó un mix con los siguientes reactivos: 6,25 µL Enzima GoTaq Colorless Mater Mix, 2x, 7 µL Primer Forward 10 µM, 7 µL Primer reverse 10 µM y 3,25 µL Agua libre de nucleasas.

Seguido se colocó en tubos de 0,2 mL un volumen del mix de 11,5 µL más 1 µL de ADN para obtener un volumen de reacción de 12,5 mL, se preparó el control negativo de la PCR sustituyendo el ADN por agua ultra pura estéril.

El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente:

Se colocó las muestras en un termociclador (EPPENDORF) para el siguiente proceso.

1. Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min
2. 40 ciclos
  - Desnaturalización 95 °C por 1 min.
  - Alineación 53 °C a 55 °C por 1 min.
  - Extensión 72 °C por 1 min.

### 3. Extensión final 72 °C por 5 min.

Por último, se dejó los productos de PCR en el ultracongelador a -40 °C. Posteriormente para visualizar las amplificaciones se realizó una electroforesis. Para la electroforesis se utilizó un buffer, se diluyó el Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) a una concentración de 1X en agua destilada estéril utilizando gel de garosa al 1%. Luego se colocó el agente intercalante (UniSafe 5 µL en 100 mL de solución de agarosa) en el gel. Se vertió la solución en la cuba para formar el gel, se colocó el peine para formar los pocillos, finalmente se cubrió el gel de la luz con papel aluminio para evitar la degradación del agente intercalante, seguido se cubrió la superficie del gel con la solución buffer TBE 1X y se cargaron las muestras en los pocillos del gel. Finalmente se corrió las muestras a 80 V por 80 min, transcurrido ese tiempo se retiró el buffer del gel e inmediatamente se colocó en un Transiluminador (FISHER SCIENTIFIC) para verificar las amplificaciones de los productos de PCR.

Para la secuenciación de los productos de PCR fueron enviados al laboratorio (MACROGEN COREA), utilizando el programa SeqAssem se obtuvieron las secuencias consenso de nucleótidos y estas fueron alineadas con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica para la identificación inicial de las especies.

#### **2.3.3. Pruebas de Antagonismo**

Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la técnica de cultivo dual según Bell y Markham (1982), en cajas de Petri con medio PDA al 3,9% más antibiótico (sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5%). Para esto se reactivó 7 cepas de *Trichoderma* spp., 1 cepa de *Clonostachys* sp. y 1 cepa *Neopestalotiopsis* sp., de la colección existentes en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.

##### *2.3.1.1 Trichoderma spp. frente a Neopestalotiopsis spp.*

Utilizando sorbetes previamente esterilizados se realizó cortes de discos con micelio de 5 mm de diámetro de *Neopestalotiopsis* sp. de 10 días de crecimiento, se tomó el disco con un palillo y se sembró a 1 cm del borde de la caja Petri con medio PDA al 3,9% más antibiótico (sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5%), luego se sembró en forma opuesta un disco con micelio de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. de 3 días de crecimiento a 1 cm del borde de la caja Petri. El antagonista se sembró a las 72 h después de la siembra del patógeno. Como control de la confrontación se utilizaron cultivos individuales tanto del antagonista como del patógeno.

Se realizó mediciones del diámetro vertical y horizontal cada 24 h del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* spp. ante el crecimiento micelial de la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. hasta las 120 h de incubación a una temperatura de 25 °C ± 1.

#### 2.3.1.2. *Clonostachys* spp. frente *Neopestalotiopsis* spp.

Utilizando sorbetes previamente esterilizados se realizó cortes de discos con micelio de 5 mm de diámetro de *Neopestalotiopsis* sp. de 10 días de crecimiento, se tomó el disco con un palillo y se sembró a 1 cm del borde de la caja Petri con medio PDA al 3,9% más antibiótico (sulfato de estreptomicina al 1% más Chloranfenicol al 5%), luego se sembró en forma opuesta un disco con micelio de 5 mm de diámetro de *Clonostachys* spp. de 10 días de crecimiento a 1 cm del borde de la caja Petri. El antagonista sembró a las 72 h después de la siembra del patógeno. Como control de la confrontación se utilizaron cultivos individuales tanto del antagonista como del patógeno.

Se realizó mediciones del diámetro vertical y horizontal cada 24 h del crecimiento micelial de las cepas de *Clonostachys* spp. ante el crecimiento micelial de la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. hasta las 312 h de incubación a una temperatura de 25 °C ± 1.

#### 2.3.4. **Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial**

El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial se determinó a través de la fórmula empleada por Ezziyani et al (2004: pp. 69-78), con algunas modificaciones.

$$PICR = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

**Donde:**

D1= diámetro mayor (diámetro del patógeno testigo)

D2= diámetro menor (diámetro del patógeno en enfrentamiento con el antagonista)

#### 2.3.5. **Micoparasitismo del Antagonista frente al Patógeno**

El micoparasitismo se evaluó mediante observaciones macroscópicas del cultivo dual y se estimó el índice de micoparasitismo usando la escala de Bell et al., (1982: pp. 379-382).

**Tabla 3-2:** Escala de Bell et al., (1982: pp. 379-382), para evaluar el micoparasitismo.

<b>Grado</b>	<b>Micoparasitismo</b>	<b>Porcentaje de cubrimiento del antagonista de la superficie del medio</b>
1	El antagonista invade completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno.	100%
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	75%
3	El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.	50%
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja de Petri.	25%
5	El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la placa de Petri.	0%

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2021.

### **2.3.6. Análisis de datos**

Para la caracterización morfológica de los antagonistas se utilizó estadística descriptiva (se obtuvo la media y la desviación estándar de las estructuras analizadas).

Para la caracterización molecular se realizó árboles filogenéticos utilizando inferencia de máxima verosimilitud.

Para el análisis de las variables que estudiaron la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. frente a *Neopestalotiopsis* spp. se realizó un análisis de varianza (ADEVA) bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA), para la separación de medias y se usó la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%.

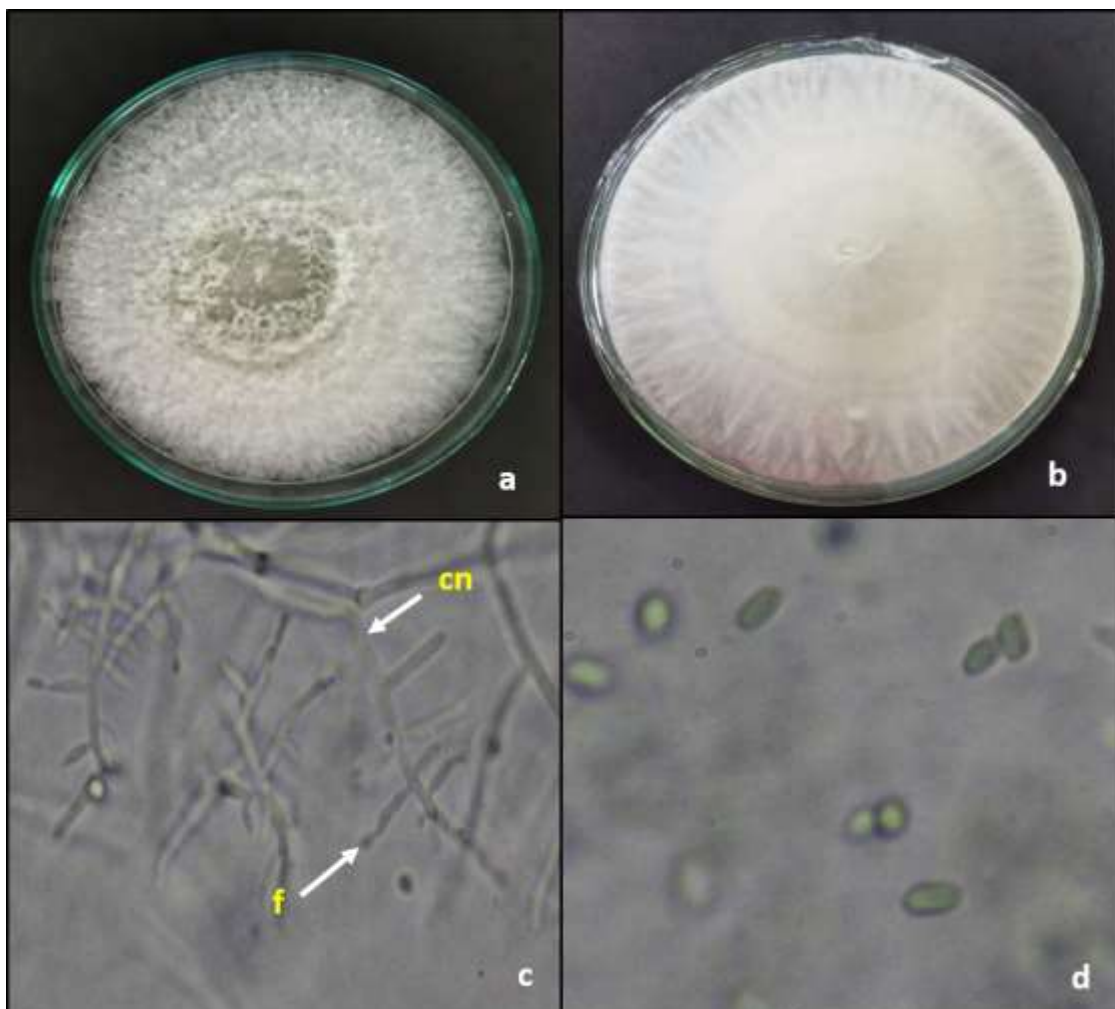
## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

##### 3.1.1. Caracterización morfológica

##### 3.1.1.1. *Trichoderma* spp. cepa MT (1)



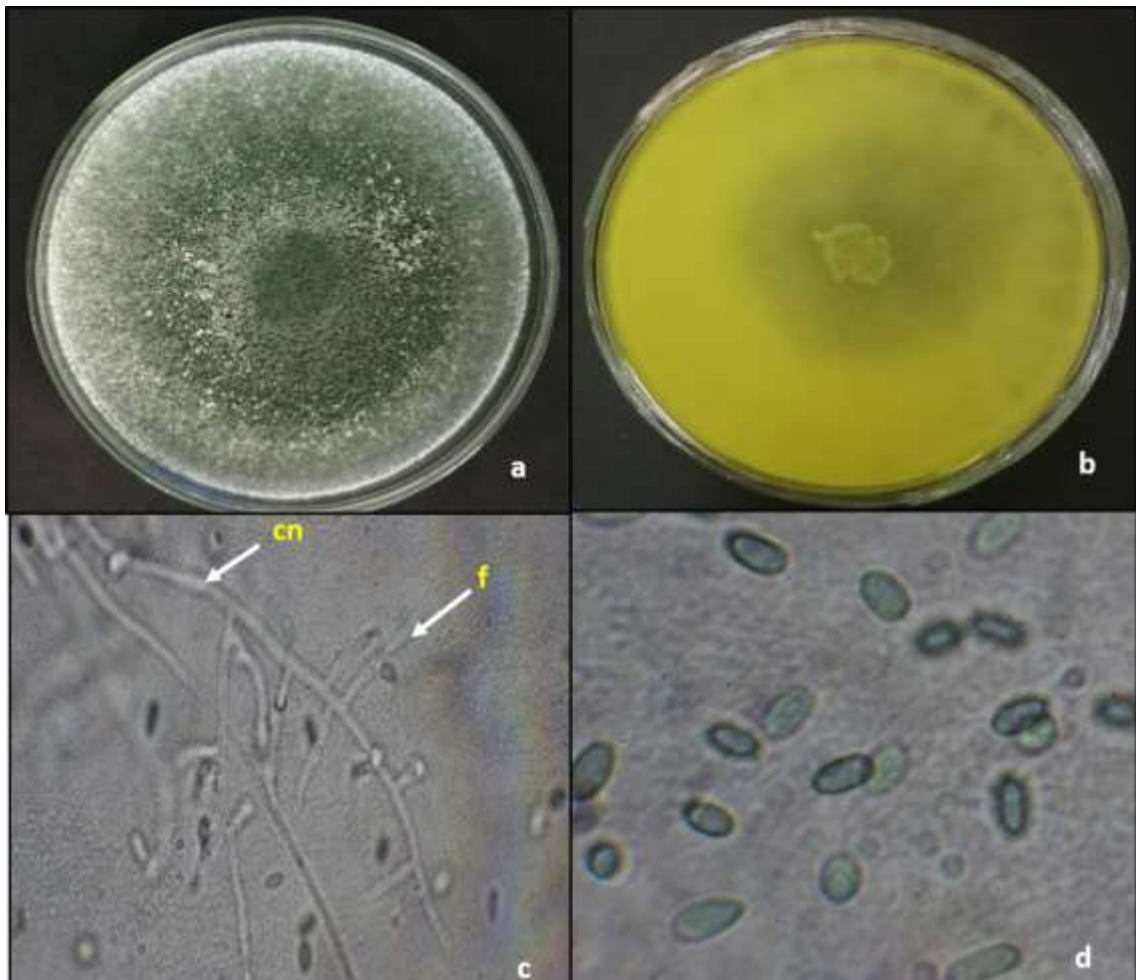
**Figura 1-3.** Características culturales de la cepa MT 1 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (c, d)

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (1) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a 25°C± 1, con una tasa de crecimiento micelial de 15,72 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa (**Figura 1-3 a, b**). Posteriormente presentó una tonalidad verde intensa, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, sin pigmentación amarilla difusa del medio.

Se observó conidióforos largos con fiálides solitarias de forma cilíndrica al menos no notoriamente de cuello estrecho midiendo de 7,1 µm de largo x 2,3 µm de ancho (**Figura 1-3 c**). Conidios de forma elipsoidal, lisos de color verde claro midiendo de 4,6 µm de largo x 2,3 µm de ancho (**Figura 1-3 d**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (1) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

3.1.1.2. *Trichoderma* spp. cepa MT (2)



**Figura 2-3.** Características culturales de la cepa MT 2 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia (a,b) Características morfológicas. Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (c,d)

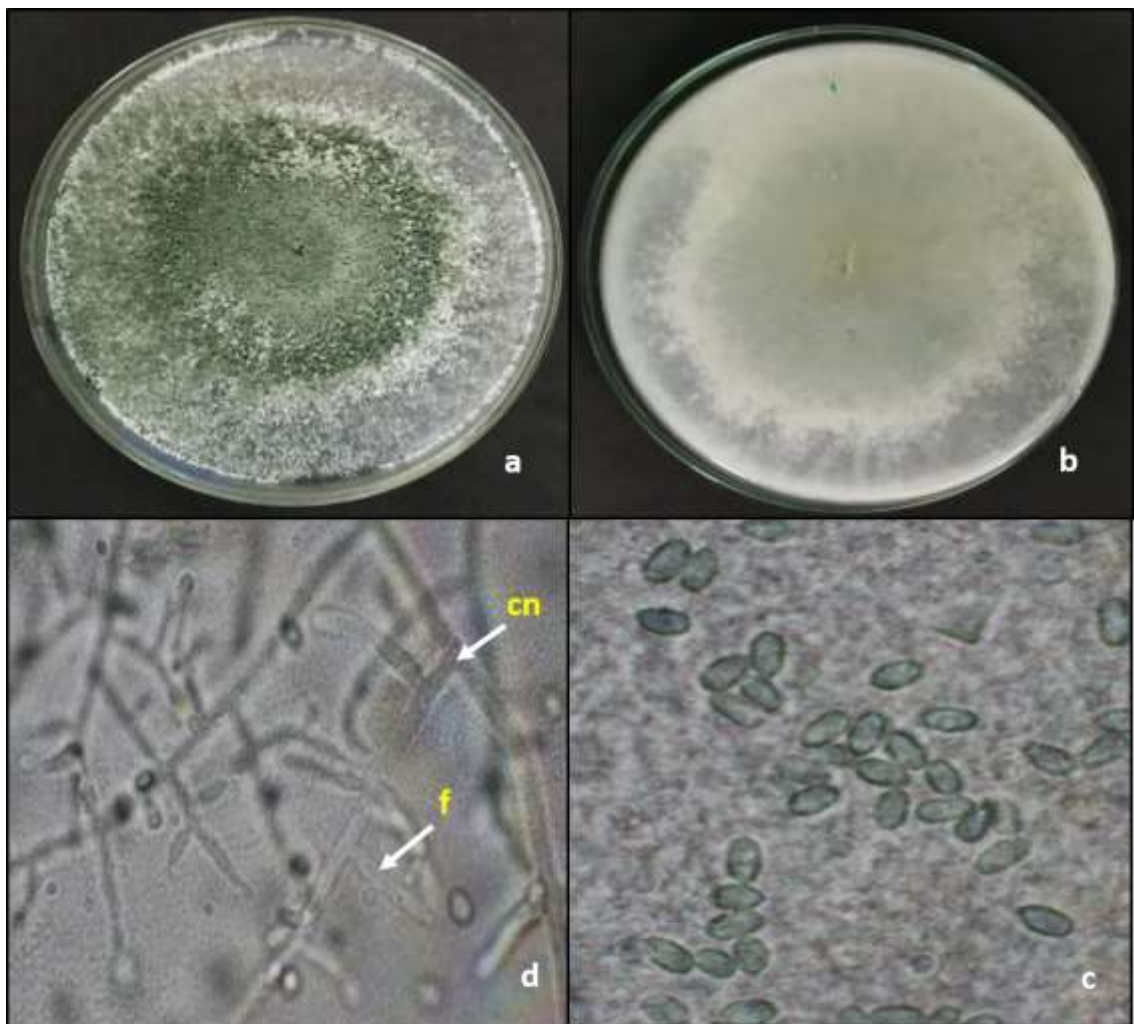
**Realizada por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (2) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , con una tasa de crecimiento micelial de 11,8 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde oscura, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, con pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 2-3 a, b**).

