



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA  
UNAN - MANAGUA

**Recinto Universitario “Rubén Darío”**  
**Facultad de Ciencias e Ingeniería**  
**Departamento de Biología**

**Trabajo de Monografía para optar al Título de Licenciada en Biología**

**Determinación de la variabilidad genética de *Trichoderma* nativo de Nicaragua mediante el uso de rep-PCR y su potencial *in vitro* como antagonista de *Fusarium* spp. Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA-CNIA. 2018-2020**

**Autora:** Br. Daniela María Castillo González

**Tutor:** MSc. Juan Carlos Ruiz Urbina

**Asesora:** MSc. Andrea María Zamora

Managua, julio de 2020.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

*Primeramente, por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios en la carrera que elegí como profesión y que durante estos cinco años he logrado desarrollarme satisfactoriamente en ella.*

### **A mis padres**

*Maribel González y Juan Francisco Castillo por su incondicional apoyo, por sus invaluable consejos que fortalecieron mi alma y en caminaron mi vida.*

*. Y, por último, pero no menos importante a mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) y a cada uno de los profesores que me impartieron clases desde el inicio de mi formación como futura Licenciada en Biología.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco sobre todas las cosas primeramente a Dios por permitirme realizar con éxito la culminación de una de mis metas que a un bajo muchas dificultades que tuve durante este tiempo de estudio logré sobrellevarlo bajo su protección. A mi familia por brindarme su comprensión y apoyo en el momento que lo requería.*

*A mi asesora Msc. Andrea María Zamora Jarquín a la que agradezco de manera especial por aceptarme para realizar esta tesis de grado bajo su dirección y compartir sus conocimientos, su guía, su apoyo y paciencia durante este periodo.*

*A mi tutor Msc. Juan Carlos Ruiz Urbina por su guía y ayuda en la elaboración de este trabajo de titulación.*

*Al Laboratorio de Agrobiotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA), por facilitarme el uso de instalaciones, el manejo de equipo. A sí mismo a los ingenieros y compañeros de trabajo por estar siempre a disposición para brindarme su colaboración.*

*A mis compañeras de estudio y amigas más cercanas nuestro grupo de “Tesisistas” y “Trio perfecto” que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y animándome en cada momento durante la etapa de universidad y Tesis.*

*Sin su apoyo este trabajo no sería realidad.*

## RESUMEN

Se determinó la variabilidad genética de 60 aislados de *Trichoderma* procedente de diferentes cultivos, sustratos y localidades, mediante el análisis Rep-PCR. Se probó tres cebadores A Box1, (GTG)<sub>5</sub> y MBO, donde se ocuparon muestras de ADN de aislados de *Trichoderma*. El tamaño de la secuencia de nucleótidos varió de aproximadamente 300 a 3,000 Pb que exhibieron alrededor del 64.9% de monomorfismo mientras que los otros fragmentos mostraron un 30.5% de polimorfismo entre los 60 aislados de *Trichoderma* obteniendo una variabilidad promedio genotípica intraespecífica en *Trichoderma*. Al utilizar los RS marcadores se encontró una relación entre el agrupamiento del aislamiento con procedencia de cada uno de ellos, ya que pertenecen a zonas agroecológicas diferentes es posible que la variabilidad haya sido afectada por los microclimas y el uso de bajos y altos insumos agrícolas y, en consecuencia, generó pequeños cambios en la construcción genética del aislamiento.

Se evaluó la capacidad antagonista de 60 aislados de *Trichoderma* frente a *Fusarium spp*, un fitopatógeno causante de muchas enfermedades en plantas. Se empleó la técnica de cultivo dual donde el aislamiento 23 mostró un mayor valor de crecimiento después de cuatro días y los más altos porcentajes de inhibición micelial después de siete días.

**Palabras claves:** aislados, antagonismo, polimorfismos, patógeno, *Trichoderma spp*.

# INDICE

## **CAPITULO I. ASPECTOS GENERALES**

1.1 INTRODUCCION .....	9
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PRBLEMA .....	10
1.3 JUSTIFICACION .....	11
1.4 OBJETIVOS.....	12
1.4.1 General .....	12
1.4.2 Especifico.....	12

## **CAPITULO II. ANTECEDENTES, MARCO TEORICO, HIPOTESIS**

2.1 ANTECEDENTES.....	13
2.2 MARCO TEORICO .....	15
2.2.1 Biología de Trichoderma spp.....	15
2.2.2 Taxonomía de Trichoderma.....	15
2.2.3 Especie del genero Trichoderma.....	16
2.2.4 Morfología .....	18
2.2.5 Identificación de aislados del genero Trichoderma spp .....	18
2.2.6 Técnica de rep-PCR.....	18
2.2.7 Marcadores Moleculares .....	19
2.2.8 Biocontroladores por competencia .....	20
2.2.9 Beneficio de utilizar Trichoderma spp en cultivos.....	23
2.3. Hipótesis .....	24
2.3.1 Hipótesis nula (Ho).....	24
2.3.2 Hipótesis alternativa (Ha) .....	24

## **CAPITULO III. DISEÑO METODOLOGICO**

3.1 Tipo de estudio.....	25
3.2 Ubicación del estudio .....	25
3.3 Población y muestra .....	25
3.4 Variables .....	26
3.4.1 Variables independiente .....	26

3.4.2 Variables dependientes .....	26
3.4.3 Operacionalización de variables .....	26
3.5 Materiales y Métodos .....	27
3.5.2 Análisis Molecular .....	27
3.5.3 Análisis de Antagonismo .....	28
3.6 Métodos para la obtención de cepas nativas de Trichoderma spp.....	29
3.6.1 Diluciones seriadas .....	29
3.6.2 Purificación.....	29
3.6.3 Cepas en estudio .....	30
3.7 Multiplicación de cepas de Trichoderma para extracción de ADN .....	31
3.7.1 Procedimiento empelado .....	31
3.7.2 Extracción del ADN .....	32
3.7.3 Programa PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	33
3.7.4 Electroforesis.....	33
3.7.5 Descripción de marcadores moleculares .....	34
3.8 Estudio de antagonismo in vitro de cepas nativas sobre Fusarium spp .....	34
3.8.1 Preparación del inóculo de cepas de Trichoderma .....	35
3.8.2 Preparación del patógeno Fusarium spp .....	35
3.8.3 Pruebas de antagonismo in vitro .....	35
<b>CAPITULO IV. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADO</b>	
4.1 Variabilidad genética.....	36
4.2 Polimorfismo determinado por los 3 marcadores .....	38
4.3 Estudio de la competencia por nutrientes y espacio según el RCA y el RCP .....	39
4.4 Grado de inhibición al que pertenece los 60 aislados de Trichoderma .....	42
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, REFERENCIAS</b>	
5.1 CONCLUSIONES .....	45
5.2 RECOMENDACIONES .....	46
5.3 REFERENCIA .....	47
5.4 ANEXOS .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	<i>Especies de Trichoderma</i>	17
<b>Tabla 2:</b>	Operacionalización de variables	26
<b>Tabla 3:</b>	Códigos de aislados de <i>Trichoderma</i>	30
<b>Tabla 4:</b>	Medios y equipos utilizados en la técnica	31
<b>Tabla 5:</b>	Descripción de marcadores	34
<b>Tabla 6:</b>	Nivel de polimorfismo por los tres marcadores de secuencia repetitiva.	36
<b>Tabla 7:</b>	Porcentaje de inhibición de las 60 cepas de <i>Trichoderma</i>	44
<b>Tabla 8:</b>	Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> Vs <i>Fusarium</i>	55
<b>Tabla 9:</b>	Inhibición consolidada por día	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b>	Criterios de recolección de muestras de suelo	50
<b>Anexo 1:</b>	Preparación de la muestra	51
<b>Anexo 2:</b>	Crecimiento de cepas en diferentes medios	52
<b>Anexo 3:</b>	<i>Extracción de ADN</i>	53
<b>Anexo 4:</b>	PCR y Electroforesis	54
<b>Anexo 5:</b>	Competencia <i>in vitro</i>	55
<b>Anexo 6:</b>	Porcentaje de inhibición	56
<b>Anexo 7:</b>	Inhibición por día	59
<b>Anexo 8:</b>	Glosario	61

## INDICE DE FIGURA

Figura 1:	Producto de amplificación de Pcr	37
Figura 2:	Nivel de polimorfismo detectado mediante 3 marcadores	37
Figura 3:	Prueba antagonista de un aislado en competencia.	39
Figura 4:	Crecimiento por nutrientes y espacio de las 60 cepas	40
Figura 5:	Índice de inhibición de los 60 aislados	41
Figura 6:	Cepas de <i>Trichoderma</i> grado 4	42
Figura 7:	Cepas de <i>Trichoderma</i> grado 3	42
Figura 8:	Cepas de <i>Trichoderma</i> grado 2	43
Figura 9:	Cepas de <i>Trichoderma</i> grado 1	43
Figura 10:	Dilución de las muestras de suelo para aislamiento y purificación de cepas de <i>Trichoderma</i> .	51
Figura 11:	cepas positivas ya aisladas en PDA perteneciente al laboratorio de agrobiotecnología del INTA-CNIA.	52
Figura 12:	Crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> en Medio líquido de extracto de malta para extracción de ADN.	52
Figura 13:	Extracción de ADN de las cepas de <i>Trichoderma</i>	53
Figura 14:	PCR y electroforesis con los tres marcadores moleculares	54
Figura 15:	Competencia in vitro de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i>	55



## Capítulo I. Aspectos generales

### 1.1. INTRODUCCION

El hongo *Trichoderma spp* es un eficiente controlador biológico que habita naturalmente en suelos agrícolas con abundante materia orgánica en descomposición, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, de ellos lo más importante es la competencia por nutrientes o espacio y la relación antagonista-patógena

Según Rey (2000) y Monte (2001), las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura, como es el caso de *Fusarium oxysporum* que se reporta que ataca a más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas.

La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación del hongo *Trichoderma* lo han convertido en uno de los antagonistas más utilizados para el control de plagas y enfermedades se presenta como una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de biofungicidas de alta calidad, para ser incorporados a los programas de manejo integrado.

En Nicaragua se han realizado investigaciones sobre *Trichoderma* de manera morfológica, obteniendo resultados muy generalizados y poco específicos de las especies de *Trichoderma* que hay en los suelos nicaragüenses por lo que el presente trabajo pretende determinar la variabilidad genética de 60 aislados de *Trichoderma spp.* nativos obtenidos de suelo de la región I, II, III, V Y VI de Nicaragua, estimando que ellos están adaptados a las condiciones del país para evaluar su actividad como antagonista de un fitopatógeno de importancia como es *Fusarium spp.*

## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

uno de los retos que enfrenta la agricultura es el combate de los hongos fitopatógenos como lo es *Fusarium*, destacándose en América latina, las principales dificultades es su rápida propagación y difícil erradicación en cultivos. Estudios de FOA inicialmente identificaron tres razas de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* capaces de infectar las Musáceas y familias relacionadas. La Raza 1 afecta a la variedad Gros Michel y Manzano, la Raza 2 ataca a los bananos de cocción como el guineo cuadrado, y Raza 3 infecta ornamentales y del grupo de las Heliconias y reportes de la introducción Raza 4 que afecta a las musáceas plátano y banano variedad Cavendish.

Ante esta situación la utilización de hongos benéficos como *Trichoderma* podría asumir un papel importante para el control del fitopatógeno *Fusarium*, sin embargo, se debe enfatizar que muchas personas desconocen las características y formas de utilización adecuada de este hongo antagonista, evitando de tal manera el aprovechamiento total y efectivo de este biocontrolador, para ello es necesario realizar estudios de las especies de *Trichoderma* que hay en Nicaragua y su potencial inhibitorio ante el patógeno *Fusarium*.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

*Trichoderma* está entre los agentes de control biológico más exitosos en la agricultura, formando parte de más del 60% de los biofungicidas registrados en el mundo. Este microorganismo está presente en el mercado como bioplaguicida, biofertilizante, promotor del rendimiento y crecimiento vegetal, y como solubilizador de nutrientes en campos agrícolas o descomponedor de materia orgánica (Vinale 2008; Charoenrak Chamswarnng 2016).

Para asegurar el éxito de *Trichoderma* como biocontrolador, se debe realizar estudios previos en donde las especies de este género muestren su capacidad de sintetizar compuestos antagónicos (proteínas, enzimas y antibióticos), y sustancias promotoras de crecimiento (vitaminas y hormonas), fácil adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos (Navaneetha 2015).

