



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

“Efecto del tratamiento con *Trichoderma* spp. sobre la composición microbiana fúngica de la rizósfera de suelos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).”

Ortiz Cadena, Sharon Carolina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ing. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo M.Sc. Ph.D.

30 de agosto del 2021



Document Information

Analyzed document	Tesis_SHARON_ORTIZ_Urkund.docx (D111919263)
Submitted	9/1/2021 1:58:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.orkund.com



Sources included in the report

W	URL: https://docplayer.es/151078069-Departamento-de-ciencias-de-la-vida-y-de-la-agricultura.html Fetched: 5/8/2021 5:15:39 AM	1
W	URL: https://www.agroes.es/agricultura/control-de-plagas-enfermedades/bioproductos-eco-para-enfermedades/1131-trichoderma-hongo-usado-como-fungicida-en-agricultura Fetched: 9/1/2021 1:59:00 PM	1
W	URL: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/119072/Documento_completo.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy Fetched: 8/6/2021 6:01:25 AM	1
SA	perfil_Castillo_Fabricao_2rev.docx Document perfil_Castillo_Fabricao_2rev.docx (D110433766)	1
SA	Grupo Difusión Científica / EParedesUrkund.txt Document EParedesUrkund.txt (D111761679) Submitted by: biblioteca@espe.edu.ec Receiver: ilbbioteca.GDC@analysis.orkund.com	1
W	URL: https://ibbm.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/62/2019/05/Monica-Oyuela-IBBM-Manuscrito-Tesis-2019.pdf Fetched: 12/18/2019 8:55:25 AM	1
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15796/1/T-ESPE-040732.pdf Fetched: 12/17/2020 1:37:41 AM	1



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, **“Efecto del tratamiento con *Trichoderma* spp. sobre la composición microbiana fúngica de la rizósfera de suelos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).”** fue realizado por la señorita **Ortiz Cadena, Sharon Carolina** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 31 de agosto del 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
ANDRES RICARDO
IZQUIERDO ROMERO

Ing. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo M.Sc., Ph.D.

C. C.: 1714479506



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo **Ortiz Cadena, Sharon Carolina**, con cédula de ciudadanía N° **1724222425**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre la composición microbiana fúngica de la rizósfera de suelos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 31 de agosto del 2021

Firma

Ortiz Cadena, Sharon Carolina

C.C.: 1724222425



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo **Ortiz Cadena, Sharon Carolina**, con cédula de ciudadanía N° 1724222425, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación del efecto de *Trichoderma spp.* sobre la composición microbiana fúngica de la rizósfera de suelos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus Benth.*)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 31 de agosto del 2021

Firma

Ortiz Cadena, Sharon Carolina

C.C.: 1724222425

Índice de contenidos

Análisis Urkund	2
Certificado.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Índice de contenidos	6
Listado de tablas	8
Listado de figuras	9
Dedicatoria.....	11
Agradecimientos	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I. Introducción.....	15
Formulación del problema	15
Justificación del problema.....	16
Objetivos de la investigación.....	18
<i>Objetivo General.....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>19</i>
Marco teórico	20
<i>Mora de Castilla (Rubus glaucus Benth).....</i>	<i>20</i>
<i>Suelo de la rizósfera.....</i>	<i>48</i>
<i>Factores ambientales determinantes en el microbioma</i>	<i>49</i>
<i>Determinación de concentración y pureza de una muestra de ADN</i>	<i>49</i>
<i>Análisis de microbiomas</i>	<i>50</i>
<i>Análisis bioinformático</i>	<i>62</i>
Hipótesis	72
<i>Hipótesis nula.....</i>	<i>73</i>
<i>Hipótesis alternativa.....</i>	<i>73</i>
Variables de la investigación	73
<i>Variable Dependiente</i>	<i>73</i>
<i>Variable Independiente.....</i>	<i>73</i>
Capítulo II. Materiales y métodos	74
Instituciones participantes.....	74
Colaboradores científicos.....	74

Área de estudio.....	74
<i>Área de muestreo</i>	74
<i>Área de procesamiento de muestras</i>	76
Metodología	77
<i>Diseño experimental</i>	78
<i>Recolección de la muestra</i>	78
<i>Etiquetados de muestras</i>	80
<i>Porcentaje de humedad y pH del suelo</i>	80
<i>Extracción de ADN de la rizósfera</i>	81
<i>Concentración y pureza de ADN</i>	82
<i>Secuenciación</i>	82
<i>Análisis Bioinformático y Estadístico de datos</i>	83
Capítulo III. Resultados y Discusión.....	88
pH y porcentaje de humedad	88
Análisis de calidad del ADN	89
Secuenciación de alto rendimiento	92
Análisis bioinformático y estadístico	93
<i>Preprocesamiento de datos</i>	93
<i>Procesamiento y análisis estadístico de datos</i>	100
Capítulo V. Conclusiones.....	126
Capítulo VI. Recomendaciones.....	128
Capítulo VII. Apéndices	130
Capítulo VII. Bibliografía	131

Listado de tablas

Tabla 1. Efecto protector del quitosano en hojas de plántulas infectadas con <i>Botrytis cinerea</i>	37
Tabla 2. Tratamientos considerados para el muestreo	78
Tabla 3. Tratamientos considerados para el muestreo	80
Tabla 4. Información de cebadores para secuenciación Illumina, regiones 16S e ITS	83
Tabla 5. Tabla de datos de porcentaje de humedad y pH del suelo	89
Tabla 6. Tabla de datos de absorbancia y concentración de muestras de ADN de rizósfera de mora de Castilla	90
Tabla 7. Tabla de datos de absorbancia y concentración de muestras de ADN de rizósfera de mora de Castilla	99
Tabla 8. Tabla de prevalencias taxonómicas (Asignada por Filos)	101
Tabla 9. Tabla de abundancias por Filos en tratamientos diferentes (T1 y T2)	104
Tabla 10. Tabla de abundancias por Filos en tratamientos diferentes (T1 y T2)	105
Tabla 11. Tabla de abundancias por Géneros en tratamientos diferentes (T1 y T2)	108
Tabla 12. Tabla de prevalencias taxonómicas (Asignada por Filos)	112
Tabla 13. PERMANOVA con distancias Bray Curtis de Divnet	114
Tabla 14. PERMANOVA con distancias UNIFRAC (abundancias relativas)	114

Listado de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Botrytis cinerea</i>	24
Figura 2. Esquema de invasión del moho gris en <i>Rubus glaucus</i>	25
Figura 3. Síntomas de cenicilla en diferentes órganos de la planta de mora de Castilla	27
Figura 4. Peritecia de <i>Neonectria discophora</i> var. <i>rubi</i>	31
Figura 5. Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> tras tratamiento con quitosano	36
Figura 6. Desarrollo radicular de semillas tratadas y no tratadas con <i>Trichoderma harzianum</i> T-22 Planter Box	43
Figura 7. Plantas de maíz dulce expuestas a tratamiento con formulación granular por difusión de <i>T. harzianum</i> T-22 (10 kg/ha)	44
Figura 8. Enfoques de análisis de microbiomas por secuenciación y plataformas de secuenciación comúnmente empleadas	50
Figura 9. Enfoques de análisis de microbiomas por secuenciación y plataformas de secuenciación comúnmente empleadas.....	55
Figura 10. Proceso de la secuenciación	57
Figura 11. Diagrama regiones del espaciador transcrito interno hipervariable	62
Figura 12. Ubicación geográfica - Estación Experimental Granja “Píllaro” en Tungurahua	75
Figura 13. Estación Expemental Granja “Píllaro” en Tungurahua.....	75
Figura 14. Cuadro resumen de metodología aplicada	77
Figura 15. Muestreo de rizósfera de mora de Castilla	79
Figura 16. Recolección y lavado de raíces en solución tamponada	82
Figura 17. Software libre FASTA Qual & FASTQ Conversion v1 .6.07 64 bits disponible en la página de MR DNA	84
Figura 18. Galaxy Europe versión 1.20	84
Figura 19. Diagrama de flujo de trabajo para análisis de secuencias en DADA2.....	85
Figura 20. Puntuaciones medias de calidad, datos globales en MultiQC versión 9, secuencias iniciales.....	94
Figura 21. Porcentaje de asignaciones N, por base. Datos globales en MultiQC versión 9, secuencias iniciales	96

Figura 22. Puntuaciones medias de calidad, datos globales en MultiQC versión 9, secuencias filtradas y recortadas	98
Figura 23. Porcentaje de asignaciones N, por base. Datos globales en MultiQC versión 9, datos recortados y filtrados	99
Figura 24. Porcentaje de contenido de adaptador, datos globales en MultiQC versión 9, datos iniciales.....	100
Figura 25. Gráficos de abundancias por Filos en tratamientos diferentes (T1 y T2)	103
Figura 26. Gráficos de abundancias por Filos (sin Filos NA) en tratamientos diferentes (T1 y T2)	105
Figura 27. Gráficos de abundancias por Filos (sin Filos NA) en tratamientos diferentes (T1 y T2)	106
Figura 28. Gráficas de índices de diversidad alfa sin corrección de errores por muestra	109
Figura 29. Gráficas de índices de diversidad alfa de Divnet por muestra	111
Figura 30. Gráficas de PcoA (Análisis de coordenadas principales)	113
Figura 31. Gráfico de abundancias diferenciales por Filo y género	116
Figura 32. Gráfico de abundancias diferenciales ASV1 correspondiente a <i>Calophoma rosae</i>	117
Figura 33. Gráfico de abundancias diferenciales ASV3 correspondiente a <i>Antrodia neotropica</i>	118
Figura 34. Gráfico de abundancias diferenciales ASV7 correspondiente a <i>Mortierella elongata</i>	118
Figura 35. Gráfico de abundancias diferenciales ASV7 correspondiente a <i>Mortierella humilis</i>	119

Dedicatoria

A mi familia, novio y amigos, por su constante apoyo, motivación y guía a lo largo de mi formación como profesional.

Agradecimientos

En primera instancia deseo agradecer a mis guías en la elaboración del proyecto de investigación, el Ing. Francisco Flores Flor, M.Sc., Ph.D. y el Ing. Andrés Ricardo Izquierdo Romero, M.Sc., Ph.D., quienes me brindaron la oportunidad de trabajar en la línea de investigación de Microbiología y Bioinformática, me extendieron su apoyo personal y científico desde el primer día como tesista y acompañaron a lo largo de todo el proceso.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, donde tuve la oportunidad de formarme como profesional.

A mis padres Marlene y Marco, hermanos, sobrinos y Gustavo, por ser la base de mis decisiones, por haber confiado en mis proyectos y capacidades a lo largo de mi vida estudiantil y haber estado a mi lado en cada momento de júbilo y adversidad.

A mi novio, Gabriel, por haberme brindado apoyo, fortaleza, motivación en toda oportunidad y buscar mi crecimiento personal.

A Patricia, Heelen y Leandro, por su incondicional amistad, consejos, paciencia y ayuda durante gran parte de mi vida.

GRACIAS

Resumen

Tungurahua, principal provincia productora de mora de Castilla en el Ecuador emplea *Trichoderma* spp. como alternativa agroecológica para el control de plagas de origen fúngico. Los mecanismos que aseguran el éxito de *Trichoderma* como biocontrol no se comprenden en su totalidad, para analizar el efecto de *Trichoderma* sobre la composición microbiana fúngica de rizósfera se estudiaron los suelos de cultivo de mora de Castilla de la Estación Experimental Granja “Píllaro” en Tungurahua, se muestrearon por triplicado dos tratamientos: T1 (rizósfera de plantas con síntomas de marchitez sin *Trichoderma*) y T2 (rizósfera de plantas sin marchitez con *Trichoderma*).

Se extrajo el ADN de las muestras y se secuenció en MR DNA (USA) y Biomol Ecuador mediante tecnología Illumina MiSeq, con cebadores ITS86F e ITS4. Los datos crudos fueron analizados en FastQC y MultiQC; filtrados y recortados en DADA2; procesados, analizados bioinformática y estadísticamente en Galaxy Europe, Nucleotide BLAST y R, empleando diferentes librerías de acceso libre. Se estimaron las diversidades taxonómicas, la composición diferencial entre tratamientos y se identificaron variantes de taxonomía no asignada en el reino Fungi. Se encontró que, existe diferencia significativa en la diversidad alfa y no existe diferencia significativa en la diversidad beta entre los tratamientos. Los géneros diferenciales significativamente fueron *Calophoma* y *Antrodia* para T1 y *Mortierella* para T2. *Calophoma rosae* parece ser un potencial patógeno de *Rubus glaucus*, mientras *Mortierella* puede representar un componente clave en la salud de los suelos tratados con *Trichoderma*. Las variantes sin taxonomía asignada correspondieron a secuencias del espaciador transcrito de *Rubus glaucus* y de algas verdes de la clase Chlorophyceae.

PALABRAS CLAVE:

- **DIVERSIDAD ALFA Y BETA**
- **GEN ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO**
- **AMPLICIÓN**

Abstract

Tungurahua, the main blackberry-producing province of Castilla in Ecuador, uses *Trichoderma* spp. as an agroecological alternative for the control of pests of fungal origin. The mechanisms that ensure the success of *Trichoderma* as a biocontrol are not fully understood. To analyze the effect of *Trichoderma* on the fungal microbial composition of the rhizosphere, the blackberry cultivation soils of Castilla from the “Pillaro” Farm Experimental Station in Tungurahua were studied. Two treatments were sampled in triplicate: T1 (rhizosphere of plants with wilt symptoms without *Trichoderma*) and T2 (rhizosphere of plants without wilt with *Trichoderma*).

The DNA of the samples was extracted and sequenced in MR DNA (USA) and Biomol Ecuador using Illumina MiSeq technology, with ITS86F and ITS4 primers. The raw data were analyzed in FastQC and MultiQC; filtered and trimmed in DADA2; processed, analyzed bioinformatically and statistically in Galaxy Europe, Nucleotide BLAST and R, using different open access libraries. Taxonomic diversities were estimated, the differential composition between treatments and variants of unassigned taxonomy were identified in the Fungi kingdom. It was found that there is a significant difference in the alpha diversity and there is no significant difference in the beta diversity between the treatments. The significantly differential genera were *Calophoma* and *Antrodia* for T1 and *Mortierella* for T2. *Calophoma rosae* appears to be a potential pathogen for *Rubus glaucus*, while *Mortierella* may represent a key component in the health of *Trichoderma*-treated soils. Variants without assigned taxonomy corresponded to sequences of the transcribed spacer from *Rubus glaucus* and from green algae of the class Chlorophyceae.

KEYWORDS:

- ALPHA AND BETA DIVERSITY
- INTERNAL TRANSCRIBED SPACER GENE
- AMPLICON

Capítulo I. Introducción

Formulación del problema

La mora de castilla es afectada por numerosas enfermedades, especialmente de origen fúngico, donde pueden destacarse a la Antracnosis (Castaño & Arango, 2008), la cual ha sido reportada en cultivos colombianos con una incidencia de hasta el 52% (Botero et al., 2002); el moho gris provocado por *Botrytis cinerea* Pers es otra afección fúngica común, aparece durante la producción y postcosecha de la mora e induce la momificación del fruto, entre otras complicaciones (Quinatoa, 2015) que afectan entre el 50 y 76% de la fruta cosechada (Tamayo Molano & Peláez, 2000); el moho suave provocado por *Peronospora corda* afecta entre 20 al 30% de la mora cosechada; la roya amarilla causada por *Gerwasia lagerheimii* (Hincapié et al., 2017); entre otras afecciones que deterioran tallos y raíces de la planta, como la enfermedad del pie negro que provoca la marchitez de este cultivo.

En las principales provincias productoras de mora de Castilla en el Ecuador de acuerdo a Boletines oficiales del INIAP se reporta que las enfermedades de mayor incidencia por porcentaje de daño en los cultivos de este producto son *Botrytis* en 91.8%, cenicilla o mildiu polvoso en 61.2% ocasionada por *Oidium* sp. y la marchitez descendente o enfermedad del pie negro en 13.3% (Villares et al., 2016), causante de la podredumbre basal o necrosis de raíz, provocada por el sistema de hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* identificados en tejido lesionado de las plantas en Tungurahua y Bolívar (Sánchez et al., 2019).

En la actualidad las prácticas modernas de cultivo pueden resultar nocivas para el ambiente debido al empleo de químicos contaminantes como fungicidas (Waghunde et al., 2016) y otros

agroquímicos, los cuales interfieren negativamente sobre la microflora beneficiosa que influye en la calidad y fertilidad del suelo (K K Pal & Gardener, 2006), sin embargo, bajo alternativas ecológicas, en Tungurahua se ha optado por el empleo de *Trichoderma* spp. para hacer frente a distintas enfermedades, donde destacan aquellas de origen fúngico, como el moho gris y el pie negro (Martínez et al., 2000).

Aunque *Trichoderma* es uno de hongos más estudiados y empleados en gran variedad de cultivos (Pascale et al., 2017) este puede mostrar distintos comportamientos aún desconocidos dependiendo de la cepa, las condiciones ambientales (Hermosa et al., 2014), la especificidad y estabilidad huésped-patógeno (Saravanakumar et al., 2017), además, al ser este capaz de alterar la microflora del suelo (R. Baker et al., 1984; Chang et al., 1986) es importante identificar los cambios en la microbiota fúngica que se promueven especialmente en la rizósfera para comprender su modo de acción como agente de biocontrol y mejoramiento del suelo.

Justificación del problema

Rubus glaucus Benth, denominada comúnmente como mora de Castilla o baya de los Andes, es una planta frutal nativa del Ecuador, su producción es de interés comercial en el sector alimentario, siendo una importante fuente de ingresos y de empleo rural en el país (Romero J. & Yépez V., 2015).

En el 2016 se reportan zonas de cosecha de mora de 5 200 ha en el Ecuador, extendidas en diferentes provincias de la sierra, como Tungurahua y Bolívar, y minoritariamente en Cotopaxi, Carchi, Imbabura y Pichincha (Viteri et al., 2016), lo que beneficia a entre 15 000 productores pequeños y medianos, bajo escalas de rendimiento promedio anual de 5 t/ha (La Hora, 2018a).

Tungurahua abarca del 60% al 70% de la producción nacional de mora de Castilla (Viteri et al., 2016), concentrándose en los cantones de Tisaleo, donde al menos un 40% de sus habitantes desarrollan esta actividad y en Píllaro; en menor escala en Ambato, Cevallos, Mocha y Patate (La Hora, 2018a; Viteri et al., 2016), por esta razón el presente estudio se realizó en una de las granjas experimentales del INIAP en Píllaro.

El moho gris, el mildiu polvoso y la enfermedad del pie negro son los padecimientos de origen fúngico más comunes en cultivos de mora de Castilla en el Ecuador (Quinatoa, 2015; Sánchez et al., 2019; Villares et al., 2016), por lo que, al ser este cultivo de gran relevancia económica, diversas investigaciones apuntan hacia tratamientos que reduzcan las pérdidas de su producción, que puedan mejorar la vida útil sin alterar las características físicas, sensoriales y nutricionales de la fruta, donde el enfoque se centra en posibles agentes de control cuyo impacto ambiental no interfiera negativamente, como ocurre con los fungicidas de origen químico, que además permiten la aparición de patógenos altamente resistentes debido a su uso indiscriminado.

En la búsqueda de medios alternativos a los agroquímicos para hacer frente a plagas se han encontrado resultados favorables con el empleo de *Trichoderma* spp., hongos que presentan aparentemente numerosos mecanismos que posibilitan la resistencia de la planta a plagas importantes (P. Fourie et al., 2001; G. Harman & Björkman, 1998; G. E. Harman, 2000; Pascale et al., 2017; Sánchez et al., 2019; Shores et al., 2010) y que en la actualidad son comercializados en el mercado.

En la Provincia de Tungurahua, en zonas de cultivo de mora de Castilla en las últimas décadas se ha empleado a *Trichoderma* para tratar su suelo agrícola en reemplazo de agroquímicos (Villares et al., 2016), este género se ha descrito como antagonista de importantes patógenos del

suelo, al desplazarlos y promover microflora beneficiosa para los cultivos (R. Baker et al., 1984; Chang et al., 1986) combinando propiedades de lisis enzimática, secreción de sustancias antibióticas, micoparasitismo y su carácter de fuerte competidor por el espacio, nutrientes y sustrato (Gary E. Harman et al., 2004; Howell, 2003), así como su capacidad para reprogramar la expresión génica en plantas, derivando en la resistencia sistémica inducida, lo que alivia el estrés fisiológico y abiótico de la planta (Shoresh et al., 2010).