Se observó conidióforos largos con muchas fiálides solitarias de forma cilíndrica a lanqueliformes al menos no notoriamente de cuello estrecho midiendo de  $7,05 \mu\text{m}$  de largo x  $3 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 2-3 c**). Conidios de forma elipsoidal, lisos de color verde oscuro midiendo de  $4,4 \mu\text{m}$  de largo x  $2,4 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 2-3 d**). Basados en las características culturales y

morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (2) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

### 3.1.1.3. *Trichoderma* spp. cepa MT (3)



**Figura 3-3.** Características culturales de la cepa MT 3 en PDA, Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (d, c).

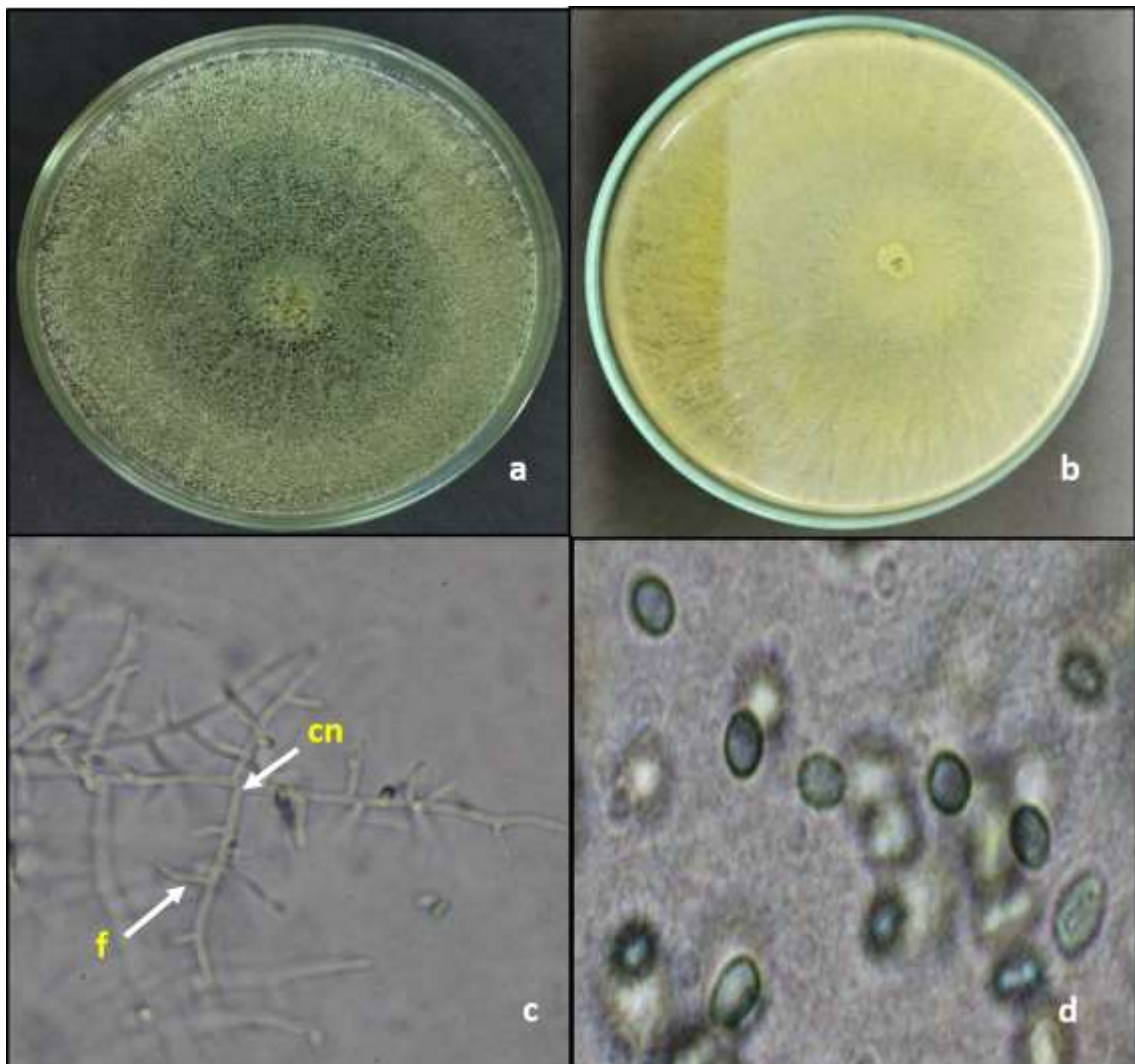
**Realizada por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.



La cepa de *Trichoderma* spp. MT (3) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a 25°C± 1, con una tasa de crecimiento micelial de 15,72 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde oscura, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, sin pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 3-3 a, b**).

Se observó conidióforos largos con muchas fiálides solitarias de forma cilíndrica al menos no notoriamente de cuello estrecho midiendo de 6,4 µm de largo x 2,3 µm de ancho (**Figura 3-3 c**). Conidios de forma elipsoidal, lisos de color verde oscuro midiendo de 4,5 µm de largo x 2,3 µm de ancho (**Figura 3-3 d**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (3) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

3.1.1.4. *Trichoderma* spp. cepa MT (4)



**Figura 4-3.** Características culturales de la cepa MT 4 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas. Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (c, d)

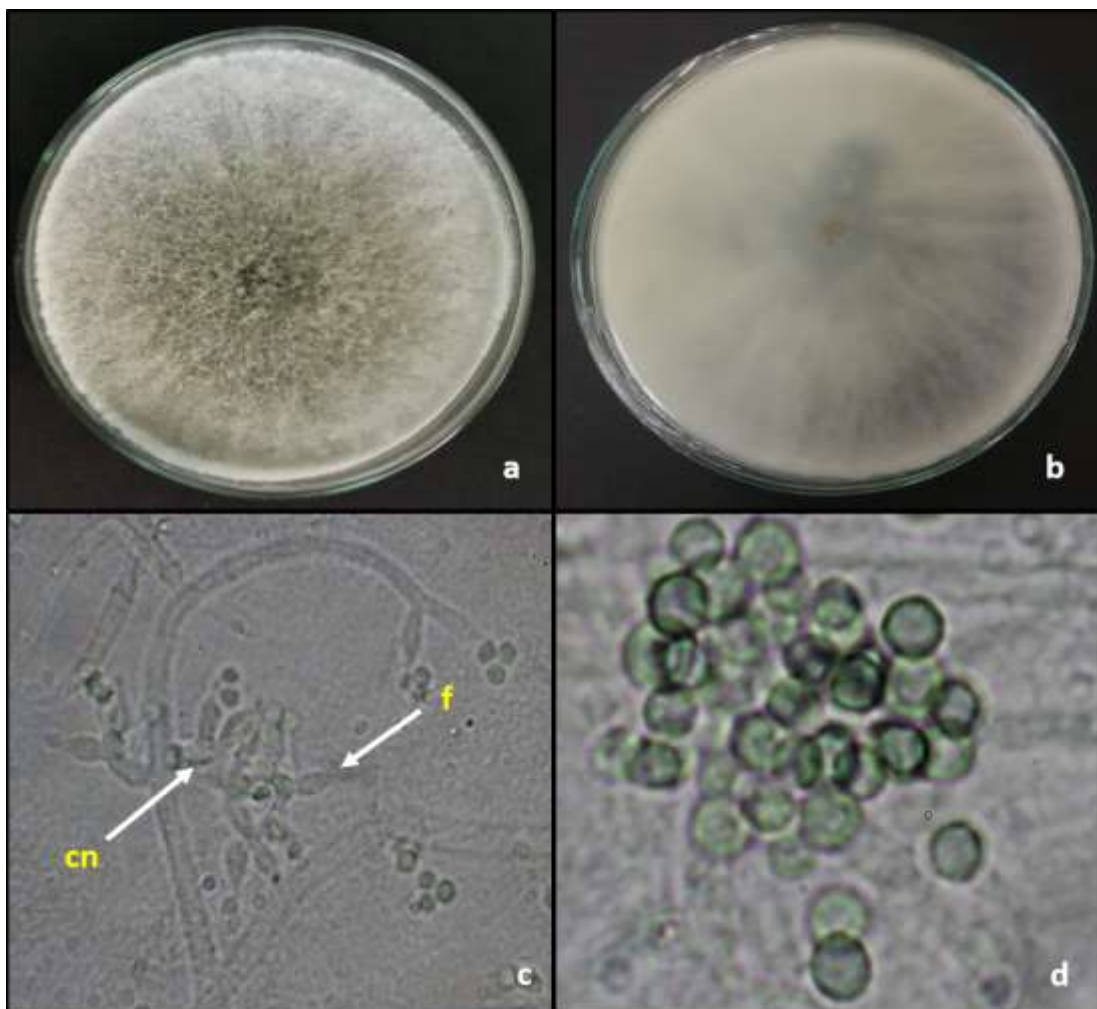
**Realizada por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (4) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , con una tasa de crecimiento micelial de 15,72 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde-amarillenta, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, con pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 4-3 a, b**).

Se observó conidióforos con ramas principales largas a su vez estas tienen algunas ramas cortas delgadas e irregulares con fiálides solitarias de forma cilíndrica al menos no notoriamente de cuello estrecho midiendo de  $6,4 \mu\text{m}$  de largo x  $2,2 \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 4-3 c**). Conidios de

forma elipsoidal, lisos de color verde claro midiendo de 4,4  $\mu\text{m}$  de largo x 2,4  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 4-3 d**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (4) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

### 3.1.1.5. *Trichoderma* spp. cepa MT (5)



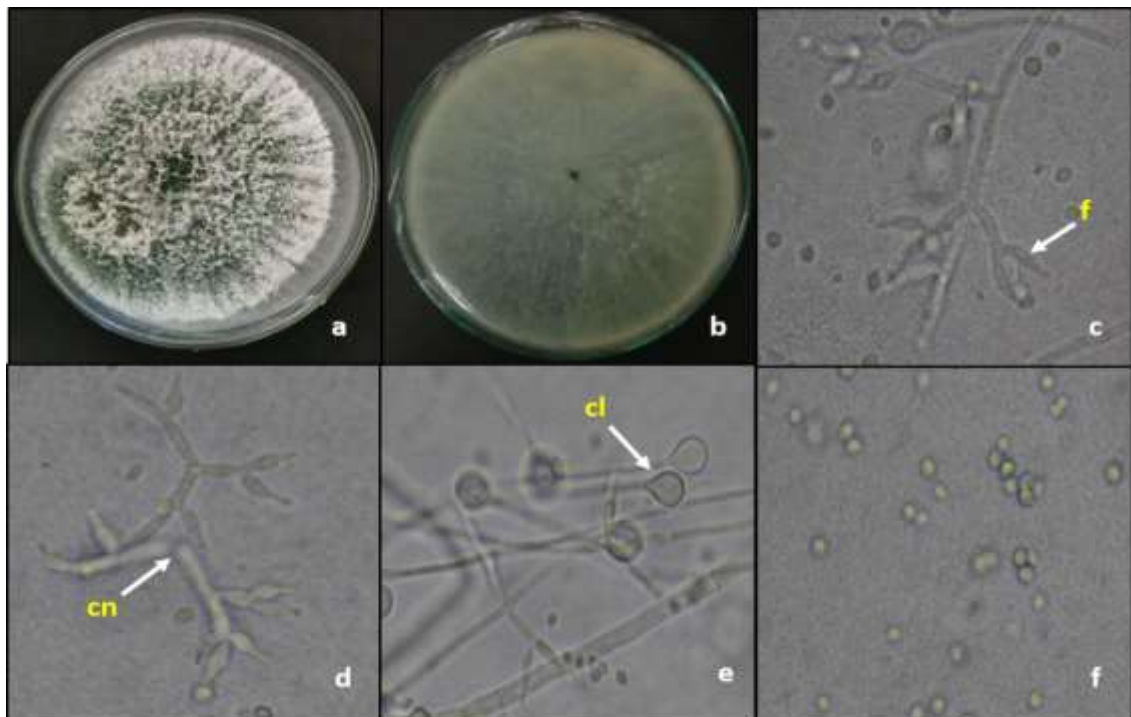
**Figura 5-3.** Características culturales de la cepa MT 5 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas. Conidióforos cn y Fiálides f, conidios (c, d)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (5) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ , con una tasa de crecimiento micelial de 13,1 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde oscura, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, sin pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 5-3 a, b**).

Se observó conidióforos gruesos y cortos recogidos en penachos con fiálides de forma ampuliformes notoriamente de cuello estrecho midiendo de  $6,7\ \mu\text{m}$  de largo x  $3,2\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 5-3 c**). Conidios de forma sub-globosos, lisos, pequeños midiendo de  $3\ \mu\text{m}$  de largo x  $2,6\ \mu\text{m}$  de ancho (**Figura 5-3 d**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (5) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

#### 3.1.1.6. *Trichoderma* spp. cepa MT (6)



**Figura 6-3.** Características culturales de la cepa MT 6 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas. Conidióforos cn, Fiálides f, Clamidosporas cl, conidios (c, d, e, f).