Benhamou et al. (1993), señalo que las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de afectar negativamente a los hongos fitopatógenos en diferentes estados de desarrollo, siendo capaces de reducir su crecimiento y esporulación al actuar sobre sus estructuras (hifas, conidios y esclerocios). Por ello se pretende estudiar el potencial antagónico de diferentes aislados en confrontación con el fitopatógeno *Fusarium*.

Por lo antes mencionado se considera de gran importancia la realización de investigaciones encaminadas a la búsqueda de microorganismos como *Trichoderma* que presenten potencial para ser futuro biocontroladores de enfermedades en cultivo, biofertilizantes o promotor de crecimiento vegetal, por lo que en el presente trabajo se pretende realizar un estudio de variabilidad genética y antagonista de 60 cepas nativas de Nicaragua.

## 1.4. OBJETIVOS

### 1.4.1. General

- Determinar la variabilidad genética de aislados de *Trichoderma* nativo de Nicaragua y su potencial antagónico de *Fusarium spp.*

### 1.4.2. Especifico

- Identificar la variabilidad genética existente en poblaciones de *Trichoderma* nativo mediante rep-PCR.
- Evaluar la acción antagónica y de competencia *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma spp* sobre *Fusarium spp.*
- Medir el potencial inhibitorio de *Trichoderma* como controlador de *Fusarium spp.*

## Capítulo II. Antecedentes, Marco teórico, Hipótesis.

### 2.1. ANTECEDENTES

Jan L, Frank j.l, James V y Frans j.(2017); en el estudio “**Characterization of the diversity of ecologically important microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting**” se demostró que la huella digital genómica Rep-PCR es una herramienta muy valiosa en la ecología microbiana para la identificación de aislados microbianos. Este método consiste en analizar patrones que serán ingresados a la computadora como un sistema bionumerico o comparación de geles que se puede utilizar para la construcción de una base de datos basados en los perfiles de Rep-PCR para crear la huella digital de ADN a aislados desconocidos.

Mohamed H, Ahmed G, y Ehab I.E. (2016); realizaron un estudio con el título “**Molecular and morphological characterization of *Trichoderma Harzianum* from different Egyptian Soils**” en la cual se utilizó la técnica de secuencia repetitiva para analizar molecularmente 12 cepas de *Trichoderma* llevando a cabo el uso de cinco primers por Rep-PCR y veinte primers por ISSR obteniendo como resultado diferentes fragmentos por cada cebador Rep-PCR e ISSR. Simultáneamente se analizó la habilidad antagónica de las 12 cepas obteniendo como resultado que las cepas más efectivas alcanzaron más del 60% de la inhibición.

Ibarra M, Verónica A, Farrera C; Ronald A, Lara H, María H; Valdez C y Jorge M. (2010); realizaron una investigación De: **“Isolation and Screening of *Trichoderma* Strains Antagonistic to *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*”** en donde mediante un ensayo in vitro con medio de papa desxtrosa agar se dispuso a poner en competencia a *Trichoderma* con los dos patógenos durante 15 días obteniendo como resultado que la cepa IBA-23 reduce la formación del esclerocio de ambos patógenos, esto se debe a que el antagonista libera enzima  $\beta$ -1-3-gluconasa, quitinasa, proteasa y celulasa que son clave para iniciar la degradación de la pared celular del patógeno.

Piero Cristóbal F. N. y Monserrate Ángel G. (2006); realizaron una investigación de **“Cultivo in vitro de *Trichoderma spp.* y su antagonismo frente a hongos fitopatogenos”** con el objetivo de evaluar el potencial del hongo *Trichoderma spp.*, se llevó a cabo un bioensayo. En el primer bioensayo se evaluó la velocidad del crecimiento de *Trichoderma spp.*, en dos medios de cultivo: Papa dextrosa agar (PDA), Agar extracto de malta (AEM). Se utilizaron ocho cepas de *Trichoderma spp.* Los mejores resultados se obtuvieron en las cepas provenientes del área de cultivo de cacao.

Marwin Valiente y Domenica Pavone (2013) publicaron un artículo científico **“Identification of *Trichoderma spp.* Strains using molecular methods”** donde se explica el uso de métodos moleculares, útil, rápido, y sencillo para identificación de especies de *Trichoderma*.

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Biología de *Trichoderma spp.*

*Trichoderma spp.*, es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprófito o parásito, propiedades que benefician su actividad antagónica, Camargo (2005). Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de materia orgánica en descomposición.

Las colonias de *Trichoderma* presentan crecimiento rápido a los 2 días, que va formando una colonia delgada sobre la superficie del agar, debido a la conidiación que presenta a través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos y algodonosos, de micelio blanco, conformando una red densa, responsable del pigmento característico. Barnett y Hunter (1982).

### 2.2.2. Taxonomía

El género *Trichoderma* se describió por Persoon en 1794. Aún en la actualidad se continúa profundizando en este aspecto. Según Villegas (2005): El género *Trichoderma* se ubica:

- **Reino:** Fungi
- **Division:** Mycota
- **Subdivisión:** Eumycota
- **Clase:** Hyphomycetes,
- **Orden:** Moniliales,
- **Familia:** *Moniliaceae.*

### 2.2.3. Especies

Posteriormente, Rifai (1969) lo revisó y propuso nueve especies. Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas; sin embargo, con la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian satisfactoriamente las especies en el género.

Según Samuels (2005) *Trichoderma* se clasifica como un hongo anamórfico. El estado teleomorfo se ha detectado en pocas especies. Pero han sido utilizadas ampliamente como agente de biocontrol. A pesar de que la clasificación propuesta por Rifai sigue en uso, solo se acepta parcialmente. Posteriormente, Bissett reexaminó los criterios de Rifai y definió cinco secciones. Estas divisiones se realizaron, fundamentalmente, con el empleo de la taxonomía tradicional, según el tipo de ramificación del conidióforo, la forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia.

Para especies del género *Trichoderma* en el GenBank se evidenció por Lieckfeldt (1999) en su estudio sobre *T. viride*, una de las primeras especies caracterizada e identificada únicamente por la rugosidad de la pared del conidio que presenta dos tipos morfológicamente distintos (I y II), ya que cada uno de esos tipos posee un diseño de ADN mitocondrial diferencial. Posteriores estudios moleculares, morfológicos y fisiológicos designaron al tipo I como el «verdadero» y II como una nueva especie, en *Trichoderma* incrementó de nueve a más de 100 especies en años recientes. Las bondades que presentan las cepas del antagonista *Trichoderma* hicieron posible la elaboración de productos biológicos con características amigables con el ambiente. Pero el éxito de estas cepas como productos está amparado por una precisa selección de cepas. La correcta identificación, a través de la conjunción de diferentes técnicas, se conoce como

Identificación polifásica y se impone teniendo en cuenta las complejidades del género antes mencionadas. Este aspecto es vital para el registro de un producto cuyo ingrediente activo es *Trichoderma*, además de la importancia que reviste para



la autenticación y protección del mismo, así como su monitoreo una vez liberado en campo. De igual forma, es preciso el conocimiento de la variabilidad entre los aislamientos de una colección o, incluso, entre especies del género, a fin de hacer una correcta selección de las cepas más promisorias según los aspectos fisiológicos, ecológicos, modos de acción y la misma variabilidad molecular.

**Tabla 1. Especies de Trichoderma**

<b>Clasificación Rifai</b>		
<i>Trichoderma piluliferum</i> Webster & Rifai, <i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Pers) Rifai, <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon) Bain, <i>Trichoderma koningii</i> Rifai, <i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai, <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai, <i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai, <i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai		
<b>Según samuels: clasificación Estado teleomorfo</b>		
<i>Hypocrea lixii</i> Chaverri de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai, <i>Hypocrea atroviridis</i> Dodd <i>Trichoderma atroviride</i> P.karst (Bissett) <i>Hypocrea virens</i> Kullnig-Gradinger de <i>Trichoderma virens</i> (Miller, Giddens & Foster) Arx.		
<b>División del género en 5 secciones por Bisset</b>	<b>Especies del género Trichoderma en el GenBank.</b>	
	<b>Tipo I Verdadero</b>	<b>Tipo II Nueva especies</b>
<i>Trichoderma:</i> <i>Longibrachiatum,</i> <i>Saturnisporum,</i> <i>Pachybasium</i> <i>Hypocreanum.</i>	<i>T. viride</i> , anamorfo de <i>Hypocrea rufa</i> (Pers.: Fr.)	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. neotipo de <i>T. hamatum</i> .

(Martínez, Infante, Peteira,2015).

#### **2.2.4. Morfología**

Morfológicamente, es un hongo que posee estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidioforo hialino largo no verticilado, nace en centros pequeños. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estructuras de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas.

En 1969 Rifai señaló que poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. En general crece en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento. Algunos aislamientos tienen olor típico a coco. Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5 -10  $\mu\text{m}$  de ancho que conforma el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano.

#### **2.2.5. Identificación de aislados del género *Trichoderma ssp.***

La identificación de las especies del género *Trichoderma* resultó ambigua mediante la caracterización morfológica con el uso de claves tradicionales. Por estas razones se introdujeron técnicas moleculares que apoyaron y facilitaron la caracterización e identificación de las especies del género con mayor precisión. No obstante, es posible que la ambigüedad en la identificación morfológica sea una de las causas por lo que existan secuencias en las bases de datos del GenBank que no se correspondan con las especies nominadas, lo que exige una revisión de las mismas.

### **2.2.6. Técnica de REP-PCR**

Esta herramienta molecular hace uso de cebadores definidos para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de elementos de ADN repetitivos intercalados presentes en distintas ubicaciones en genomas procarióticos se denomina reacción en cadena de la polimerasa basada en la secuencia de elementos repetitivos (rep-PCR). El descubrimiento inicial de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) ocurrió en los genomas de *Escherichia coli* y *Salmonella*.

La familia de elementos REP generalmente tiene entre 35 y 40 pb de longitud, tiene entre 500 y 1.000 copias por genoma, Los fragmentos de ADN amplificados, cuando se separan por electroforesis, constituyen una huella digital genómica que puede emplearse para la discriminación de subespecies y la delineación de cepas de bacterias y hongos.

### **2.2.7. Marcadores moleculares**

Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico), los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), permiten explorar diferentes regiones del genoma para inferir la estructura genética de las poblaciones, y su asociación con características significativas desde el punto de vista agronómico.

Estos se basan en el grado de polimorfismo presente naturalmente en el material genético de los organismos y se emplean, entre otras, para estudiar la diversidad genética de los mismos, a nivel intra e interespecífico. Teniendo en cuenta que *Trichoderma* es un género muy diverso, y que la identificación de cepas a nivel de especie mediante caracteres morfológicos es difícil y confusa, debido a la complejidad del género. El empleo de los marcadores moleculares y el análisis de secuencias nucleotídicas específicas, incrementaron las facilidades para la correcta ubicación filogenética, identificación y caracterización de la diversidad de las especies que lo conforman.

Los elementos que se utilizan cuando se decide usar la técnica REP-PCR (PCR-Based repetitive sequence RS) son los RS marcadores BOX, BOX A1 (sub unidad de BOX), ERIC, MBO-REP; estos primers parecen estar ubicados en posiciones distintas e intergenicas a lo largo de los genomas microbianos, rep- PCR utiliza estos cebadores de manera arbitraria para reconocer verdaderas secuencias de oligonucleótidos. También, se ha encontrado poli trinucleotidos más pequeños como (GTG)<sub>5</sub> en múltiples copias en genomas microbianos y han demostrado ser aplicables a las huellas digitales de PCR.

## **2.2.8. Biocontrol por competencia**

### **2.2.8.1. Fungistasis**

Un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, incluyendo plantas, y sobrevive bajo condiciones adversas o competitivas (Benítez, 2004).

Las cepas de *Trichoderma* crecen rápidamente cuando se inoculan en suelo ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como DDT, y compuestos fenólicos (Chet, 1997), además, se recuperan muy rápidamente después de la adición de dosis sub letales de algunos de estos compuestos.

#### **2.2.8.2. Competencia por nutrientes**

La inhibición es la causa más común de muerte para microorganismos, la competencia por nutrientes limitantes, resulta en un control biológico de hongos fitopatògenos, antagonistas y micoparasitos Chet (1997).