El presente estudio propone determinar y comparar los perfiles taxonómicos de la microbiota fúngica presente en la rizósfera de cultivos de *Rubus glaucus* tratados y no tratados con *Trichoderma* spp., aportando en la comprensión del modo de acción de este agente de biocontrol frente a patógenos de los suelos de Tungurahua tales como *Oidium* sp., *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, *Botrytis cinérea*, entre los principales y otros, así también contribuirá en la determinación y monitoreo de la dinámica entre la microbiota fúngica que promueve el empleo de *Trichoderma* en la mora de Castilla, siendo determinante en la mejora de las técnicas de cultivo y control de enfermedades de este producto.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Determinar el efecto del tratamiento con *Trichoderma* spp. sobre la composición microbiana fúngica de la rizósfera de cultivos de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

Objetivos Específicos

Extraer el ADN proveniente de muestras de rizósfera de suelo tratado y no tratado con *Trichoderma* spp. en zonas de cultivo de mora de Castilla pertenecientes al Programa de Fruticultura Sierra- Central del INIAP.

Construir los perfiles taxonómicos de hongos a través del análisis de secuencias ITS empleando softwares bioinformáticos.

Analizar estadísticamente los datos obtenidos para establecer las diferencias entre la microbiota fúngica encontrada entre los tratamientos.

Marco teórico

Mora de Castilla (Rubus glaucus Benth)

Generalidades. *Rubus glaucus*, denominada comúnmente como mora de Castilla o baya de los Andes, es una planta frutal nativa del Ecuador, descrita científicamente por George Benthham en 1845 (Fundación Botánica de los Andes, 2019). De naturaleza arbustiva, trepadora, perenne, semierecta, pertenece al orden de los Rosales, familia Rosaceae, género *Rubus* sp., sus cultivos se extienden en el norte de América del Sur, principalmente en zonas altas (2600 y 3100 m.s.n.m) de Colombia y Ecuador (Kumar et al., 2017). Su hábitat idóneo son los suelos franco arenosos o franco arcillosos, de abundante materia orgánica, potasio y fósforo, donde crecen durante todo el año a temperaturas que oscilan entre los 12 a 13 °C (Viteri et al., 2016).

La mora de Castilla combina características de la frambuesa negra (*R. subg. Idaeobatus*) y la mora (*R. subg. Rubus*), es un anfidiplóide fértil (Jennings, 1988), es decir que, se trata de un híbrido, cuyo número de cromosomas es la suma de cromosomas de las especies parentales, presenta brotes basales primarios, alcanzan una altura de hasta tres metros de longitud, raíces de corta longitud, aproximadamente 60 cm, (Fundación Botánica de los Andes, 2019). La planta presenta múltiples drupas unidas entre sí formando una polidrupa de 1 a 2.5 cm., coloración roja oscura o púrpura, jugosidad, olor intenso y sabor atractivo en comparación con sus homólogos (Gunata et al., 1985; Osorio et al., 2012; Sinuco et al., 2013).

El alto contenido de antocianinas y polifenoles, como elagitaninos, proantocianidinas, flavonoles, entre otros, convierten a la mora de Castilla en una potencial fuente de antioxidantes

dietéticos (Osorio et al., 2012), cuyas propiedades antiinflamatorias y quimiopreventivas, la posicionan como un producto funcional de alto interés de consumo (Monroy et al., 2019).

Las moras son frutos no climatéricos, es decir no son capaces de madurar fuera de planta, por lo que deben cosecharse maduros, cuando presentan un color brillante, morado oscuro/negro y están firmes, pues en su etapa madura es cuando se logra la mejor calidad del producto, alcanzando las propiedades organolépticas adecuadas, acumulando azúcares y antocianinas y disminuyendo ácidos orgánicos. La fruta sobre madurada tendrá una vida útil bastante corta, debido a su susceptibilidad a la pudrición.

Importancia económica. La producción de mora de Castilla es de interés comercial en el sector alimentario, siendo una importante fuente de ingresos y empleo rural en el Ecuador (Romero J. & Yépez V., 2015), pues, numerosas industrias la incluyen, a mayor y menor escala, tal es el caso del sector vinícola en zonas climáticas y latitudes específicas, donde *Vitis vinifera* no se desarrolla con facilidad (Arozarena et al., 2012).

En el 2016 se reportan zonas de cosecha de mora de 5 200 ha en el Ecuador, extendidas en diferentes provincias de la sierra, como Tungurahua y Bolívar, y minoritariamente en Cotopaxi, Carchi, Imbabura y Pichincha (Viteri et al., 2016), lo que beneficia a entre 15 000 productores pequeños y medianos bajo escalas de rendimiento promedio anual de 5 t/ha (La Hora, 2018a).

Tungurahua abarca del 60% al 70% de la producción nacional de mora de Castilla (Viteri et al., 2016), concentrándose en los cantones de Tisaleo (al menos un 40% de sus habitantes desarrollan esta actividad) y Píllaro; y en menor escala en Ambato, Cevallos, Mocha y Patate (La Hora, 2018a; Viteri et al., 2016).

En el Ecuador la agricultura orientada a la producción de mora adolece de baja tecnificación (Viteri et al., 2016), como consecuencia los volúmenes no abastecen totalmente el mercado nacional e impiden avanzar sobre nuevas plazas de mercados extranjeros alicientes, en la actualidad Ecuador ha ingresado con la exportación de mora solamente en algunos países, aunque los ingresos por exportación de este producto aún no son significativos frente a otros según cifras oficiales de la (SENAE, 2019). Entre los países captadores de mora ecuatoriana se encuentran Estados Unidos y España, principalmente; Rusia, Países Bajos, Chile y El Salvador en menor proporción (SENAE, 2019).

A partir de septiembre del 2018 se han generado espacios de diálogo y conexión con el sector agrícola de este frutal, mediante los Congresos Provinciales de mora desarrollados en Tisaleo, bajo el enfoque de siembra orgánica, manejo, mercado y valor agregado, entre otras temáticas, donde se ha contado con la participación de expertos académicos y de la industria alimenticia (La Hora, 2018b, 2018a).

Principales enfermedades de origen fúngico en mora de Castilla en el Ecuador tratadas con *Trichoderma spp.*

Moho gris o pudrición blanda. El moho gris, uno de los grandes problemas fitosanitarios es causado por el hongo necrotrófico, *Botrytis cinerea* (Toral et al., 2018), puede vivir como saprófito o parásito facultativo transmitido por el aire (Williamson et al., 2007), tiene la capacidad de hibernar en el suelo en forma de micelios o con esclerocios (Villares et al., 2016), es causante de numerosas enfermedades ampliamente distribuidas.

Afecta principalmente a cultivos de tipo hortícola, ornamental (Gao et al., 2018), frutales de climas fríos y fríos moderados alrededor del mundo, especialmente en condiciones de alta humedad y baja temperatura. Los conidios invaden y penetran los tejidos, provocando el colapso y desintegración celular, la germinación de conidios ocurre óptimamente a 20°C y a 93-100% de humedad relativa, mientras la esporulación ocurre a 15°C y a 70 – 10% de humedad relativa.

Taxonómicamente *Botrytis cinerea* pertenece al reino: Hongos, filo: Ascomycota, subfilo: Pezizomycotina, clase: Leotiomycetes, orden: Helotiales, familia: Sclerotiniaceae, género: Botryotinia (Williamson et al., 2007).

Botrytis cinerea es un patógeno de difícil control, debido a su amplia gama de hospedantes, se conocen al menos 200 especies de plantas que pueden ser parasitadas, principalmente dicotiledóneas, sin embargo, existen especies de *Botrytis* especializadas en monocotiledóneas. También puede sobrevivir como micelios y/o conidios, incluso como esclerocios en los desechos de los cultivos, durante largos periodos (Williamson et al., 2007).

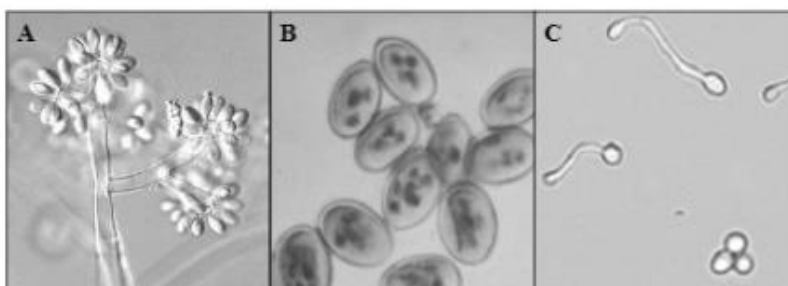
El hongo es capaz de causar la pudrición de todas las partes aéreas de la planta y la pudrición postcosecha de verduras, frutas y flores prolíficos conidióforos grises y (macro) conidios, a menudo ingresa a los tejidos en etapas tempranas de desarrollo y permanece inactivo durante un periodo considerable, mientras la fisiología del hospedador cambia y se produce la pudrición de los tejidos maduros, sin embargo, también causa pérdidas masivas en cultivos antes de la cosecha incluso en la etapa de plántulas en algunos huéspedes (Williamson et al., 2007).

El mecanismo que emplea el hongo es a través de una variedad de enzimas que degradan la pared celular, toxinas y compuestos como ácido oxálico, según investigaciones se cree que *Botrytis cinerea* induce a la muerte celular programada del hospedador como una estrategia de ataque (Hoeberichts et al., 2003). *B. cinerea* secreta enzimas pectinasas, proteasas, hidrolíticas, cutinasas y fitotoxinas que contribuyen la patogénesis (Benito et al., 2000).

En el cultivo de mora de Castilla en el Ecuador, *Botrytis* sp. constituye el principal problema fitosanitario, según detallan los agricultores de las zonas productoras del país, causando la pudrición del fruto, moho gris o pudrición blanda (Villares et al., 2016), el cual afecta cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo, llega a colonizar tallo, hojas, flores y frutos. El patógeno impacta sobre el rendimiento y calidad de los cultivos e incluso el almacenamiento postcosecha del fruto (Ribera, 2007).

Figura 1

Morfología de Botrytis cinerea



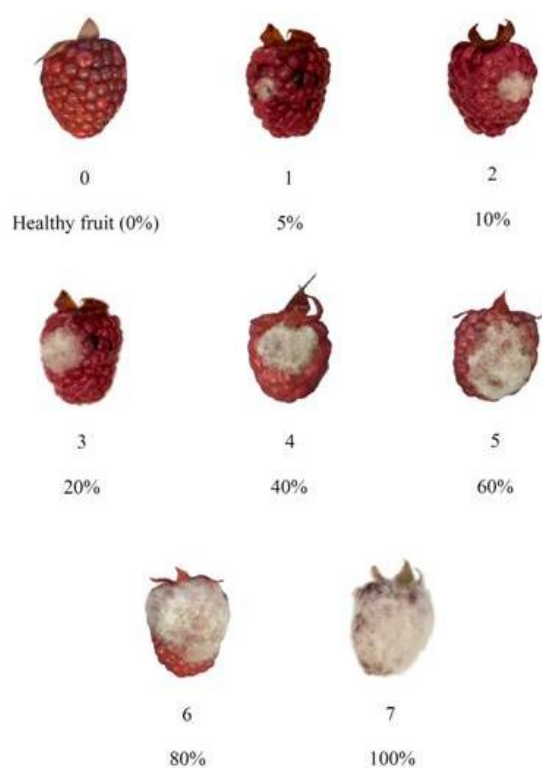
Nota. A. conidióforos; B. Conidias; C. Germinación de conidias. Tomado de (Ribera, 2007)

Botrytis infecta al tejido vegetal en varias etapas, primero las conidias se ubican en la superficie, segundo inicia el proceso de germinación, donde las conidias producen tubos germinativos, el cual ingresa al tejido hospedero a través de heridas o por aperturas naturales como

estomas y/o lenticelas, cuarto invade las células adyacentes hasta poblar todo el tejido (Kolattukudy, 1981), quinto vence las barreras defensivas de la planta, diseminándose a lo largo de toda la superficie, finalmente, el patógeno libera nuevas esporas desde el tejido infectado, iniciando un nuevo ciclo de infección (Benito et al., 2000) (**Figura 1**).

Figura 2

Esquema de invasión del moho gris en Rubus glaucus



Nota. Escala esquemática para evaluar la severidad de *Botrytis cinerea* (moho gris). Tomado de (Arias et al., 2020)

El patógeno provoca un micelio lanoso y blanquecino, el cual durante el periodo de esporulación se torna gris y encapsula o momifica el fruto (Villares et al., 2016) (**Figura 2**). *B. cinerea* presenta hifas septadas ramificadas y posee numerosas estructuras de penetración, como

apresorios que le permiten invadir la epidermis de los tejidos (Salinas et al., 1986), también posee estructuras de resistencia a condiciones climáticas desfavorables, conocidas como esclerocios (Ten Have, 2000).

Cenicilla o mildiu polvoso. El mildiu polvoso es una enfermedad generalizada de plantas de campo e invernadero provocada por ascomicetos biotróficos obligados del orden Erysiphales, estos fitopatógenos tienen la capacidad de corromper las funciones celulares basales del huésped para una patogénesis fúngica exitosa, para ello el hongo coloniza exclusivamente células epidérmicas (Hückelhoven & Panstruga, 2011).

El ciclo de vida asexual del patógeno inicia con el aterrizaje de las conidiósporas en la planta, inicia la germinación de las esporas y se desarrollan apresorios en donde las esporas de hongo intentarán penetrar la pared de las células hospederas, se liberan alcanos epicuticulares y/o aldehídos de cadena muy larga que permiten la adhesión del hongo a la superficie de las hojas, el mildiu invade la primera célula epidérmica (Hückelhoven & Panstruga, 2011).

El mildiu polvoso prolifera en temporada seca, así mismo es predominante en climas cálidos-secos (Villares et al., 2016). Afecta hojas jóvenes y provoca que las hojas se deformen enroscándose, inicialmente se observan manchas cloróticas, profusas (**Figura 3 a.**) (Saldarriaga et al., 2017), también puede llegarse a observar un polvillo blanco en la superficie de la hoja (**Figura 3 b.**), lo cual indica la esporulación de hongo (Tamayo, 2001).

El patógeno también puede afectar los botones florales, en donde se aprecia una cobertura del polvillo blanco (**Figura 3 c.**), cuando la enfermedad llega al fruto, este retrasa su crecimiento y

se malforma, también exhibe el polvillo blanco en su superficie (**Figura 3 d.**), posteriormente los frutos y estructuras florales se necrosan (**Figura 3 e.**), en algunos casos, cuando la infección es tardía se da el tiempo para la formación del fruto (**Figura 3 f.**) (Saldarriaga et al., 2017).

Figura 3

Síntomas de cenicilla en diferentes órganos de la planta de mora de Castilla.



Nota. a. Encrespamiento y zonas cloróticas profusas en hojas; b. c. Polvillo blanco debido a esporulación del hongo en superficie de la hoja y sobre botones florales, respectivamente; d. Malformación de frutos y Polvillo blanco debido a esporulación en la superficie; e. Estructuras reproductivas malformadas y con polvillo blanco; f. Afección tardía, el fruto alcanza a madurar. Tomado de (Saldarriaga et al., 2017).

Ataques severos de la enfermedad impiden que la planta se desarrolle con normalidad, debido a que detienen el crecimiento de nuevos brotes y ramas cargadoras, lo que se traduce en disminución de la productividad (Espín, 2010).

Se ha reconocido a *Blumeria graminis* como el causante de mildiu polvoriento en plantas de trigo, mientras *Blumeria graminis secalis* parasita el centeno (Menardo et al., 2016), *Erysiphe polygoni*, *Erysiphe necator* y *Sphaerotheca fuliginea* causan el mildiu polvoriento en plantas de frijol común, vid y pepino, respectivamente (Jaulneau et al., 2011; Stummer et al., 2005).

En plantas de mora en Serbia se ha encontrado como responsable del mildiu polvoso al patógeno *Podosphaera aphanis* (Stevanović et al., 2021), el cual también parasita a fresa y frambuesa, sin embargo, el mildiú polvoroso de la fresa y la frambuesa son genéticamente distintos y podrían representar dos especies crípticas de Erysiphales, debido a variaciones en pares de bases de secuencias ITS (Harvey & Xu, 2010).

En el país vecino, Colombia la enfermedad del mildiu polvoso es causada por el género *Oidium* (Tamayo, 2001), perteneciente al orden de los Erysiphales, familia Erysiphaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2021). De acuerdo a la identificación realizada por el Laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD el género *Oidium* sp. es el responsable de esta enfermedad en el Ecuador y está presente en múltiples zonas de producción de la mora de Castilla en el país (Villares et al., 2016).

Enfermedad del pie negro. La enfermedad del pie negro causa podredumbre basal o necrosis de raíz y marchitez en la planta, el sistema de hongos ingresa a través de la raíz, colonizan produciendo la necrosis del tejido vascular, provoca clorosis en el follaje y puntas de hojas rizadas hacia el haz, así como el marchitamiento severo de la planta e inhibición del desarrollo de esta (Carlucci et al., 2017; Sánchez et al., 2019).

Los agentes causales de la enfermedad del pie negro han sido identificados en diferentes tipos de cultivo; en plantas de vid en las regiones de Apulia y Molise en Italia, el consorcio fúngico aislado de plantas sintomáticas fue *Dactylonectria torresensis*, *Ilyonectria liriodendri* y *Thelonectria blackeriella* (Carlucci et al., 2017), en España las especies fúngicas identificadas en viñedos con un tiempo de vida inferior a cinco años fueron *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum* (Ferro, 2008).

En Portugal *Cylindrocarpon destructans* y *Phaeoacremonium chlamydosporum* estarían involucradas en el declive de viñedos jóvenes a causa de esta enfermedad (Rego et al., 2000). En California, *Cylindrocarpon obtusisporum*, habría sido identificado como causante de la enfermedad (Scheck et al., 1998). De manera general, la enfermedad del pie negro en plantas de vid se encuentra ampliamente distribuida a escala global (Ferro, 2008; Halleen et al., 2004; Rego et al., 2000).

La podredumbre de la raíz, es una afección destructiva, alcanzando a cultivos de toda clase, en Vietnam se ha descrito en productos de importancia económica para la región, como en pimienta negra, siendo esta enfermedad la de mayor preocupación, el agente que causa la pudrición se ha identificado como *Phytophthora capsici* (Walker-Simmons et al., 1983). En plantas jóvenes de vid (2

a 5 años), dentro de la sintomatología, se ha reportado manchas de color marrón oscuro a negro en los tejidos vasculares, así como una notable reducción en el desarrollo de la raíz, donde a menudo se aprecia tejido necrótico (Scheck et al., 1998).

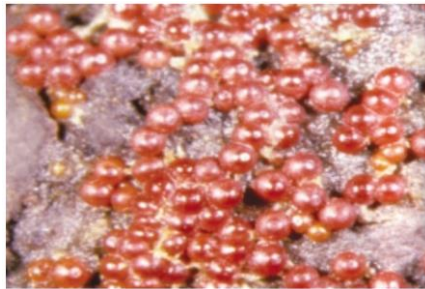
En mora de Castilla se han evidenciado casos en Venezuela, Municipio Libertador. En mayo de 1999, la enfermedad del pie negro ocasionó notables pérdidas de cultivos a causa de *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* (teleomorfo: *Neonectria radicola* var. *radicola*), donde se observaron: plantas marchitas, algunas habían perdido la totalidad de sus hojas, existía tejido necrosado en el ápice y bordes, las hojas estaban curvadas hacia el haz, algunos frutos se encontraban secos y duros, con colores marrón verdoso y marrón oscuro, mientras las raíces y coronas de las plantas adoptaron un color negro (signo de pudrición). Las raíces exhibían grietas transversales, el tejido vascular revelaba rayas de color marrón claro, oscuro y negro, todas las plantas muertas presentaron coronas con una porción central hueca. En el año 2002 y 2003 se encontraron nuevos hallazgos con síntomas similares, el agente causante fue determinado como *Neonectria discophora* var. *rubi*, fase sexual de *Cylindrocarpon ianthothele* var. *ianthothele*, los tejidos vasculares dañados en la zona basal de la planta presentaban coloraciones violetas en lugar de marrón y en el cuello, raíz y corona de las plantas se aglomeraban numerosos peritecios rojos (Cedeño et al., 2004).