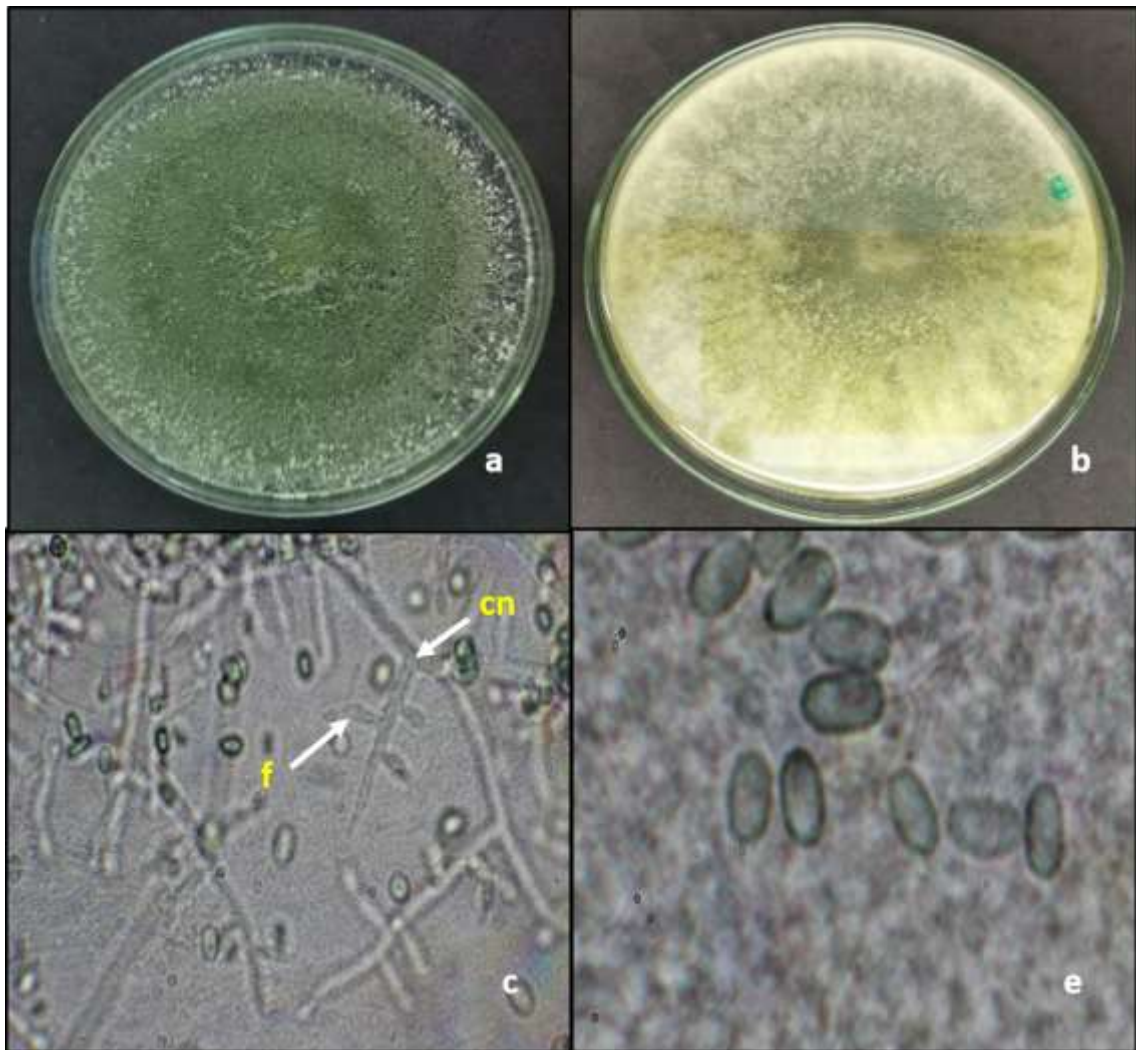
**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (6) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a 25°C± 1, con una tasa de crecimiento micelial de 15,72 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde oscura, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, sin pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 6-3 a, b**).

Se observó conidióforos con ramas muy espaciadas formadas de 3 a 4 fiálides de forma ampuliformes fuertemente contraídos en el cuello midiendo de 6,8 µm de largo x 3 µm de ancho (**Figura 7-3 c, d**). Clamidosporas terminales de forma globosas a sub-globosas (**Figura 6-3 e**). Conidios de forma sub-globosos a ovoideos, pequeños midiendo de 3,1 µm de largo x 2,8 µm de ancho de color verde claro (**Figura 6-3 f**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (6) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.



3.1.1.7. *Trichoderma* spp. cepa MT (7)



**Figura 7-3.** Características culturales de la cepa MT 7 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas. Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (c, e)

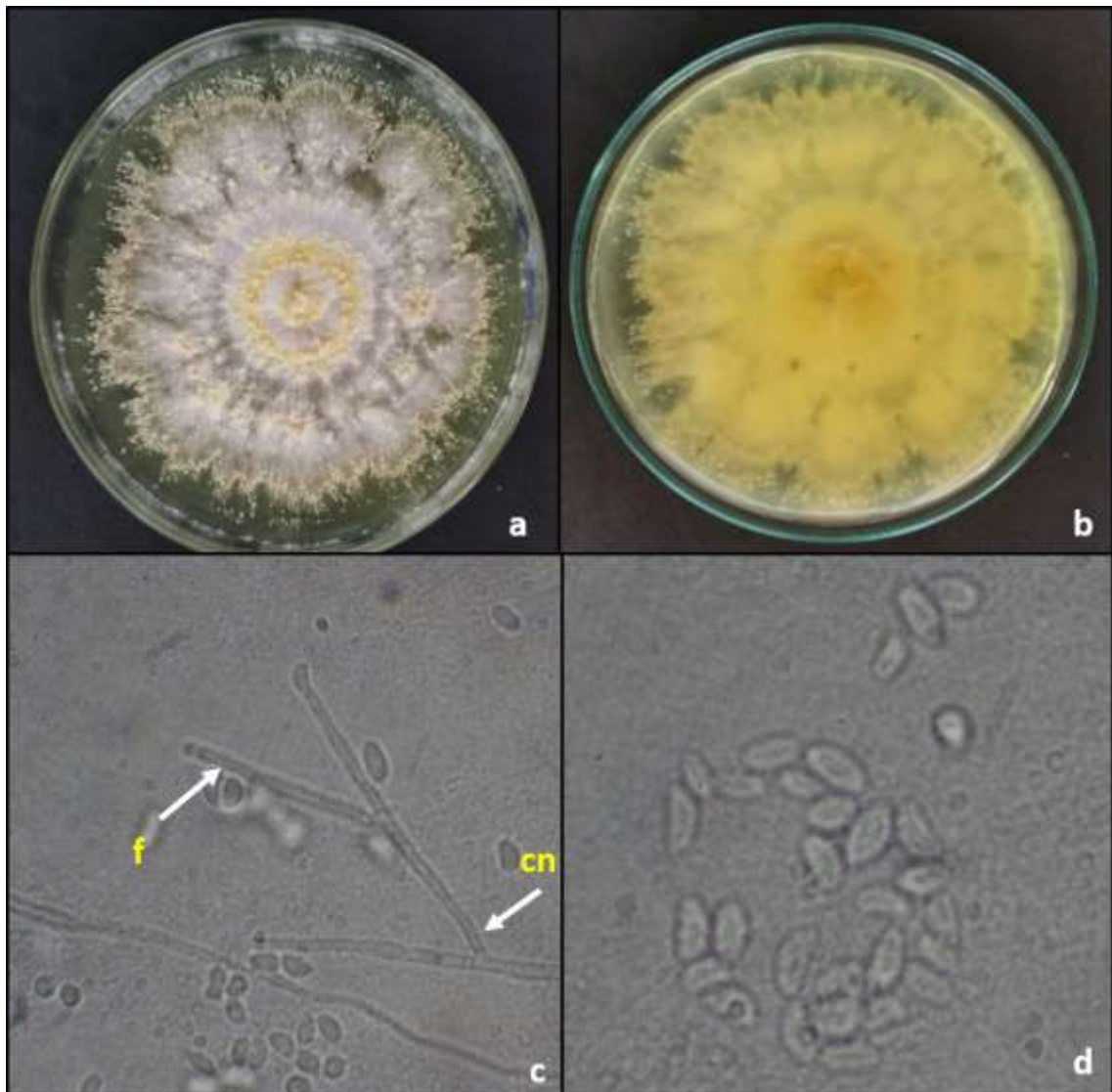
**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Trichoderma* spp. MT (7) creció en medio de cultivo PDA de forma rápida a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , con una tasa de crecimiento micelial de 8,73 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente se observó en el anverso como el reverso una coloración blanca de textura lanosa. Posteriormente presentó una tonalidad verde-amarillenta, márgenes ondulados, textura principalmente semi compacta lanosa, con pigmentación amarilla difusa del medio (**Figura 7-3 a, b**).

Se observó conidióforos largos con fiálides solitarias de forma lageniforme al menos no notoriamente de cuello estrecho midiendo de 7  $\mu\text{m}$  de largo x 3  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 7-3 c**).

Conidios de forma elipsoidal, lisos midiendo de 3,9  $\mu\text{m}$  de largo x 3,7  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 7-3 d**). Basados en las características culturales y morfológicas de la cepa de *Trichoderma* spp. MT (7) obtenidos en el estudio, fueron similares a las expuestas por Samuels et al., (2015) & Sharma et al., (2014), que mencionan que las colonias de *Trichoderma* spp. son compactas anormales de tonalidades que varían del verde a un verde intenso a un verde muy oscuro; además algunas especies como *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* presentan pigmento amarillo difuso en el reverso de la caja de Petri; así como también otras que no presentan pigmentación como es el caso de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, etc.

### 3.1.1.8. *Clonostachys* spp. cepa C (5)



**Figura 8-3.** Características culturales de la cepa C 5 en PDA. Color del anverso y reverso de la colonia (a, b) Características morfológicas. Conidióforos cn, Fiálides f, conidios (c, d)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

La cepa de *Clonostachys* spp. C (5), creció de forma lenta en medio PDA a 25 °C±1, con una tasa de crecimiento micelial de 3,74 mm. día (**Tabla 3-3**). Inicialmente presenta una coloración blanca, margen lobulado y textura algodonosa, posterior tomó una tonalidad amarillo-naranja (**Figura 8-3 a, b**). Se observó conidióforos de forma verticilada con fiálides largas a manera de espiga en la parte inferior anchas y delgadas en el ápice, conidios hialinos ligeramente curvadas con un lado poco aplanado midiendo de 4,7 de largo x 2,6 (**Figura 8-3 c, d**). Basadas en las características morfológicas de la cepa de *Clonostachys* spp. C (5), son semejantes a lo estudiado por Ebrahimi (2016; citado en Toaquiza, 2021: pp. 35-36), en donde manifiesta que las colonias de *Clonostachys* spp. presentan un micelio de color blanco algodonoso y conforme envejece se torna amarillo y en el revés de la caja una pigmentación naranja pálido. Los conidióforos verticilados son los primeros en formarse con fiálides largas y divergentes, las conidias son hialinas, lisas, ligeramente curvadas con un lado poco aplanado miden entre 4,2-6,5 por 2,1-3,3 µm (Piontelli & Guisiano, 2003; citado en Santa Cruz, 2017: pp. 12-13).



**Tabla 1-3:** Identificación Morfológica de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. de las cepas de acuerdo con las medidas largo y ancho de conidios y fiálides.

Cepa	Conidios						Fiálides					
	Largo (µm)			Ancho (µm)			Largo (µm)			Ancho (µm)		
	Máximos	Mínimos	$\bar{x}$	Máximos	Mínimos	$\bar{x}$	Máximos	Mínimos	$\bar{x}$	Máximos	Mínimos	$\bar{x}^1$
C (5)	5,3	4,1	4,7	3,1	2,1	2,6	15,2	9,5	12,3	1,5	0,5	1
MT (1)	4,7	4,5	4,6	2,5	2,2	2,3	8,7	5,5	7,1	2,5	2,2	2,35
MT(2)	4,6	4,3	4,4	2,7	2,2	2,4	8,8	5,3	7,0	3,5	2,5	3,00
MT(3)	4,6	4,4	4,5	2,5	2,2	2,3	7,5	5,3	6,4	2,5	2,2	2,35
MT(4)	4,6	4,4	4,5	2,5	2	2,2	7,5	5,3	6,4	2,5	2,2	2,35
MT(5)	3,5	2,5	3,	2,8	2,5	2,6	7,3	6,2	6,7	3,4	3	3,20
MT(6)	3,5	2,7	3,1	3,4	2,2	2,8	7,5	6,2	6,8	3,5	2,5	3,00
MT(7)	4,5	3,3	3,9	4,2	3,2	3,7	8,3	5,7	7	3,5	2,5	3,00

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

<sup>1</sup>  $\bar{x}$ = Promedio de 20 estructuras

### 3.1.2. Caracterización molecular

Las secuencias de nucleótidos obtenidas y alineadas con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica indicaron que se trata de cuatro especies del género *Trichoderma*. La cepa MT (1) corresponde a la especie *T. gamsii* (Rpb<sub>2</sub>) con 86,28% de identidad. MT (2) corresponde a la especie *T. longibrachiatum* (EF) con 99,80% de identidad y *T. longibrachiatum* (Rpb<sub>2</sub>) con 99,91 % de identidad. MT (3) corresponde a la especie *T. longibrachiatum* (EF) con 87,33% de identidad y *T. longibrachiatum* (Rpb<sub>2</sub>) con 99,91 % de identidad. MT (4) corresponde a la especie *T. bissettii* (EF) con 97,33% de identidad, *T. longibrachiatum* (EF) con 97,33% de identidad y *T. longibrachiatum* (ITS) con 99,83 % de identidad. MT (5) corresponde a la especie *T. harzianum* (EF) con 99,36% de identidad. MT (7) corresponde a la especie *T. bissettii* (EF) con 94,22% de identidad, *T. longibrachiatum* (EF) con 94,38% de identidad y *T. longibrachiatum* (Rpb<sub>2</sub>) con 99,72 % de identidad. Para *Clonostachys* sp. C (5) con 99,73% de identidad corresponde a la especie *Clonostachys rosea* (EF) (**Tabla 2-3**).

Según Chaverri et al., (2015), menciona que la identificación molecular es un procedimiento adoptar cuando no es posible obtener el 100% de identidad de la secuencia de interés con alguna secuencia de referencia en la base de datos. Los valores de identidad en el rango del 99% para *tef1* y *rpb2*, y correspondientes a un solo nombre en la base de datos, aún pueden considerarse positiva. En el caso de valores inferiores al 99% de identidad (asumiendo que hay una buena cobertura de la secuencia objetivo y un valor estimado del parámetro E-value cercano a cero), y cuando se quiere tener una confirmación más robusta de la identificación, se sugiere la composición de un alineamiento múltiple con secuencias *tef1* y/o *rpb2* de los aislados a identificar y de aislados de referencias de especies cercanas a las obtenidas en el resultado del GenBank, seguido de la realización de análisis filogenéticos con protocolos comúnmente utilizado en la taxonomía de *Trichoderma*. De acuerdo a lo mencionado se puede confirmar que las cepas MT (2), MT (3) y MT (7) para *rpb2* presentaron una buena cobertura de la secuencia objetivo con un valor de 100% (**Tabla 2-3**) y realizando análisis filogenéticos, estas se encontraron dentro del clado *longibrachiatum* especie *T. longibrachiatum* (**ANEXO F**). En el caso de la cepa MT (1) que sugiere *T. gamsii* en *rpb2* no presentó una buena cobertura de la secuencia objetivo con un valor de 58% (**Tabla 2-3**) y el tamaño de la secuencia fue muy pequeña (**ANEXO E**), por lo que no permitió una identificación tan clara mediante BLAST ni mediante filogenia.