Un ejemplo claro de este mecanismo de acción se encuentra representado en hongos filamentosos, donde la toma de hierro es esencial para la viabilidad de los mismos. Bajo condiciones de deficiencias de hierro, el hongo excreta agentes quelantes específicos de bajo peso molecular llamados sideroforos, que le permiten tomar el hierro en forma reducida (Eisendle *et al.*, 2004 citado por Chávez, 2004).

#### **2.2.8.3. Antibiosis**

La antibiosis ocurre durante la interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Además, las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden colonización por microorganismos antagonizados; entre estos metabolitos, la producción de ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentyl a pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptédico y otros están siendo descritos (Howell *et al.*, 1998).

#### **2.2.8.4. Micoparasitismo**

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma spp* puede ejercer control directo por el rango de parasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre él. (Benítez *et al.*, 2004).

El proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas. Comienza por el crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma* hacia el hospedador, estimulado por moléculas procedentes del mismo, de naturaleza desconocida. Las únicas que se han detectado hasta ahora son aminoácidos y azúcares, por lo que no cabe esperar que la inducción sea específica del hospedador (Chet *et al.*, 1981).

Los hongos del género *Trichoderma* se adhieren con carbohidratos unidos a lectinas en la pared celular del patógeno. Una vez *Trichoderma* es adherido se enrosca alrededor del patógeno y forma el apresorio (Howell, 2003).

El paso siguiente consiste de la producción de CWDE's, peptaiboles y enzimas hidrolíticas CWDE's (Howell, 2003), lo cual facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del lumen del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared celular (Benítez *et al.*, 2004).

#### **2.2.8.5. Fusarium**

*Fusarium* es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse y Rep 2009). Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo. *Fusarium oxysporum* es un organismo muy amplio a nivel de especie, se conocen 4 razas de FOA y ninguna ha sido descrita como no patogénica, la clasificación también está basada en la sintomatología de la planta.

Esto significa que la mayoría de las especies han sido divididas en grupos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan, tales como *Fusarium* del cáncer del tallo, *Fusarium* de la putrefacción de la raíz y *Fusarium* del marchitamiento vascular.

### 2.2.9. Beneficios de utilizar *Trichoderma spp* en cultivos

Controlador eficaz de enfermedades de plantas	Preserva el ambiente al disminuir el uso de funguicidas
Posee un alto rango de acción	Al reemplazar agroquímicos sintéticos por microorganismos benéficos, el productor ahorra en sus costos de producción
Con el uso de microorganismos en los cultivos, las plagas no generar resistencia como sucede cuando utiliza agroquímicos	
descompone la materia orgánica: haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo	Se propaga en el suelo, aumentando su población y ejerciendo control en hongo
Estimula el crecimiento de los cultivos	Ataca patógenos de la raíz ( <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> ) y del follaje ( <i>Botritis</i> y <i>Mildu</i> ) antes que puedan ser los detectados; y evita el ataque de ( <i>Phytophthora</i> )
Puede ser aplicado en compostaje o materia orgánica en descomposición	
Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos	Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje de las plantas

(Hernández, Fernández, Alarcón, 2019).

## **2.3. HIPÓTESIS**

### **2.3.1. Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

Las cepas de *Trichoderma* presentan polimorfismo que determine que entre los aislados hay variabilidad genética y tienen potencial de inhibir a *Fusarium*.

### **2.3.2. Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>)**

Las cepas de *Trichoderma* no presenten polimorfismo que determine que entre los aislados hay variabilidad genética y no posee potencial de inhibir a *Fusarium*.



## **Capítulo III. Diseño metodológico**

### **3.1. Tipo de estudio**

La presente investigación monográfica según la intervención del investigador, manipulación intencional y control de las variables se considera un estudio de tipo experimental, así mismo de acuerdo al diseño metodológico y en base a la manifestación de determinados fenómenos sometidos a medición es considerado un estudio cualitativo y conforme al tiempo de ocurrencia de los hechos y registro de la información obtenida, el estudio es prospectivo, de igual manera es un estudio longitudinal por la sucesión y el periodo de tiempo empleado. Y según el análisis y el alcance de los resultados es analítico. (Piura López, Hernández y Fernández).

### **3.2. Ubicación del estudio**

La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB), del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en el kilómetro 14 ½ Carretera Norte, en la ciudad de Managua, localizado entre las coordenadas 12° 08' 36" latitud norte y a los 86°09' 49" longitud oeste.

### **3.3. Población**

Precedente a este trabajo se colectaron muestras de suelo de fincas ubicadas en diferentes lugares del país, donde se obtuvieron 26 cepas positivas entre la región I, II, III Y VI, para este estudio se procesó aproximadamente 40 unidades de la región V, lo cual se analizaron en el laboratorio de agrobiotecnología en donde se efectuó un estudio de aislamiento y purificación para obtención de cepas nativas de *Trichoderma spp.* **Anexo 1**

### **3.4. muestra**

26 cepas previamente aisladas más 34 cepas aisladas y purificadas de suelo colectado de la región V para un total de 60 cepas de *Trichoderma* para este estudio.

### 3.4. Variables

#### 3.4.1. Variables independientes

- a. variabilidad genética presente en cepas de *Trichoderma*.

#### 3.4.2. Variables dependientes

- a. Inhibición del crecimiento de la cepa *Fusarium spp.*

#### 3.4.3. Operacionalización de las variables

**Tabla 2. Descripción operacional de las variables**

Objetivos específicos	Definición operacional	Indicador	valores	Escala
1. Se Identificó la variabilidad genética existente en poblaciones de <i>Trichoderma</i> nativo mediante REP-PCR.	1.1. variabilidad genética de los 60 aislados de <i>Trichoderma</i> por el método molecular Rep-PCR con los marcadores MBO, BOX A1, (GTG)5	1.1.1. Variabilidad genética	Nivel de polimorfismo	1Kb/kpb
2. Se evaluó la acción antagónica y de competencia <i>in vitro</i> de aislados nativos de <i>Trichoderma spp</i> sobre <i>Fusarium spp.</i>	2..1. capacidad inhibitoria de las 60 cepas de <i>Trichoderma</i> Sobre el patógeno <i>Fusarium</i> Mediante competencia en <i>in vitro</i>	2.2.1. Porcentaje de inhibición	Competencia por nutrientes y espacio	Cm

### 3.5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.5.2. Análisis Molecular:

El análisis molecular se realizó según el protocolo de (Versalovic y Brujin, 2004)

Gel-Pro analyzer: es un programa que detecta y cuantifica automáticamente las bandas de electroforesis determina el peso, tamaño y puntos isoeléctricos de las moléculas con múltiples carriles estándar, la interpretación de los datos arrays dot blot regulares e irregulares, se exporta directamente al Microsoft® Excel que permite medir y automatizar los procesos de medida en distintos tipos de geles, y así calcular su peso molecular.

#### 3.5.3. Análisis de Antagonismo

Se evaluaron con la fórmula utilizada por ( Fakhrunnisa & Ghaff, 2006) porcentaje de inhibición de *Trichoderma*.

$$I = \left( \frac{r1 - r2}{r1} \right) \times 100$$

I: porcentaje de inhibición

r1: crecimiento radial del patógeno sobre el lado opuesto, evaluado en la caja Petri.

r2: crecimiento radial del patógeno en enfrentamiento.

Grado de inhibición de *Trichoderma*: se midió de acuerdo a la escala de Fernandez & Suarez,2009)

Grado	Índice de inhibición
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia de <i>Trichoderma</i>
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia de <i>Trichoderma</i>
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia de <i>Trichoderma</i>
3	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>Trichoderma</i>
4	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>Trichoderma</i> y esporulación sobre ella

- a. **Microsoft Office Excel:** es un software informático que se utilizó para evaluar el porcentaje de inhibición que posteriormente se representó en tablas, gráficos y formatos que incluyo cálculos matemáticos mediante fórmulas.
- b. **Microsoft office Word:** programa informático que permitió la realización y edición de todo el documento.
- c. **Adobe Photoshop:** es un editor de gráficos rasterizados desarrollado por Adobe Systems Incorporated. Usado principalmente para el retoque de fotografías y gráficos, empleado para la edición de imágenes en general.
- d. **Canva:** es un sitio web de herramientas de diseño gráfico simplificado, Utiliza un formato de arrastrar y soltar y proporciona acceso a más de un millón de fotografías, vectores, gráficos y fuentes. Es utilizado por no diseñadores, así como profesionales.

### **3.6. Métodos para la obtención de cepas nativas de *Trichoderma spp.***

#### **a. Tipo de método**

Aislamiento y purificación de *Trichoderma* de suelo colectado en la región V.

#### **b. Técnica empleada para el aislamiento**

##### **3.6.1. Diluciones seriadas**

Para el aislamiento de *Trichoderma* se utilizó el método de dilución seriada descrita por Hassan & El-Awady, (2011): se tomaron muestras de 10 g de suelo que fue diluida en 100ml de agua estéril en un Erlenmeyer para la obtención de la suspensión de suelo. En total se prepararon de 10<sup>-5</sup> diluciones seriadas y se depositaron 100 µL de la solución en platos Petri conteniendo medio papa dextrosa agar. Luego se procedió a guardar las muestras en una incubadora a una temperatura de 26<sup>0</sup> c, durante 7 días o hasta el apareamiento de las colonias de *Trichoderma*, ilustración en **Anexo 2**.

#### **Criterios de selección de cepas**

##### **Criterios de inclusión**

- ☞ Crecimiento rápido.
- ☞ Coloración: blanca-verdes, amarillo-verdosas.
- ☞ Olor a coco.
- ☞ Áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos.

##### **3.6.2. Purificación**

Para la purificación las colonias identificadas como *Trichoderma* se realizaron transferencia directa a cajas Petri con medio de PDA.

### 3.6.3. Cepas en estudio

**Tabla 3. Códigos de los aislados de *Trichoderma***

<i>referencia</i>	<i>código de cepas</i>	<i>referencia</i>	<i>códigos de cepas</i>	<i>Referencia</i>	<i>códigos de cepas</i>	<i>fuentes</i>
1	<b>TRII FIII MI</b>	21	<b>R5F717</b>	41	<b>R5BF2M2</b>	suelo
2	<b>TRIII F4 M4</b>	22	<b>F4R1#2 A</b>	42	<b>R5CRGM4</b>	suelo
3	<b>TRII FIIIMI</b>	23	<b>F3 R1 #1 C</b>	43	<b>R5KHF3M3</b>	suelo
4	<b>TRII F1 M4</b>	24	<b>F4R1 #2 B</b>	44	<b>R5CR5F1M2B</b>	suelo
5	<b>TRII FII M4</b>	25	<b>R5KHF1M4V</b>	45	<b>R5TF2M3B</b>	suelo
6	<b>TRIII FII M2</b>	26	<b>R5KHF1M4B</b>	46	<b>R5TF2M3A</b>	suelo
7	<b>TRIII F3 M2</b>	27	<b>R5CRGF1M4</b>	47	<b>R5TF2M1</b>	suelo
8	<b>TRII FII M4</b>	28	<b>R5CRGF4M3</b>	48	<b>R5LPF2M1B</b>	suelo
9	<b>TRII F1 M5</b>	29	<b>R5CREF4M1</b>	49	<b>R5TF2M5B</b>	suelo
10	<b>TRIII F3 MI</b>	30	<b>R5CR5F1M2</b>	50	<b>R1LPF2M3A</b>	suelo
11	<b>TRIII F3 M2</b>	31	<b>R5BF1M4</b>	51	<b>R5TF2M2</b>	suelo
12	<b>MMRI</b>	32	<b>R1LPF2M3B</b>	52	<b>R5LPF2M1A</b>	suelo
13	<b>TRIII F1 M2</b>	33	<b>R5TF2M4</b>	53	<b>R5LPF2M248</b>	suelo
14	<b>TRIII F3 M2</b>	34	<b>R5BF2M3</b>	54	<b>R5KHF1M5B</b>	suelo
15	<b>F2 RI #2 B</b>	35	<b>R5TF2M5A</b>	55	<b>R5KHF1M5A</b>	suelo
16	<b>R6 F8 17 A)</b>	36	<b>R5LPF2M4</b>	56	<b>R5KHF1M1</b>	suelo
17	<b>F3 R1 #2 C</b>	37	<b>R5LPF1M1A</b>	57	<b>R5LPF1M1B</b>	suelo
18	<b>F4 R1 #2 C</b>	38	<b>R5LPF1M4</b>	58	<b>R5BF2M4</b>	suelo
19	<b>F3 R1 #2B</b>	39	<b>R5DCRF1M</b>	59	<b>R5BF1M3</b>	suelo
20	<b>R6F317 C)</b>	40	<b>R6CREF4M5</b>	60	<b>R5TF1M1</b>	suelo

### 3.7. Multiplicación de cepas de *Trichoderma* para extracción de ADN

Tabla 4. Medios y equipos utilizados en la técnica.