A partir del año 2010 se evidencia síntomas de la enfermedad del pie negro en plantaciones de mora de Castilla en Tungurahua y Bolívar, provincias del Ecuador, apreciándose signos de necrosis en los haces vasculares y marchitamiento, en el mismo estudio se extrajeron muestras de tejido lesionado de las plantas infectadas, encontrando como responsables a los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*. Los agentes causales de la enfermedad se determinaron a través de

pruebas de patogenicidad, siendo estos *D. torresensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* e *I. vredehoekensis*, se excluyeron a los aislados de *I. europaea* y *D. novozelandica*, en la investigación, debido a la contaminación de la muestra (Sánchez et al., 2019). De acuerdo a diferentes estudios la enfermedad del pie negro estaría asociada a géneros como *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Dactylonectria*, *Thelonectria*, *Ilyonectria* y *Neonectria* (Ferro, 2008; P. H. Fourie & Halleen, 2004; Rego et al., 2000; Sánchez et al., 2019).

Figura 4

Peritecia de Neonectria discophora var. *rubi*.



Nota. Peritecias ovoides y esféricas de color rojizo, 380-700 x 350-650 μm en plantas de mora de Castilla enfermas. Fotografía in situ. (Cedeño et al., 2004).

Tratamientos para principales fitopatologías de la mora de Castilla.

Tratamientos Físicos. En plantas de vid, se han llevado a cabo métodos de control de la enfermedad del pie negro sumergiendo en agua caliente (50°C por 30 min.) los esquejes de portainjertos, antes de realizarse el injerto, obteniendo resultados favorables, sin embargo, el hallazgo no logró ser concluyente, debido a que los niveles de infección en la investigación fueron bajos, sin embargo, se sugiere que este tipo de tratamiento para hacer frente a esta clase de patógenos y otros, se integre como una estrategia adicional a otras en el control de plagas (P. H. Fourie & Halleen, 2004).

Agentes químicos.

Múltiples de origen sintético. Pese a que existen fungicidas para controlar a *Botrytis*, la mayoría de estos fallan debido a la plasticidad genética del hongo (Williamson et al., 2007). Para el tratamiento de *Botrytis cinerea* a lo largo de los años se han empleado desde benzimidazoles y dicarboximidias, sin embargo, la resistencia del patógeno ha inhabilitado poco a poco dichos fungicidas químicos sintéticos (Latorre & Rioja, 2001). En los 90 aparecieron prometedores nuevos compuestos al mercado, las anilinopirimidinas, fenilpirrol fluidioxinil, hidroxianilida fenhexamida (Latorre & Rioja, 2001), sin embargo, debido a la gran capacidad de adaptación de *B. cinerea*, existe una enorme necesidad de desarrollar nuevos botricidas de manera constante.

Ozono. En algunas investigaciones (Luo et al., 2019; Sharpe et al., 2009) se ha reportado el uso de ozono para tratar patógenos de importancia como *Botrytis cinerea*, entre otros múltiples, informando la capacidad del ozono como antagonista de bacterias hongos, parásitos y virus, al reaccionar con enzimas intracelulares, ácidos nucleicos y componentes de envolturas celulares, capas de esporas o cápsides virales.

El tratamiento con ozono de 450ppb aplicado sobre lesiones de *B. cinerea* redujo la germinación de esporas in vitro en un 99.5% a 20°C, sin embargo, no logró matar el micelio, pero su exposición incluso a 18 días sí retrasó el crecimiento del micelio en zanahorias, uvas y manzanas. También se obtuvo inhibición de la descomposición de zanahorias, indicando que el ozono puede inducir reacciones de defensa de las plantas, sin embargo, en experimentos con bayas como arándanos, los resultados no fueron tan favorables, debido a que la infección por *B. cinerea* progresa rápidamente, antes de que el ozono haya logrado actuar (Sharpe et al., 2009).

En investigaciones previas en Kentucky se ha reportado que el ozono es eficaz para la conservación de la calidad de las moras y otras frutas pequeñas en postcosecha especialmente contra *B. cinerea*, como alternativa a fungicidas, en donde no influye negativamente sobre la calidad del producto, con un tratamiento de hasta 0.3 ppm de ozono en las bayas durante 12 días a 2°C (Barth et al., 1995), sin embargo, al ser aplicado en plantas se observaron niveles superiores de POD (actividad peroxidasa) que puede interferir con la calidad de la fruta, ya que el POD podría estar participando en la degradación oxidativa de antocianinas, las antocianinas proporcionan el color del característico del fruto (Streb et al., 1996).

Se cree que el ozono actúa principalmente permitiendo la fuga del contenido celular, y rompiendo los dobles enlaces de los lípidos insaturados en la envoltura celular, permite la destrucción general de los sistemas de enzimas deshidrogenantes e inactiva a los microorganismos al dañar su material genético (Kim et al., 1999). Su modo de acción es rápido y no produce compuestos halogenados tóxicos como en el caso del cloro (Miller et al., 2013).

Pese a sus múltiples beneficios como desinfectante, el ozono es inestable, puede descomponerse en oxígeno y radicales libres, por lo que el uso excesivo de ozono puede provocar la oxidación superficial de alimentos y puede influir sobre la pérdida de coloración de los alimentos, es capaz de oxidar lípidos que protegen los alimentos, aunque existen reportes favorables en otras investigaciones que sugieren que el efecto de tratamientos con ozono dependerá de la concentración del ozono y la composición química de los alimentos, tiempo de contacto, temperatura, pH, así como distintos factores del tratamiento (Miller et al., 2013). El ozono es irritante para la nariz, garganta y ojos y la exposición a 2, 4, 15 y 95 ppm en una hora pueden inducir efectos sintomáticos, irritantes, tóxicos e irreversibles letales, respectivamente (Kim et al., 1999).

Agentes biológicos.

Polímeros – Quitosano. Mientras que el empleo de fungicidas químicos representa un problema, debido a que reducen la cantidad y calidad del producto, favoreciendo a su vez la contaminación ambiental, se ha recurrido al empleo de fungicidas biológicos, empleando quitosano y AgNP (Le Quang Luan & Xo, 2018).

En cultivos de pimienta en reemplazo de fungicidas químicos para hacer frente a enfermedades graves como la pudrición de la raíz, se ha empleado ampliamente el quitosano (Le

Quang Luan & Xo, 2018), siendo este un polisacárido naturalmente abundante, segundo después de la celulosa, como un medio de conservación (Khot et al., 2012) y recubrimiento de semillas, la producción de fertilizantes y semillas artificiales (Kume et al., 2002; Le Q. Luan et al., 2005; Tay et al., 1993; Vasyukova et al., 2001), además de presentar otros numerosos beneficios frente a plagas fúngicas (Walker-Simmons et al., 1983).

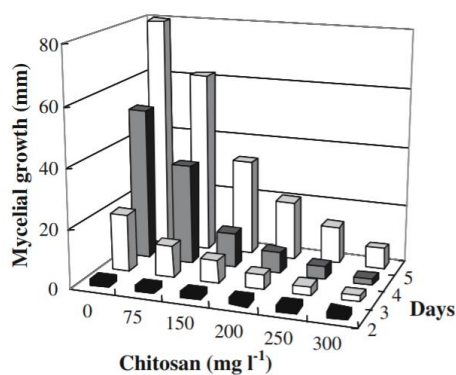
El quitosano u oligómero de glucosamina b-1,4-ligado es un desecho de las pesquerías de camarón y cangrejo, ha sido empleado contra el moho gris *B. cinerea*, se ha observado el potencial de este polímero para mejorarla tolerancia hacia el moho gris (Trotel-Aziz et al., 2006). De acuerdo a estudios, la quitina, un componente de las paredes celulares de muchos hongos puede reaccionar y convertirse en quitosano a través de una reacción de desacetilación, la quitina es detectada por las plantas que a su vez producen enzimas quitinasas para hacer contra a la infección por hongos, sin embargo, estas enzimas pueden activarse inducidas por el quitosano, este mecanismo se ha observado en plantas de guisantes, en donde se produjeron fitoalexinas y se probó contra *Fusarium solani* (Hadwiger & Beckman, 1980), mientras en plántulas de arroz se indujo a la producción de proteínas PR, planta de melón y trigo (Vander et al., 1998), entre otros estudios tanto in vivo como in vitro.

En un estudio se empleó quitosano comercial, se incubó en hojas de plantas de vid con *Botrytis cinerea*, a las cuales se les suplementó diferentes concentraciones de quitosano (0-300 mg/L). En el experimento controlado se demostró que el quitosano es un inductor de reacciones de defensa en las hojas de la vid, observándose actividad de enzimas marcadoras de la respuesta de defensa de las plantas como LOX (enzima lipooxigenasa), PAL (fenilalanina amoniaco-liasa, activadora de las vías fenilpropanoides) y quitinasas. La inducción de dichas enzimas llegaba a su

pico máximo a 150 mg/L de quitosano. Se evidenció disminución de lesiones necróticas por *B. cinerea* en concentraciones de 150 mg/L de quitosano (**Tabla 1**) y se observó que el quitosano inhibió el crecimiento de *B. cinerea* in vitro de una manera dependiente de la dosis (**Figura 5**) (Trotel-Aziz et al., 2006).

Figura 5

Crecimiento micelial de B. cinerea tras tratamiento con quitosano



Nota. Efecto del quitosano sobre el crecimiento radial de *B. cinerea* en placas de agar que contienen diferentes concentraciones de quitosano (0, 75, 150, 200, 250, 300 mg/L) 1). Los datos son medias de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones.

Tabla 1

Efecto protector del quitosano en hojas de plántulas infectadas con Botrytis cinerea.

Chitosan (mg l ⁻¹)	Necrotic lesion (mm)	Corresponding Protection (%)
0	20 ± 3	0 ± 0
75	6 ± 2	70 ± 10
150	0 ± 0	100 ± 0
200	2.4 ± 2.2	88 ± 11
250	4.6 ± 1.8	77 ± 9
300	10 ± 2	50 ± 10

Nota. Las hojas de vid se dejaron flotar durante 20 h en una solución tampón que contenía diferentes concentraciones de quitosano (0–300 mg l⁻¹), se retiraron de la solución y se infectaron con una suspensión de conidios de *Botrytis*. Las lesiones necróticas se midieron 7 días después de la infección. Cada tratamiento se realizó por triplicado con al menos 10 hojas en cada ensayo. Los datos son medias de 2 experimentos independientes.

El quitosano también ha sido probado con patógenos del mildiu polvoso en cotiledones de pepino inoculados con *Sphaerotheca fuliginea* y *Erysiphe cichoracearum*, de dos razas distintas cada una, inocularon quitosano en concentraciones de 1% y 2,5%, encontrándose que la concentración más alta de quitosano inhibió significativamente la incidencia de mildiu en cotiledones pretratados inoculados con ambos patógenos, disminuyendo los diámetros de las lesiones (Moret et al., 2009).

Hongo Trichoderma spp.

Generalidades.

Pertenecientes al reino Fungi, división Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, orden de los Hipocreales, familia *Hypocreaceae* (N. Zhang et al., 2006), dentro de estos *Trichoderma* es el taxón más grande (Martin, 2013). Fueron descritos por primera vez hace doscientos años y confundidos con un gasteromiceto (Persoon, 1794), Bisset (Bissett, 1991), realizó la clasificación infragenérica, determinándose cinco secciones (*Longibrahmatum*, *Saturnisporum*,

Pachybasium, *Hypocreanum*, *Trichoderma*). El género *Trichoderma* destaca debido a su capacidad para parasitar Ascomycetes y especies cercanas filogenéticamente, el estudio genético de algunas de sus especies sugiere que el micoparasitismo es innato del género (Kubicek et al., 2011).

Trichoderma es un género de hifomicetos, deuteromicetos filamentosos, imperfectos, ya que no se conocen en etapa sexual (Howell, 2003). De rápido crecimiento en cultivo, presentan numerosos conidios generalmente lisos, sin embargo, rara vez pueden ser ornamentados, son elipsoidales a oblongos, inusualmente globosos, su coloración va de amarillo (inusual) a verde o hialino, el reverso de las colonias exhibe coloraciones entre amarillo y amarillo verdoso, e incluso incoloro o ámbar (Howell, 2003).

Estructuralmente se presentan como conidióforos complejos con ramificaciones (Sharma & Salwal, 2017). Cuentan con abundantes clamidosporas globosas a subglobosas, las cuales se forman en las hifas, ya sea en las puntas o dentro de estas estructuras (Samuels, 1996). Ubicuos en ambientes como el suelo, donde abundan en su mayoría, incluyendo en el humus (Wardle et al., 1993), se les considera cosmopolitas, debido a su distribución en diversos hábitats alrededor del mundo, debido a su capacidad para metabolizar una gran variedad de sustratos y producir numerosos metabolitos secundarios y algunos son endofíticos (Mulaw et al., 2013). *Trichoderma* destaca entonces por su versatilidad nutricional.

Algunas especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir enzimas (entre ellas enzimas celulolíticas a través de organismos como *T. reesei*, haciendo a este organismo de interés industrial) pudiendo en algunos casos atacar o inhibir el crecimiento de otros hongos, característica útil en el control biológico de patógenos en suelos que afectan a los cultivos (biofungicidas), se

conoce que *T. harzianum* y *T. virens* poseen enzimas quitinolíticas, capaces de degradar las paredes celulares de otros hongos y así impedir el crecimiento del micelio (Gunderson et al., 1987), esto ha hecho atractivo a este género a nivel comercial, elaborándose preparados de los mismos para beneficios en la agricultura (Benhamou & Chet, 1993; Dennis & Webster, 1971).

Algunas especies de *Trichoderma* pueden comportarse altamente oportunistas, llegando a devastar plantaciones de hongos e incluso logran parasitar humanos, también se ha empleado a este género en el estudio de control genético, manipulación de hongos filamentosos y como promotores de crecimiento en plantas (biofertilizantes) (Kubicek et al., 2019), son considerados competidores agresivos, sin embargo, esto depende de la especie (Wardle et al., 1993).

Modo de acción.

Trichoderma es uno de los agentes de control biológico más estudiados y empleados en gran variedad de cultivos (Pascale et al., 2017). Debido a su capacidad antagónica frente a patógenos del suelo, atribuyéndosele actividad antimicrobiana contra un importante número de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Vizcaino et al., 2006) combinando propiedades de lisis enzimática, secreción de sustancias antibióticas y su carácter de fuertes competidores por el espacio, nutrientes y sustrato (Gary E. Harman et al., 2004; Howell, 2003), algunas de sus especies tienen la capacidad de actuar como simbioses oportunistas al interactuar de manera íntima con las raíces de las plantas, penetrando la epidermis de la raíz (Gary E. Harman et al., 2004; Shores et al., 2010), durante este proceso de simbiosis *Trichoderma* obtiene nutrientes, mientras brinda protección contra patógenos invasores y el estrés abiótico (Gary E. Harman et al., 2004; Shores et al., 2010).

Producción de antibióticos.

Se cree que *Trichoderma* podría producir más de 1000 compuestos, dependiendo de la cepa y las condiciones ambientales (Hermosa et al., 2014). Entre los antibióticos producidos por *Trichoderma*, se puede realizar una clasificación: 1) Metabolitos volátiles y de bajo peso molecular: se trata de metabolitos con alta presión de vapor y no polares, incluye a los compuestos aromáticos simples, algunas pironas y butenófilos, terpenos volátiles, isocianos. 2) Metabolitos polares y de alto peso molecular: incluye a los peptaibols, compuestos de gliovirina, gliotoxinas, esta clase de metabolitos ejercen acción a través del contacto directo entre *Trichoderma* y sus antagonistas.

Los Peptaibols son péptidos antibióticos lineales, anfipáticos (Rebuffat et al., 1992) comprenden de 7 a 20 aminoácidos, son producidos por la péptido sintasa no ribosómica de organismos fúngicos (Chugh & Wallace, 2001; Chutrakul et al., 2008) se caracterizan por un aminoácido inusual ácido α -aminoisobutírico (Aib), un aminoácido C-terminal-hidroxilado y N-terminal-acetilado (Chugh & Wallace, 2001) poseen características antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas, más de 190 de estos compuestos son producidos por algunos clados de *Trichoderma* (Hermosa et al., 2014).

Los peptaibols inhiben a las enzimas asociadas a la síntesis de la pared celular del hongo diana, además, se ha demostrado que estas moléculas pueden inducir a apoptosis independiente de metacaspasas en diferentes líneas celulares, como las de *Fusarium oxysporum*, debido a la acumulación de vacuolas citoplasmáticas acompañada de una compleja ruta de señalización, que incluye la acumulación de Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citosol (Shi et al., 2012).

Los policétidos (PK) son compuestos sintetizados por enzimas complejas policétido sintetasas (PKS), estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas, anticancerígenas e inmunosupresoras y parecen facilitar la competencia por el sustrato a los organismos productores (Khosla, 2009), se conoce que *T. virens* y *T. atroviride* albergan una gran cantidad de genes PKS (Kubicek et al., 2011).

Micoparasitismo.

El micoparasitismo es la forma más importante de antagonismo frente a un patógeno, involucrando el contacto físico entre ambos agentes (Kamal Krishna Pal & Gardener, 2006).

El fenómeno inicia con el crecimiento quimiotrópico del micelio del hongo antagonista sobre el hongo patógeno, se produce un enrollamiento y posterior secreción de enzimas hidrolíticas que disuelven la pared o membrana celular (Tewari & Mukhopadhyay, 2001), estas enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE) permiten que los materiales de la misma, como el β -1,3 glucano y la quitina sean empleados por *Trichoderma* como nutrientes para su desarrollo (Yedidia et al., 2001).

Resistencia inducida.

En plantas expuestas a *Trichoderma* se ha observado el enrollamiento de las hifas del hongo alrededor de las raíces, colonizándolas, se forman apresorios donde crece intercelularmente en la epidermis y corteza de la raíz, lo cual provoca que la planta produzca compuestos fenólicos y limite el crecimiento endofítico de *Trichoderma* en las raíces (Yedidia et al., 1999), esta interacción resulta en una reprogramación a nivel de transcriptoma y proteoma de la planta (Shoresh et al., 2010).

Trichoderma secreta algunas sustancias que pueden identificarse como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales desempeñan un papel clave en lo referente a inmunidad innata (Bent & Mackey, 2007), algunos de estos pueden ser los peptaibols, así como los oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular liberados por las paredes celulares de hongos por la actividad de las enzimas de *Trichoderma* (De Souza et al., 2008; Gary E. Harman et al., 2004; Woo et al., 2006).

Según el tipo de agente inductor, en plantas se tiene dos tipos de inducción de resistencia, la resistencia sistémica adquirida (SAR) provocada generalmente por una infección local permite una resistencia a largo plazo para infecciones posteriores, está correlacionado con la activación de genes PR que promueven la activación de proteínas de resistencia (PR) y necesita de la participación del ácido salicílico, el agente inductor es biótico, mientras la resistencia sistémica inducida (ISR) se produce gracias a agentes inductores abióticos (Kuč, 2001), los cuales pueden ser promovidos por la colonización de las raíces por parte de microorganismos no patógenos, se produce una cascada de señales que involucran el ácido jasmónico y etileno.

Se conoce también que los jasmonatos participan en el crecimiento de la raíz (C. Zhang & Huang, 2013) y promueven la biosíntesis de enzimas involucradas en la resistencia en plantas, tales como fitoalexinas (polifenol oxidasa, calcona sintasa, fenilalanina amonio sintasa) (Jankiewicz & Urbanczyk de Espinoza, 2003), también que el ácido jasmónico genera efectos similares a los del abscísico en la planta (Schilmiller & Howe, 2005).

Efecto de *Trichoderma* como control biológico.