**Tabla 2-3:** Identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. alineados con las especies mantenidas en la base de datos del BLAST

Hongo	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
MT (1)	RNA Polimerasa 2 (Rpb <sub>2</sub> )	391	<i>T. gamsii</i>	MF043076.1	86,28%	57%	Colección	Sudáfrica
			<i>T. gamsii</i>	MF043084.1	85,53%	58%	Colección	Sudáfrica
			<i>T. gamsii</i>	MF043074.1	85,40%	57%	Colección	Sudáfrica
			<i>T. gamsii</i>	MF043068.1	85,40%	57%	Colección	Sudáfrica
MT (2)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	506	<i>T. longibrachiatum</i>	MH208265.1	99,80%	100%	Colección	Turquía
			<i>T. longibrachiatum</i>	MH208264.1	99,80%	100%	Colección	Turquía
			<i>T. longibrachiatum</i>	MF782844.1	99,80%	100%	Colección	Polonia
			<i>T. longibrachiatum</i>	KJ467815.1	99,80%	100%	Colección	Italia
	RNA Polimerasa 2 (Rpb <sub>2</sub> )	1078	<i>T. longibrachiatum</i>	MZ241240.1	99,91%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MT444432.1	99,81%	100%	Colección	China

			<i>T. longibrachiatum</i>	MZ361839.1	99,81%	99%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MK355393.1	99,63%	99%	Colección	China
MT (3)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	449	<i>T. longibrachiatum</i>	EU401612.1	87,33%	97%	Colección	Austria
			<i>T. longibrachiatum</i>	EU401611.1	87,33%	97%	Colección	Austria
			<i>T. longibrachiatum</i>	MH249945.1	87,30%	97%	Colección	Hungría
			<i>T. longibrachiatum</i>	KX912214.1	87,30%	79%	Colección	Corea del Sur
	RNA Polimerasa 2 (Rpb <sub>2</sub> )	1073	<i>T. longibrachiatum</i>	MZ241240.1	99,91%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MZ361839.1	99,81%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MT444432.1	99,81%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	KJ665291.1	99,72%	100%	Material vegetal	Austria
MT (4)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	592	<i>T. bissettii</i>	MN641029.1	97,33%	100%	Colección	Austria
			<i>T. longibrachiatum</i>	MK179408.1	97,33%	100%	Colección	China
			<i>T. bissettii</i>	MH249955.1	97,33%	100%	Colección	Hungría
			<i>T. bissettii</i>	MH249954.1	97,33%	100%	Colección	Hungría
	Espacios Internos	587	<i>T. longibrachiatum</i>	MT520608.1	99,83%	100%	Colección	Francia

	Transcritos ITS		<i>T. longibrachiatum</i>	MT428423.1	99,83%	100%	Colección	Francia
			<i>T. longibrachiatum</i>	MT276110.1	99,83%	100%	Colección	Polonia
			<i>T. longibrachiatum</i>	MT276059.1	99,83%	100%	Colección	Polonia
MT (5)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	476	<i>T. harzianum</i>	MN580170.1	99,36%	98%	Suelo	Corea del Sur
			<i>T. harzianum</i>	MK050521.1	99,36%	98%	Colección	Italia
			<i>T. harzianum</i>	MK050519.1	99,36%	98%	Colección	Italia
			<i>T. harzianum</i>	MH397726.1	99,36%	98%	Colección	Tailandia
MT (7)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	621	<i>T. longibrachiatum</i>	MT881862.1	94,38%	100%	Colección	Francia
			<i>T. longibrachiatum</i>	EU401589.1	94,38%	100%	Colección	Austria
			<i>T. longibrachiatum</i>	EU401587.1	94,38%	100%	Colección	Austria
			<i>T. bissettii</i>	MN641029.1	94,22%	100%	Colección	Austria
	RNA Polimerasa 2 (Rpb <sub>2</sub> )	1065	<i>T. longibrachiatum</i>	MZ241240.1	99,72%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MZ361839.1	99,62%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	MT444432.1	99,62%	100%	Colección	China
			<i>T. longibrachiatum</i>	KJ665291.1	99,53%	100%	Material vegetal	Austria

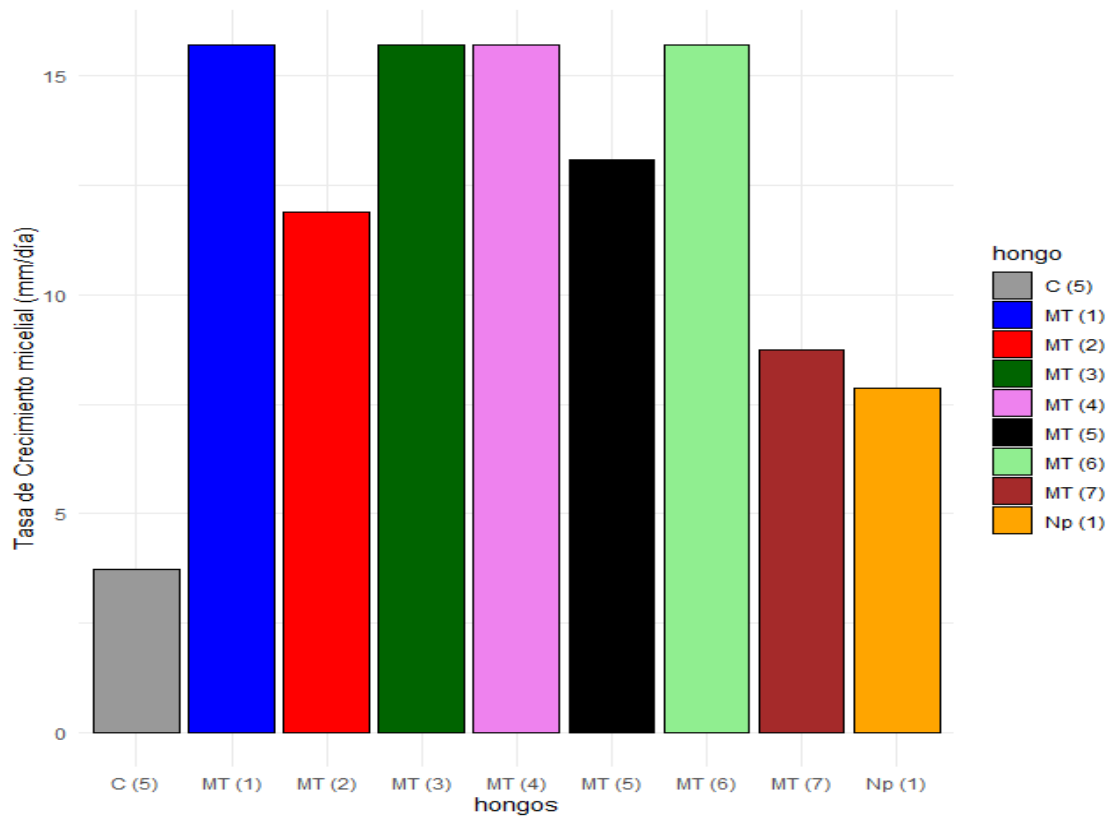
C (5)	Factor de Elongación y Traducción (EF)	375	<i>Clonostachys rosea</i>	KX185001.1	99.73%	100%	Colección	Brasil
			<i>Clonostachys rosea</i>	KX184998.1	99.47%	100%	Colección	Brasil
			<i>Clonostachys rosea</i>	KX184995.1	99.47%	100%	Colección	Brasil
			<i>Clonostachys rosea</i>	KX185000.1	99.20%	100%	Colección	Brasil

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

**Tabla 3-3:** Tasa de crecimiento micelial, clasificación del antagonismo y porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. y *Neopestalotiopsis* spp.

Cepa	Código	Clasificación de antagonismo	Tasa de crecimiento micelial (mm. día)	Porcentaje de inhibición
<i>Trichoderma</i> spp.	MT (1)	2	15,72	54,7
	MT (2)	2	11,8	52,9
	MT (3)	2	15,72	53,5
	MT (4)	3	15,72	56,4
	MT (5)	1	13,1	55,5
	MT (6)	1	15,72	59,7
	MT (7)	2	8,73	55,2
<i>Clonostachys</i> spp.	C (5)	4	3,74	30,1
<i>Neopestalotiopsis</i> spp.	Np (1)	-	7,86	-

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022



**Gráfico 1-3.** Tasa de crecimiento micelial en (mm/día) de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. y *Neopestalotiopsis* spp.

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022.

Las medias de la tasa de crecimiento micelial (mm/día) de las cepas de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp, y *Neopestalotiopsis* spp, al realizar el análisis de varianza (ADEVA) el p-valor < 0,01 indicó que existieron diferencias significativas entre la tasa de crecimiento de las distintas cepas (**Tabla 4-3**). El mayor crecimiento micelial obtuvo las cepas de *Trichoderma* spp. MT (1), MT (3), MT (4) y MT (6) con 15,72 mm/día, por otro lado, la cepa de *Clonostachys* sp. C (5) obtuvo el menor crecimiento micelial con 3,74 mm. día (**Grafico 1-3**).

La prueba de rangos múltiples Tukey = 0,05 para las distintas cepas (**Tabla 5-3**) presentaron seis grupos estadísticos; en el grupo “**a**” tenemos a las cepas MT (1), MT (3), MT (4) y MT (6) con una media de 15,72; en el grupo “**ab**” encontramos a la cepa MT (5) con una media de 13,10; en el grupo “**bc**” las cepa MT (2) con una media de 11,89; en el grupo “**cd**” la cepa MT (7) con una media de 8,73; en el grupo “**d**” la cepa Np (1) con una media de 7,86 y en el grupo “**e**” la cepa C (5) con una media de 3,74.

**Tabla 4-3:** Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. y *Neopestalotiopsis* spp.

F.V	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
Hongos	457,7	8	57,21	41,08	> 0,01	**
Error	25,1	18	1,39			

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

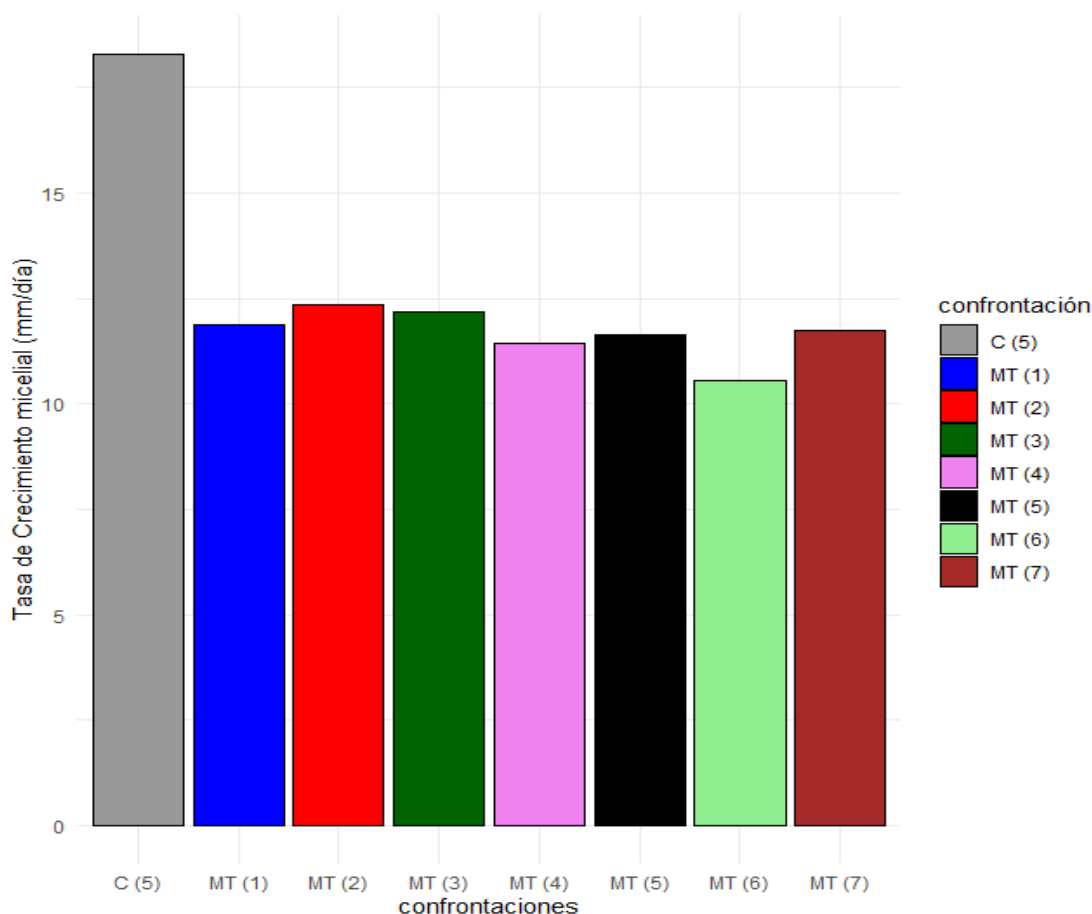
**Nota:** p-valor: > 0,01 y > 0,05: ns (No significativo), p-valor: > 0,01 y < 0,05: \* (Significativo), p-valor: < 0,01 y < 0,05: \*\* (Altamente significativo).

**Tabla 5-3:** Test de Tukey al 0,05 de la tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. y *Neopestalotiopsis* spp.

Hongos	Medias	n	Rangos de significancia
MT (1)	15,72	3	<b>a</b>
MT (3)	15,72	3	<b>a</b>
MT (4)	15,72	3	<b>a</b>
MT (6)	15,72	3	<b>a</b>
MT (5)	13,10	3	<b>ab</b>
MT (2)	11,89	3	<b>bc</b>
MT (7)	8,73	3	<b>cd</b>
Np (1)	7,86	3	<b>d</b>
C (5)	3,74	3	<b>e</b>

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.





**Gráfico 1-3.** Tasa de crecimiento micelial en de la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en confrontación con *Trichoderma* spp. MT (1,2,3,4,5,6,7) y *Clonostachys* spp. C (5).

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

Se aprecia que la tasa de crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Clonostachys* sp. C (5) fue mayor en comparación a los enfrentamientos de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Trichoderma* spp. MT (1), MT (2), MT (3), MT (4), MT (5), MT (6), MT (7) (**Gráfico 2-3**). En cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) ejercida por las cepas de *Trichoderma* spp. MT (1), MT (2), MT (3), MT (4), MT (5), MT (6), MT (7) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ; se obtuvo porcentajes entre 52,9% y 59,7%, mientras que para la cepa de *Clonostachys* sp. C (5) se obtuvo el 30,1% (**Tabla 3-3**).

Los resultados obtenidos fueron comparados con estudios de antagonismo “*in vitro*” realizados por Arbito (2017: p. 53), que menciona que cepas de *Trichoderma* sobre *Fusarium* presentan un porcentaje de inhibición de crecimiento micelial entre el 50 y 67%, sin embargo, Magdama (2010; citado en Mejía & Alvarado, 2016: p.41) en estudio de efecto de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de *M. roreri*, obtuvo porcentajes de inhibición en un rango que varió de 89,57 % a 100 %.

Para el Antagonista *Clonostachys* spp. Zaldúa et al., (2012 citado en Mejia y Alvarado, 2016: p.29) reporta en bioensayos con *Botrytis cinerea*, inhibición de 27 % en condición de temperatura a 25 °C, mientras que Rodríguez & Chico (2013) y Flores et al., (2015) reportan inhibición de 63,95 % y 11,32 % respectivamente. Sin embargo, al realizar el análisis de varianza (ADEVA) el p-valor > 0,01 indicó que no existieron diferencias significativas entre los distintos enfrentamientos (**Tabla 6-3**).

La prueba de rangos múltiples Tukey = 0,05 para los distintos enfrentamientos (**Tabla 7-3**) presentó un grupo estadístico; grupo “a” tanto para la confrontación de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Clonostachys* sp. C (5) y *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Trichoderma* spp. MT (1), MT (2), MT (3), MT (4), MT (5), MT (6), MT (7).

**Tabla 6-3:** Análisis de varianza de Tasa de crecimiento micelial de la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en confrontación con *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. C (5).

F.V	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
<b>Confrontación</b>	121,2	7	17,309	2,104	> 0,01	ns
<b>Error</b>	131,6	16	8,227			

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

**Nota:** p-valor: > 0,01 y > 0,05: ns (No significativo), p-valor: > 0,01 y < 0,05: \* (Significativo), p-valor: < 0,01 y < 0,05: \*\* (Altamente significativo).

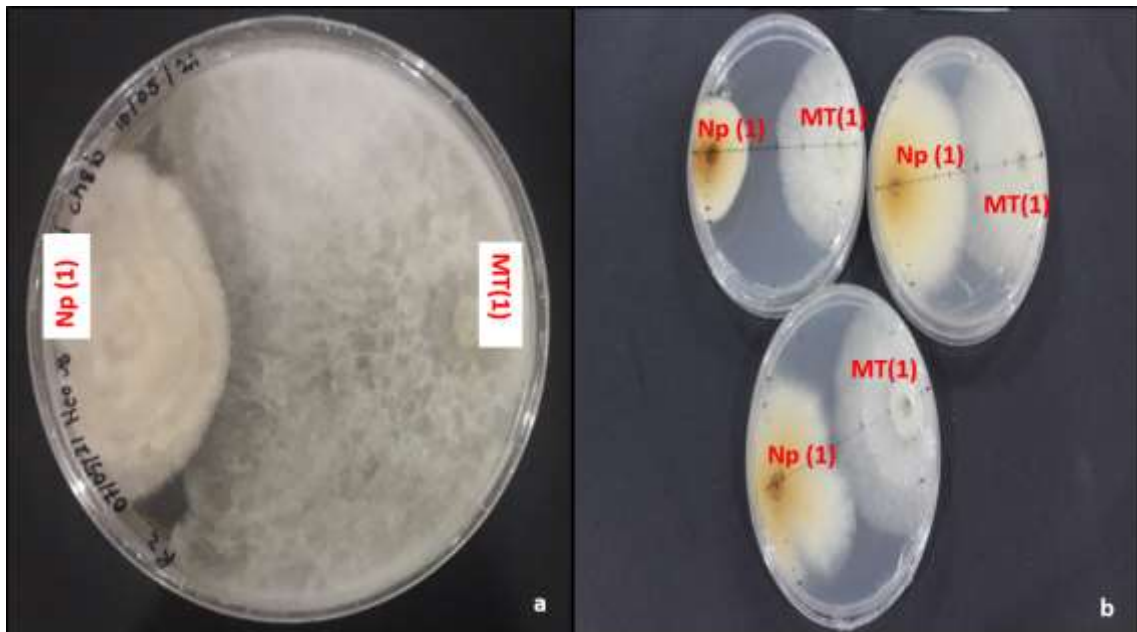
**Tabla 7-3:** Test de Tukey (0,05) de la tasa de crecimiento micelial de la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en confrontación con *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. C (5).