Material	Equipo	Medio
Tubo de cultivo T/Rosca Plato Petri	Baño maría Hotplates, stirres Autoclave Cabina de bioseguridad	Malt extract broth potato Dextrose Agar

#### 3.7.1. Procedimiento empleado

Como parte de este proceso se utilizaron dos medios para la multiplicación de aislado de *Trichoderma*, por cada cepa se realizó diez replicas, ejemplo **Anexo 3**.

##### MEB

- Esterilización de tubos de cultivo.
- Preparación del medio 37g/1Lt.
- Se colocó baño maría por una hora
- Se agitó el medio a 6stir.
- Autoclave 20 minutos a 120°C
- Se procedió a llevar a la cabina de Bioseguridad para la inoculación del micelio.

##### PDA

- Esterilización de Platos Petri.
- Preparación de medio 17g/1Lt.
- Se agitó por 6stir.
- Autoclave 20 minutos a 120°C
- Se procedió a llevar a la cabina de bioseguridad; una vez solidificado se colocó el inóculo en los platos Petri.

#### 3.7.2 Extracción del ADN

Se usaron dos Protocolos, original con la metodología propuesta por kim et.al. (1992), modificado por Lee (2000) y Argoti, (2006), para extracción de ADN de hongos, modificado.

Con un asa descartable, se tomó todo el micelio luego se depositó en un mortero y se agregó 1 ml de malt extract broht. Una vez totalmente amacerado el micelio se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugo a 13,000 rpm por 30 minutos, eliminando el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 500 µL de buffer de CTAB y 1.5 µL de proteínasa K a 68° C por media hora en baño María, después se añadió 700ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico y centrifugo 13,000rpm por 30 minutos, se transfirió 300 µL de sobrenadante a un nuevo tubo, se trató el sobrenadante con 1 µL de RNasa y se incubó por media hora. se agregó un volumen de fenol cloroformo, se centrifugo 13,000rpm por 15 minutos, se transfirió 200 µL de sobrenadante a otro tubo, se añadió 25 ml acetato de sodio y 500 µL de isopropanol y se dejó en incubación por media hora a -20° C. Después se centrifugo a 13,000rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se añadió 400 ml de etanol de 70% y centrifugo 13,000rpm por 15 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente, se disolvió el pellet de ADN en 100 µL TE.

Segundo Protocolo reportado por Aljanabi & Martinez (1997) modificado.

Con un asa descartable se tomó pequeños micelios en crecimiento de medio de PDA y se depositó en un mortero donde se le añadió 500 µL de buffer de CTAB, una vez macerado se procedió a incubar en baño María a 65° c por 30 minutos, luego se centrifugo a 10,000rpm por 5 minutos y se transfirió 300 µL de sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadió un volumen igual de cloroformo alcohol isoamilico, luego el tubo se voltio suavemente varias veces y se centrifugo a 12,000rpm por 10 minutos, se transfirió 200 µL de sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió un volumen igual de isopropanol frio, se almacenó -20° c por una hora, la muestra se precipito a 14,000rpm durante 10 minutos, y se añadió 500 µL de etanol al 70% , y se precipito a 12,00rpm durante 5 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 50 µL de TE. **Anexo 4**



### 3.7.3. Programa PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Las reacciones PCR se realizaron en volúmenes de 25  $\mu$ L, 2  $\mu$ L de ADN, 2  $\mu$ L de primer reverse y 2  $\mu$ L de primer forward, 12.5  $\mu$ L de Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mixt 6.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasa.

La amplificación se realizó *en un Mastercycler®pro-ependorf* con una programación de 94°C por 5 minutos y 94°C por un minuto para la desnaturalización, seguido de 30 a 35 ciclos de 45 segundos a temperaturas de 51.7-58.8°C *para* el anidamiento, vario dependiendo el tipo de marcador RS utilizado, seguido de 2,5 minutos a 72°C de elongación y una elongación final de 10 minutos a 72°C. una vez finalizado el programa se añadió 1.2 $\mu$ L de 6X Buffer de tinción, para luego pasar a electroforesis, ilustración **Anexo 5**.

### 3.7.4. Electroforesis

A la cámara de electroforesis se le adicionó 600 ml de TBE 5X (Tris base, Ácidobórico y EDTA), este tampón permite mantener las moléculas de ADN con una carga negativa uniforme y constante.

La visualización de las reacciones se realizó en gel de agarosa (Agarose, LE, Analytical Grade) 3%, colocando en cada posición 6  $\mu$ L de mezcla del producto PCR, y 4  $\mu$ L de GeneRuler de ADN en cada extremo del gel, cuyos pares de base dependió del marcador utilizado. Se dejó correr 120 minutos, a 330 amperios y 90 voltios.

La visualización de las bandas se realizó con el transluminador ultravioleta High Performance UV Transilluminator con el sistema de documentación de geles Doc-It® Life Science Software.

### 3.7.5. Descripción de marcadores moleculares

Se utilizaron tres marcadores RS-PCR (repetitive sequence) seleccionados de estudios diversos que cualifican como una poderosa herramienta para análisis de estudio genético.

**Tabla 5. Descripción de marcadores**

Cebadores	Secuencia
<b>Box1</b>	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
<b>MBO REP 1</b>	5'-CCGCCGTTGCCGCCGTTGCCGCCG-3'
<b>(GTG)5</b>	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

### 3.8. Estudio de antagonismo in vitro de cepas de nativas sobre *Fusarium* spp.

El potencial antagónico de *Trichoderma* sobre *Fusarium* spp fue determinado utilizando el enfrentamiento descrito por Morton & Stroube, (1995), para este estudio se utilizaron todas las cepas y biotipos aislados.

#### 3.8.1. Preparación del inóculo de cepas de *Trichoderma*

El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio. Se utilizaron 60 cepas de hongos filamentosos, para evaluar el crecimiento libre de cada una de las cepas antagonista se realizó repique en cajas de PDA en un periodo de crecimiento de 7 días, posteriormente se tomaron disco 0,5 cm de diámetro de zonas de crecimiento con mayor esporulación y fueron sembradas en PDA.

### **3.8.2. Preparación del patógeno *Fusarium spp.***

Para la preparación del inóculo de *Fusarium spp.*, se tuvo en cuenta su crecimiento fúngico activo en PDA durante 7 días.

### **3.8.3. Pruebas de antagonismo in vitro**

Las pruebas de antagonismo son un paso fundamental para evaluar la capacidad de un determinado microorganismo como agente biocontrolador. Conocer el porcentaje radial obtenido por cada cepa es un indicador directo de su potencial.

Para determinar la capacidad antagónica de las 60 cepas de *Trichoderma* sobre el patógeno *Fusarium*, se aplicó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones, la unidad experimental correspondió a una caja con PDA.

Para las pruebas de enfrentamiento se colocó un disco de agar de 0,5 cm con hongo antagonista, en el extremo opuesto de la caja Petri, se colocó otro disco de agar con el hongo patógeno a confrontar, se procedió a incubar en un periodo de 7 días con una temperatura de 25<sup>0</sup>C, el crecimiento de los organismos en enfrentamiento fue evaluado cada 24 horas, se consideraron 3 repeticiones para cada enfrentamiento. Para medir el efecto inhibitorio, de hongo antagónico hacia el patógeno, se midió el crecimiento de estos últimos. El porcentaje de inhibición se estimó con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento del patógeno confrontado con la cepa antagónica y el crecimiento de la cepa del respectivo patógeno sin antagonista, ilustración **Anexo 6**.

## **Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados**

Para el análisis de los datos obtenidos en el desarrollo de las dos etapas de la investigación, se ponen en evidencia dichos resultados detallando los aspectos más importantes y demostrando así ser útil para evaluar la diversidad genética de aislados de *Trichoderma* de las regiones I, II, III, V & VI.

### **4.1. Variabilidad genética**

En el análisis de la variabilidad mediante RS-marcadores, se evaluaron 60 aislados de *Trichoderma spp.* Empleando tres cebadores de secuencia repetitiva, donde patrones de bandas presentaron diferencias polimórficas.

Para el análisis, solo se consideraron aquellas bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel. Las intensidades de las bandas no fueron consideradas como un factor polimórfico de acuerdo a la sugerencia de Luna (2003).

Se probó tres cebadores diferentes (BOX A1, MBO, GTG5) para los patrones de huella digital, donde se ocuparon muestras de ADN de aislados de *Trichoderma*, en este estudio los marcadores RS se realizaron por duplicados, y se descubrió que los productos de la amplificación eran reproducibles. El tamaño de la secuencia de nucleótidos vario de aproximadamente 300 a 3,000 Pb (*Fig. 1*).

El resultado con el mayor número de fragmentos amplificados fue usando el cebador BOX A1 mostrando un total de 25 bandas en todos los aislamientos de *Trichoderma* en un rango de 310 Pb a 2,000 Pb (*Fig. 2*).

19 bandas comunes se observaron en todos los aislamientos de *Trichoderma* que exhibieron alrededor del 70% de monomorfismo mientras que los otros fragmentos mostraron un 24% de polimorfismo entre los 60 aislados de *Trichoderma* (Tabla 6).

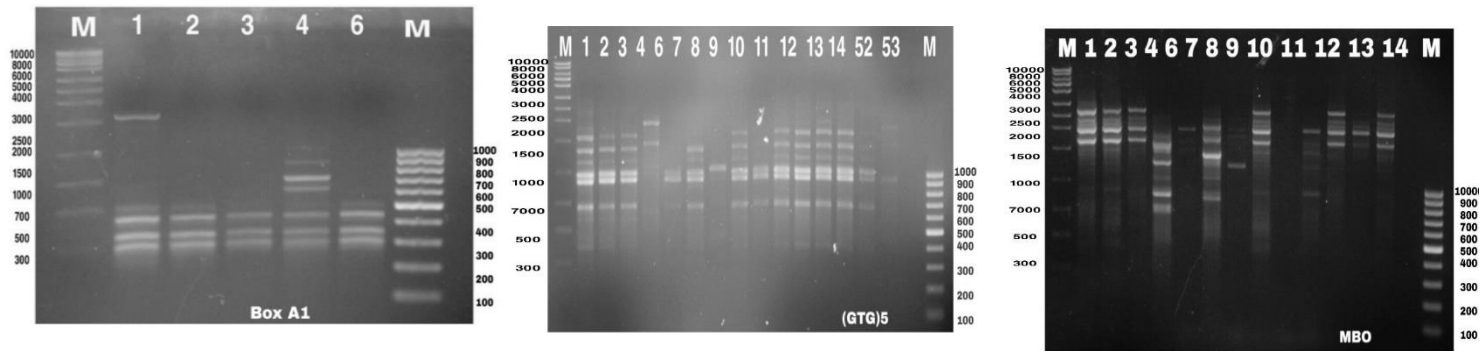


Figura 1. Productos de amplificación de PCR a partir de ADN genómico de las cepas nativas de *Trichoderma* donde se logra comparar los aislados 1 2 3 4 6 con los tres cebadores Box A1, (GTG)5, MBO, observando el rango de elongación de 300pb a 3000pb

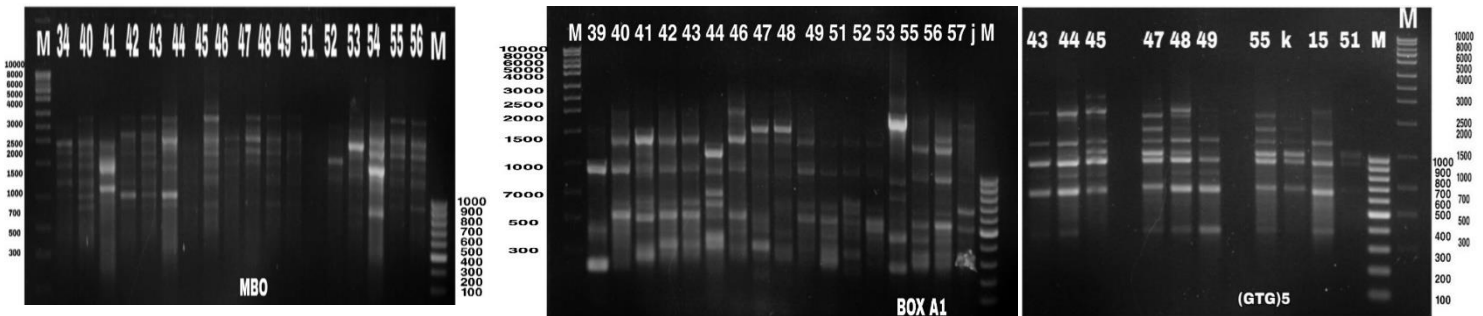


Figura 2. nivel de polimorfismos detectado mediante 3 marcadores de secuencia repetitiva Rep-PCR de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. M: 1kb DNA. M:100pb

#### 4.2. polimorfismo de los 60 aislados determinado por los tres marcadores

**Tabla 6.** Nivel de polimorfismo por los tres marcadores de secuencia repetitiva que fue usado para el análisis de rep-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Total bands</i>	<i>Monomorphic Bands</i>	<i>Polymorphic Bands</i>	<i>Monomorphism (%)</i>	<i>Polymorphism (%)</i>
<b>BOX A1</b>	25	19	6	76	24
<b>MBO</b>	20	17	3	85	15
<b>GTG5</b>	27	14	13	51.9	48.1
<b>TOTAL</b>	72	50	22	69.4	30.5

En este estudio se encontró una variabilidad promedio genotípica intraespecífica en *Trichoderma*, a pesar de estar potencialmente limitado en su capacidad de generar variación debido a su reproducción de tipo asexual. Esta variación dentro de las poblaciones puede explicarse debido a la existencia de diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como las mutaciones, el flujo de genes en las poblaciones y la recombinación.