Estudios pasados han evaluado el empleo de *Trichoderma harzianum*, cepa T-22 (mutante competente en la rizósfera) en variedades de plantas anuales, entre otras formas, como recubrimiento de raíces, en todo tipos de suelos, tanto ácidos como alcalinos (Lo et al., 1996), arenosos o arcillosos y con un contenido de materia orgánica variable (G. Harman & Björkman, 1998) encontrando que la cepa colonizaba las raíces y desplazaba a otra microflora, cambiando la composición microfloral de la raíz, lo que desencadenaba en protección contra enfermedades, disminución de la sensibilidad de los cultivos al estrés (sequía) y permitió el desarrollo de estas, haciéndolas más grandes y robustas (**Figura 6**) (R. Baker et al., 1984; Chang et al., 1986), entre otros beneficios.

Figura 6

Desarrollo radicular de semillas tratadas y no tratadas con Trichoderma harzianum T-22 Planter Box.



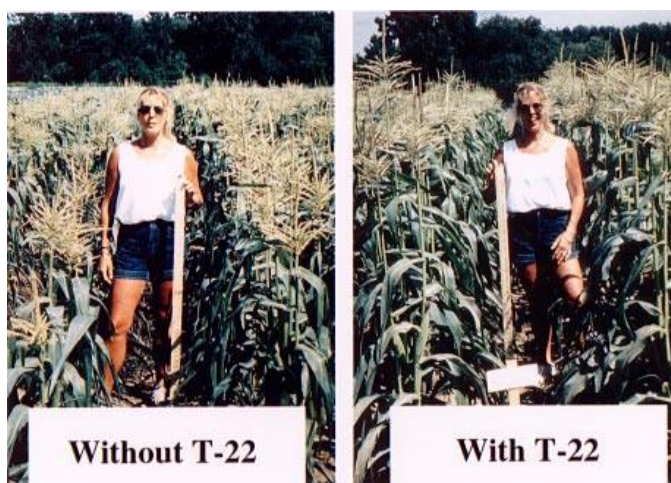
Nota. (A) Raíces de maíz dulce cultivadas, el incremento de densidad radicular no influyó sobre el rendimiento. (B) Raíces de soja, rendimiento del 123% en plantas tratadas con T-22. Tomado de G. E. Harman (2000).

Se cree que esto se debe al desplazamiento de la microflora nociva de la raíz, así como por efectos de productos bioquímicos que actúan directamente sobre la planta, modificando el proteoma y metabolismo de la misma (G. E. Harman et al., 2004). La colonización de la raíz con T-22 se ha logrado en tratamientos de semilla previo a la siembra, empleando gránulos de difusión en la superficie del suelo plantado, o como gránulos incorporados en mezcla de siembra de invernadero, así como a través de suspensiones conidiales en macetas de invernadero (G. E. Harman, 2000).

En plantas como el maíz, también se han observado rendimientos de cosecha superiores en los tratamientos con T-22, frente a los no tratados (empleo de T-22 en tratamiento de semillas) (**Figura 7**), así como el incremento en el aprovechamiento de nitrógeno (Piekkielek & Fox, 1992), lo cual contribuye a la reducción en el uso de fertilizantes (G. E. Harman, 2000).

Figura 7

*Plantas de maíz dulce expuestas a tratamiento con formulación granular por difusión de *T. harzianum* T-22 (10 kg/ha).*



Nota. Se realizó un tratamiento estándar de semillas con fungicidas. Tomado de Harman (2000).

Según (G. E. Harman, 2000), un mayor desarrollo de la raíz es influyente sobre la tolerancia al estrés biótico, el enraizamiento mejorado, entonces, podría inducir a un incremento en la tolerancia de plagas de la planta.

Fourie *et al.*, (P. Fourie et al., 2001) estudió el potencial de *Trichoderma* para el control biológico de *Cylindrocarpon* spp. causantes de la enfermedad del pie negro, encontrando que los tratamientos con *Trichoderma* generaban un crecimiento superior en 41.7% en la raíz y como resultado se aislaron 42.9% menos hongos pertenecientes a *Cylindrocarpon* spp. de las raíces.

Diversos beneficios se le atribuyen al empleo de *Trichoderma* en las plantas, debido a la presencia de metabolitos secundarios (Pascale et al., 2017) y enzimas (Waghunde et al., 2016) que contribuyen en: el control contra patógenos y otras enfermedades, el crecimiento de la planta y la mayor disponibilidad de nutrientes (Pascale et al., 2017).

Un estudio reciente, evaluó la respuesta de los sembríos de mora de Castilla cultivada en la Provincia de Tungurahua - Ecuador a *T. asperellum* (1.53×10^9 CFU/g), y encontró rendimientos superiores en plantas inoculadas frente al control no inoculado (rendimiento incrementado en el crecimiento de la planta: Tisaleo 17%, Píllaro 14% y Huachi Grande 39%), el estudio a su vez encontró correlación significativa ($r = 0.60, p = 0.002$) entre el contenido de materia orgánica en el suelo con la población de *T. Asperellum* a los 30 días de inoculación de la cepa (Viera et al., 2019).

Saravanakumar et al. (2016), en "Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp.

cucumerinum", al sudeste de China probaron el efecto antagonista *in vitro* de 100 cepas de *Trichoderma*, para prevenir el marchitamiento vascular del pepino, seleccionando a 10 cepas con un porcentaje superior al 85% de inhibición de *Fusarium oxysporum* para pruebas de invernadero en pepino, seleccionando CCTCC-RW0014, la cual mostró una reducción de la enfermedad del 71.67%, en este estudio se investigó a través de RT-qPCR la colonización de raíces por *Trichoderma*, para cuantificar en tiempo real el ADN objetivo, empleando un cebador específico para la detección del biocontrol, los metabolitos derivados de la cepa seleccionada se determinaron por cromatografía de gases espectrómetro de masas (AutoSystem XL GC / TurboMass MS).

También se estudió la posible interacción entre metabolitos secundarios de *Trichoderma* y la proteína de crecimiento de FOC Snt2 al reconstruir bioinformáticamente a las moléculas y estudiando los modelos de unión para el sitio activo, se encontró una alta energía de acoplamiento entre Snt2 y 1,6-difenilhexano-1,3,4,6-tetrona.

Saravanakumar et al. (2017), en "Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot" hablan sobre la influencia *Trichoderma harzianum* sobre la podredumbre de tallo de maíz causada por *Fusarium graminearum*, para lo cual trabajaron *in vitro* con 100 aislados de *Trichoderma* encontrando que la cepa con mayor porcentaje de antagonismo frente al patógeno (96.30%) fue CCTCC-RW0024, para la cual se realizaron pruebas de invernadero, donde el ensayo de qRT-PCR demuestra que la presencia de *Fusarium graminearum* en la raíz del maíz disminuyó en 66%. La pirosecuenciación demostró que la población de acidobacterias en la rizósfera incrementó en un 18.4%, las cuales promueven el crecimiento del maíz, la pirosecuenciación se desarrolló extrayendo el ADN genómico de las muestras del suelo, posteriormente por espectrofotometría UV en gel de agarosa de 0.8% se probó la pureza del ADN

(20 min, 120V), se amplificaron las regiones ITS de interés por PCR y se purificaron los productos con AMPure Beads, cuantificaron el ADN con PicoGreen dsDNA para su posterior piroseminación con Roche 454 GS FLX. Para determinar la correlación entre la actividad antagonista de la cepa de biocontrol y la actividad enzimática de la quitinasa y la B-glucanasa, se determinó la capacidad de hidrólisis en base a fórmulas que implicaron la medida de las colonias del biocontrol y el patógeno, además se aisló el ARN de *Trichoderma* y por transcripción inversa se obtuvo DNAc, en donde se determinó la expresión génica por PCR cuantitativa de tiempo real FTC-3000, encontrándose un 19% y 50% de correlación positiva, respectivamente.

En Cevallos y Tisaleo, cantones de Tungurahua, provincia del Ecuador, el INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), junto al Programa de Fruticultura y contando con el apoyo de la AgResearch de Nueva Zelanda realizaron un estudio acerca de nuevas técnicas agroecológicas o de producción limpia de mora de Castilla en beneficio de los campesinos de la zona centro del Ecuador. En la investigación de (Martínez et al., 2019), se evaluaron tratamientos con y sin *Trichoderma* (conidios de *Trichoderma viridae* comercial al 5%, 150 g/ha: dosis recomendada comercialmente) con abonos orgánicos y sintéticos, en donde se observó que la incidencia de *Trichoderma* en el número de frutos, peso por fruto (g) y rendimiento (kg/ha) fue significativa tanto en el manejo limpio (abonos sintéticos) como en el manejo orgánico (abonos orgánicos), mientras la incidencia de *Peronospora* y *Botrytis* en frutos y de marchitez en la planta fue significativamente más baja en los tratamientos con *Trichoderma*. Resultados similares se obtuvieron en un reciente estudio donde se evaluó el potencial antagonista de *Trichoderma* en pruebas in vitro contra *Botrytis* (Pincay et al., 2021).

Las medidas de control adoptadas por el INIAP en Ecuador frente a enfermedades provocadas por hongos patógenos como la marchitez descendente de la mora, o también conocida como enfermedad de pie negro, el mildiu polvoso y la pudrición del fruto por *Botrytis*, incluyen a *Trichoderma*, ya sea solo o suplementado con caldo bordelés neutralizado o Penconazol en casos de mildiu polvoso leves y severos, mientras que para tratar la pudrición de la mora se emplea *Trichoderma* suplementado con caldo bordelés y *Bacillus* spp. o fungicidas a base de imidazoles, triazoles, dependiendo de la severidad del caso (Villares et al., 2016).

Suelo de la rizósfera

Las plantas albergan una microbiota altamente compleja en los suelos estrechamente adheridos a las raíces, como la rizósfera y la microbiota radicular, la composición microbiana que habita estos suelos de acuerdo a estudios es radicalmente distinta a la de suelos a granel (Hein et al., 2007).

Los microorganismos que colonizan la rizósfera de las plantas representan un factor de gran impacto en el rendimiento de cultivos, tanto en la producción como en la resistencia a plagas, por ello es importante comprender precisamente los mecanismos que subyacen de la interacción suelo-microorganismo-planta, para convertir la teoría científica en la producción real, sin embargo, este conocimiento es aún limitado (Qu et al., 2020).

Como consecuencia a esta necesidad existen actualmente numerosos enfoques de estudio de microbiomas, en donde destacan los estudios de abundancia, actividad y composición microbianas a través de métodos como la secuenciación de Amplicón y la metagenómica de escopeta (Qu et al., 2020). La investigación actual se basa en la técnica de secuenciación de

Aplicón para evaluar la microbiota fúngica presente en tratamientos con *Trichoderma* frente a aquellos sin este biocontrol, con la tecnología Illumina MiSeq.

Factores ambientales determinantes en el microbioma

Factores como la humedad y el pH tienen la capacidad de alterar la actividad microbiana (Gorissen et al., 2004; Paşca et al., 2012). De acuerdo a un estudio en matorrales en Reino Unido, Dinamarca, Países Bajos, España, en donde se aplicaron tratamientos de sequía y calentamiento a escala de campo, se llegó a la conclusión de que en el largo plazo la falta de humedad puede llegar a afectar el funcionamiento de ecosistemas, debido a que influye sobre la biomasa microbiana y su capacidad en los procesos de descomposición que juegan un papel central en los ciclos de nutrientes del suelo, tales como el ciclo del carbono (Gorissen et al., 2004), mientras que (Paşca et al., 2012) concluyeron que el pH y la humedad guardan relación con el contenido de potasio disponible en el suelo y que son factores que pueden cambiar la competencia entre los microorganismos de este hábitat.

Determinación de concentración y pureza de una muestra de ADN

La espectrofotometría permite determinar la concentración y pureza de una muestra de ADN en base a la absorbancia que posee un compuesto a una longitud de onda dada. La concentración se logra a partir de la absorbancia a 260 nm, mientras que las relaciones A260/280 y A260/230 permiten evaluar la pureza (Banco Nacional de ADN, 2020).

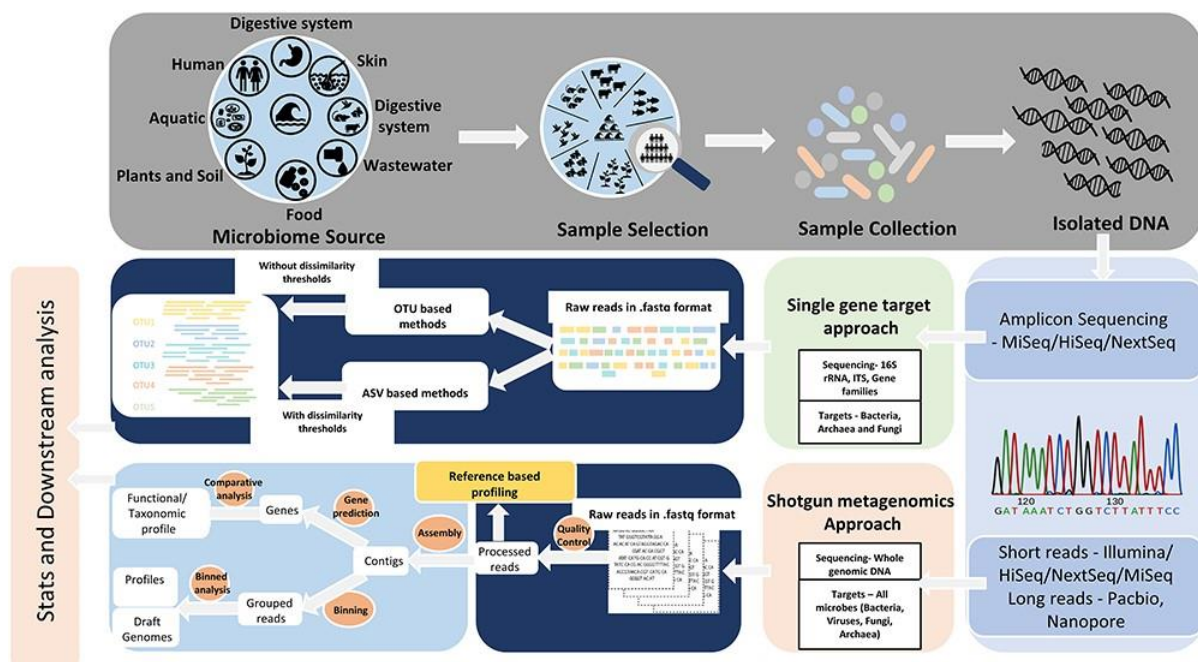
La absorbancia máxima del ADN es a 260 nm, sin embargo, al tomar una lectura a 260 nm es posible sobreestimar el contenido de ADN debido a contaminantes como proteínas por lo que la relación 260/280 es un buen indicador de estos contaminantes, cuando esta relación es ≥ 1.8 se

considera un ADN puro o de buena calidad, cuando es <1.8 (Mettler Toledo, 2021), es debido a una probable contaminación, valores < 1.5 indican una impureza que puede estar comprometiendo la funcionalidad de la muestra, la cual puede involucrar compuestos aromáticos o proteínas, mientras que la relación A260/230 es un indicador de sales, fenoles e hidratos de carbono, entre otros (Banco Nacional de ADN, 2020).

Análisis de microbiomas

Figura 8

Enfoques de análisis de microbiomas por secuenciación y plataformas de secuenciación comúnmente empleadas.



Tomado de Bharti & Grimm (2021).

Más del 99% de microorganismos en cualquier entorno no han logrado ser cultivados mediante técnicas de cultivo estándar, por lo que actualmente se emplean nuevas metodologías independientes de cultivo para obtener información a partir de esas enormes comunidades desconocidas (De Tender et al., 2017). En la actualidad el método molecular más empleado en este interés es (HTS) High-Throughput Sequencing, secuenciación de alto rendimiento o secuenciación masiva a través de tecnologías Miseq, HiSeq, NextSeq, NovaSeq y MiniSeq y a partir del 2014 se incorpora la tecnología single molecule real-time [SMRT] o secuenciación de molécula única (Hernández et al., 2020).

Las metodologías más empleadas en la identificación microbiana y genotipado son secuenciación de amplicón y metagenómica de escopeta (Shotgun sequencing), una tecnología que realiza la secuenciación de cadenas de ADN aleatorias, dividiendo el ADN en numerosos segmentos de cadena corta para secuenciarlos mediante el método de terminación de cadenas.

Durante los últimos 25 años la secuenciación de amplicones de genes ha sido la principal técnica para el estudio filogenético y de taxonomía de microbiomas complejos. A través de esta técnica es posible identificar bacterias, arqueas, hongos y micobacterias empleando genes marcadores, que en su mayoría se conservan funcionalmente a través de distancias filogenéticas, por ello sirven también con relojes moleculares para estudio de cambios evolutivos (Bharti & Grimm, 2021).

Identificación molecular con secuenciación de nueva generación (NGS) La secuenciación es una tecnología que permite descifrar la composición en bases nitrogenadas del ADN o ARN, el método de Sanger, en honor al equipo dirigido por Fred Sanger fue una de los primeros métodos de secuenciación y se posicionó como un método estándar para la secuenciación durante muchos años, debido a su precisión, empleando didesoxinucleótidos (ddNTP) los cuales que carecen de un grupo 3'-hidroxilo (-OH) en la desoxirribosa extraída (Rodicio & Mendoza, 2004).

A principios del siglo XXI nuevos métodos de secuenciación toman parte, los basados en la pirosecuenciación y los NGS (Next Generation Sequencing) con tecnologías como 454 GS de la compañía Life Sciences-Roche. Posteriormente nacen los métodos HTS (High-Throughput Sequencing) o secuenciación masiva con tecnologías como Ion Torren de Life Technologies o Illumina, que aparece por primera vez en el 2006. Illumina MiSeq se comercializó a partir de 2011. En la actualidad se cuenta incluso son secuenciadores de tercera generación como SMRT (single molecule real-time) empleados para la secuenciación de molécula única como el equipo portátil MinION™ de Oxford Nanopore Technologies (2014), entre otros (King et al., 2021; Loman et al., 2012).

La identificación molecular parte de la extracción de ADN a partir de un cultivo del microorganismo de estudio o de la muestra directamente extraída (Rodicio & Mendoza, 2004). La secuenciación masiva constituye una herramienta poderosa para el análisis de la biodiversidad microbiana en muestras biológicas y ambientales, permitiendo la lectura en paralelo de millones de secuencias a un costo asequible y requiriendo la aplicación de bioinformática (Hernández et al., 2020).

Los análisis filogenéticos inician con la alineación de las secuencias obtenidas, organizándolas para encontrar residuos homólogos, la homología implica la existencia de un ancestro en común, por lo cual la inferencia filogenética se basa en la hipótesis de que las características sujeto de comparación se encuentran relacionadas por un ancestro en común, mientras la similitud podría implicar un ancestro en común o ser resultado del azar (C. Woese & Olsen, 1993).

En la secuencia los sitios conservados son importantes para reconocer secuencias homólogas, sin embargo, no proporcionan información filogenética, esta se determina gracias a los sitios ligeramente variables, pues estas indican características particulares de grupos más profundos, sin embargo, al producirse el cambio lentamente, solo un número limitado cambia dentro de un intervalo evolutivo interesante (C. Woese & Olsen, 1993).

A través de estudios filogenéticos moleculares se conoce que en una muestra ambiental un bajo porcentaje de los microorganismos pueden cultivarse en condiciones de laboratorio (Amann et al., 1995). Aunque actualmente no se cuenta con un dato en específico del porcentaje de bacterias cultivables en una muestra, debido a la variabilidad de los mismos, se han encontrado valores de 0.5% de células cultivables en muestras de lagos, ríos, agua potable, agua de mar, suelos, entre otros (Lloyd et al., 2018), contra fracciones superiores que alcanzan el 7% en bacterias quimioheterotróficas de un lago eutrófico (Bartscht et al., 1999), y otros valores superiores (Pinhassi et al., 1997), sin embargo, un porcentaje dominante de estos microorganismos permanecen sin ser cultivados (Lloyd et al., 2018; Steen et al., 2019)).