Hongos	Medias	n	Rangos de significancia
C (5)	18,30167	3	<b>a</b>
MT (2)	12,35000	3	<b>a</b>
MT (3)	12,19000	3	<b>a</b>
MT (1)	11,86333	3	<b>a</b>
MT (7)	11,72889	3	<b>a</b>
MT (5)	11,64889	3	<b>a</b>
MT (4)	11,42222	3	<b>a</b>
MT (6)	10,57000	3	<b>a</b>

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

### 3.2. Pruebas de antagonismo

#### 3.2.1. *Trichoderma* spp. MT (7) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1)

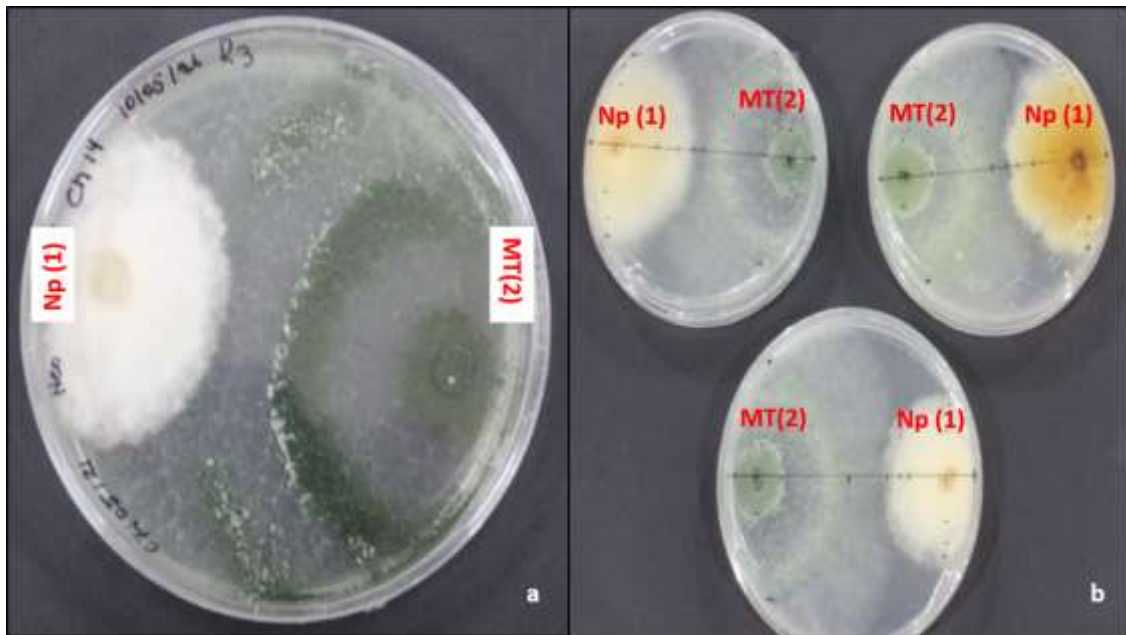


**Figura 9-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (1) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (1), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (1) ocupó el 75% de la caja (**Figura 9-3 a, b**). Es decir, el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo, ubicado en el grado 2 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al, (1982).

3.2.2. *Trichoderma* spp. MT (2) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1)

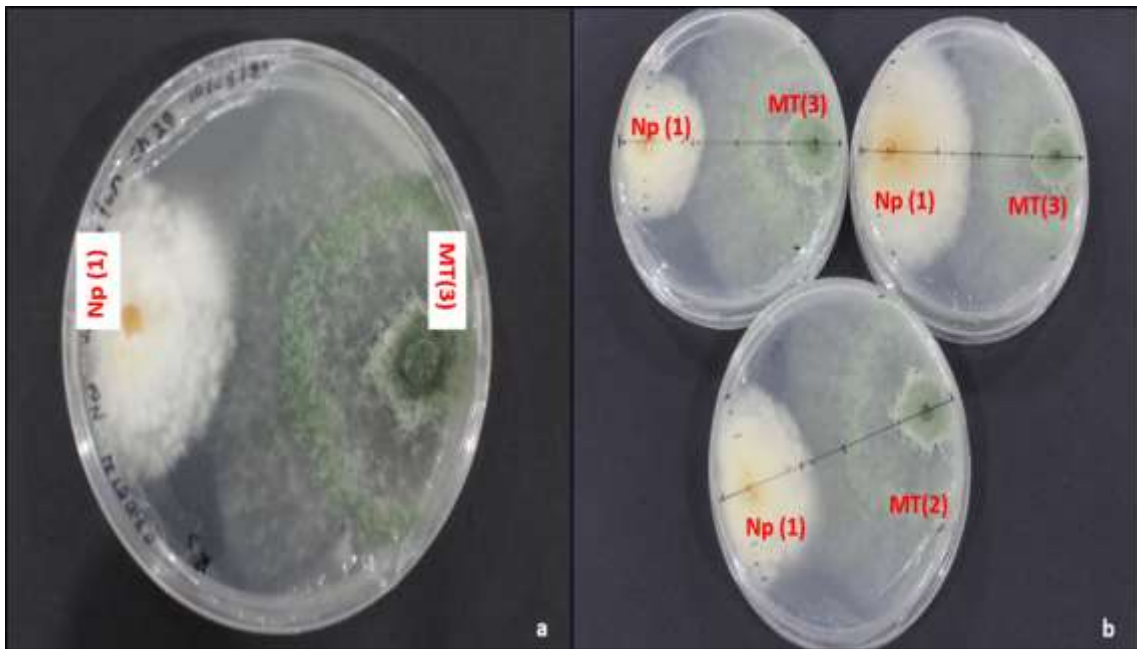


**Figura 10-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (2) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (2), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (2) ocupó el 75% de la caja (**Figura 10-3 a, b**). Es decir, el antagonista llegó a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo ubicado en el grado 2 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).

### 3.2.3. *Trichoderma* spp. MT (3) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1).

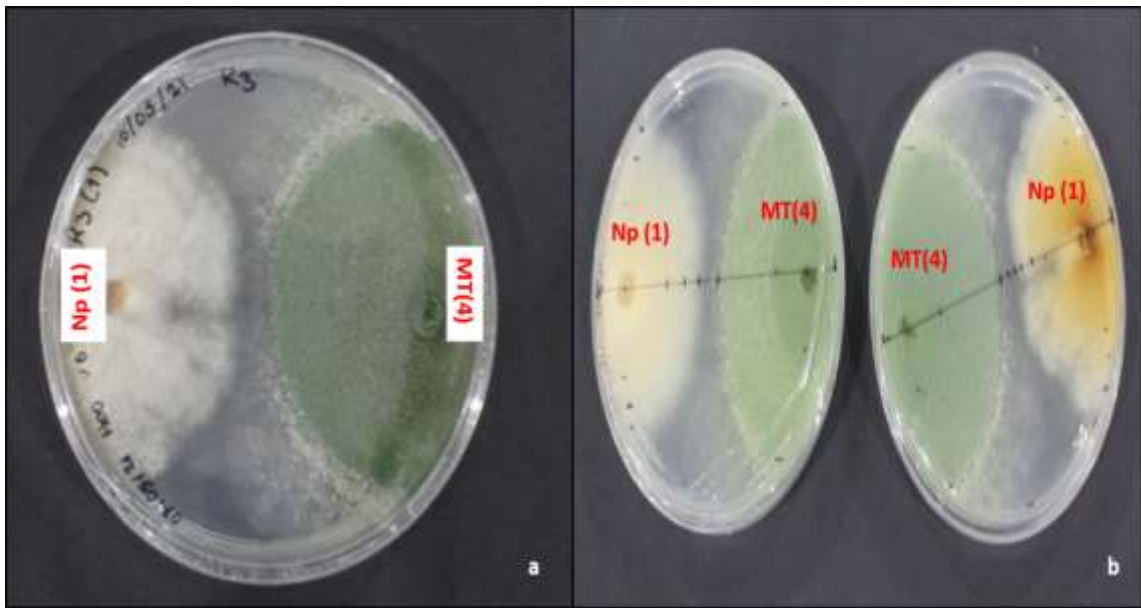


**Figura 11-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (3) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022.

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (3), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (3) ocupó el 75% de la caja (**Figura 11-3 a, b**). Es decir, el antagonista llegó a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo ubicado en el grado 2 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).

3.2.4. *Trichoderma* spp. MT (4) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1).

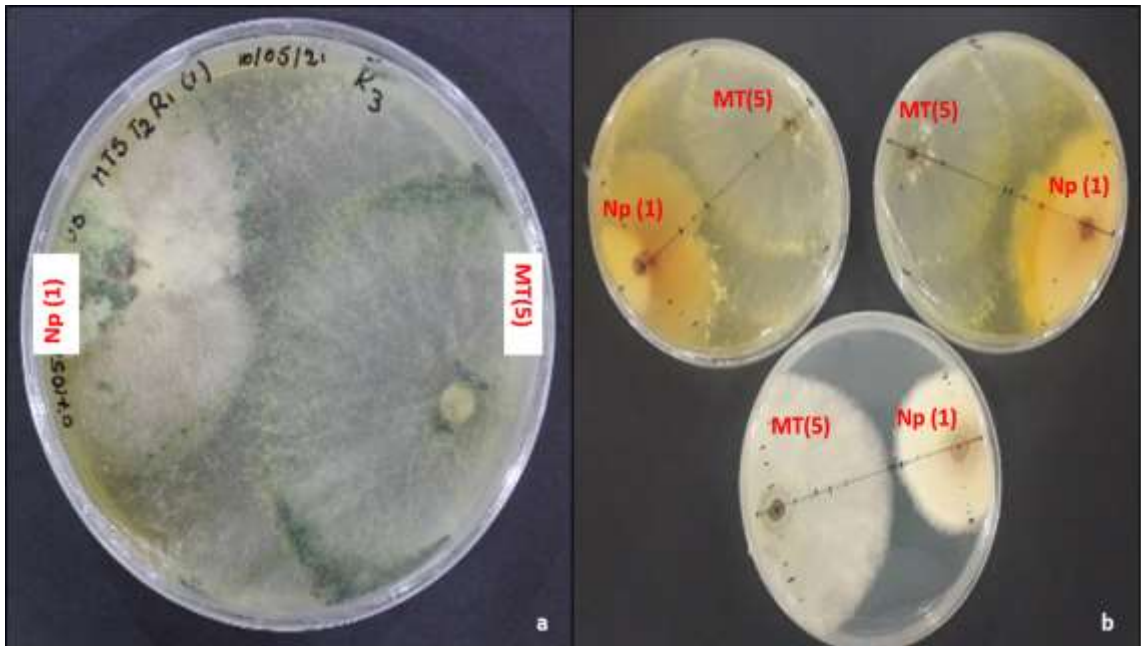


**Figura 12-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (4) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (4), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (4) ocupó el 50% de la caja (**Figura 12-3 a, b**), es decir, el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro, ubicado en el grado 3 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).

### 3.2.5. *Trichoderma* spp. MT (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1).



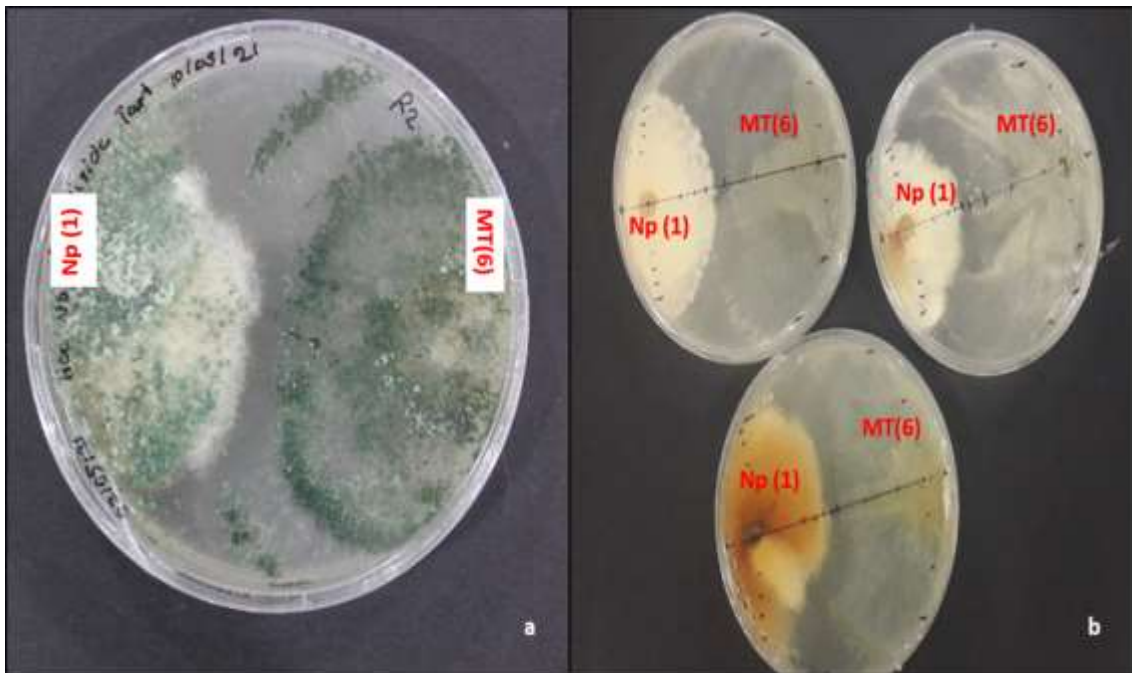
**Figura 13-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ . Anverso (a), reverso (b)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (5), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (5) ocupó el 100% de la caja (**Figura 13-3 a, b**). Es decir, el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno, ubicado en el grado 1 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).



### 3.2.6. *Trichoderma* spp. MT (6) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1)



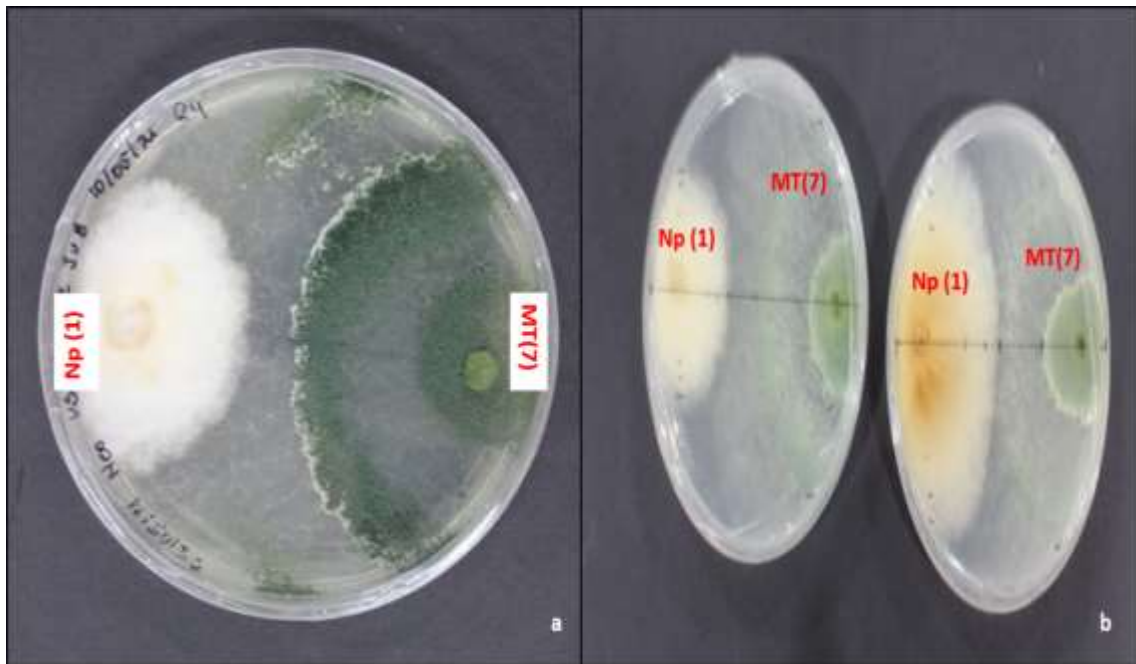
**Figura 14-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (6) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (6), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (6) ocupó el 100% de la caja (**Figura 14-3 a, b**). Es decir, el antagonista acopa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno, ubicado en el grado 1 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).