Este tipo de variación puede ser continua o discontinua. La variación continua puede ser cuando se observa diferencias entre dos extremos de una población de patógenos, pero la diferencia entre los individuos es muy sutil. Por el contrario, la mutación discontinua ocurre cuando la expresión del cambio tiene efectos determinantes Carlie y Watkinson (1996).

Al utilizar los RS marcadores se encontró una relación entre el agrupamiento del aislamiento con procedencia de cada uno de ellos, ya que pertenecen a zonas agroecológicas diferentes es posible que la variabilidad haya sido afectada por los microclimas y el uso de bajos y altos insumos agrícolas y en consecuencia generó cambios en la construcción genética del aislamiento.

### 4.3. Estudio de la competencia por nutrientes y espacio según la comparación del RCA y el RCP.

Al hacer comparación diaria del radio del crecimiento antagonista (RCA), con el radio del crecimiento patógeno (RCP) de cada cultivo dual se determinó la competencia por nutrientes y espacio donde se encontró que las cepas de *Trichodermas* se desarrollaron a una velocidad superior a la de *Fusarium spp.* Debido a que los aislamientos del antagonista tuvieron un crecimiento promedio de 7.0 cm al décimo día similar al promedio de sus testigos (8,0cm); mientras que el patógeno mostró un crecimiento limitado de 2,83 cm al décimo día, diferente al testigo que creció hasta 4,95 cm de radio.

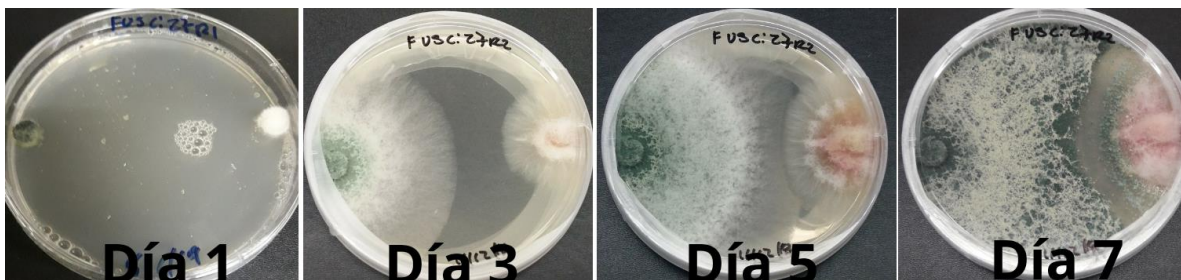


Figura 3. prueba antagonista del aislado 27 contra el patógeno, al lado izquierdo *Trichoderma* al lado derecho *Fusarium*.

Evaluación del Crecimiento y esporulación en PDA de las diferentes antagonistas, algunas cepas de *Trichoderma* presentaron mico parasitismo esporulando sobre *Fusarium spp.* Esta actividad mico parasitaria ha podido degradar en un 100% la estructura en reposo del patógeno gracias a que estas cepas presentan enzimas extracelulares tales como quitinasa y celulosas durante este proceso crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante una vez cerca del patógeno comienza su adhesión y enrollamiento para finalizar con la actividad lítica.

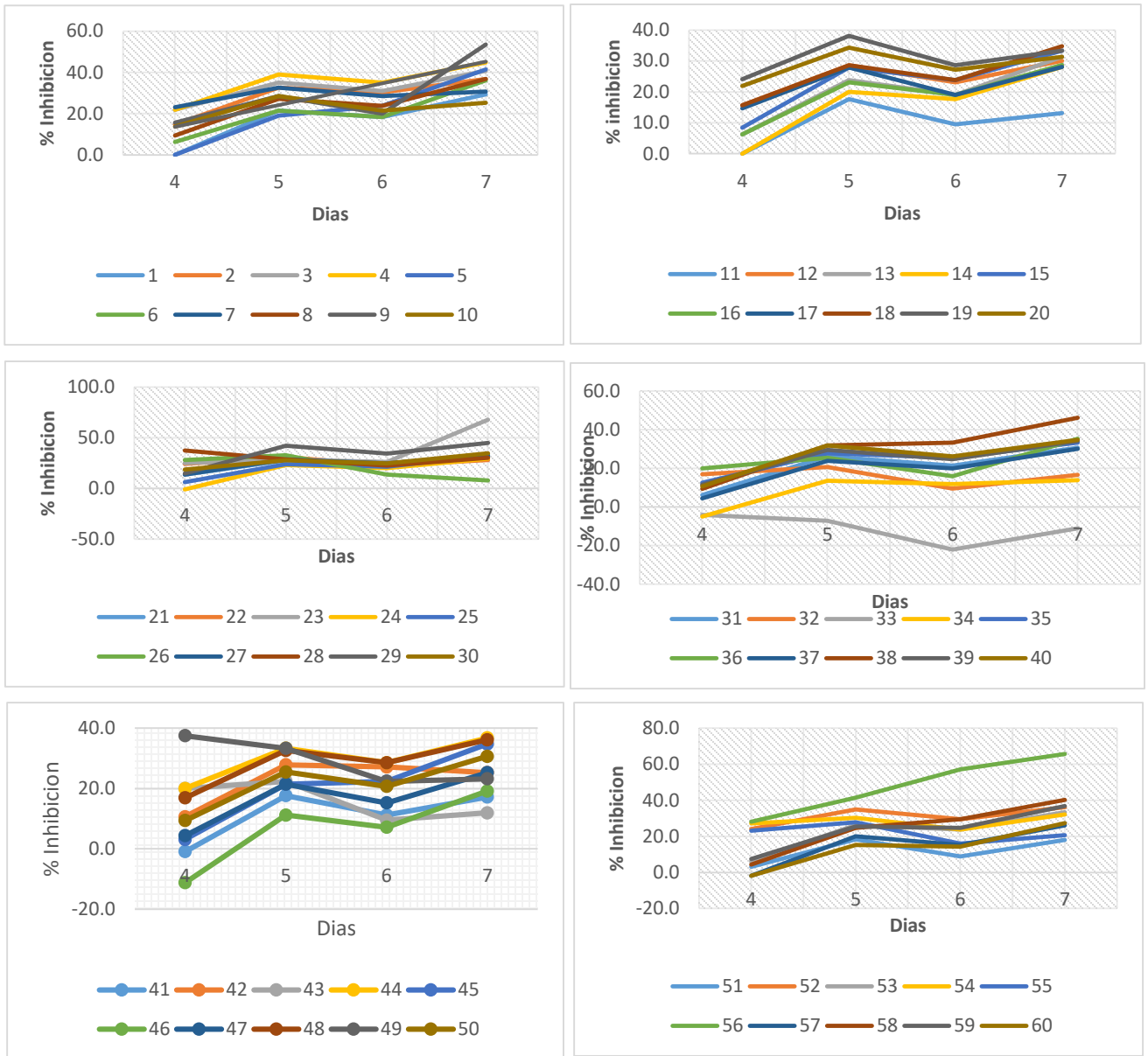
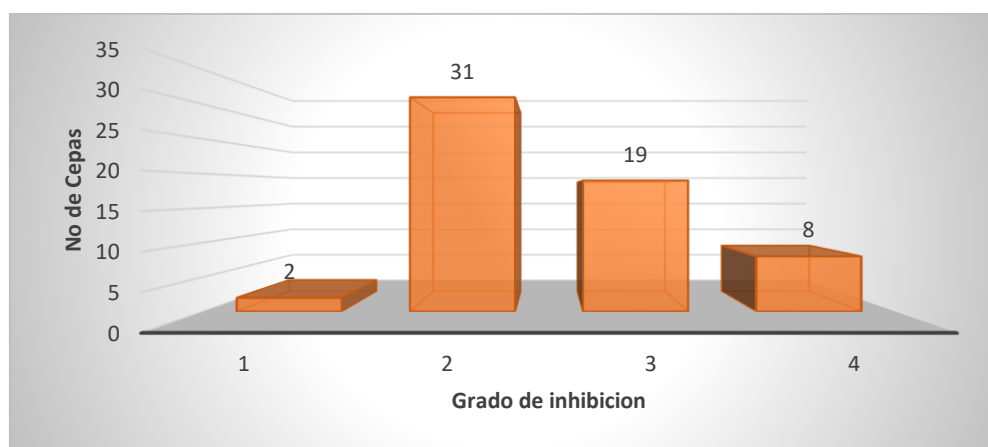


Figura 4. Crecimiento por nutrientes y espacio de las 60 cepas nativas de *Trichoderma spp.* Frente al patógeno *Fusarium spp.*; en cultivo dual



Cuando comparamos el desarrollo radial de las cepas de *Trichoderma* nativas, con el patógeno *Fusarium*, en cada cultivo dual, se determinó que estas muestran un mejor desarrollo radial en el medio de cultivo PDA, mostrando un mejor aprovechamiento de los nutrientes y espacio, lo que se traduce como un mayor desarrollo de la colonia, siendo algunas cepas superiores al patógeno (Fig. 3).

Los resultados promedios de los valores obtenidos del crecimiento radial de cada cepa aislada, tanto patógeno como del antagonista, establece diferencias importantes en cuanto a susceptibilidad y agresividad.



**Figura 5. Índice de inhibición de los 60 aislados**

De acuerdo a la escala propuesta por Fernandez & Suarez (2009) se evaluó que de las 60 cepas de *Trichoderma* 8 pertenecen al grado 4, 19 cepas al grado 3, 31 cepas al grado 2 y 2 cepas al grado 1. (Fig. 5).

Se pudo observar visualmente que las cepas grado 8 ganaron espacio en el plato Petri, lo que demuestra que estas cepas tienen una mayor habilidad para luchar por un substrato común frente al patógeno (Fig.6) podría estar ocurriendo la muerte del patógeno por causa de la inanición coincidiendo con lo reportado por Garret (1965) como también, Sutton, J.C y Peng, G. (1993) se refirió a *Trichoderma* S.

#### 4.4. Grado de inhibición al que pertenece los 60 aislados de *Trichoderma*.

De acuerdo a la escala mencionada anteriormente la capacidad antagónica de las cepas 2, 6,9,19,23,29,38 y 56 frente al fitopatógeno, Corresponde al grado 4 en donde *Trichoderma* invade totalmente la superficie de la colonia del hongo *Fusarium spp.* Esporulando sobre ella (Fig. 6). Mostrando un potencial efecto inhibitorio y parasítico sobre el patógeno, que a nivel de *in vitro* se demuestra por la rapidez con que el microorganismo logra hacer contacto con el patógeno y detener su crecimiento. Son cepas altamente competitivas por nutrientes y espacio con crecimiento rápido a los 7 días de la confrontación.