La secuenciación de amplicones de un locus en particular, como genes marcadores taxonómicos ya sea el gen 16S de rRNA en bacterias, 18S rRNA en células eucariotas o ITS en hongos es un método revolucionario para la investigación de los microorganismos presentes en los ambientes, debido a que al estudiar el ADN extraído de las comunidades de interés no se requiere cultivar a los microorganismos para determinar la presencia de estos, permitiendo de manera rentable el censo de dichas comunidades (B. Callahan et al., 2020), de este modo, es posible detectar a organismos no cultivables provenientes de cualquier fuente ambiental (G. C. Baker et al., 2003)

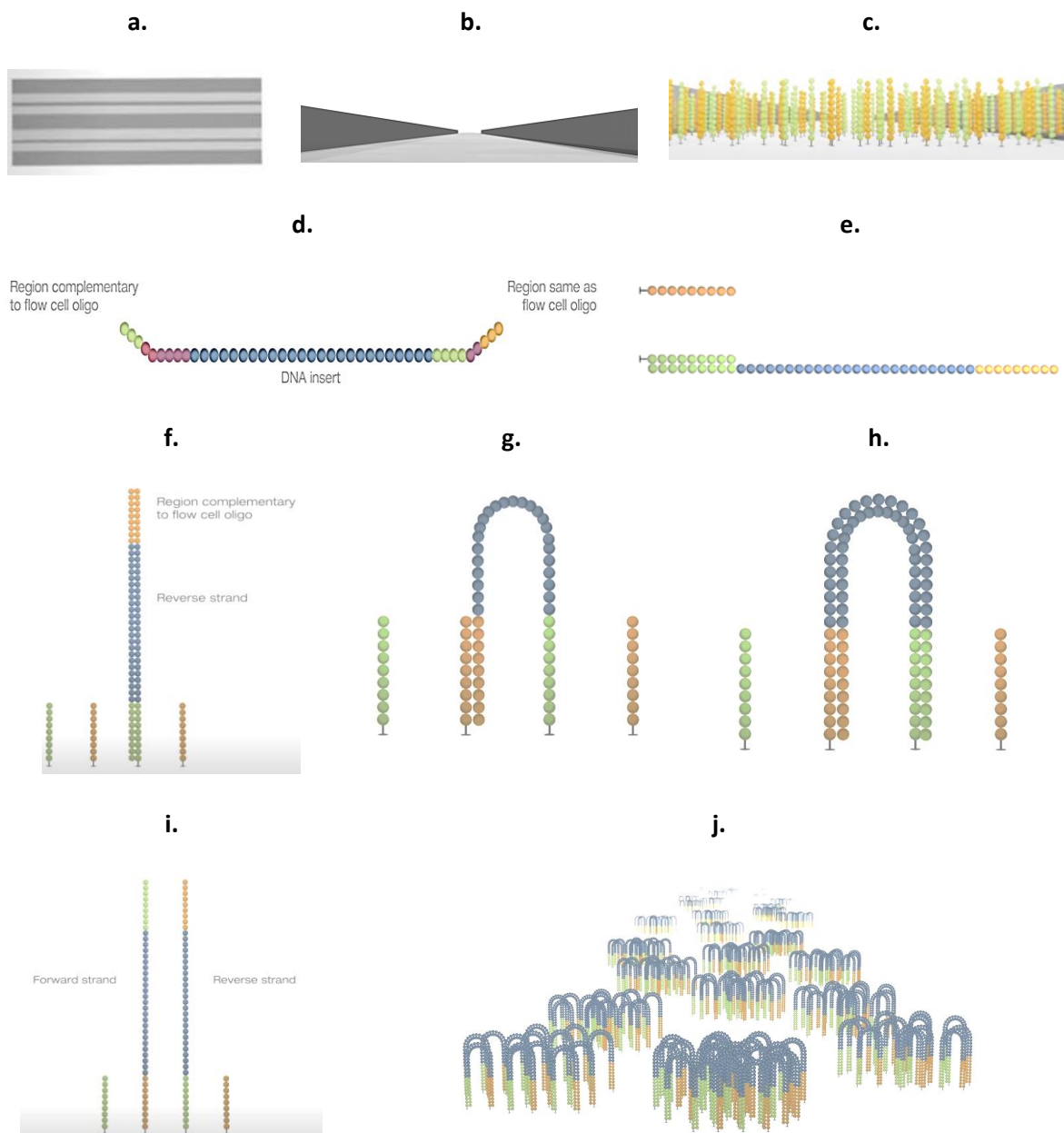
El análisis detallado de las comunidades microbianas a través de secuenciación genera millones de lecturas de los ácidos nucleicos que componen a los microorganismos. Zuckerkandl & Pauling (1965), propusieron el empleo de secuencias de genes como marcadores filogenéticos, mientras C. R. Woese & Fox (1977), abrieron paso a la creación de oligos específicos para nuevos taxones.

Tecnología de secuenciación Illumina Miseq

La agrupación es un proceso en el que cada molécula de fragmento es isotérmicamente amplificada, la celda de flujo es un portaobjetos de vidrio con carriles (**Figura 9 a.**), cada carril es un canal recubierto (**Figura 9 b.**), sobre este se encuentran dos tipos de oligos (**Figura 9 c.**), la hibridación está habilitada por el primero de los dos tipos el cual va a la superficie, este oligo es complementario a la región adaptadora en una de las hebras del fragmento (**Figura 9 d. y e.**), la polimerasa crea un complemento del fragmento hibridado (**Figura 9 f.**), el fragmento hibridado se desnaturaliza y la plantilla original se lava de las hebras clon (Illumina, 2014).

Figura 9

Secuenciación Illumina paso a paso



Nota. a) vista frontal celda de flujo, b) imagen de uno de los canales, c) canal recubierto por dos tipos de oligos, d) modelo de secuencia de librería, e) complementariedad secuencia-oligo, f) amplificación de la secuencia con polimerasas, g) formación del puente e hibridación con segundo oligo, h)

amplificación - formación de doble hélice con polimerasas i) deshibridación – cadenas forward y reverse, j) millones de clústeres de secuenciación. Tomado de (Illumina, 2014).

Posteriormente, ocurre la amplificación por puente, para lo cual la hebra clon se pliega y la región adaptadora se hibrida con el segundo tipo de oligo (**Figura 9 g.**), las polimerasas celulares generan la hebra complementaria que forma una doble hélice (**Figura 9 h.**), el puente se desnaturaliza generando dos copias monocatenarias que están atadas a la celda de flujo (**Figura 9 i.**), se corta la cadena original del oligo de la celda y el proceso se repite para la copia clon, este proceso ocurre para cada una de las cadenas una y otra vez simultáneamente para millones de clústeres (**Figura 9 j.**) que resultan en la amplificación clonal de todos los fragmentos después de la amplificación del puente. Las hebras inversas se cortan y se lavan dejando solo las hebras delanteras (Illumina, 2014).

La secuenciación inicia con la extensión del primer cebador para producir la primera lectura, con cada ciclo los nucleótidos marcados con fluorescencia compiten para adicionarse en la secuencia de la plantilla, posteriormente a su adición los nucleótidos son excitados por una fuente de luz y estos emiten una señal fluorescente característica, esta forma de secuenciación de denomina secuenciación por síntesis (**Figura 9 a.**). El número de ciclos determina la longitud de la lectura. La longitud de onda de emisión junto con la intensidad de la señal determina la base.

Todas las hebras idénticas se leen simultáneamente cientos de millones de veces, los grupos se secuencian en un proceso masivamente paralelo (**Figura 10 b.**). Todo el proceso genera millones de lecturas que representan todos los fragmentos. Las secuencias de las bibliotecas de muestras agrupadas se separan en función de los índices únicos introducidos durante la preparación de la

Las lecturas se emparejan creando secuencias contiguas, estas secuencias contiguas son alineados con el genoma de referencia para la identificación de variantes, la información se utiliza para resolver alineaciones ambiguas (**Figura 10 e.**) (Illumina, 2014).

Marcadores moleculares en la Ecología microbiana molecular.

16S rRNA. Polirribonucleótido, codificado por el gen rrs (16 rDNA) cuya extensión es de aproximadamente 1500 nucleótidos, presenta una estructura de plegamiento secundaria (Neefs et al., 1990), con segmentos de doble y simple cadena de manera alternada, por lo que consta de tallos y bucles, las secuencias presentes en algunos de los bucles son a menudo conservadas en casi todas las especies de bacterias, debido a que están involucradas en funciones esenciales, mientras que las regiones variables a menudo involucran características estructurales que pueden ser específicas de cada especie (Van de Peer et al., 2013).

Se encuentra en al menos una copia en el genoma bacteriano, y también está presente en todos los genomas mitocondriales que tras una larga vida en simbiosis han perdido la gran mayoría de su genoma ancestral (Gray et al., 1999). En células eucariotas la macromolécula equivalente es el 18S rDNA (G. C. Baker et al., 2003).

16S rRNA posee secuencias características conocidas como oligonucleótidos firma los cuales son secuencias cortas específicas presentes en todos los miembros de un grupo filogenético determinado, muy escasamente se presentan en otros grupos, los cuales pueden ser próximos, por esta razón estas secuencias pueden emplearse para clasificar a las bacterias en grupos o taxones, además, al poseer una secuencia relativamente larga durante su estudio se minimizan las

fluctuaciones estadísticas, así como su estructura secundaria conservada favorece la alineación precisa de las secuencias (C. R. Woese et al., 1985).

16S rRNA se encuentra en todos los procariotas, constituye entonces una diana universal de este dominio, su estructura y función han cambiado mínimamente a lo largo del tiempo, por lo cual las alteraciones en la secuencia podrían indicar cambios aleatorios, que permiten relacionar organismos alejados y también a próximos, por lo que se pueden establecer relaciones evolutivas en base a la similitud de secuencias y analizar genealogía molecular, sin embargo, es necesario considerar que solamente la comparación de la secuencia del genoma completo puede establecer relaciones evolutivas exactas, sin embargo, constituye una herramienta poderosa para la evaluación de la diversidad bacteriana en muestras ambientales (Gillian C. Baker et al., 2001).

A partir del gen 16S rDNA es posible inferir información taxonómica y filogenética, debido a que existen regiones altamente conservadas con fragmentos comunes entre organismos y regiones hipervariables, las regiones conservadas que favorecen el diseño de cebadores universales para amplificar las regiones hipervariables o menos conservadas de los microorganismos (G. C. Baker et al., 2003) que llevan información de la asignación taxonómica (Y. Wang & Qian, 2009).

Gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*). *rpoB* es un gen con presencia universal en procariotas, posee regiones de lenta evolución, mientras otras son de rápida evolución, lo cual también facilita el diseño de cebadores, parece estar presente solamente en una copia en las bacterias, un estudio investigó la versatilidad de sus cebadores, así como comprobó la no heterogeneidad de este gen a través de PCR-DGGE, mientras que al analizar el gen 16S rDNA en las

mismas bacterias encontraron una sobreestimación del número de cepas, y algunas cepas no estuvieron representadas (Dahllöf et al., 2000).

Así también el gen marcado *rpoB* resolvió algunas relaciones filogenéticas de escala fina entre algunas cepas estudiadas, brindando mayor resolución frente al gen 16S rDNA, *rpoB* posee una cadena lo suficientemente grande como para inferir filogenia, incluso tras la eliminación de fragmentos de alineación difícil (Case et al., 2007).

Un importante obstáculo al momento de trabajar con el gen *rpoB* es que al ser un gen que codifica proteínas, tiene todas las terceras posiciones de codón saturadas en una escala larga evolutiva, esto constituye un problema al diseñar cebadores, sin embargo, algunos de estos se han desarrollado con éxito

Además, otra de las limitaciones al trabajar con el gen 16S rDNA es que no se puede trabajar a nivel de aminoácidos, como sí es posible con el gen *rpoB*, esto influye especialmente en que al relacionar proteínas es posible alcanzar la resolución de relaciones a niveles taxonómicos más altos, como filos o dominios, mientras que al trabajar con alineaciones a nivel de nucleótidos se permiten mutaciones casi neutrales que pueden detectarse en microorganismos relacionados estrechamente (mutaciones de codón primero o tercero), como organismos emparentados a nivel de especie. Una clara ventaja es que el mRNA para el gen *rpoB* no es igual de abundante que el rRNA en procariotas, sin embargo, sí puede estar en concentraciones significativas.

El empleo de marcadores genéticos alternativos al gen 16S rRNA es limitada en gran parte por encontrarse bases de datos relativamente pobres, por lo que se espera se incrementen las representaciones de bases de datos (Neufeld & Mohn, 2006).

Región del espaciador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS). Las regiones ITS son fragmentos de ADN espaciadores nucleares no funcionales ubicados entre genes de ARN ribosomal de subunidad pequeña y grande, están presentes en organismos como bacterias y arqueas (entre los genes 16S y 23S), eucariotas excepto plantas (ITS1: entre los genes 18S y 5.8S e ITS2: entre los genes 5.8S y 28S), en plantas (entre los genes 5.8S y 25S) (Edger et al., 2014).

Los denominados ITS1 e ITS2 son los marcadores nucleares más empleados en el análisis filogenético de muchos eucariotas, como plantas, hongos, entre otros, debido a:

- Presencia ubicua en todos los taxones
- Se consideran de evolución neutra ya que no son funcionales, sin embargo, esto está en discusión.
- Alto número de copias en los genes
- Cebadores altamente conservados
- Marcadores de evolución, ya que varían entre especies altamente relacionadas (Bellemain et al., 2010).

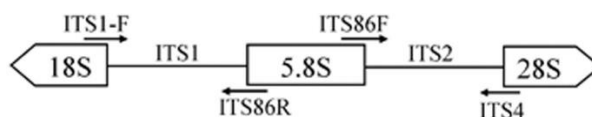
De acuerdo a Edger et al. (2014), tanto las regiones ITS1 como ITS2 coevolucionan con al menos otra posición con la finalidad de preservar la estructuras secundarias autoempalmadas funcionales de la molécula en las Brassicaceae, lo que puede alterar las hipótesis filogenéticas.

Uno de los problemas de trabajar con la región ITS es que su longitud varía significativamente entre grupos taxonómicos (Seifert, 2009), los cebadores ITS deben seleccionarse con cuidado, especialmente cuando se utilizan para la secuenciación de muestras ambientales de alto rendimiento, siendo recomendable el análisis en paralelo diferentes combinaciones de cebadores o diferentes partes de la región ITS (Bellemain et al., 2010).

En los hongos, los genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S poseen regiones del espaciador transcrito interno hipervariable (ITS) 1 e ITS2 atravesados entre ellos, para establecer relaciones filogenéticas se emplean cebadores que atraviesen los genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S, limitando las regiones ITS1 e ITS2 (**Figura 11**).

Figura 11

Diagrama regiones del espaciador transcrito interno hipervariable



Tomado de Vancov & Keen (2009).

Análisis bioinformático

Preprocesamiento de datos. Los secuenciadores entregan secuencias crudas, que pueden contener regiones que dificultan o interfieren el ensamblaje por lo que se requiere eliminar o bloquear regiones antes de comenzar, como bases de mala calidad de lectura, vectores o adaptadores de la secuenciación, bases altamente repetidas, contaminaciones (Gómez & Guerrero,

2020), artefactos, como cebadores de PCR, quimeras, entre otros, también es importante separar por barcodes “demultiplexar” (Mastretta, 2018).

Actualmente existen numerosas herramientas bioinformáticas que permiten cuantificar las métricas de control de calidad ya que los datos pueden ser propensos a errores, defectos en el lote o muestras atípicas que puedan pasarse por alto, entre otras razones (Ewels et al., 2016), para el presente estudio se ha trabajado el control de calidad con los softwares de acceso libre FastQC, MultiQC, y DADA2 integrando los valores de estos softwares para un mejor tratamiento de datos a la hora de limpiar secuencias.

La tecnología de secuenciación de alto rendimiento produce decenas de miles de lecturas, en una de estas lecturas a la llamada de una base en una posición i tiene una probabilidad de error p_i que se representa con números enteros que determinan una puntuación de calidad Phred. Cuando dicha puntuación es alta se puede detectar y corregir errores alineando las lecturas o con una secuencia conocida relacionada, sin embargo, cuando la puntuación es baja y no se dispone de secuencias de referencia se dificulta distinguir errores o variaciones biológicas, por lo cual el filtrado y recorte de secuencias es un paso crítico para el análisis de diversidad (Edgar & Flyvbjerg, 2015).

(E) El número esperado de errores, describe el número medio de errores que se presentarían en grupo muy grande de secuencias en donde la puntuación de calidad es la tasa de error, se asume que cada error en distintas posiciones ocurre de manera independiente, entonces, E es un valor entero y puede ser inferior a 1. Por lo tanto, para filtrar por calidad es posible asignar un parámetro al valor máximo de errores admitidos E_{max} , de modo que se descarten las lecturas de baja calidad.

Edgar & Flyvbjerg (2015) demostraron que imponer un E_{max} es un filtro de calidad eficaz, y sugieren que se maneje un $E_{max} = 1$, ya que el número más probable de errores es cero cuando $E < 1$ y permitirán una mayor precisión de las inferencias biológicas, sin embargo, es posible implementar umbrales más o menos estrictos dependiendo de los datos. El parámetro seleccionado fue $E_{max} = 2$, el cual es recomendado para DADA2, también se realizó el recorte de secuencias con $truncQ = 2$ (caracteres ASCII), es decir que se truncaron las secuencias en el primer nucleótido con una asignación de base N, en caso de que se presente alguna y si esta secuencia tenía una longitud menor a 50, se descartó la secuencia con $minLen = 50$.

QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology). Herramienta de Código abierto que permite analizar datos de secuenciación sin procesar generados en plataformas como Illumina y otros. El software, por tanto, permite las siguientes acciones:

- Demultiplexación
- Filtrado de calidad
- Selección de OTU
- Asignación Taxonómica
- Reconstrucción filogenética
- Análisis y visualizaciones de diversidad (Caporaso et al., 2010).

FastQC. Los secuenciadores de alto rendimiento pueden generar millones de secuencias en una sola ejecución. FastQC es un software empleado en control de calidad de secuencias crudas o sin procesar, que se han generado por secuenciación de alto rendimiento en plataformas como Illumina, con formatos FastQ, BAM o SAM, entre otros (Babraham Institute, 2020). Su salida es un

informe detallado sobre la composición y calidad de las lecturas que permite al investigador una visión rápida de posibles problemas en sus datos, los cuales deben ser considerados antes de analizarlos.

FastQC proporciona información sobre: Estadísticas básicas, Calidad de secuencia por base, Calidad de secuencia por mosaico, Puntuaciones de calidad por secuencia, Contenido de secuencia por base, Contenido de GC por secuencia, Porcentaje de contenido de N base, Distribución de la longitud de la secuencia, Niveles de duplicación de secuencias, Secuencias sobrerrepresentadas, Contenido del adaptador (Babraham Institute, 2020).

MultiQC. Herramienta que analiza las estadísticas de archivos generados por otras herramientas bioinformáticas y genera un informe reducido en formato HTML, por lo que permite analizar múltiples muestras, así se logran e identificar rápidamente tendencias o sesgos globales (Ewels et al., 2016).

Procesamiento de datos.

Análisis OTU VS ASV. El análisis de datos de secuenciación de alto rendimiento de genes marcadores durante un largo tiempo se ha abarcado mediante la construcción de unidades taxonómicas operativas moleculares (OTU), dichas unidades integran grupos de lecturas que difieren común y arbitrariamente en un umbral de 3% (B. J. Callahan et al., 2017) para lo cual se realizan agrupamientos de lecturas suficientemente similares entre sí con algoritmos como UCLUST, USEARCH, SortMeRNA, entre otros múltiples (Kopylova et al., 2016). Las OTU moleculares también reducen el impacto del error de secuenciación de amplicones en la diversidad y composición de las comunidades, ya que agrupa secuencias con y sin errores (A. M. Eren et al., 2016).

Las agrupaciones de OTU no permiten realizar comparaciones de escala fina (A. M. Eren et al., 2013), ya que en muchos organismos muy estrechamente relacionados que ocupan nichos ecológicos separados los niveles de similitud superan el umbral del 97% o más (A. Eren et al., 2014; A. M. Eren et al., 2015; M. J. Rosen et al., 2012; Tikhonov et al., 2015). Por lo tanto, se estaría produciendo una importante pérdida de información al emplear OTU, ya que los análisis de variación a escala fina pueden informar sobre nichos ecológicos, dinámica temporal (Tikhonov et al., 2015), estructura de la población (M. Rosen et al., 2015) e incluso puede marcar diferencias entre cepas patógenas y comensales (McElroy et al., 2013; C. Wang et al., 2007).