### 3.2.7. *Trichoderma* spp. MT (7) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1)



**Figura 15-3.** Confrontación de la cepa *Trichoderma* spp. MT (7) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

**Realizado por:** Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento rápido de la cepa de *Trichoderma* sp. MT (7), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Trichoderma* sp. MT (7) ocupó el 75% de la caja (**Figura 15-3 a, b**). Es decir, el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro, ubicado en el grado 3 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).

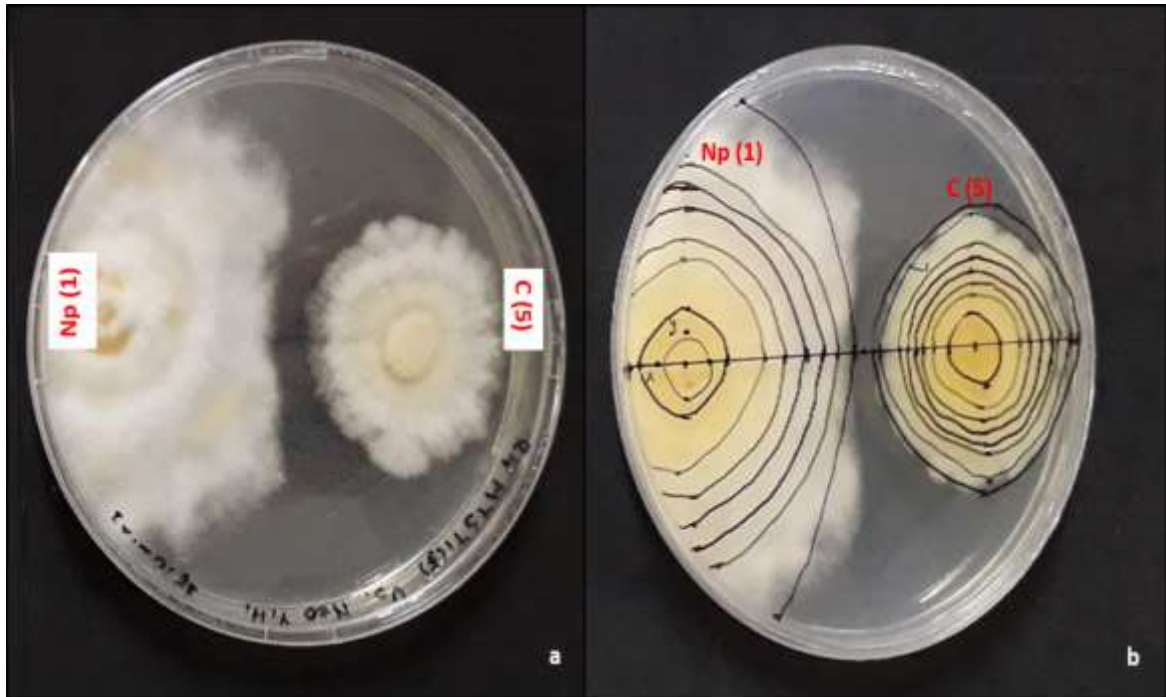
El tiempo de contacto entre antagonista y patógeno fue a los 3 días, resultados similares han sido obtenidos por otros autores quienes han determinado que *Trichoderma* spp. y diversos patógenos (*M. fijiensis*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc.) entran en contacto uno y tres días después de establecida la prueba de cultivo dual (Hernández et al, 2005; citado en Calvo et al, 2012: pp .225-231). Un tiempo de contacto corto es una característica deseable en un antagonista ya que entre menor sea este implicará una mayor agresividad (Michel, 2001; citado en Calvo et al, 2012: pp .225-231).

La velocidad de crecimiento presentadas por las especies de *Trichoderma* son motivos para la utilización de este microorganismo como antagonista para el control de fitopatógenos (Benítez et al, 2004; citado en Tovar, 2008: pp. 17-19). Infante et al., (2009), sugieren que la competencia por sustrato o espacio depende de la velocidad de crecimiento conjuntamente con otros mecanismos

de acción del antagonista, siendo determinante en el control biológico del patógeno y colonización del sustrato. Martínez et al., (2013) mencionan que si el crecimiento del antagonista es más rápido que el del patógeno, éste no tiene la capacidad de explorar el sustrato debido a la ausencia de germinación y formación de estructuras. Estos resultados están de acuerdo con Infante et al., (2009) y Martínez et al., (2008) quienes registraron que *Trichoderma* spp tiene una alta capacidad de competencia por el sustrato.

En el reverso de la caja Petri *Neopestalotiopsis* sp. presenta una coloración naranja negruzca, lo observado se sustenta en lo señalado por Arbito et al., (2017) que menciona esta coloración sobre el patógeno *Fusarium* debido a los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. por el mecanismo de antibiosis. Posterior se visualizó una expresión de necrosis del tejido micelial del patógeno y de las cepas de *Trichoderma* una coloración amarillenta que según Tovar et al., (2008) se debe a la presencia de metabolitos difusibles y altamente tóxicos de carácter enzimático ( celulasas, quinasas y proteasas ) acompañadas de otros compuestos encargados de la inhibición del crecimiento como ácido harzianico, alamenticinas, ácido hepteldico, 6-pentil- $\alpha$ -pirona y otros; Villamil et al., (2015) menciona que varias cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios como trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina responsables del mecanismo antagónico.

### 3.2.8. *Clonostachys* spp. C (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1)



**Figura 16-3.** Confrontación de la cepa *Clonostachys* spp. C (5) frente a la cepa de *Neopestalotiopsis* spp. Np (1) en medio PDA a 25 °C±1. Anverso (a), reverso (b)

Realizado por: Acosta Gómez, Jenny, 2022

En el enfrentamiento se presentó un crecimiento lento de *Clonostachys* sp. C (5), tanto en el anverso como el reverso de la caja Petri se observó que *Clonostachys* sp. C (5) ocupó el 25% de la caja (**Figura 16-3 a, b**). Es decir, el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja de Petri., ubicado en el grado 4 de micoparasitismo según la Escala de Bell et al., (1982).

El tiempo de encuentro entre patógeno y antagonista fue en el día 9, no hubo contacto entre los micelios ya que se observó claramente una zona con crecimiento reducido para el patógeno (**Figura 17-3 a**), por lo que existió un espaciamento entre ambas colonias entre 1 a 3 mm, similar a lo estudiado por Mejía et al., (2016), quienes manifiestan que *Clonostachys* sp. frente a *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao después de 9 días de evaluación no hicieron contacto, por lo que ocurrió un rechazo entre 1 a 3 mm entre ambos hongos, probablemente se deba a la secreción de metabolitos secundarios al medio, tal como menciona Sánchez, (2009).

Se ha comprobado también que distintas especies de *Clonostachys* son capaces de producir metabolitos tóxicos y antibióticos (Rodríguez et al., 2011).

Entre los metabolitos de importancia de *Clonostachys* sp. destacan cuatro tipos de glisopreninas y una mezcla de péptidos pertenecientes a la familia de peptabióticos los cuales están relacionados con sistemas de defensa de plantas contra patógenos (Viterbo et al., 2007).

## CONCLUSIONES

- Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* sp. fueron identificadas y caracterizadas morfológica y molecularmente correspondiendo a las siguientes especies: MT (1) *Trichoderma gamsii*, MT (2), MT (3), MT (4) y MT (7) *Trichoderma longibrachiatum*, MT (5) *Trichoderma harzianum* y C (5) *Clonostachys rosea*.
- Las tasas de crecimiento de las diferentes cepas fueron: para *Trichoderma* spp. MT (1), MT (3), MT (4) y MT (6) con un valor de 15,72 mm/día; MT (5) con un valor de 13,1 mm/día ; MT (2) con un valor de 11,8 mm/día y MT (7) con un valor de 8,73 mm/día. Para *Clonostachys* sp. C (5) con un valor de 3,74 mm/día y para *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) con un valor de 7,86 mm/día.
- Las distintas formas de antagonismo que presentaron las cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* sp. frente a *Neopestalotiopsis* sp. fueron las siguientes: el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) ejercida por las cepas de *Trichoderma* spp. MT (1), MT (2), MT (3), MT (4), MT (5), MT (6), MT (7) a 25 °C ± 1; fue entre 52,9% y 59,7%, mientras que para la cepa de *Clonostachys* sp. C (5) se obtuvo el 30,1% ya que la tasa de crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Clonostachys* sp. C (5) fue mayor en comparación a los enfrentamientos de *Neopestalotiopsis* sp. Np (1) frente a *Trichoderma* spp. MT (1), MT (2), MT (3), MT (4), MT (5), MT (6), MT (7). De acuerdo con escala de Bell, para evaluar el micoparasitismo se observó que las cepas de *Trichoderma* spp. MT (1), MT(2), MT (3) y MT (7) cubrieron el 75 % del medio ubicándose en el grado 2 es decir, llegaron a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; la cepa MT (4) cubrió el 50% del medio ubicándose en el grado 3 es decir, el antagonista y el patógeno colonizaron cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno pareció dominar al otro; MT (5) y MT (6) cubrieron el 100 % ubicándose en el grado 1 es decir, antagonista acopó completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno. Por otra parte, *Clonostachys* sp. C (5) cubrió el 25% ubicándose en el grado 4 es decir, el patógeno sobrepaso al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri, pero sin que existiera contacto entre ambos.
- Las cepas que presenten mayor eficacia antagonista frente a *Neopestalotiopsis* sp. fueron *Trichoderma* spp. MT (5) y MT (6) ya que cubrieron totalmente al patógeno.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar las especies identificadas de *Trichoderma* en campo, ya que los resultados obtenidos en la presente investigación arrojan resultados prometedores para el manejo de *Neopestalotiopsis* sp.
- Realizar investigaciones encaminadas a determinar otros mecanismos de acción de las especies de *Trichoderma* obtenidos en la presente investigación como son: la inducción de resistencia sistémica y la estimulación de crecimiento vegetal.
- Realizar técnicas para determinar el efecto de metabolitos volátiles y difusibles de las especies antagonistas utilizadas en el ensayo.
- Se sugiere realizar nuevamente la secuenciación de la cepa MT (1) ya que el porcentaje de cobertura de la secuencia objetivo fue menor al 80%.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Ampuliformes:** Subesférico a elíptico con un cuello corto, con forma de botella hinchado parcialmente en la parte basal. (Morales, 2010, p. 63).

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

**Antibiosis:** Asociación antagónica entre organismos en detrimento de uno de ellos por no soportar las sustancias tóxicas que segrega el otro (Cortes, 2019).

**Ascospora:** Espora sexual que se produce dentro de un asca (Peña & Páez, 2011: p. 2).

**Basidiocarpo:** Es el esporocarpo de un hongo basidiomiceto que consiste en una estructura multicelular sobre la que se dispone el himenio producto de las esporas (Pío Font Quer, 2010: p. 187).

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

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

**Competencia:** Ocurre cuando diferentes microorganismos necesitan de un mismo recurso para sobrevivir sea nutrientes, espacio físico, luz, oxígeno etc (Villaruel, 2015; citado en Arbito, 2017: p. 31).

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

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

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

**Desnaturalización:** Proceso por el cual una enzima pierde la conformación que le permite tener actividad (Rossky, 2008; Canchi et al., 2010 citado en Rodríguez 2016: p. 44).

**Divergente:** Tipo de rama himeniífera en el que hay una zona central de hifas (capa media) de la que divergen oblicuamente dos hileras de células (los estratos laterales) (Ulloa et al., 2006: p.164).

**Elicitar:** Se refiere al traspaso de información de forma fluida (Cortes, 2019).

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

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

**Epífito/a:** Vegetal que vive sobre otra planta, sin alimentarse a expensas de esta, como los musgos y líquenes (Cortes, 2019).

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

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

**Fialosporas:** Espora de reproducción asexual formada por abstricción en el ápice de la fiálide; se aplica principalmente a los estados conidiales y espermaciales de hongos (Ulloa et al., 2006: p.202).

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

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



**Intrones:** Es una región del ADN que forma parte de la transcripción primaria de ARN, pero a diferencia de los exones, son eliminados del transcrito maduro, previamente a su traducción (Pío Font Quer, 2010: p. 626).

**Lectinas:** Proteína que se une a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto, su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular ( Cortes, 2019).

**Loci:** Lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN (Pío Font Quer, 2010: p. 672).

**Mesófilo:** Término botánico que designa el tejido que se encuentra entre las epidermis del haz y del envés de las hojas (Pío Font Quer, 2010: p. 703).

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

**Micoparasitismo:** Proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno (Villarreal, 2015; citado en Arbito, 2017: p. 31).

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

**Neótipo:** Se aplica al ejemplar que no extiende materiales proterotípicos, concuerda con la descripción original y se toma como tipo (Pío Font Quer, 2010: p. 752).

**Nodo:** En los ejes de los tallos, zonas donde se producen las ramificaciones. Las distancias entre nodos se llaman internodos, suelen ser un buen carácter taxonómico (Barreno & Pérez, 2003: p. 469).

**Parásito/ta:** Organismos que deriva su alimento de otro organismo, ya sea una planta, un animal o un hongo; si el parásito invade y causa enfermedad se considera como patógeno (Ulloa et al., 2006: p.422).

**Penicillus/penicilo:** Cabeza conidial de forma de pincel, constituida por un conidióforo o pedicelo que soporta un racimo de células conidiógenas (fiálides), y que también puede tener otros elementos (ramas y métulas), dependiendo de las especies (Ulloa et al., 2006: p.428).

**Peptaibols:** Son péptidos biológicamente activos que contienen entre siete y veinte residuos de aminoácidos, algunos de los cuales son aminoácidos no proteinógenos (Cortes, 2019).

**Peritecio:** Ascocarpo en forma de botella o globular que tiene una abertura o poro (Peña & Páez, 2011: p. 10).

**Polimorfismo:** Que tiene variantes morfológicas muy diversas (Barreno & Pérez, 2003: p. 474).

**Polifásico:** Constituida por la combinación de varias corrientes monofásicas que tienen el mismo período y amplitud, pero distinta fase (Ulloa et al., 2006: p.134).

**Quimiotropismo:** Tendencia de las células u órganos a moverse en dirección determinada por la influencia de estímulos químicos, se aplica especialmente a la curvatura de las plantas por estímulos químicos (Cortes, 2019).

**Saprófito/ta:** Se aplica a las plantas y los microorganismos que viven a expensas de materias orgánicas muertas o en descomposición (Cortes, 2019).

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

**Tomentoso:** Que tiene una capa de pelos cortos, suaves y entrelazados que cubren la superficie (Ulloa et al., 2006: p.254).

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

## BIBLIOGRAFIA

**AGAMEZ, E.; et al.** “Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* spp. en sustrato de plátano en medio líquido estático”. Acta Biológica Colombiana [en línea], 2009, (Colombia) 14 (3), pp. 3-11. [Consulta: 2021-10-05]. ISSN 0120-548X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028005005.pdf>

**ARBITO RIERA, Marcos Paul.** Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp, [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales) Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. 2017. pp.26-31. [Consulta: 2021-08-23]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14419/1/UPS-CT007088.pdf>

**ÁVILA CUBILLOS, Eliana.** Manual de fresa [en línea]. Bogotá-Colombia: Gill Sans, 2015. [Consulta: 2021-08-23]. Disponible en: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/>

**BARRENO, Eva & PÉREZ Sergio.** *Glosario de Fitopatología*. Consejería del Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e infraestructuras del Principado de Asturias y KRK ediciones. España, 2003 [Consulta: 5 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.uv.es/barreno/Glosario.pdf>

**BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J.** Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA Fungus, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

**CEJA TORRES, Luis; et al.** “Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico”. Agrocencia [en línea], 2008, México 42 (4), pp. 451–461. [Consulta: 2021-08-23]. ISSN 1405-3195. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/>

**CHAVERRI, P.; et al.** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.

**CHAVERRI, P.; SAMUELS, G.** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Utrecht: The Netherlands An institute of the Royal Netherlands; Academy of Arts and Sciences; Central Bureau voor Schimmelcultures, 2003, p. 48.