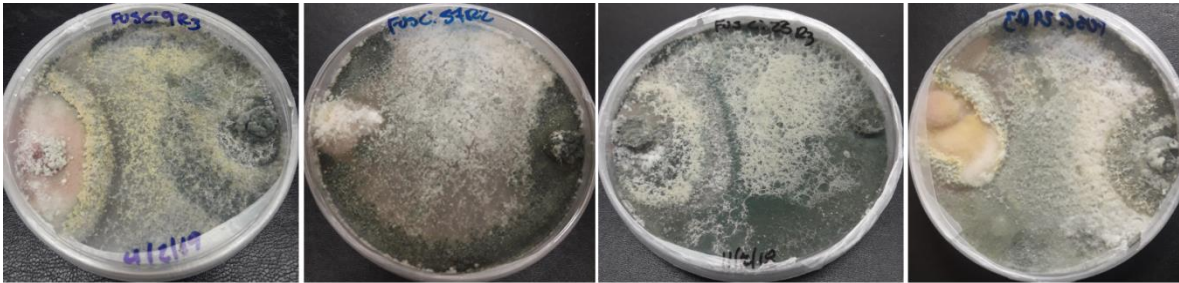


Figura 6. cepas de *Trichoderma* que cumplen con el grado 4 de inhibición

las cepas 3,4,8,13,15,18,25,39,40,44,48,49,31,52,53,54,57,58,59 cumplen con el grado 3 donde el antagonista invade totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno (Fig. 7). Se pudo observar la susceptibilidad de *Fusarium spp.* Ante cada una de las cepas evaluadas, obteniendo un alto valor como biocontrolador.

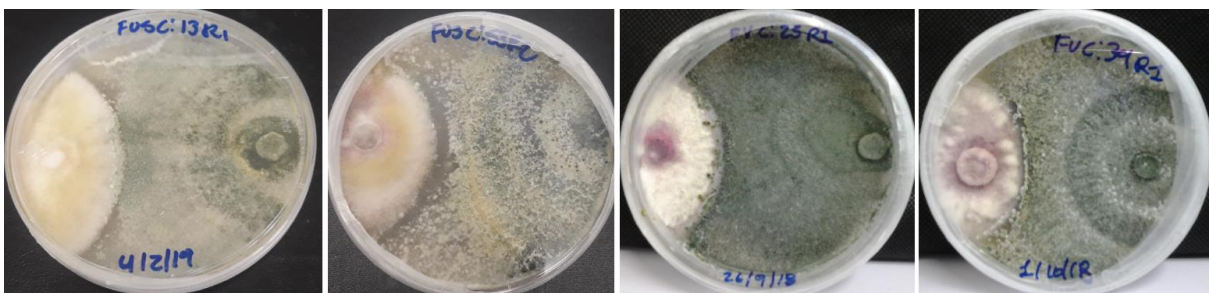


Figura 7. Cepas de *Trichoderma* que cumplen con el grado 3 de inhibición

Las cepas 1,5,7,10,12,14,16,17,20,21,22,24,26,27,28,30,31,32,34,35,36,37,41, 42,43,45,46,47,50,55,60 cumplen con el grado 2 Invasión de  $\frac{1}{2}$  de la superficie de la colonia hongo patógeno (Fig. 8). El biocontrol sobre el patógeno es regular.

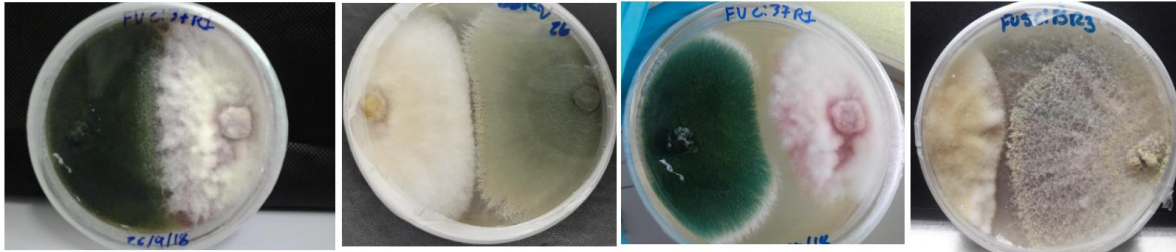


Figura 8. Cepas de *Trichoderma* que cumplen con el grado 2 de inhibición.

Las cepas 11 y 33 son grado 1 Invasión de  $\frac{1}{4}$  de la superficie de la colonia del hongo patógeno (Fig.9). El biocontrol de estas dos cepas sobre fusarium es nulo.

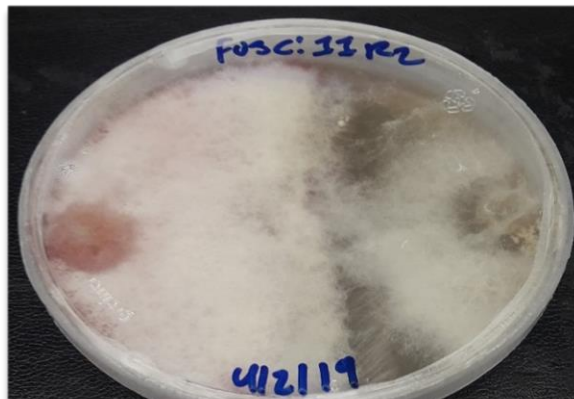


Figura 9. Cepa de *Trichoderma* que cumplen con el grado 1

**Tabla 7. Porcentaje de inhibición de las 60 cepas Nativas de *Trichoderma* sobre *Fusarium spp.***

Cepa	% de Inhibicion	Cepa	% de Inhibicion	Cepa	% de Inhibicion
1	29.29	21	33.33	41	17.17
2	36.77	22	28.08	42	25.25
3	40.81	23	67.68	43	11.92
4	44.85	24	29.29	44	36.77
5	41.41	25	32.73	45	34.75
6	36.16	26	7.88	46	19.19
7	30.71	27	32.12	47	25.25
8	36.77	28	30.10	48	36.16
9	53.54	29	44.85	49	23.23
10	25.25	30	34.75	50	30.71
11	13.13	31	30.71	51	17.98
12	30.10	32	16.57	52	36.16
13	31.31	33	-11.11	53	33.33
14	28.08	34	13.94	54	32.12
15	33.33	35	33.33	55	20.61
16	28.69	36	35.35	56	65.66
17	28.08	37	30.10	57	26.06
18	34.75	38	46.26	58	40.20
19	33.33	39	34.14	59	36.77
20	31.31	40	34.75	60	27.27

El fenómeno de antagonismo entre hongos esta mediado por una serie de mecanismo de ataque y repuesta desarrollado por el biocontrolador y el patogeno por controlar. *Trichoderma spp.* Dispone de una gran variedad de mecanismo de ataque; entre los más conocidos se encuentran el parasitismo, la antibiosis, la competencia por nutrientes y espacio, la liberación de enzimas que afectan el metabolismo de otros microorganismos, la activación de repuesta de defensa, la estimulación de la germinación y crecimiento (Infante et al., 2009, Harman, 2006; Howel, 2003; Lorito et al.;1990) estos mecanismos y su intensidad varían entre especies y cepas aisladas. por lo tanto, se puede decir que la cepa 23 presenta el mejor control para *Fusarium spp* entre las 8 cepas que pertenecen al grado 4. (Tabla7).

## Capítulo V. Conclusiones, recomendaciones, referencias

### 5.1. CONCLUSIONES

En el análisis de rep-PCR con los tres marcadores de secuencia repetitiva permitió identificar 72 bandas que presentaron un polimorfismo de 30.5% dentro de los 60 aislados, resultante de este análisis se comprobó que hay variabilidad genética por lo que entre los aislados de *Trichoderma* hay diferentes especies con variaciones genéticas dentro del mismo género. Bisset (1991) lo describió con una gran variedad intraespecífica. y Kredics (2003;2006) estableció que se debe por las diferencias entre las distintas circunstancias donde se desarrollaron los aislamientos, contrastes entre las áreas geográficas donde se encuentran y las fuentes de inóculo muestreadas, características propias de cada individuo y la forma en cómo se reproducen.

El análisis estadístico demostró el potencial inhibitorio de *Trichoderma* spp, confrontado con *Fusarium*.

Las cepas con grado 4 obtuvieron un promedio en el índice de inhibición de **49.64%**; cepas grados 3: promedio de inhibición de **36.10%**, cepas grado, 2 obtuvieron un promedio de **27.11%** las cepas grado 1: un promedio de **12.12%**. Con respecto a los resultados obtenidos, la mayor inhibición fue dada por el aislado 23 código F3 R1 #1 C, el cual inhibió el crecimiento de *Fusarium* spp, en un **67.68%** y la cepa de menor inhibición fue la cepa 33 código R5TF2M4 con un **-11.11%** de inhibición

Los aislados identificados para *Trichoderma* del presente estudio tienen importancia para la agricultura desde el punto de vista como biocontrolador de fitopatógenos al estar estas cepas adaptadas a las condiciones de suelo nicaragüense, pudieran ser utilizadas próximamente en aplicaciones biotecnológicas.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Se propone al laboratorio del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB) que las mejores cepas antagonistas determinadas por este estudio se deben probar en campo para observar su interacción con microorganismo de la raíz, suelo y planta y así tomar una decisión final de cuáles son los aislamientos dentro de la misma especie para un combate biológico de distintos patógenos.
- Desarrollar el árbol filogenético de las especies de cepas de *Trichoderma*, para profundizar en los aspectos relacionados con el control biológico.
- Indagar sobre la naturaleza de los compuestos liberados por *Trichoderma* en la confrontación con *Fusarium* ya que serían muy útiles para ser empleados en la industria de productos fitosanitario de origen biológico.
- Realizar bioensayos donde se evalúen la tendencia de algunos aislamientos de *Trichoderma spp.* Hacia la promoción del crecimiento y vigorización de las plantas por lo que sería necesario pruebas bajo condiciones de invernáculo y campo.

### 5.3. REFERENCIAS

Benedicto Martínez, Dnay Infante y Belkis Pereira. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. Protección veg. Vol. 30. Cuba.

Barrera VA.; (2012). Estudio de la variabilidad molecular de su estado Anamórfico *Trichoderma*. Universidad de Buenos Aires.

Beil, D.K.; Wells, H.D &Markham, C.R (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*.USA.

Castro Josué Umaña (2018). Relaciones genéticas y características fisiológicas de especies promisorias de *trichoderma* como agentes biocontroladores de *Fusarium oxysporum* Y *Pectobacterium carotovorum*, patógenos de la piña (*Ananas comosus*). Heredia, Costa Rica.

Daynet, Sosa. Ene-Abr (2014). Diversidad genética de *Trichoderma* SPP. Determinada mediante análisis combinado ITS-AFLP.vol.29 no.14, Venezuela.

Egyptian soils. Scientific Research Deanship, Department of Genetics, Faculty of Agriculture.Minufiya University.Egypt.

Griffiths, A.F., Miller J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. y Gelbart, W.M. (1993). An introduction to genetic analysis. Fifth edition Freeman, New York, United States. W.H. and Company / New York.

González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, 2012; 29:12-16. et al. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotechnology Applicate*.

Hernán Chiriboga P. Graciela Gómez B. Karla Garcés E. (2015). *Trichoderma spp.* Para el control biológico de enfermedades. Paraguay.

Harman, G. 2001. *Trichoderma sp.*, Including *T. Harzianum*, *T. viride*, *T. Koningii*, *T. Hamatum* and other sp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system), <http://www.birdhybrids.com/t-22 .htm>.

Ibarra-Medina, Azucena V.; Ferrera-Cerrato (2010). Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. vol. 31. Xalapa, Mexico.

Jan L.w. rademaker, James Versalovic y Frank J. Lows. (2004) characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. Department of plant pathology North Carolina state univ. Raleigh, NC, USA.

Mohamed M. Hassan, Ahmed Gaber and Ehab I. (2014). Molecular and Morphological Characterization of *Trichoderma Harzianum* from different

Martínez Benedicto, Danay Infante, Belkis Peteira; (2015) Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. Mayabeque, Cuba.

Marwi y Pavone. (2013). Identificación de cepas del hongo *Trichoderma spp.* Por métodos moleculares. Venezuela

Navarrete Piero, Cedeño Ángel. (2000) Cultivo *in vitro* de *Trichoderma spp.* Y su antagonismo frente a hongos fitopatógenos. Granda Centeno. Calceta, Manabí, Ecuador.