En la actualidad están surgiendo cada vez nuevas investigaciones donde se está empleando un método de mayor resolución, los ASV o variantes de secuencia de amplicón (Lee, 2019), que pueden reemplazar a las OTU como la unidad estándar de análisis e informes de genes marcadores (B. J. Callahan et al., 2017). Para la inferencia de ASV se emplea un proceso de novo, mediante el

cual las secuencias biológicas se discriminan de los errores, es decir, se considera que es más probable que las secuencias biológicas se observen repetidas, que las secuencias con errores, por lo tanto, para inferir ASVs es necesario múltiples lecturas por muestra para crear etiquetas que representan una realidad biológica que existe fuera de los datos que se están analizando, por esta razón es posible realizar comparaciones de los ASV inferidos aunque se traten de estudios o muestras diferentes (B. J. Callahan et al., 2017). Este manejo de datos permite un esfuerzo computacional menor comparado al de OTU, debido a que este implica agrupaciones de secuencias que requieren ser comparadas, ya sea entre sí o con secuencias de referencia, lo que incrementa cuadráticamente el esfuerzo de procesamiento a medida que incrementa el volumen de datos (Rideout et al., 2014).

La inferencia de variantes de secuencia exacta también tiene sus limitaciones, por ejemplo, un mismo genoma puede contener múltiples ASV si existen múltiples copias del locus genético objetivo, este tipo de problemas es recurrente en genes ribosomales 16S, por lo tanto, aunque sea capaz de detectar variaciones de escala fina no garantiza resolver las propias limitaciones del gen marcador seleccionado (Berry et al., 2017). Por lo tanto, la fusión de ASV provenientes de diferentes estudios deben realizarse únicamente si provienen el mismo locus genético (B. J. Callahan et al., 2017). Pese a esto los métodos de inferencia de ASV disponibles actualmente proporcionan una mejor resolución y precisión que los métodos OTU (B. J. Callahan et al., 2016), aprovechando las puntuaciones de calidad entregadas por las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, por lo tanto, debido a las múltiples ventajas de estas nuevas unidades estándar y en conocimiento de sus limitaciones se han seleccionado como método de análisis para el presente estudio mediante la tubería de datos DADA2.

Los errores en datos de secuenciación de amplicones en la plataforma Illumina se abordan a través del filtrado de calidad y la construcción de OTU, sin embargo, al agrupar secuencias con un porcentaje de similitud los errores se malinterpretan como variabilidad biológica, actualmente a través de DADA2 es posible modelar y corregir errores de amplicón para secuenciación Illumina, ya que incorpora las puntuaciones de calidad en su modelo de error (B. J. Callahan et al., 2016), por lo que emplea secuencias de diferentes calidades para robustecer su algoritmo (Severin et al., 2021).

DADA es un algoritmo de particionamiento divisivo, que realiza una inferencia y modelamiento de errores a partir de los datos de secuenciación, considera que los errores ocurren de manera independiente en sitios dentro de la lectura y entre diferentes lecturas e incorpora las puntuaciones de calidad (B. J. Callahan et al., 2016).

Normalización de datos. En Ecología microbiana, para evaluar diferencias entre entornos es a menudo empleada la diversidad alfa a través de datos de secuenciación de amplicones, sin embargo, esta comparación puede ser afectada por el tamaño de las bibliotecas entre un ambiente u otro, ya que a menudo es detectable mayor diversidad mientras incrementa el tamaño de biblioteca de la muestra (Lande et al., 2000). El tamaño de biblioteca suele variar sustancialmente entre tecnologías y modelo de secuenciación, de una muestra a otra e inclusive puede variar en un mismo ciclo de secuenciación, por ello es importante métodos de normalización a los datos (Aitchison & Egozcue, 2005).

El cálculo de abundancias relativas es la normalización más simple y frecuente, la cual consiste en dividir las abundancias brutas por el número total de conteos por muestra (Calle, 2019), sin embargo, de acuerdo con P. J. McMurdie & Holmes (2014), la normalización basada en

proporciones, puede inducir a falsos positivos ya que este no considera la heterocedasticidad entre muestras

La rarefacción es otro método de normalización que permite ajustar las comparaciones entre muestras, realizando un submuestreo para igualar el tamaño de las bibliotecas, sin embargo, esto conduce a una pérdida importante de información, lo que incrementa el número de falsos positivos, de acuerdo con McMurdie & Holmes, (2014) esto también ocurre con la normalización basada en proporciones, ya que este no considera la heterocedasticidad entre muestras, por lo cual el autor recomienda emplear paquete como DESeq2 o edgeR en R, los cuales permiten la normalización de muestras basados en la estabilización de varianza y la robustez, especialmente para análisis de abundancia diferencial.

La normalización de datos a través de la estabilización de varianza con DESeq, se basa en un modelo de datos mixtos de recuento de microbiomas permite abordar problemas como diferencia en los tamaños de bibliotecas y proporciones de recuento de secuencias muy variables, lo que mejora la comparación entre unidades estándar de taxonomía, mientras potencia la precisión y detección de abundancia diferencial (P. J. McMurdie & Holmes, 2014)

DESeq permitirá entonces emplear pruebas estadísticas para decidir si para una determinada secuencia existe diferencia significativa en los recuentos de lectura, por lo que, si se muestrearan de manera independiente las lecturas a partir de una población (tratamiento en nuestro caso), estas deberían seguir una distribución multinomial que puede ser aproximada a una distribución binomial negativa (Anders & Huber, 2010), la cual se emplea a menudo con datos sobredispersos (Delgado Alcaide, 2015). DESeq realiza un modelamiento con varios supuestos para

lograr estimaciones útiles de media y varianza para un número de réplicas pequeño y a la vez considera la mediana de las relaciones entre recuentos (Anders & Huber, 2010).

Análisis de diversidad. En el microbioma, determinar la diversidad es un indicador de las condiciones del ecosistema, ya que a menudo se asocia la diversidad a un mejor estado de salud, estos índices ecológicos son la diversidad alfa y beta (Calle, 2019).

La diversidad alfa proporciona información sobre la variabilidad de especies en una muestra, por lo que a través de la riqueza observada en una muestra se estima la riqueza de especies diferentes en un ambiente, sin embargo, la riqueza observada tiende a subestimar la riqueza real, ya que pueden no detectarse las especies menos frecuentes, también proporciona información sobre la uniformidad en abundancia de las especies en una muestra (Calle, 2019).

Por otro lado, la diversidad beta o diversidad entre poblaciones proporciona información sobre las diferencias en la composición entre poblaciones, para ello se emplean distancias ecológicas o diferencias que permiten determinar qué tan cerca están dos composiciones microbianas, tales como Bray-Curtis, UniFrac, UniFrac ponderado y Aitchison (Calle, 2019).

Estimar o comparar de manera significativa la diversidad alfa constituye un reto, debido a que a menudo las réplicas de un experimento de secuenciación para analizar microbiomas genera distintos tamaños de bibliotecas, distintas composiciones y diferentes niveles de diversidad alfa, por lo que existe un error de medición entre dichos experimentos (Willis, 2019), sin embargo, las métricas de análisis de datos comúnmente empleados no toman en consideración estos errores, por

ello no es recomendable realizar un ANOVA, ya que considera que el sesgo y varianza de las estimaciones de diversidad alfa son cero.

De acuerdo con Lande (1996), las estimaciones de índices de diversidad alfa subestiman la verdadera diversidad alfa, por lo que para obtener conclusiones significativas sobre la comunidad microbiana se requiere emplear modelos de error de medición que ajusten la incertidumbre en la estimación de la diversidad alfa (Willis, 2019).

De acuerdo con Willis & Martin (2018), comparar la diversidad entre comunidades es un reto, especialmente cuando existe variabilidad de número de grupos taxonómicos entre muestras, y propone DivNet, como un método de estimación de diversidad dentro (diversidad alfa) y entre comunidades (diversidad beta) donde los taxones interactúan fuerte o débilmente en una red ecológica, estas interacciones muestran patrones repetibles en diferentes entornos (Faust & Raes, 2012). Para lo cual DivNet incorpora un método de submuestreo para estimar la diversidades en una misma muestra, lo que también permite predecir ecosistemas que no han sido muestreados e incorpora el análisis redes ecológicas que analiza la coocurrencia de taxones para determinar la varianza de las estimaciones de diversidad a través de un modelo de razón logarítmica (Modelo de máxima verosimilitud) (Willis & Martin, 2018), con las cuales es posible realizar pruebas de hipótesis (Faust & Raes, 2012).

Una de las limitaciones de DivNet es que si bien puede estimar la abundancia relativa de un taxón en una muestra donde no se observó, no puede estimar el número de taxones que faltan en todas las muestras (Willis & Martin, 2018).

Se entiende que dos entornos o comunidades se parecen cuando su composición y estructura se parece, para comparar comunidades se suele graficar estas en un plano, a través de datos de distancias que reflejan cuán similares o distintas son entre sí, como es el caso de la distancia Bray-Curtis, la cual expresa la diferencia total en la abundancia de especies entre dos comunidades, dividido para la abundancia total de cada comunidad (Espinoza, 2019).

Las distancias Unifrac miden la distancia filogenética entre conjuntos de taxones en un árbol filogenético, por lo que se emplea para determinar si las comunidades son diferentes significativamente, por lo que presumiblemente refleja la adaptación a un entorno. Cuando dos entornos son similares se necesita pocas adaptaciones para transferir de un entorno a otro y la mayoría de los nodos tendría descendientes en ambos entornos, también se compartirían gran parte de la longitud de las ramas del árbol. Contrariamente si dos entornos son bastante distintos los organismos adaptados a uno no podrían sobrevivir en el otro, debido a que los linajes entre entornos serían distintos (Lozupone & Knight, 2005).

Unifrac permite determinan diferencias significativas ente comunidades empleando simulaciones de Monte Carlo y permite aplicar estadísticas multivariadas estándar como PcoA (Análisis de coordenadas principales) (Lozupone & Knight, 2005).

Hipótesis

Hipótesis nula

No se evidencia diferencia significativa entre los perfiles taxonómicos determinados a partir de la microbiota fúngica presente en las muestras de rizósfera de suelos de cultivo de *Rubus glaucus* Benth tratados y no tratado con *Trichoderma* spp.

Hipótesis alternativa

Se evidencia diferencia significativa entre los perfiles taxonómicos determinados a partir de la microbiota fúngica presente en las muestras de rizósfera de suelos de cultivo de *Rubus glaucus* Benth tratados y no tratados con *Trichoderma* spp.

Variables de la investigación***Variable Dependiente***

Abundancia de microorganismos, índices de diversidad taxonómica.

Variable Independiente

Tratamientos con *Trichoderma* spp., presencia o ausencia de síntomas de marchitamiento.

Capítulo II. Materiales y métodos

Instituciones participantes

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT.

Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Colaboradores científicos

Director del proyecto de titulación

Ing. Andrés Ricardo Izquierdo Romero, M.Sc., Ph.D. (Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE)

Codirector del proyecto de titulación

Ing. Francisco Flores Flor, M.Sc., Ph.D. (Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE)

Área de estudio

El desarrollo experimental del presente estudio involucró tres zonas, en donde se realizó el muestreo y procesamiento de las muestras, como describen a continuación.

Área de muestreo

El proyecto de investigación estudió suelo de rizósfera de plantaciones de mora de Castilla de la Estación Experimental Granja “Píllaro”, con una altitud de 2760 m.s.n.m. La Granja está localizada en el cantón Píllaro, Provincia de Tungurahua. Coordenadas: Latitud -1.17578, Longitud -78.55657.

Figura 12

Ubicación geográfica - Estación Experimental Granja "Píllaro" en Tungurahua.

**Figura 13**

Estación Experimental Granja "Píllaro" en Tungurahua.



Nota. Área de muestreo en zona de cultivo de mora de Castilla en la Estación Experimental Granja "Píllaro" en Tungurahua.

Área de procesamiento de muestras

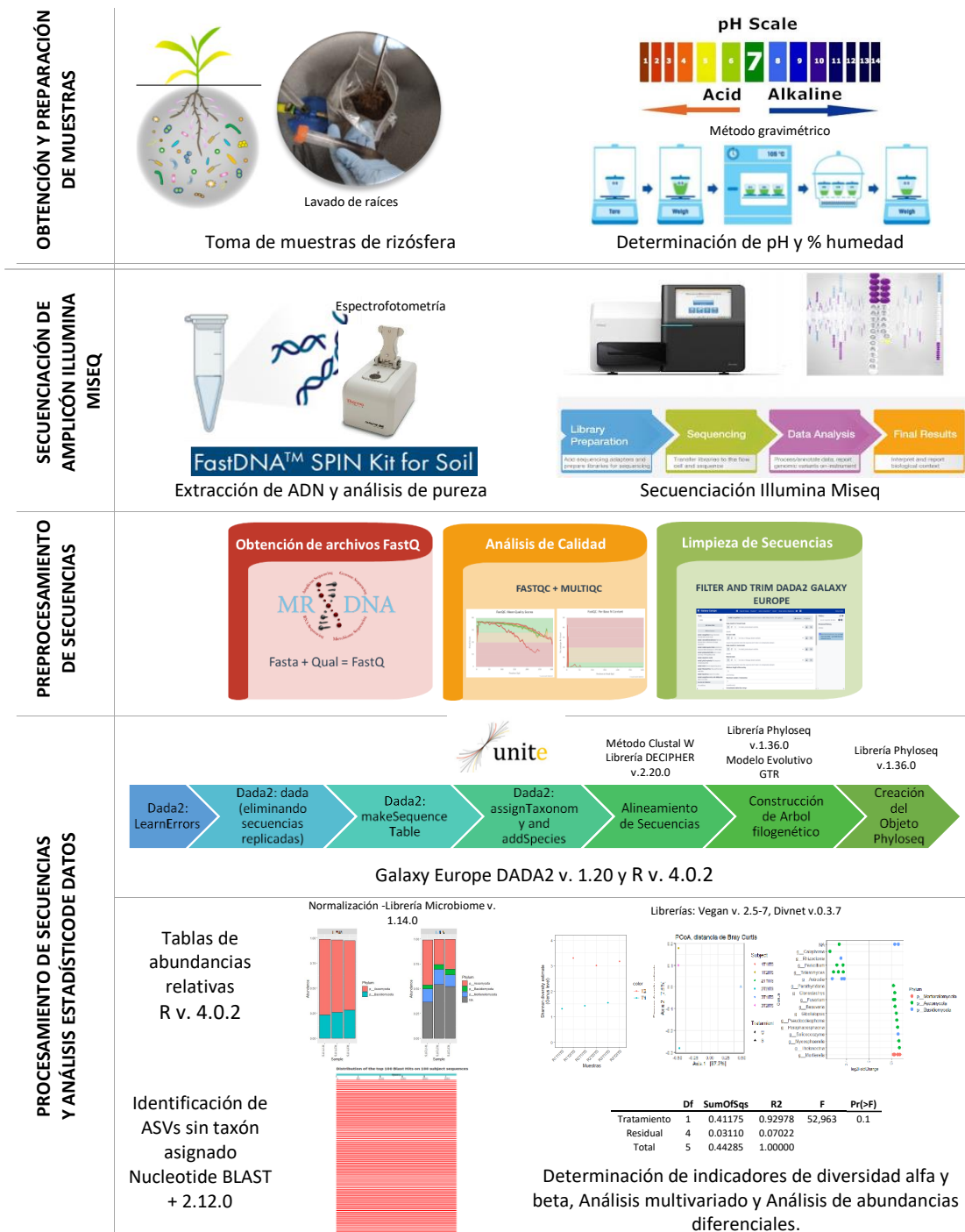
Las muestras de suelo de rizósfera obtenidas fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen, ubicada en la Avenida de los Granados en el Cantón Quito – Ecuador, en donde se extrajeron muestras de ADN total.

El proceso de secuenciación de las muestras de ADN total se realizó en los laboratorios MR DNA y Biomol Ecuador CIA. LTDA.

Metodología

Figura 14

Cuadro resumen de metodología aplicada



Realizado por Sharon Ortiz y adaptado de Abarenkov et al. (2020); Mettler Toledo (2020, 2021a); PacBio (2021); ThermoFisher (2021).

Diseño experimental

Se aplicó un diseño cuasi experimental transversal, debido a la ausencia de aleatorización en la toma de muestras de los tratamientos propuestos y a que no se evaluaron las variables en el tiempo.

El muestreo se realizó por triplicado con la finalidad de determinar la varianza en los datos, para ello se tomaron muestras de rizósfera para dos tratamientos como se detalla en la **Tabla 2**.

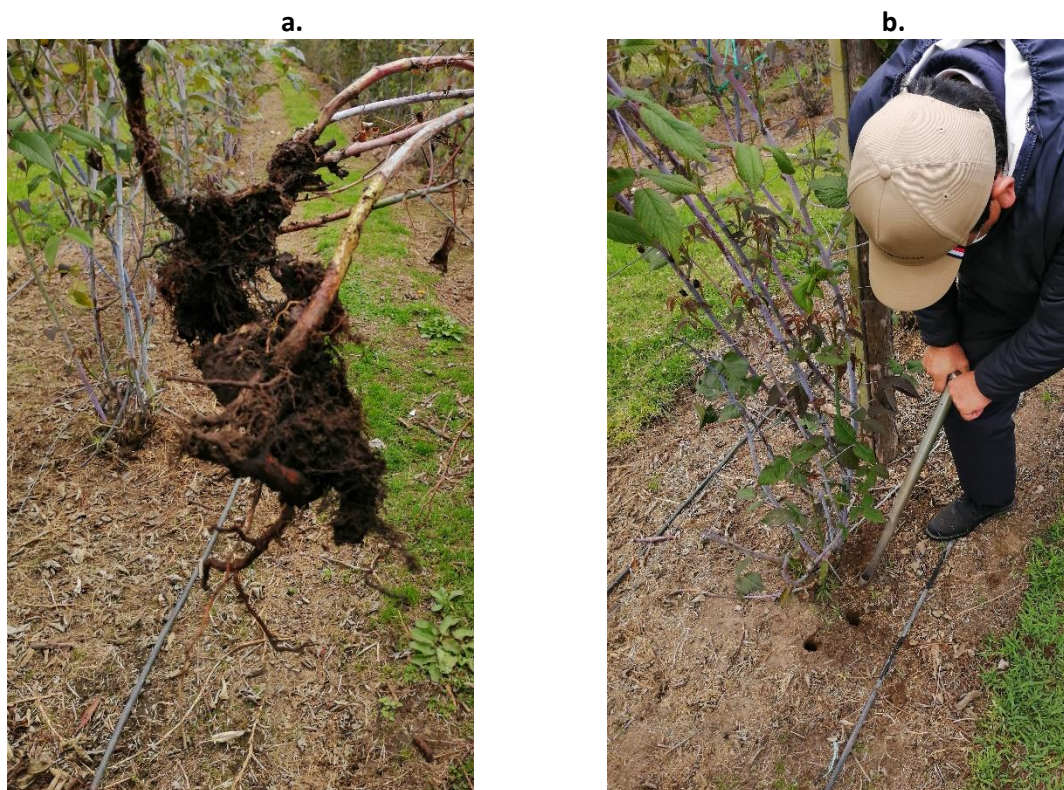
Tabla 2

Tratamientos considerados para el muestreo

Tratamientos	Síntomas de marchitamiento	Tratamiento con <i>Trichoderma</i>
T1	Sí	No
T2	No	Sí

Recolección de la muestra

La recolección de muestras se realizó en la Estación Experimental Granja “Píllaro” en Tungurahua, provincia de la sierra ecuatoriana, con la colaboración del Ingeniero Aníbal Martínez, responsable FRUTALES ZONA CENTRAL en INIAP ECUADOR. Se realizó el muestreo de suelo de rizósfera en los campos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) (**Figura 13**), en donde se estudian metodologías de cultivo limpio de mora de Castilla y otros frutales, empleando *Trichoderma* spp., por lo tanto, la granja cuenta con zonas tratadas con *Trichoderma* spp. y zonas control sin este hongo. Las muestras se recolectaron en el mes de julio del 2020, temporada seca en Píllaro a una temperatura ambiental de 18°C. Para el muestreo de la rizósfera se siguió el protocolo descrito por Lakshmanan (2017).

Figura 15*Muestreo de rizósfera de mora de Castilla*

Nota. a. Muestreo T1: con síntomas de marchitamiento y no tratadas con *Trichoderma* spp.; b. Muestreo T2: sin síntomas de marchitamiento y tratadas con *Trichoderma* spp.