**CORTES, Francisco.** *Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico.* Universidad de Salamanca, España 20019. ISBN: 8478005722, [Consulta: 5 enero 2022]. Disponible en: <https://dicciomed.usal.es/bibliografia>

**DOMSCH, K.; et al.** Compendium of soil fungi. 2nd ed. Eching: IHW Verlag, 2007, p. 672.

**DRUZHININA, I.; KUBICEK, C.** Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v. 6, n. 2, 2005, p. 100.

**GARCÍA VERA, Alma Guadalupe.** Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri* [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría en Ciencias de la Floricultura) Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, Jalisco. 2014. pp. 17-18. [Consulta: 2021-10-23]. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/433/1/ALMA%20GUADALUPE%20GARCIA%20VERA.pdf>

**GIRALDINO, M.; et al.** “Patógenos fúngicos de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivada bajo sistema de transición ecológica”. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias.* [en línea], 2018, 5(3), pp. 6–10. [Consulta: 2021-09-15]. Disponible en: <http://revistafcaunlz.gramaweb.com.ar/wp-content/uploads/2018/09/Gilardino-et-al.pdf>

**HARMAN, G. E.; et al.** Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease*, v. 94, n. 8, 2010 p. 928-939.

**HASSLER, M.** *Vascular Plants. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 2018. [Consulta: 2021-08-23]. Disponible en: <https://www.catalogueoflife.org/col/>

**HOOPEN, M.; et al.** “Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*)”. *The British Mycological Society* [en línea], 2003, (Costa Rica) 107 (5), pp. 587-595. [Consulta: 2021-10-05]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/repdoc/A3645i/A3645i.pdf>

**HOWELL, C.** Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, v. 96, n. 2, 2006, p. 178-180.

**HUSAINI, A.; & NERI, D.** *Strawberry: Growth, Development and Disease*. Boston-USA. CABI, 2016.

**INTRIAGO REYNA, Hamilton Octavio.** Aislamiento, caracterización, e identificación de hongos filamentosos asociados con síntomas de pudrición de corona en frutilla (*fragaria ananassa* Duch.) en la parroquia Yaruquíes [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería agronómica) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2020. pp. 4-8. [Consulta: 2021-08-23]. Disponible en: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/Tesis-Hamilton%20Intriago-signed-signed-signed.pdf>

**KINDERMANN, J.; KUHL, C.** Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA Cluster. *Fungal Genetics and Biology*, v. 24, n. 3, 1997, p. 298-309.

**MAAS, J. L.** *Compendium of Strawberry Diseases*. 2a ed. United States of America: American Phytopathological Society. 1998.

**MONTOYA, Q.** Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 109, n. 5, 2016, p. 633-651.

**MAHARACHCHIKUMBURA, S.; et al.** “*Pestalotiopsis* revisited”. *Studies in Mycology* [en línea], 2014, 79(1), pp. 121–186. [Consulta: 2021-09-15]. ISSN 01660616. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/>

**OBREGÓN, V.; et al.** “First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina”. *Plant disease* [en línea], 2019, (Argentina) 103 (9), p. 1856. [Consulta: 2021-10-05]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/>

**PARRA CASTRO, Elizandra Jhoana.** Producción y comercialización de frutilla (*fragaria* sp) en la parroquia Yaruquí, cantón Quito, provincia de Pichincha [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería en Ciencias Pecuarias y Ambientales) Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. 2018 p.7. [Consulta: 2021-08-23]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/8658/1/03%20AGN%20041%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>

**PEÑA, Rafael & PÁEZ Jaime.** *Glosario General de fitopatología*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia., 2011, [Consulta: 5 enero 2022]. Disponible en: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/glosario.pdf>

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

**RAURA SALINAS, Diana Carolina.** Análisis de Riesgo de Plagas para importar plantas de frutilla (*Fragaria ananassa*) para plantar originarias de Argentina y Chile [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería agronómica) Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2017. p.4. [Consulta: 2021-10-05]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9545/1/T-UCE-0004-78.pdf>

**RODRIGUEZ, M & CHICO, J.** “Efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinífera*”. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL) [en línea], 2013, (Perú) 33 (2), pp. 542-49. [Consulta: 2021-10-05]. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/issue/view/90>

**SAMUELS, G.; et al.** Accepted Trichoderma names in the year 2015. IMA Fungus, v. 6, n. 2, 2006, p. 263-295.

**SAMUELS, G.** Trichoderma: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology, v. 96, n. 2, 2006, p. 195-206.

**SAMUELS, G.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K. P.** *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. Mycological Research, v. 104, n. 6, 2000, p. 760-764.

**SAMUELS, G.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S.** The *Trichoderma koningii* aggregate species. Studies in Mycology, v. 56, 2006 p. 67-133.

**SAMUELS, G.; ISMAIEL, A.; DE SOUZA, J.; CHAVERRI, P.** *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. Mycological Progress, v. 11, n. 1, 2012, p. 215-254.

**SANCHEZ PEREZ, María Isabel.** Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp nativos del Norte de Tamaulipas [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría en ciencias en Biotecnología Genómica) Instituto Politécnico Nacional, Cd Reinoso, Tamp, México. 2009. p.3-6. [Consulta: 2021-11-18]. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8464/53.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**WEBSTERS, J.** *Introduction to fungi*. Cambridge University Pres. 2<sup>a</sup> ed. Gran Bretaña: 1984. p 649.



## ANEXOS

### ANEXO A: PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA PRUEBAS PCR.







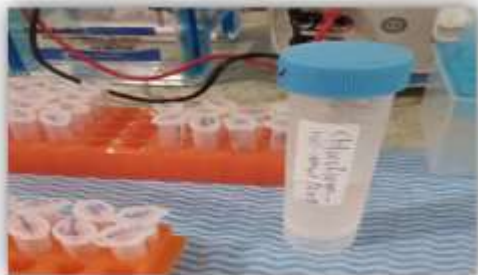
Se adicionó 200  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas.



Vortex por 20 segundos.



Se centrifugo por 10 minutos a 14000 rpm.



Se adicionó 600  $\mu$ L de clorofórmio-alcohol-isoamílico .



Transferencia del sobrenadante conteniendo el ADN a un nuevo tubo.



Formación del pellet.



Vortex por 20 segundos y centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm.



Se transfirió el sobrenadante +/- 600  $\mu$ L conteniendo el ADN a nuevos tubos.



Se adicionó 600  $\mu$ L de etanol 70% frío.



Mezcla de la solución invirtiendo los tubos hasta observar una masa vesível de ADN y almacenada a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.



Se centrifugo por 10 minutos a 14000 rpm.



Formación del pellet al fondo del tubo.



Se centrifugo a 14000 rpm por 5 minutos.



2 lavados con etanol 70% frío , en cada lavado se adiciónó 600  $\mu\text{L}$ .



Descarte del sobrenadante.



Se descarto el etanol y se coloco los tubos en ambiente estéril en posición horizontal para el secado por 24 horas.

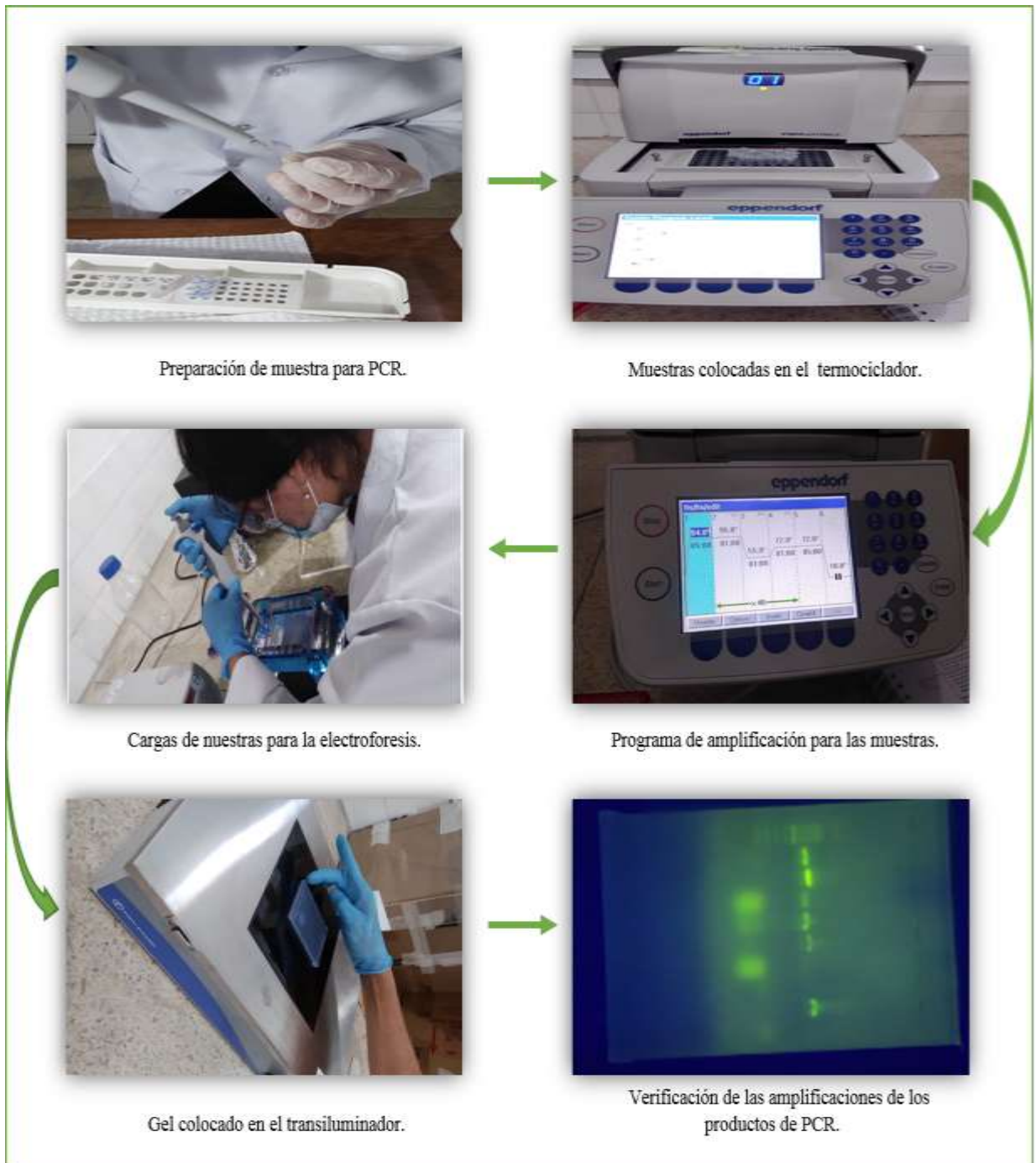


Se adiciónó 50  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación de ADN y 2  $\mu\text{L}$  de RNasa.

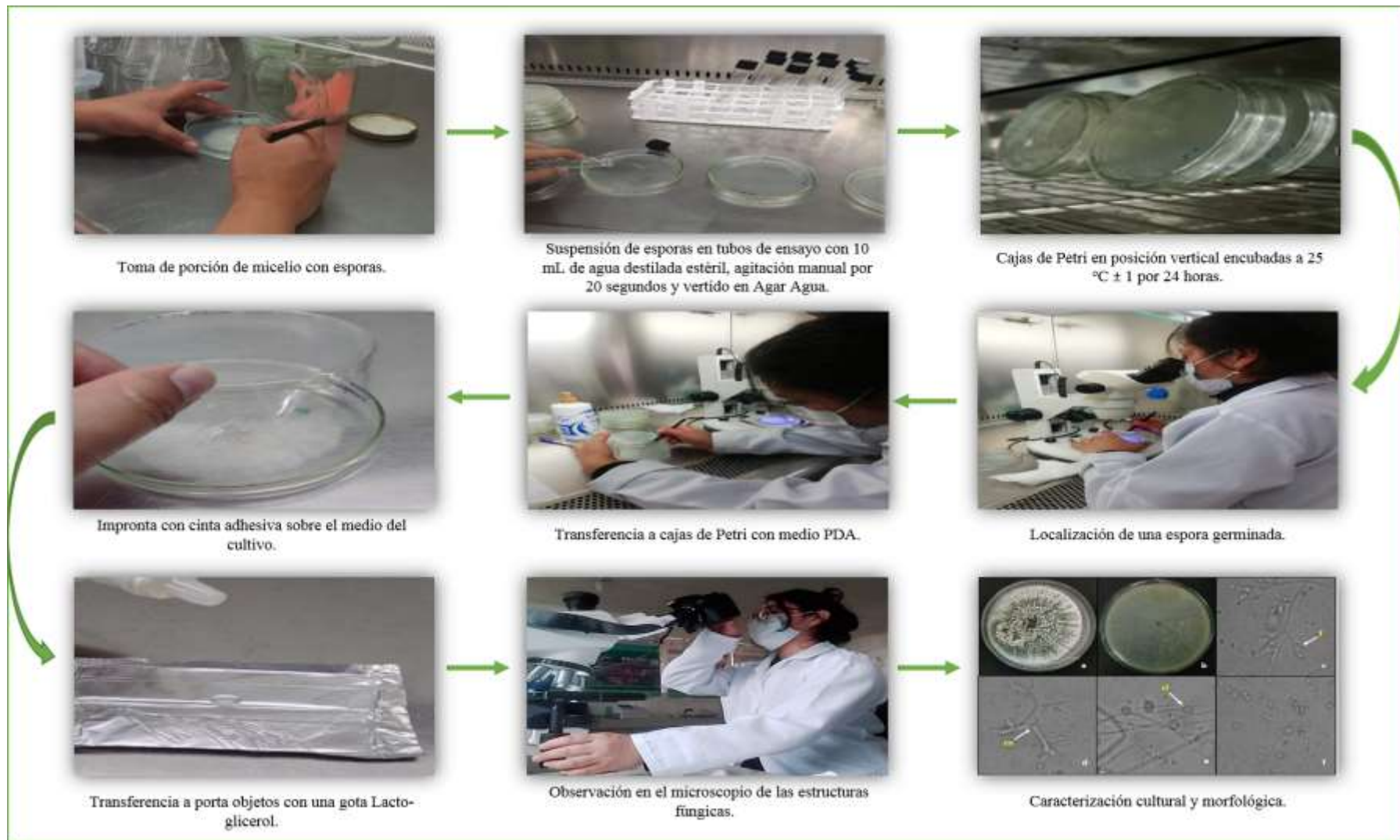


Se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en Baño Maria por 3 horas y se almacenó el ADN en el ultracongelador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO B: PROCEDIMIENTO PARA PRUEBAS PCR







**ANEXO C: CULTIVOS MONOSPÓRICOS PARA CARACTERÍSTICAS CULTURALES Y MORFOLÓGICA**

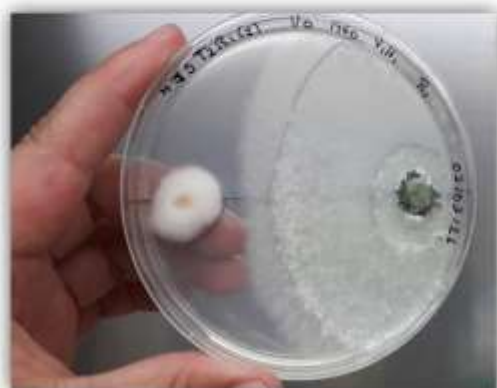
## ANEXO D: PRUEBAS DE ANTAGONISMO



Técnica de cultivo dual.



Siembra del antagonista a las 72 horas después de la siembra del patógeno.



*Trichoderma* spp. en enfrentamiento con *Neopestalotiopsis* sp.



*Clonostachy* sp. en enfrentamiento con *Neopestalotiopsis* sp.

ANEXO E: SECUENCIAS DE HONGOS EN ESTUDIO.