Rey, M., Delgado, J. J., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Benítez, T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. España.



Tovar Julio, C. (2000). Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *trichoderma* spp frente al hongo fitopatogeno *rhizoctonia solani*. Bogotá D.C.

Verma, M., Brar, S., Tyag, R., Surampalli, R. y Valero, J. 2007. Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal.

Williams, G., kubelik, R., Livak, J., Rafalski, J., Antoni, y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research.

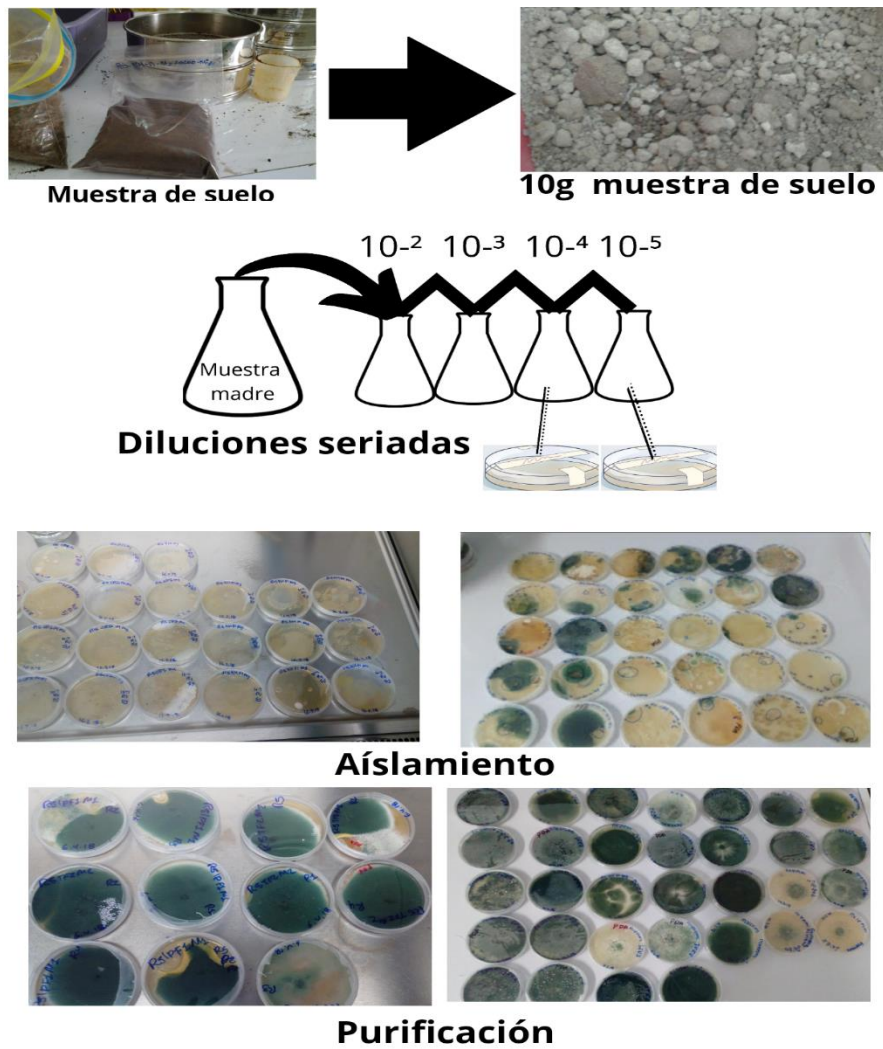
Woo, S., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp, pathogenic fungi, and plants. Phytopathology.

## 5.4. ANEXOS

**Anexo 1.** Criterios de recolección de muestras de suelo de las distintas regiones del país.

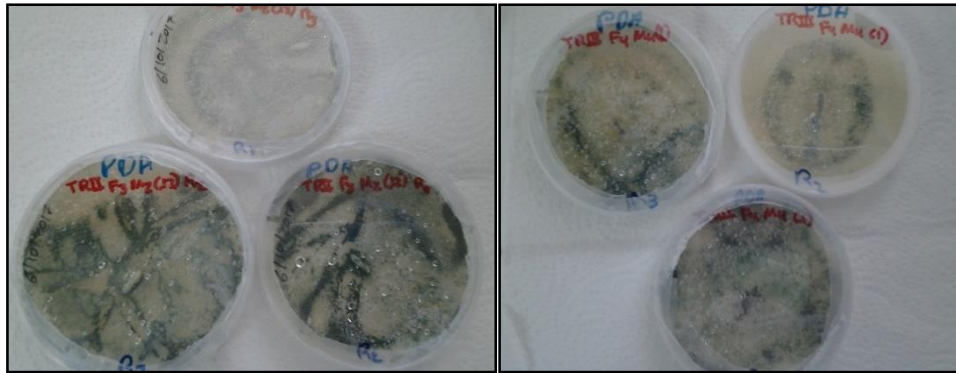
<b>Formato de recolección de la muestra</b>		
Nombre del productor:		
Nombre de la finca:		
Departamento:	Municipio:	Comarca:
Coordenadas:		
Altitud:		
<b>TIPO Y USO DE LA TIERRA</b>		
Agricultura orgánica:	Agricultura convencional:	
<b>SISTEMA DE LABRANZA</b>		
Pasto:	Labranza reducida:	Labranza convencional:
<b>TIPOS Y NIVELES DE FERTILIZACION:</b>		
Biopreparados:	Bioinsumos:	Químicos:
Otros:		
<b>PRACTICAS:</b>		
Monocultivo:	Rotación de cultivo:	Descanso con barbecho:

**Anexo 2.** Aislamiento y purificación de cepas positivas de *Trichoderma* spp.

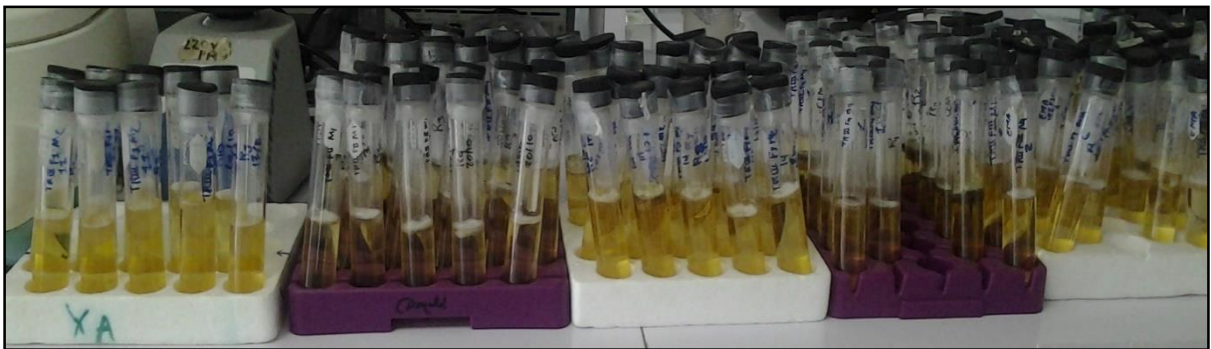


**Figura 10:** Dilución de las muestras de suelo para aislamiento y purificación de cepas de *Trichoderma*.

### Anexo 3. Crecimiento de cepas en diferentes medios.



**Figura 11.** cepas positivas ya aisladas en PDA perteneciente al laboratorio de agrobiotecnología del INTA-CNIA.



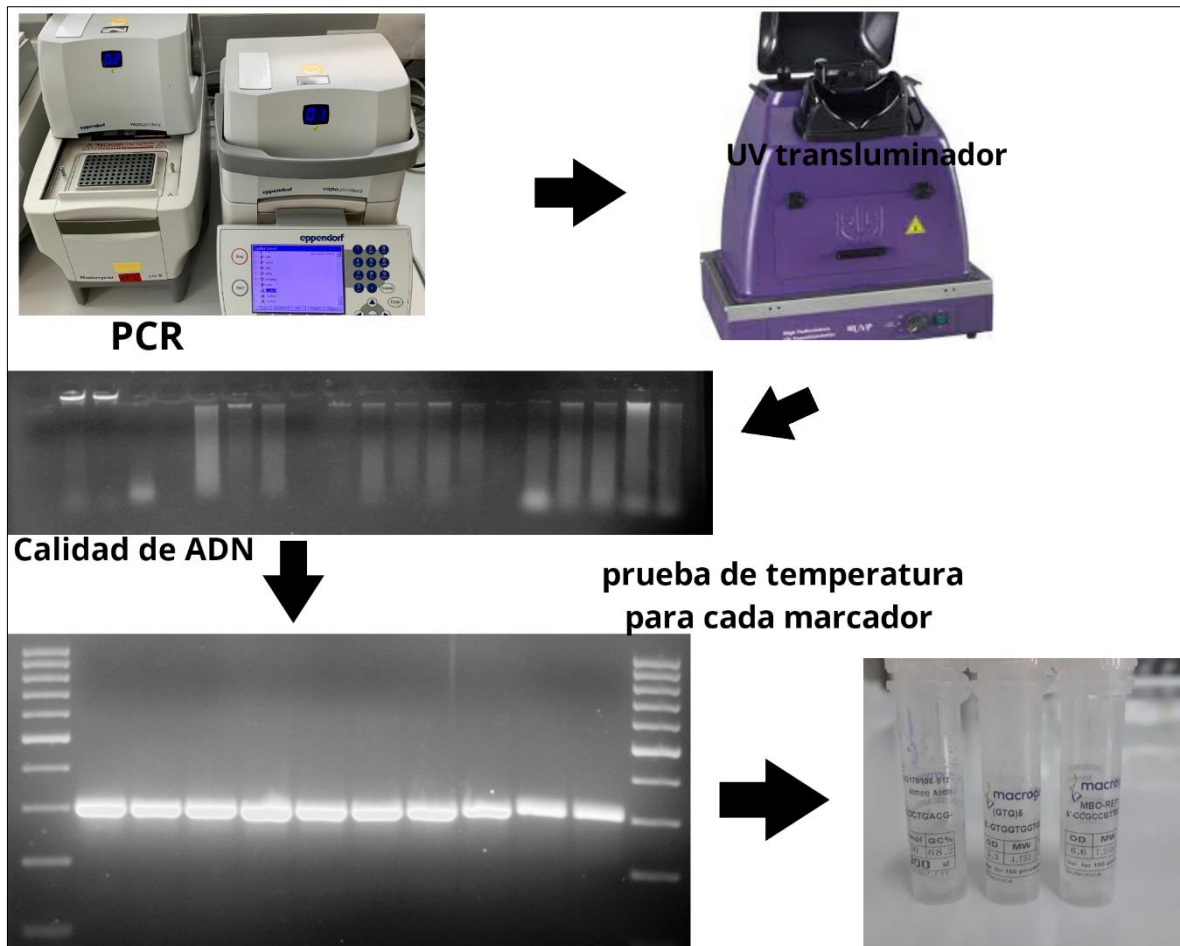
**Figura 12.** Crecimiento de cepas de Trichoderma en Medio liquido de extracto de malta para extracción de ADN.

Anexo 4. Extracción de ADN.