Con ayuda de un barreno se realizaron de 3 a 4 perforaciones de 15 a 20 cm del suelo que rodea cada planta a muestrear (**Figura 15 b.**), procurando rescatar sistema radicular de las mismas, los trozos de suelo se ubicaron en fundas ziploc (doble funda ziploc por muestra) identificadas, esto se realizó en el muestreo de plantas sin síntomas de marchitamiento, mientras aquellas plantas con síntomas de marchitamiento se extrajeron completamente y se recuperaron las raíces completas, las cuales fueron almacenadas en fundas ziploc identificadas debidamente (**Figura 15 a.**). Las fundas ziploc cerradas se almacenaron en un cooler con hielo para preservar las muestras durante su

transporte a Quito, en donde fueron refrigeradas durante 40h a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Etiquetados de muestras

Las muestras recolectadas fueron etiquetadas con las codificaciones que se exhiben en la

Tabla 3.

Tabla 3

Etiquetado de muestras de rizósfera

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
R1T1	Réplica 1, Tratamiento 1: sí síntomas marchitamiento, no <i>Trichoderma</i> spp.
R2T1	Réplica 2, Tratamiento 1: sí síntomas marchitamiento, no <i>Trichoderma</i> spp.
R3T1	Réplica 3, Tratamiento 1: sí síntomas marchitamiento, no <i>Trichoderma</i> spp.
R1T2	Réplica 1, Tratamiento 2: no síntomas marchitamiento, sí <i>Trichoderma</i> spp.
R2T2	Réplica 2, Tratamiento 2: no síntomas marchitamiento, sí <i>Trichoderma</i> spp.
R3T2	Réplica 3, Tratamiento 2: no síntomas marchitamiento, sí <i>Trichoderma</i> spp.

Porcentaje de humedad y pH del suelo

Para calcular el porcentaje humedad del suelo se empleó el método gravimétrico, se tomaron alícuotas de las muestras del suelo, se registró la masa de suelo inicial para cada muestra, posteriormente se colocó en una estufa a 105°C durante 24 horas, y se procedió a registrar la masa del suelo seco o masa final. Para determinar el porcentaje de humedad del suelo se empleó la fórmula (1) (Lunt et al., 2005).

$$\frac{\text{masa suelo inicial} - \text{masa suelo final}}{\text{masa suelo inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Para calcular el pH del suelo, se procedió a secar durante 3 días alícuotas de muestras de suelo, sin exponerlas a la luz, se pasó las muestras por un tamiz de 2mm. Se pesaron 5 gramos de suelo seco y se mezclaron con 5 mL de agua destilada (proporción 1:1) en un vaso de precipitación y se procedió a agitar con una varilla de vidrio, durante 30 minutos de una forma intermitente (Missouri Agricultural Experiment Station SB 1001, 2011; Thunjai et al., 2001). Las medidas de pH se tomaron introduciendo Tiras reactivas de pH fijo 0-14 Macherey-Nagel en la solución, posteriormente se registraron los datos.

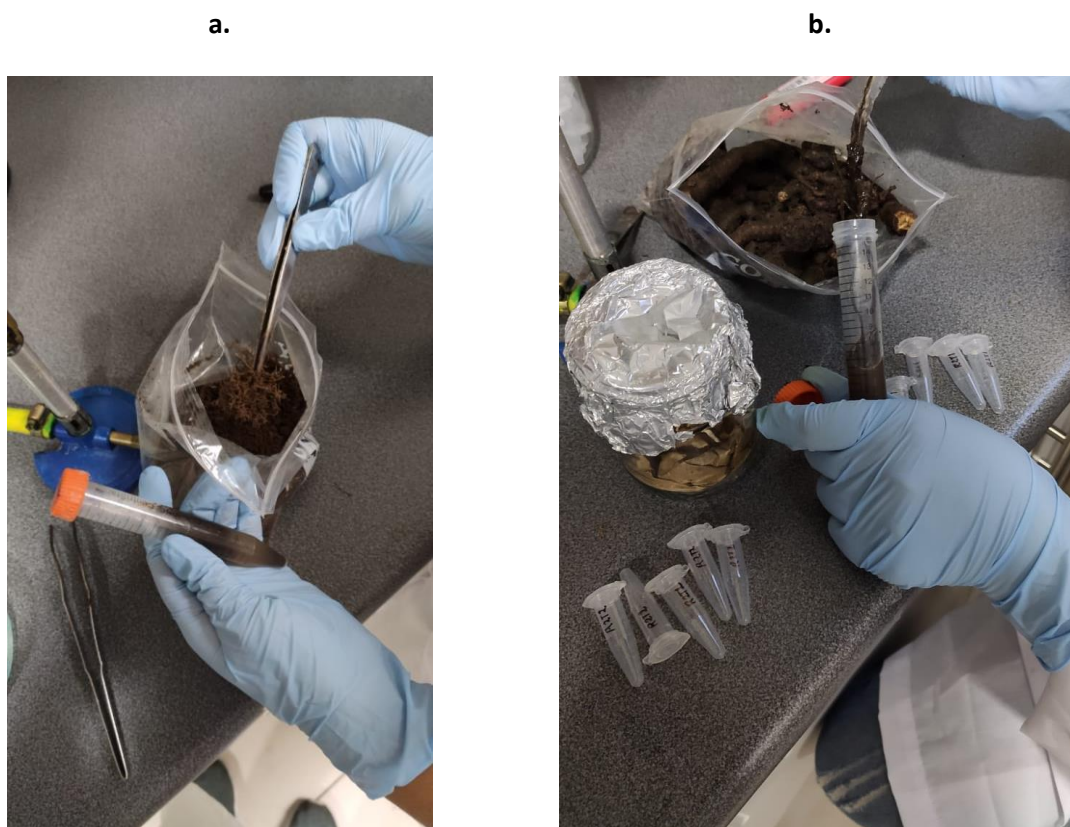
Extracción de ADN de la rizósfera

La extracción de ADN de las muestras de rizósfera el presente estudio se basó en dos protocolos, con modificaciones de acuerdo con el caso. El sistema radicular fue rescatado de las muestras de suelo extraídas, las raíces impregnadas de tierra se ingresaron en dos tubos Falcon de 15 mL por muestra, los cuales contaban con 7 mL de solución tamponada con fosfato (pH=7.6, 1000 mL H₂O, 6,8 g de NaCl, 0,24 g de KH₂PO₄ y 0,896 g de Na₂HPO₄·7H₂O) (**Figura 16 a.**).

Se cerraron los tubos y se agitaron manualmente girando el tubo Falcon para permitir que la solución lave el suelo adherido a la raíz, posteriormente se agitó en vórtex durante 15 segundos, la solución obtenida, esta fue distribuida en tubos eppendorf de 1.5 mL (**Figura 16 b.**), para ser centrifugados 20 minutos a 180 rpm, se recuperó el sedimento (Guo et al., 2019; Jia et al., 2006), de donde se extrajo el ADN con FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MPBio, siguiendo las especificaciones propias del Kit.

Figura 16

Recolección y lavado de raíces en solución tamponada.



Concentración y pureza de ADN

La concentración y pureza del ADN total extraído de las muestras de rizósfera se determinó con un Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific™, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Secuenciación

Las muestras de ADN quedaron suspendidas en agua libre de DNAsas, propia del kit de extracción empleado (FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MPBio). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta ser enviadas a los laboratorios MR DNA y Biomol Ecuador CIA. LTDA, donde se procedió a la

secuenciación NGS (Secuenciación de nueva generación) con la plataforma Illumina MiSeq, los cebadores empleados están expuestos en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Información de cebadores para secuenciación Illumina, regiones 16S e ITS.

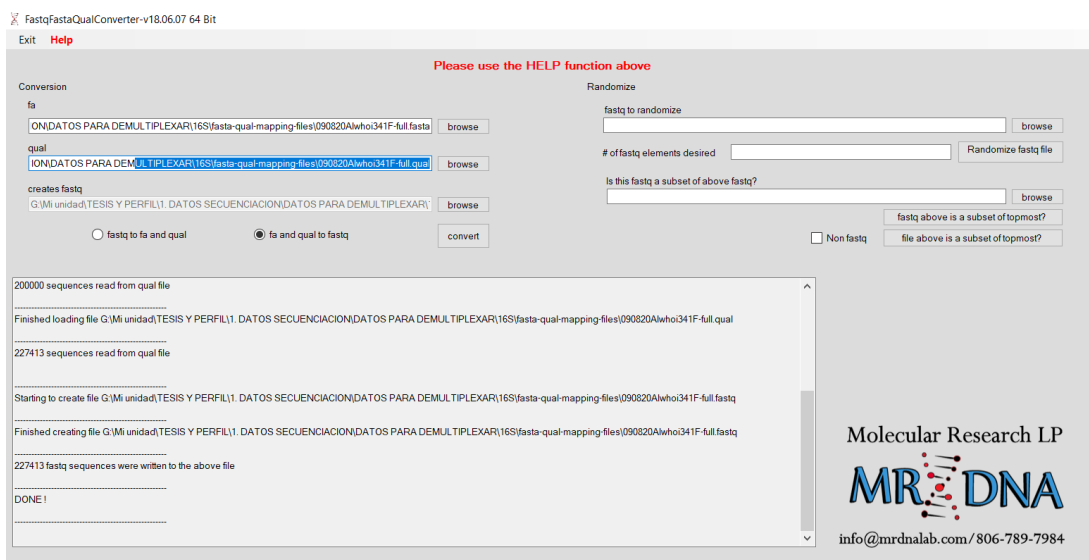
Gen	Región	Amplicón	Nombre	Secuencia	Organismo	Fuente
ITS	ITS 2	~369 pb	(F) ITS86F	ctgaatcatcgaatctttgaa	Fungi	(Vancov & Keen, 2009)
			(R) ITS4	tcctccgcttattgatatgc		

Análisis Bioinformático y Estadístico de datos

2.1.1.1. Preprocesamiento de datos

Figura 17

Software libre FASTA Qual & FASTQ Conversion v1 .6.07 64 bits disponible en la página de MR DNA.



Los resultados de secuenciación crudos se receptaron en formato fasta y qual, estos se transformaron en archivos fastq con la aplicación de software libre FASTA Qual & FASTQ Conversion v1.6.07 64 bits disponible en la página de MR DNA (**Figura 17**).

El análisis de calidad de secuencias se realizó en FastQC v0.11.9 para el sistema operativo Debian 10 basado en Linux, para obtener un informe general se empleó MultiQC versión 9 para el sistema operativo Debian 10. El recorte y limpieza de secuencias se realizó en el módulo Filter and Trimming de DADA2 con valores predeterminados (**Figura 18**).

Figura 18

Galaxy Europe versión 1.20.

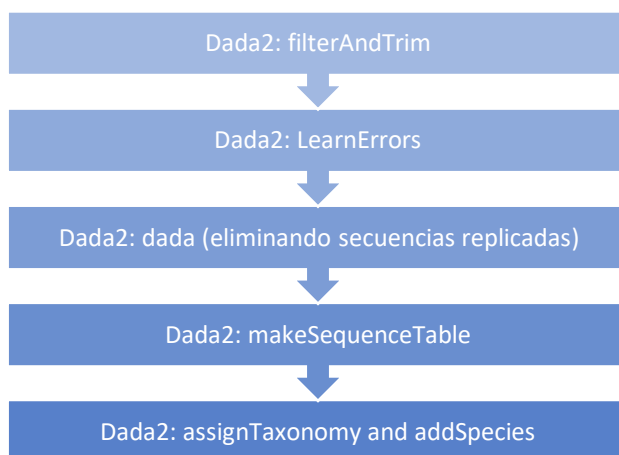
2.1.1.2. Procesamiento y análisis estadístico de datos

El procesamiento de las secuencias se realizó en Galaxy Versión 1.20 (Afgan et al., 2018) en los módulos DADA2 (**Figura 18**), de acuerdo con la secuencia expuesta en la (**Figura 19**), empleando valores predeterminados de DADA2.

La tabla de ASV de las secuencias Forward de cada muestra fue comparada con la bases de datos optimizada para DADA2 para establecer asignaciones taxonómicas con las secuencias ASV, esta fue la base de datos UNITE general FASTA release for Fungi 2, versión 8.2 (consta de un 97% de singletons) (Abarenkov et al., 2020). Para ello DADA2 emplea el método clasificador bayesiano ingenuo de Q. Wang et al. (2007), donde la secuencia de referencia con el perfil más similar se usa para asignar taxonomía a la secuencia de consulta, posteriormente se evalúa la asignación de confianza en cada nivel taxonómico.

Figura 19

Diagrama de flujo de trabajo para análisis de secuencias en DADA2.



El posterior procesamiento de datos se realizó en R versión 4.0.2 empleando diferentes librerías. Se alinearon las secuencias por el método ClustalW y se construyó del árbol filogenético considerando el modelo evolutivo GTR (General Time Reversible Model), empleando la librería Phangorn versión 1.36.0. Se creó un objeto Phyloseq con la librería Phyloseq versión 1.36.0 compuesto de la información:

- Tabla de secuencias ASVs
- Tabla de asignación taxonómica

- Metadatos de las muestras
- Árbol filogenético.

Una vez con el objeto Phyloseq, se procedió a realizar un control de calidad, generando un data frame con los valores de filios de prevalencia (**Tabla 8**), los datos fueron normalizados por proporcionalidad y llevados a abundancias relativas con la librería microbiome versión 1.14.0, se eliminaron los filios no asignados; con un parámetro (> 0.1) se eliminaron los filios y géneros poco representados y se procedió a graficar a nivel de Filo y Género con sus respectivas tablas de abundancia por muestra.

Los ASVs que no obtuvieron una asignación de Phylum y que tuvieron una alta abundancia proporcional fueron comparados con bases de datos de nucleótidos no redundante en Standard Nucleotide BLAST + 2.12.0, los resultados se muestran en **3.1.1.2 Identificación de variantes sin taxonomía asignada**.

Empleando la librería Vegan versión 2.5-7 y el objeto Phyloseq sin normalizar y sin filios no asignados se calcularon los índices de diversidad alfa, los cuales se graficaron y se compararon con las gráficas de índices de diversidad obtenidos con la librería de R Divnet versión 0.3.7, además se realizó un test de diversidad (prueba de significancia por pares del índice de diversidad) con los índices de Shannon entre tratamientos con la librería Divnet.

Para realizar una comparación entre tratamientos (diversidad beta) se procedió a calcular las distancias Unifrac del árbol filogenético empleando la librería Phyloseq y las distancias Bray Curtis empleando la librería Vegan con los datos normalizados por composición (diversidad relativa)

mediante la librería Microbiome versión 1.14.0. Con las distancias Bray Curtis y UNIFRAC se realizó un Análisis de coordenadas principales (PCoA) con la librería Phyloseq y un PERMANOVA con 9 999 permutaciones con la librería Vegan. Posteriormente se determinaron las abundancias diferenciales con la librería Deseq2 versión 1.32.0 y se graficaron los ASVs más abundantes para cada tratamiento.

Capítulo III. Resultados y Discusión

pH y porcentaje de humedad

Los meses julio y agosto en el Cantón Píllaro son los de más baja probabilidad de precipitación (aproximadamente 10 días al mes), con mayor probabilidad de días soleados y una mínima probabilidad de días totalmente nublados (Meteoblue, 2021), el muestreo se dio a 18°C. El suelo de la zona de muestreo es del Orden Mollisol, el cual es un suelo mineral altamente fértil y productivo, rico en carbono orgánico de tipo franco-limoso (PDyOT, 2014).

Debido a que el pH y porcentaje de humedad son parámetros determinantes en el microbioma, se determinaron para todas las muestras (**Tabla 5**), y de este modo reunir información sobre la condición en la que las muestras fueron tomadas, sin embargo, no formarán un factor de estudio.

Puede observarse que la humedad determinada se encuentra en un rango del 16,46% al 22,78%. De acuerdo con O'Geen, (2013), los suelos franco limosos deben tener un contenido de agua entre el 16% (punto de marchitez permanente) y 35% (capacidad de campo) para que el agua esté disponible para la planta, en las muestra observadas en la **Tabla 5**, es apreciable que el porcentaje de humedad encontrado para todas está dentro del rango del 16 al 35%, sin embargo, R3T2 se encuentra cerca del punto de marchitez permanente. También es importante considerar que el muestreo se realizó en la temporada seca de Píllaro en un día soleado a 18°C, en un suelo limoso cuya retención de humedad es moderada (O'Geen, 2013) para estudiar más detalladamente si este factor es determinante en el microbioma es necesario realizar toma de muestras en distintos tiempos posteriores al riego (investigación longitudinal), el cual se realiza en la granja cada 15 días,

sin embargo, estudiar la influencia de este factor en el presente estudio no es factible, debido a las limitaciones de una investigación transversal.

Respecto al pH estos variaron en un intervalo de 6 a 7. Los cultivos de mora de Castilla se crecen sin problemas en suelo con pH entre 5.5 y 7.5 (Villavicencio & Vásquez C., 2008), por lo que los rangos encontrados en las muestras (**Tabla 5**), no se encuentran fuera de lo normal. De acuerdo con Villares et al. (2016), pese a que la mora de Castilla se adapta bien a pH ácidos, el pH 7 es el más óptimo para el cultivo.

Tabla 5

Tabla de datos de porcentaje de humedad y pH del suelo

	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Humedad	pH
R1T1	5,018	3,875	22,7779992	6,5
R2T1	5,005	3,956	20,95904096	6
R3T1	5,003	4,029	19,46831901	7
R1T2	5,030	4,124	18,01192843	6,5
R2T2	5,023	4,086	18,65419072	6,5
R3T2	5,025	4,198	16,45771144	7

Nota. Masa inicial: masa de suelo húmedo, Masa final: masa de suelo posterior al proceso de secado a 105°C.

Análisis de calidad del ADN

La **Tabla 6** muestra las concentraciones y radios de pureza establecidos mediante espectrofotometría, las concentraciones se encuentran sobre los 100 ng/uL en cada una de las

muestras, lo cual se considera como una concentración alta, considerando los requerimientos para la secuenciación de los laboratorios, quienes solicitaron concentraciones a partir de los 20 ng/uL.

Tabla 6

Tabla de datos de absorbancia y concentración de muestras de ADN de rizósfera de mora de Castilla.

	Concentración (ng/uL)	Concentración media (ng/uL)	A260 (10 mm path)	A280 (10 mm path)	260/280	260/230
R1T1	270,2	269,6	5,403	3,102	1,74	0,43
R1T1	269,0		5,379	3,096	1,74	0,41
R2T1	259,4	260,35	5,188	3,212	1,62	0,93
R2T1	261,3		5,227	3,237	1,61	0,88
R3T1	411,4	411,75	8,228	5,374	1,53	0,64
R3T1	412,1		8,243	5,39	1,53	0,63
R1T2	161,6	461,5	3,232	2,085	1,55	0,23
R1T2	161,4		3,229	2,092	1,54	0,22
R2T2	107,6	112,4	2,152	1,389	1,55	0,19
R2T2	117,2		2,343	1,519	1,54	0,2
R3T2	221,5	221,05	4,429	2,843	1,56	0,45
R3T2	220,6		4,411	2,833	1,56	0,44

Nota. Datos de pureza y concentración de ADN para las muestras de rizósfera. Mediciones obtenidas con Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific™. Los datos se tomaron por duplicado y se estableció un promedio.

Empleando el kit de extracción especializado en suelo (FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MPBio) se obtuvieron concentraciones de ADN altas, sin embargo, esta medición resulta inexacta considerando que los rangos en pureza obtenidos para 260/230 fueron bajos, inferior al 1.5, indicando contaminación con sales, fenoles e hidratos de carbono, entre otros (Banco Nacional de ADN, 2020).

De Liphay et al. (2004) compararon métodos de extracción de ADN de suelo sobre las concentraciones, pureza y perfiles de diversidad bacteriana generados por cada uno de ellos. Al emplear Kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MPBio lograron concentraciones altas de ADN con radios de pureza bajos, con determinaciones similares a las expuestas en el presente estudio, además empleando el kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MPBio encontraron menor diversidad OTU frente a otros kits mediante secuenciación de alto rendimiento, pero, se detectaron OTUs específicas no encontradas con otros métodos, finalmente, el estudio concluyó que el método de extracción influye significativamente en los perfiles de las comunidades microbianas.