HONGO	SECUENCIA	GEN AMPLIFICADO
<p><b>MT (1)</b></p>	<p>GGCCAACCAAGCTTAGGCCGTTTTTGAACGTAACATACAGGAAAGATGAACAAAGGAAGA  AATATTATCTCTCTCGGCTTTGACATACCTGGTTGTGATCCGGGGGAAAGGAATGGATAC  TAGCACAGATACCTTATAATCATACTCCGGGTTGAATCCTCGCAATGCGATATACATGTG  AGTTGTGCGGATTTGTCTTTGGCCCCACACCCCCACCTCACCCATCTCCTATGGTCTTC  ATCCGTGCTCATTGGCCGCCCTCGTCAGACCCATTCTCACTAATATCCTCTCACCTTCTT  TGGCAACTCGACCTCGATCCATTACCTCTTCGCCTCGCAGTCTTCTTACCATTCTCCCT  GCTGTCTTCCGTCTCTCAGGGCTCTCTTTC</p>	<p><b>Rpb2</b></p>
<p><b>MT (2)</b></p>	<p>cgagaaggaagcttgagatccctcaattttcggacgatttctgtgcctctgccaacatctttttcaccacccc  gcttctectaccctcctttggcgacgcaaattttttgtGCGTTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCAGCAA  ACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCTTCCAACAGTCTGCGCA  GCAATGCTAATCATTTCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTACGCGTGGGTCTTGACA  AGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCyCTCTGGAAGTTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACC  GTCATTGGTATGTTTGTATCCCGTGCCTCATTGCATCATCGccacaacaacataactaatgcctctgacagacgctcccg  Gccaccgtgatttcatcaagaacatg</p>	<p><b>EF</b></p>
	<p>gctgtccgaggtattatgcaagaatgaacaccgagctggccaactattgagacgttgcgtggagggaataggcatt  tcaacctcgcggtcggcatcaagcctggcacgctctcaacggcttgaagtattcgtcggcaactggaactggggtgAT  CAGAAGAAGGCCATGAGCTCGACTGCAGGAGTGTCTCAGGTGCTCAACCGATACACGTTTCGCTCGACCCTCTCGCATT  GCGCCGCACCAACACGCCCATCGGAAGAGACGGCAAGCTGGCGAAGCCTCGACAGCTGCACAACACCCATTGGGGTCTGG</p>	<p><b>Rpb2</b></p>

	<p>TCTGCCCGGCCGAGACGCCCGAAGGACAGGCCTGTGGTCTTGTCAAGAACCTGTCTCTGATGTGTTATGTCAGTGTCCGGC  TCTCCCTCAGAGCCGTTGATCGAGTTTATGATCAATAGGGGCATGGAAGTGGTTCGAGGAATACGAGCCGCTGCGTTATCC  TCACGCTACCAAGATCTTTGTCAACGGTGTCTGGGTGGGCATTACCAAGATCCCAAACATCTGGTGCAGCAGGTCGTGG  ACACTCGTCGTAAGTCGTACCTGCAGTACGAGGTCTCTCTGGTCAGAGAAATTTCGAGACCAGGAGTTCAAGATCTTCTCC  GACGCAGGCCGCGTCATGCGACCCGCTTTTACCGTCCAGCAAGATGACGAGTCGGACACTGGCATTCCCAAGGGCCACTT  GGTCTGACCAAAGACCTCGTTAATAAAATTGGCCCAGGAGCAGGCCGAGCCTCCAGAAGACCCAAGCATGAAGATTGGTT  GGGAGGGACTCATCAGGGCTGGTGCAGTTGAATATCTCGACGCCGAGGAAGAGGAGACGGCCATGATTTGCATGACTCCG  GAGGATCTCGAGCTGTATCGTGCGCAAAAGGCAGGTATTGCCACCGAAGAGGACGTTGGCGACGATCCGAACAAGCGACT  Caagacgaggacaaccaacaacgcacatgtacacgcactcgcagatccatccaagcatgatcttgggtatttgcgcga  Gcatcattcctttcccgatcacaaccaggtatgtca</p>	
<p><b>MT (3)</b></p>	<p>AACATACCAATGATCCTAACCCTCCATTGGGAGTCTCGAATTTTTTIGTTGCGTGTCCGGG  TTTTAGTGGGGACTCACCCCGGCCTTGAGCTTGTCTCGGCCCCCTCGGACTTGATCGA  ACCCATGCTTAGTTCTGGGGTCTCCTGTTTTTCGGACAATCGGCTCACCATGGCTCATCAA  TTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCGAGGGTTTCCTTCAAGTACGCGTGGGTTT  TTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGT  TCGAGACTCCCAAGTACTATTTCACCGTCATTGGTATGTTTATGATCCCGTGCACCTCATTGC  ATCATCGCCACAACAATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTT  ATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCA</p>	<p><b>EF</b></p>
	<p>ctgttccgaggtattatgcgaagaatgaacaccgagctggccaactatttgagacgttgcgtggagggcAATAGGCATTT  CAACCTCGCGGTCGGCATCAAGCCTGGCAGCCTCTCCAACGGCTTGAAGTATTCGCTCGCCACTGGAACTGGGGTGATC  AGAAGAAGGCCATGAGCTCGACTGCAGGAGTGTCTCAGGTGCTCAACCGATACACGTTTCGCTCGACCCTCTCGCATTG  CGCCGCACCAACACGCCCATCGGAAGAGACGGCAAGCTGGCGAAGCCTCGACAGCTGCACAACCCATTGGGGTCTGGT  CTGCCCGGCCGAGACGCCCGAAGGACAGGCCTGTGGTCTTGTCAAGAACCTGTCTCTGATGTGTTATGTCAGTGTCCGGCT</p>	<p><b>Rpb2</b></p>

	<p>CTCCCTCAGAGCCGTTGATCGAGTTTATGATCAATAGGGGCATGGAAGTGGTCGAGGAATACGAGCCGCTGCGTTATCCT  CACGCTACCAAGATCTTTGTCAACGGTGTCTGGGTGGGCATTACCAAGATCCCAAACATCTGGTGCAGCAGGTCGTGGA  CACTCGTCGTAAGTCGTACCTGCAGTACGAGGTCTCTCTGGTCAGAGAAATTCGAGACCAGGAGTTCAAGATCTTCTCCG  ACGCAGGCCGCGTCATGCGACCCGTCTTTACCGTCCAGCAAGATGACGAGTCGGACACTGGCATTCCCAAGGGCCACTTG  GTCCTGACCAAAGACCTCGTTAATAAAATTGGCCCAGGAGCAGGCCGAGCCTCCAGAAGACCCAAGCATGAAGATTGGTTG  GGAGGGACTCATCAGGGCTGGTGCAGTTGAATATCTCGACGccgaggaagagagacggccatgattgcatgactccgg  aggatctcgagctgatatcgtcgcgcaaaaggcaggtattgccaccgaagaggacgttggcgcagatccgaacaagcgactc  aagacgaggacaaccaacaacgcacatgtacacgcactcgcagatccatccaagcatgatcttgggtatttgcgcgag  catcattcctttccccgatcacaaccaggtatg</p>	
<p><b>MT (4)</b></p>	<p>TTGTTGTGGCGATGATGCAATGAGTGCACGGGATCAAACATACCAATGACGGTGACATAG  TACTTGGGAGTCTCGAACTTCCTTAGGGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCG  GCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCACTCGTACTTGAAGGAACCCTTGCCGAGTTCGGCGGCT  TCCTGTTGAGGGGAAAATGATTAGCATTGGTGCAGACTGTTGGAAGTTGATGACCCC  CGCGCCAAGGTGGTGTACACCAAATCAGAGGGCGTTCTAGGATAGTGCTTTGCCGAACG  TGAACCCGCTATACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTAATATGT  CACAGACATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACTCATTGCATCATCGCCACAACAACATACT  AATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTCATCAAGAACATGATCACTGGTA  CTTCCCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTG  GTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCT</p>	<p><b>EF</b></p>
	<p>AGTTTACAACCTCCCAAACCCCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCT  CTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCCGCCGAGGACCAACTCCAA  ACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCC  TTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTC</p>	<p><b>ITS</b></p>

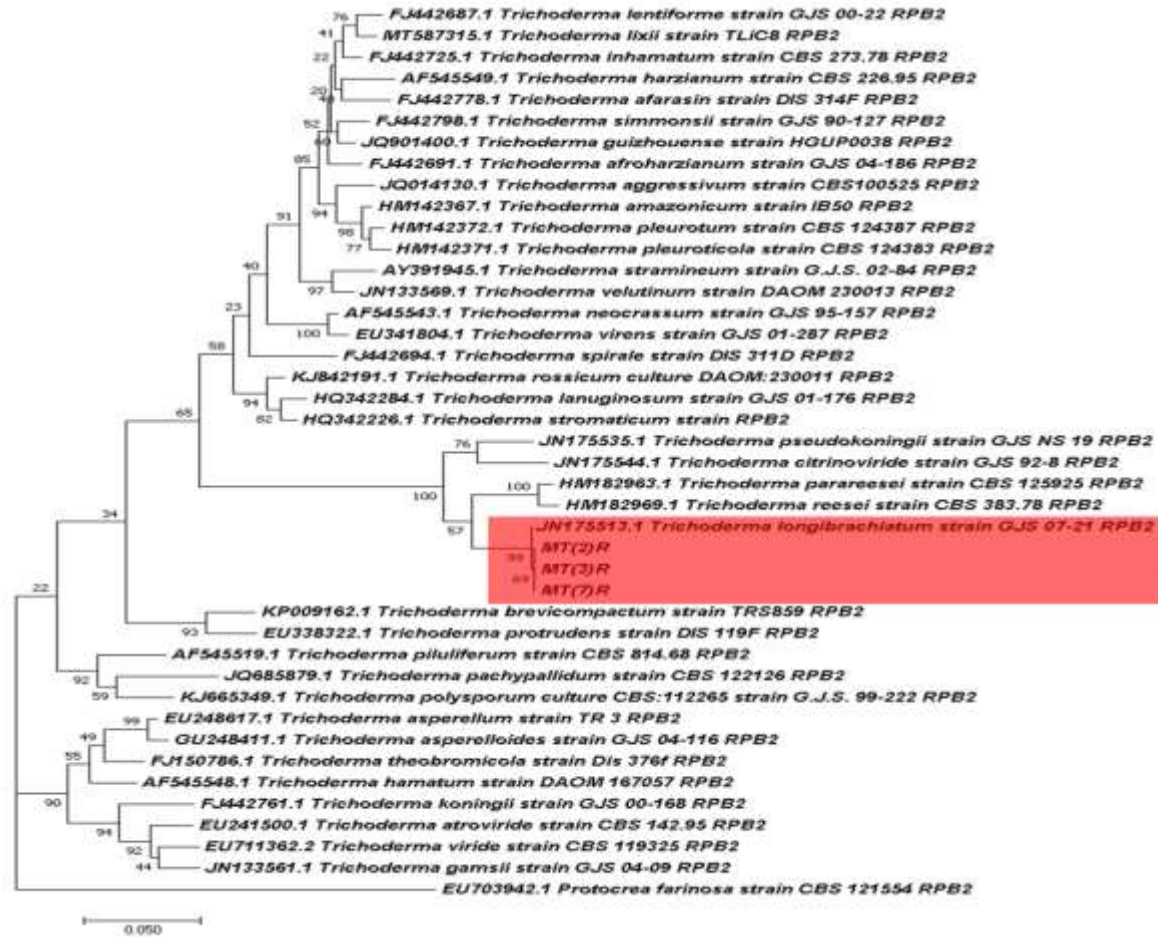


	<p>TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC  CTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCC  CCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCTCTCCTGCGCAGTA  GTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGGCCACAGCCGTAGAACACCCCAAATTCT  GAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA</p>	
<p><b>MT (5)</b></p>	<p>GTATCGCTGTGTGAAGTTGATGGAAAGAACATAACCAATGACGGTGACATAGTACTTGGGA  GTCTCGAACTTCCACAGAGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGC  TTGTCAAGAACCCAAAGCGTACTTGAAGGAACCCCTTGCCGAGTTCCGGCGGCTTCTATTGA  TGGAAAAGTGGTTAGCATCGTTGAAAGTGATGAGACGCAGAGCACGTTGAATGATGGCTG  GGCAGTAAGAGCGAAGCAGAAAAAAGCAGTGACCTAGTGGGTGCACGAGAAACCCAC  TAAACCACGACAGCCAAAAAATTTGCGTCGCTGCAAAGGAGGGGTAATGCAAAATCG  GGGTGATGAAAAATTGTCGACACGAAAATCTCTGCAGAATTATCGGGCACAATTAATG  TGGAGGGAGAATCGAGGCGAAAATGAGTTGAAGCTTACCTTCTCGATTTTCTCCGA</p>	<p><b>EF</b></p>
<p><b>MT(7)</b></p>	<p>CCCCCTCCATTGGGCAACGCAGATTTTTTTTGTTCGTTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCAC  CTCCGGCAAACCACTATCCTCTGCCCCCTCTGCTCTGATCGAACACACGTTTAGCGCTG  GGGTCTCAACCTACGAAAATCGGCGCACCATGGCTCATCAATTGCCCTCAACAGGAA  GCCGCCGAACTCGGCGAGGGTTCCTTCAAGTACGCGTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCC  GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTAC  TATGTCACAGTCATTGGTATGTTTGTATCCCGTGCACTCATTGCATCATCGCCACAACAAC  ATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTCATCAAGAACATGATCAC  AGGGTACTTCACAGGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCAGTACTGGTGAGTTCG  AGGCTGGTATCTCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGG  GTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCCTCAACAAGATGGACACTGCCTACTGGGCCGAGGCTC  GTTACCAGGAAATCATCAAGG</p>	<p><b>EF</b></p>

CTGTTCCGAGGTATTATGCGAAGAATGAACACCGAGCTGGCCA ACTATTTGAGACGTTGC  
GTGGAGGGCAATAGGCATTTCAACCTCGCGGTCGGCATCAAGCCTGGCACGCTCTCCAAC  
GGCTTGAAGTATTCGCTCGCCACTGAAA ACTGGGGTGATCAGAAGAAGGCCATGAGCTCG  
ACTGCAGGAGTGTCTCAGGTGCTCAACCGATACACGTTTCGCCTCGACCCTCTCGATTTG  
CGCCGCACCAACACGCCCATCGGAAGAGACGGCAAGCTGGCGAAGCCTCGACAGCTGCAC  
AACACCCATTGGGGTCTGGTCTGCCGGCCGAGACGCCGAAGGACAGGCCTGTGGTCTT  
GTCAAGAACCTGTCTCTGATGTGTTATGTCAGTGTGGCTCTCCCTCAGAGCCGTTGATC  
GAGTTTATGATCAATAGGGGCATGGAAGTGGTCGAGGAATACGAGCCGCTGCGTTATCCT  
CACGCTACCAAGATCTTTGTCAACGGTGTCTGGGTGGGCATTACCAAGATCCCAAACAT  
CTGGTGCAGCAGGTCGTGGACACTCGTCGTAAGTCGTACCTGCAGTACGAGGTCTCTCTG  
GTCAGAGAAATTCGAGACCAGGAGTTCAAGATCTTCTCCGACGCAGGCCGCGTCATGCGA  
CCCGTCTTTACCGTCCAGCAAGATGACGAGTCGGACACTGGCATTCCCAAGGGCCACTTG  
GTCCTGACCAAAGACCTCGTTAATAAAATTGGCCCAGGAGCAGGCCGAGCCTCCAGAAGAC  
CCAAGCATGAAGATTGGTTGGGAGGGACTCATCAGGGCTGGTGCAGTTGAATATCTCGAC  
GCCGAGGAAGAGGAGACGGCCATGATTTGCATGACTCCGGAGGATCTCGAGCTGTATCGT  
GCGCAAAGGCAGGTATTGCCACCGAAGAGGACGTTGGCGACGATCCGAACAAGCGACTC  
AGGACGAGGACAAACCAACAACGCACATGTACACGCACTGCGAGATCCATCCAAGCATG  
ATCTTGGGTATTTGCGCGAGCATCATTCCTTTCCCGATCACAACC

**Rpb2**

## ANEXO F: ÁRBOL FOLOGÉNÉTICO REGIÓN Rpb2





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:** 08 / 07 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Jenny Marianela Acosta Gómez
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Recursos Naturales
<b>Carrera:</b> Agronomía
<b>Título a optar:</b> Ingeniera Agrónoma
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

Ing. Cristhian Fernando Castillo



1313-DBRA-UTP-2022