Figura 13: Extracción de ADN de las cepas de *Trichoderma*

**Anexo 5. PCR y Electroforesis.**



**Figura 14.** PCR y electroforesis con los tres marcadores moleculares.

Anexo 6. Competencia in vitro

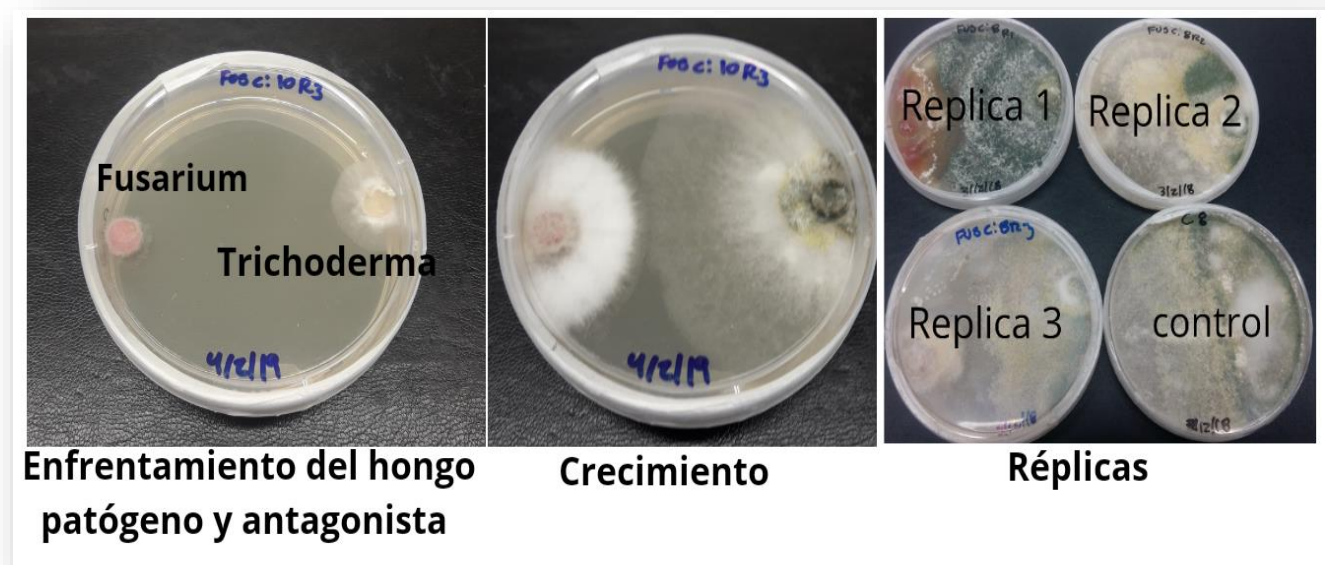


Figura 15. Competencia in vitro de *Fusarium* y *Trichoderma*

## Anexo 7. Porcentaje de inhibición

**Tabla 8.** porcentaje de inhibición de cepas de *Trichoderma* vs *Fusarium*

Cepa	Días	Fusarium (cm)	Fusarium confrontado (cm)	% de Inhibicion
1	1	1	1.46	-46.0
1	2	1.1	2.16	-96.4
1	3	3	2.4	20.0
1	4	3.2	3.2	0.0
1	5	4.2	3.3	21.4
1	6	4.2	3.43	18.3
1	7	4.95	3.5	29.3

Cepa	Días	Fusarium (cm)	Fusarium confrontado (cm)	% de Inhibicion
2	1	1	1.56	-56.0
2	2	1.1	2.2	-100.0
2	3	3	2.5	16.7
2	4	3.2	2.73	14.7
2	5	4.2	2.83	32.6
2	6	4.2	2.93	30.2
2	7	4.95	3.13	36.8

Cepa	Días	Fusarium (cm)	Fusarium confrontado (cm)	% de Inhibicion
3	1	1	1.1	-10.0
3	2	1.1	1.6	-45.5
3	3	3	2.03	32.3
3	4	3.2	2.5	21.9
3	5	4.2	2.73	35.0
3	6	4.2	2.9	31.0
3	7	4.95	2.93	40.8

Cepa	Días	Fusarium (cm)	Fusarium confrontado (cm)	% de Inhibicion
4	1	1	1.43	-43.0
4	2	1.1	2	-81.8
4	3	3	2.6	13.3
4	4	3.2	2.5	21.9
4	5	4.2	2.56	39.0
4	6	4.2	2.73	35.0
4	7	4.95	2.73	44.8



<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
5	1	1	1.4	-40.0
5	2	1.1	2.2	-100.0
5	3	3	2.7	10.0
5	4	3.2	3.2	0.0
5	5	4.2	3.4	19.0
5	6	4.2	3.2	23.8
5	7	4.95	2.9	41.4

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
6	1	1	1.46	-46.0
6	2	1.1	2.13	-93.6
6	3	3	2.4	20.0
6	4	3.2	3	6.3
6	5	4.2	3.3	21.4
6	6	4.2	3.43	18.3
6	7	4.95	3.16	36.2

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
7	1	1	1.5	-50.0
7	2	1.1	1.76	-60.0
7	3	3	2.23	25.7
7	4	3.2	2.46	23.1
7	5	4.2	2.83	32.6
7	6	4.2	3	28.6
7	7	4.95	3.43	30.7

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
8	1	1	1.53	-53.0
8	2	1.1	2.16	-96.4
8	3	3	2.53	15.7
8	4	3.2	2.9	9.4
8	5	4.2	3.06	27.1
8	6	4.2	3.2	23.8
8	7	4.95	3.13	36.8

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
9	1	1	1.8	-80.0
9	2	1.1	2.3	-109.1
9	3	3	2.56	14.7
9	4	3.2	2.7	15.6
9	5	4.2	3	28.6
9	6	4.2	3.36	20.0
9	7	4.95	2.3	53.5

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
10	1	1	1.73	-73.0
10	2	1.1	2.16	-96.4
10	3	3	2.33	22.3
10	4	3.2	2.76	13.8
10	5	4.2	3	28.6
10	6	4.2	3.3	21.4
10	7	4.95	3.7	25.3

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
11	1	1	1.36	-36.0
11	2	1.1	2.73	-148.2
11	3	3	2.9	3.3
11	4	3.2	3.2	0.0
11	5	4.2	3.46	17.6
11	6	4.2	3.8	9.5
11	7	4.95	4.3	13.1

<b>Cepa</b>	<b>Dias</b>	<b>Fusarium (cm)</b>	<b>Fusarium confrontado (cm)</b>	<b>% de Inhibicion</b>
12	1	1	1.36	-36.0
12	2	1.1	2.16	-96.4
12	3	3	2.46	18.0
12	4	3.2	2.7	15.6
12	5	4.2	3	28.6
12	6	4.2	3.23	23.1
12	7	4.95	3.46	30.1

## Anexo 8. Inhibición consolidada

**Tabla 9.** Inhibición consolidada por día

	1	2	3	4	5	6	7
1	-46.0	-96.4	20.0	0.0	21.4	18.3	29.3
2	-56.0	-100.0	16.7	14.7	32.6	30.2	36.8
3	-10.0	-45.5	32.3	21.9	35.0	31.0	40.8
4	-43.0	-81.8	13.3	21.9	39.0	35.0	44.8
5	-40.0	-100.0	10.0	0.0	19.0	23.8	41.4
6	-46.0	-93.6	20.0	6.3	21.4	18.3	36.2
7	-50.0	-60.0	25.7	23.1	32.6	28.6	30.7
8	-53.0	-96.4	15.7	9.4	27.1	23.8	36.8
9	-80.0	-109.1	14.7	15.6	28.6	20.0	53.5
10	-73.0	-96.4	22.3	13.8	28.6	21.4	25.3

	1	2	3	4	5	6	7
11	-36.0	-148.2	3.3	0.0	17.6	9.5	13.1
12	-36.0	-96.4	18.0	15.6	28.6	23.1	30.1
13	-63.0	-105.5	9.0	6.3	23.8	19.0	31.3
14	-30.0	-136.4	0.0	0.0	20.0	17.6	28.1
15	-40.0	-136.4	8.0	8.4	27.9	23.8	33.3
16	-46.0	-87.3	13.3	6.3	23.1	19.0	28.7
17	-63.0	-105.5	19.0	14.7	27.9	19.0	28.1
18	-50.0	-114.5	18.0	15.6	28.6	23.8	34.7
19	-60.0	-84.5	23.3	24.1	38.1	28.6	33.3
20	-10.0	-39.1	31.3	21.9	34.3	27.1	31.3

	1	2	3	4	5	6	7
21	-23.0	-72.7	11.3	13.8	27.9	24.8	33.3
22	-10.0	-27.3	32.3	24.1	31.0	22.4	28.1
23	-56.0	-54.5	28.0	25.0	28.6	26.2	67.7
24	-56.0	-127.3	13.3	-0.9	23.1	20.0	29.3
25	-50.0	-81.8	21.3	6.3	23.8	21.4	32.7
26	-13.0	-23.6	41.3	28.1	32.6	13.6	7.9
27	-56.0	-66.4	25.7	13.8	28.6	24.8	32.1
28	-13.0	-27.3	40.0	37.5	28.6	22.4	30.1
29	-16.0	-27.3	48.0	14.7	42.1	34.3	44.8
30	-23.0	-100.0	10.0	18.8	27.9	24.8	34.7

	1	2	3	4	5	6	7
31	-10.0	-87.3	10.0	6.3	26.2	21.4	30.7
32	-16.0	-30.0	32.3	16.9	20.7	9.5	16.6
33	-10.0	-87.3	9.0	-4.1	-7.1	-22.1	-11.1
34	-20.0	-81.8	-1.0	-5.0	13.6	11.9	13.9
35	-30.0	-102.7	18.0	12.5	27.9	25.5	33.3
36	-26.0	-30.0	34.7	20.0	25.5	16.0	35.4
37	-53.0	-130.0	4.7	4.4	23.8	20.0	30.1
38	-76.0	-81.8	13.3	9.4	31.9	33.3	46.3
39	-56.0	-81.8	24.7	11.6	29.5	24.8	34.1
40	-10.0	-32.7	23.3	10.6	31.9	26.2	34.7

	1	2	3	4	5	6	7
41	-33.0	-48.2	31.3	-0.9	17.6	11.2	17.2
42	-10.0	-32.7	25.7	10.6	27.9	27.1	25.3
43	-10.0	-39.1	32.3	20.0	22.4	9.5	11.9
44	-46.0	-72.7	26.7	20.0	33.3	28.6	36.8
45	-10.0	-81.8	5.7	3.1	21.4	22.4	34.7
46	-46.0	-81.8	-1.0	-11.3	11.2	7.1	19.2
47	-10.0	-109.1	1.3	4.4	21.4	15.2	25.3
48	-16.0	-32.7	22.3	16.9	32.6	28.6	36.2
49	-30.0	-45.5	40.0	37.5	33.3	22.4	23.2
50	-40.0	-111.8	9.0	9.4	25.5	20.7	30.7

	1	2	3	4	5	6	7
51	-13.0	-45.5	16.7	3.1	18.3	8.8	18.0
52	-10.0	-54.5	23.3	24.1	35.0	29.5	36.2
53	-10.0	-54.5	24.7	6.3	26.2	23.8	33.3
54	-43.0	-20.9	25.7	27.2	30.2	23.8	32.1
55	-16.0	-48.2	34.7	23.1	27.9	16.0	20.6
56	-10.0	-18.2	25.7	28.1	41.4	57.1	65.7
57	-40.0	-90.9	4.7	-1.9	20.0	15.2	26.1
58	-50.0	-93.6	8.0	4.4	24.8	29.5	40.2
59	-63.0	-132.7	6.7	7.5	25.5	24.8	36.8
60	-46.0	-109.1	13.3	-1.9	15.2	14.3	27.3

## **Anexo 9. Glosario**

**ADN:** el ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus, también es responsable de la transmisión hereditaria.

**Agarosa:** es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gelidium* y *Gracillaria*. es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °c, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales.

**Amplificación:** la amplificación génica es aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

**Cebador:** el cebador o primer está formado por nucleótidos de ácido ribonucleico (arn) (éste es sintetizado por la arn primasa), que permite que la ADN polimerasa comience la síntesis de la nueva cadena de ADN.

**Desnaturalización del ADN:** la desnaturalización de ácidos nucleicos como el adn por altas temperaturas produce una separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.

**Variabilidad genética:** La variabilidad genética se refiere a la diversidad en las frecuencias de los genes. La variabilidad genética puede referirse a las diferencias entre individuos o las diferencias entre poblaciones. Las mutaciones son la causa fundamental de la variabilidad genética, pero mecanismos tales como la reproducción sexual y la deriva genética también contribuyen a la misma.

**Electroforesis:** técnica para separar los componentes de una mezcla de moléculas (proteínas, dnas o rnas) en un gel sometido a un campo eléctrico.

**Extensión de ADN:** es la última etapa en la PCR. La temperatura es elevada para permitir que un ADN polimerasa inicie la síntesis a partir del cebador.

**Polimorfismo:** el polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN en los cromosomas (locus) entre los individuos de una población.

**In vitro:** En un ambiente artificial, fuera de un organismo o cuerpo. Por ejemplo, ciertos ensayos de toxicidad se hacen sobre cultivos celulares o sobre secciones de tejidos que han sido cultivados en el laboratorio, y no en un animal vivo.

**Antagonismo biológico:** Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos, como la acción de los antibióticos frente a las bacterias.

**Quimiotropismo:** es el crecimiento o movimiento de una planta o parte de la planta en respuesta a un estímulo químico. En quimiotropismo positivo, el movimiento es hacia el producto químico; en el movimiento quimiotropismo negativo, está lejos de la sustancia química.