Ya que las muestras pertenecen a suelo fértil rico en materia orgánica contaminantes como sales, fenoles e hidratos de carbono, entre otros pueden esperarse en las muestras de ADN. El radio de pureza 260/230 bajo 1.5 puede afectar la integridad del ADN, lo cual puede influir también en los perfiles taxonómicos de las comunidades de microorganismos, como lo determina Corcoll et al. (2017), sin embargo, debido a las limitaciones del presente estudio no se empleó un kit de purificación de ADN, lo cual puede ser influyente en los resultados de secuenciación.

Es importante recalcar que en el estudio de Corcoll et al. (2017) pese a trabajar con el mismo kit de extracción y bajos radios de pureza lograron una diversidad importante de OTU e

identificaron variantes únicas con secuenciación de amplicones y tecnología de alto rendimiento. Por otro lado, los rangos de pureza de 260/280 fueron superiores al 1.5 por lo que la contaminación por proteínas fue baja, la muestra R1T1 se aproximó al 1.8 (pureza ideal).

Secuenciación de alto rendimiento

El estudio actual se basa en el análisis de microorganismos fúngicos a través del gen ITS, caracterizando suelo de rizósfera en íntima interacción con las raíces, debido a que, previamente Benítez, (2019) buscó diferencias en la composición microbiana fúngica entre suelos tratados y no tratados con *Trichoderma* en el Ecuador, sin embargo, su estudio no se lo ha realizado con el suelo en contacto íntimo con las raíces, lo cual es importante, debido a que se ha encontrado que, en esta zona se establecen poblaciones microbianas activas y mejoradas (tanto en bacterias como en hongos) mucho más altas en comparación con el suelo a granel, tanto en áreas cultivadas, como no cultivadas (Gomes et al., 2003), especialmente, cuando se agregaban hongos antagonistas de patógenos como *Trichoderma* (Berg et al., 2005).

Para llevar a cabo estudios de diversidad microbiana el diseño y selección de cebadores juega un papel crucial en los resultados, ya que estos oligonucleótidos deben ser específicos y universales dentro de un grupo objetivo (Vancov & Keen, 2009), en comunidades fúngicas los genes de ARNr 5.8S, 18S y 28S poseen regiones ITS1 y 2 (espaciador transcrito interno hipervariable), el par de cebadores seleccionado para el presente estudio (ITS86F y ITS4) fue concebido específicamente para hongos (Turenne et al., 1999) y comprenden la región ITS2 hipervariable entre los genes 5.8S y 28S.

La estimación preferencial es uno de los inconvenientes que suele presentarse al trabajar con regiones variables ITS debido a que se presentan longitudes variables entre especies, lo que promueve a menudo una amplificación y secuenciación preferenciales de secuencias cortas y por lo tanto una estimación de abundancia incorrecta (Bellemain et al., 2010), pese a esto se continúa empleando, esto debido a la existencia de bases de datos curadas y ricas en comparación con las disponibles para otros genes como ARNr SSU / LSU. Filippis et al., (2017) detectaron claros fenómenos de amplificación preferencial con todos los conjuntos de cebadores para regiones ITS 1 y 2, por otro lado Petrolli et al. (2021) reporta que el par de cebadores ITS86F e ITS4 en muestras de corteza de árbol en estimaciones OTU tienen selectividad por los filos Ascomycetes y Basidiomycetes, esto coincide con Vancov & Keen (2009) quienes reportan que el par de cebadores ITS86F e ITS4 en muestras de suelo tienen selectividad por Ascomycetes, Basidiomycetes y Zygomycetes del género *Mortierella*.

Análisis bioinformático y estadístico

Preprocesamiento de datos

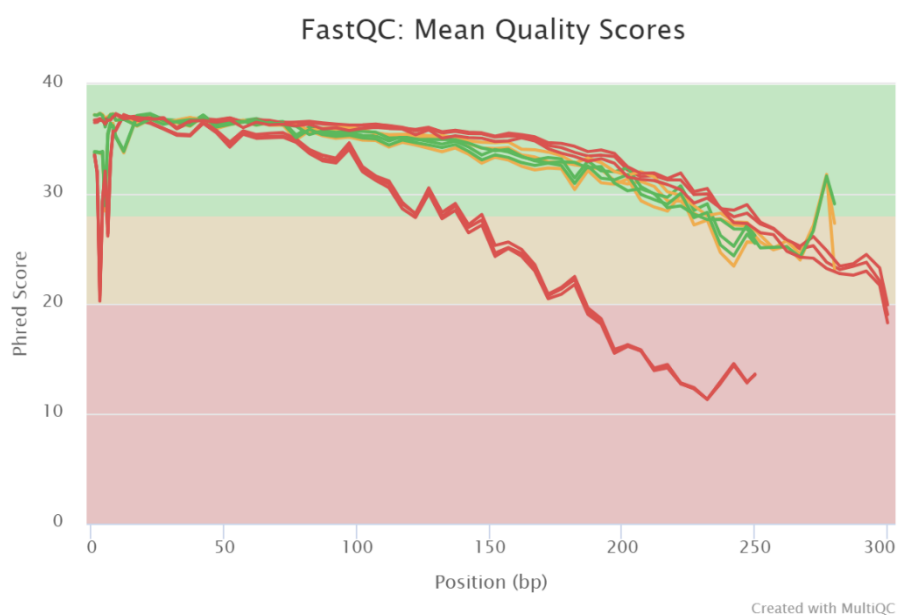
Para procesar datos en DADA2 se requieren archivos demultiplexados y libres de secuencias no biológicas, como adaptadores, las secuencias receptoras fueron preprocesadas en Qiime2 por los proveedores de secuenciación para eliminar secuencias adaptadoras y etiquetas multiplex, sin embargo, se corroboró la ausencia de estas secuencias en el software FastQC y MultiQC, en el informe resumen generado (**Figura 24**) no se detectaron adaptadores Illumina sobre el 0.1% en ninguna de las muestras.

Aunque el algoritmo de DADA2 incorpore puntuaciones de calidad, cuando estas puntuaciones son demasiado bajas pueden inducir a problemas durante la inferencia de secuencias, especialmente con llamadas de base N, por lo cual, el preprocesamiento de datos es esencial para los estudios, debido a que si conservamos fragmentos de mala calidad acumulamos errores de secuenciación y no verdaderas variantes de diversidad (Labastidas, 2019).

Actualmente existen numerosas herramientas bioinformáticas que permiten cuantificar las métricas de control de calidad ya que los datos pueden ser propensos a errores, defectos en el lote o muestras atípicas que puedan pasarse por alto, entre otras razones (Ewels et al., 2016), para el presente estudio se ha trabajado el control de calidad con FastQC, MultiQC, y DADA2 integrando los valores de estos softwares para un mejor tratamiento de datos a la hora de limpiar secuencias.

Figura 20

Puntuaciones medias de calidad, datos globales en MultiQC versión 9, secuencias iniciales.



Nota. El gráfico se divide en tres rangos de calidad: buena - verde, razonable - naranja, mala – rojo.

Se empleó el software FastQC debido a que entrega un informe detallado sobre la composición y calidad de las lecturas que permiten una visión rápida de posibles problemas con los datos, los cuales deben ser considerados antes de analizarlos con otras herramientas, por otra parte, se trabajó con MultiQC a la par, ya que genera un informe reducido de los datos proyectados por FastQC, lo que permite analizar múltiples muestras a la vez para identificar tendencias o sesgos globales (Ewels et al., 2016) (**Figura 20, Figura 22 y Figura 24**).

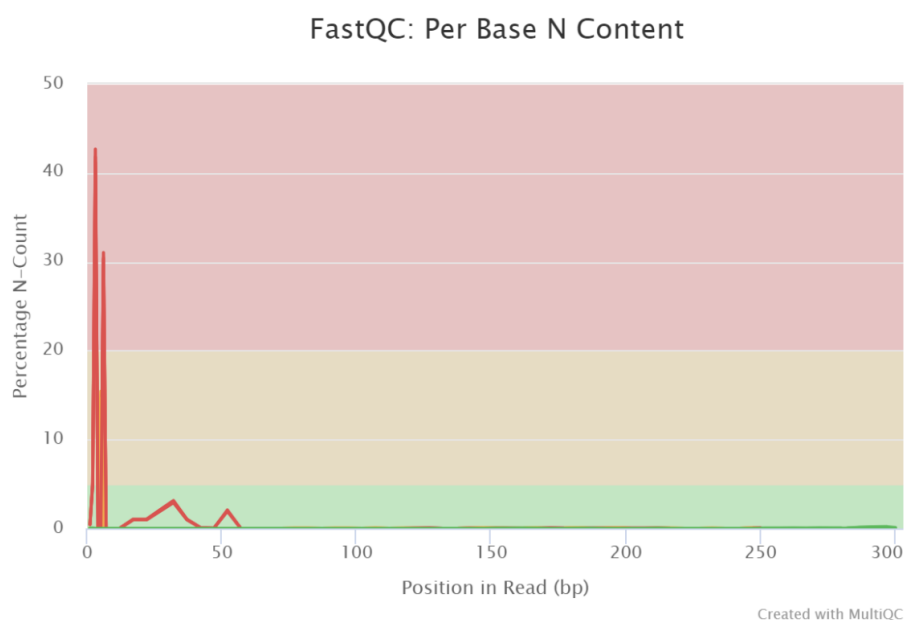
El gráfico de puntuaciones medias de calidad de los datos originales (**Figura 20**) muestra en rojo a todas las lecturas reverse correspondientes a cada muestra, debido a que la calidad cae en un Phred Score < 20. Para R1T1_R2, R2T1_R2 y R3T1_R2 la caída se presenta aproximadamente a partir del nucleótido 187, mientras que para R1T2_R2, R2T2_R2 y R3T2_R2 la caída se presenta a partir del nucleótido 300, aproximadamente. Se observa una caída de calidad a lo largo de las secuencias, especialmente en las últimas bases en todos los tratamientos, este resultado es esperado de acuerdo con Babraham Institute (2020), ya que a medida que incrementa la longitud de la secuencia, es común que la calidad general decaiga, debido a la química de la secuenciación, por falla de las polimerasas, acumulación de dinucleótidos, entre otros (Labastidas, 2019).

Así mismo, es observable una caída de calidad en las primeras bases (**Figura 20**), este comportamiento se ve en todas las muestras, especialmente en las lecturas reverse del tratamiento 1, sin embargo, en las demás lecturas no se observa una caída bajo un Phred Score de 30, de acuerdo con Babraham Institute (2020), también es posible que la calidad sea baja al inicio de la secuencia, para posteriormente presentar mayores puntuaciones de calidad, esto es posible cuando existen problemas transitorios durante la ejecución, en estos casos no es sugerible el recorte de bases. Por otro lado, las lecturas forward para el tratamiento 1 y 2 lograron puntuaciones Phred

Score entre 23.45 y 37.47, por lo que no requieren un procesamiento de recorte y filtrado riguroso, ya que no caen en una calidad por debajo de 20 (**Figura 20**. Puntuaciones medias de calidad, datos globales en MultiQC versión 9, secuencias iniciales).

Figura 21

Porcentaje de asignaciones N, por base. Datos globales en MultiQC versión 9, secuencias iniciales.



El gráfico de contenido de bases N en las secuencias (**Figura 21**), muestra asignaciones de base N en las primeras posiciones, especialmente en la base 3 con un porcentaje del 42.67% y en la base 6 con un 31.03% de bases N, posteriormente en las posiciones 32 y 52 alcanzan un 3.13% y 2.08%, en la posición 57 se llega a un 0%. Las bases N indican que los datos no pudieron interpretarse lo suficientemente bien como para llamar bases convencionales. Cuando existe una pérdida significativa de la calidad general se observan proporciones significativas de N, por lo que se torna importante analizar otros módulos de calidad (Babraham Institute, 2020). Este comportamiento es evidenciable en las secuencias de menor calidad visualizadas también en la **Figura 20**, debido a que los picos en los porcentajes de base N corresponden a las secuencias

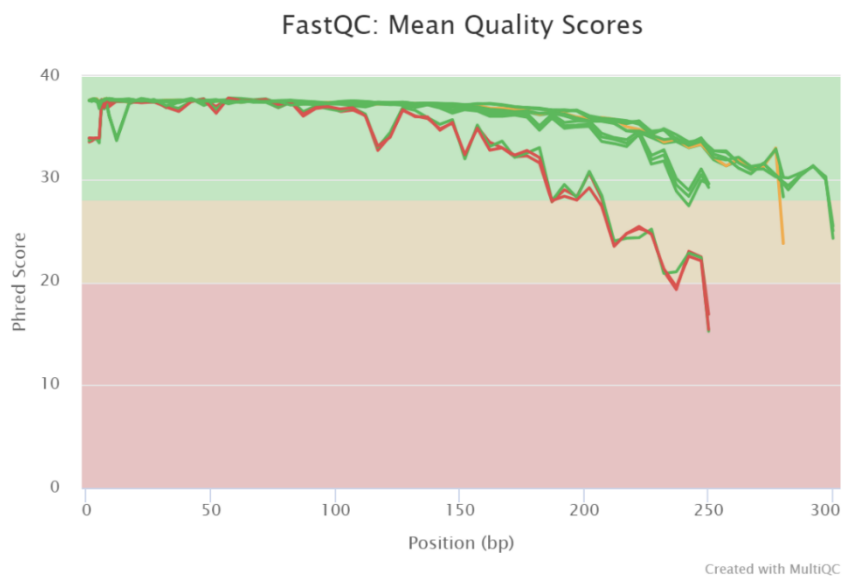
reverse del tratamiento 1, las cuales también presentaron la calidad general más baja y exponían picos de caída de calidad de 20.24 en la base 3 y 26.17 en la base 6.

Edgar & Flyvbjerg (2015) demostraron que imponer un E_{max} es un filtro de calidad eficaz, y sugieren que se maneje un $E_{max} = 1$, ya que el número más probable de errores es cero cuando $E < 1$ y permitirán una mayor precisión de las inferencias biológicas, sin embargo, es posible implementar umbrales más o menos estrictos dependiendo de sus datos. El parámetro seleccionado fue $E_{max} = 2$, el cual es recomendado para DADA2, también se realizó el recorte de secuencias con $truncQ = 2$ (caracteres ASCII), es decir que se truncaron las secuencias en el primer nucleótido con una asignación de base N, en caso de que se presente alguna y si esta secuencia tenía una longitud menor a 50, se descartó la secuencia con $minLen = 50$.

Al aplicar estos parámetros en el filtrado y recorte de secuencias con DADA2 incrementaron las puntuaciones medias de calidad de todas las muestras (**Figura 22**), y se observa la eliminación de todas las bases N (**Figura 23**), sin embargo, se perdió significativamente información en las lecturas reverse del tratamiento 1 (R1T1ITS_R2, R2T1ITS_R2 y R3T1ITS_R2) (**Tabla 7**), ya que se perdieron más del 99% del total de secuencias iniciales, incluso cuando se flexibilizó el parámetro E_{max} a 3, la pérdida de lecturas era significativa, por lo que trabajar con dichas lecturas reverse para el alineamiento con las secuencias forward de mayor calidad habría generado pérdida de información de abundancia, incluso, si se conservan dichas lecturas sin un parámetro E_{max} , debido a su mala calidad interferirían en las inferencias biológicas, generando posiblemente falsos positivos. Debido a esto se descartaron las lecturas reverse del análisis y se procedió a trabajar únicamente con las lecturas forward en la tubería DADA2.

Figura 22

Puntuaciones medias de calidad, datos globales en MultiQC versión 9, secuencias filtradas y recortadas.



Nota. El gráfico se divide en tres rangos de calidad: buena - verde, razonable - naranja, mala – rojo.

Filtrado y recorte realizado en Galaxy DADA2 versión 1.20.

Figura 23

Porcentaje de asignaciones N, por base. Datos globales en MultiQC versión 9, datos recortados y filtrados.

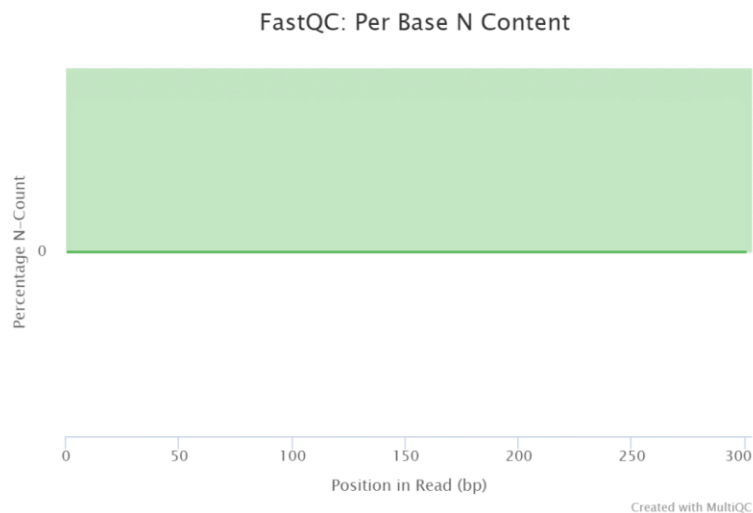


Tabla 7

Porcentaje de pérdida de secuencias tras filtrado de calidad.

Sample	Reads in	Reads out	% Pérdida
R1T1ITS_R1	115029	63030	45,21
R1T1ITS_R2	115029	206	99,82
R2T1ITS_R1	119015	73523	38,22
R2T1ITS_R2	119015	183	99,85
R3T1ITS_R1	174547	101959	41,59
R3T1ITS_R2	174547	277	99,84
R1T2ITS_R1	82692	48553	41,28
R1T2ITS_R2	82692	50833	38,53
R2T2ITS_R1	102801	62590	39,12
R2T2ITS_R2	102801	65560	36,23
R3T2ITS_R1	119258	67427	43,46
R3T2ITS_R2	119258	68342	42,69

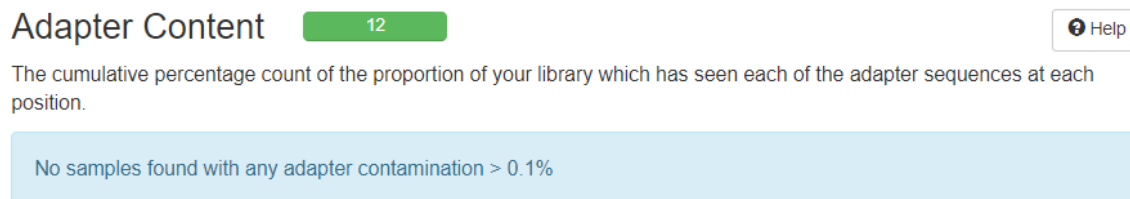
Nota. Comparación entre número de secuencias iniciales (Reads in) y número de secuencias tras el filtrado y recorte en DADA2 versión 1.20 (Reads out). (_R1) representa lecturas forward y (_R2) lecturas reverse.

Por otro lado, las secuencias reverse del tratamiento 1 (R1T1ITS_R1, R2T1ITS_R1, R3T1ITS_R1), tras el filtrado de calidad perdieron un porcentaje de lecturas entre 38.22% y 45.21%, mientras que las secuencias forward del tratamiento 2 perdieron entre el 39.12% y 43.46% de lecturas, lo que indica que las secuencias forward de ambos tratamientos acumularon un menor número de errores,

lo que permitió pasar el filtro de calidad preservando una gran cantidad de datos importante (más del 50%) (**Tabla 7**), este resultado es congruente con las puntuaciones de calidad en la **Figura 20**, donde las puntuaciones de calidad más altas correspondieron a las lecturas forward de ambos tratamientos y tras el filtrado de calidad (**Figura 22**), se incrementaron dichos puntajes. Aunque los porcentaje de pérdida de lecturas son elevados, el filtrado de calidad mejorará la sensibilidad del algoritmo a variantes de secuencia raras (B. J. Callahan et al., 2016) y evitará falsos positivos en los datos biológicos (Edgar & Flyvbjerg, 2015).

Figura 24

Porcentaje de contenido de adaptador, datos globales en MultiQC versión 9, datos iniciales.



Procesamiento y análisis estadístico de datos

Valores de prevalencia. El elemento principal durante el estudio del microbioma es la tabla de abundancias, la cual proporciona un número de secuencias correspondientes a un taxón en una determinada muestra, también son de gran importancia la tabla de taxones, los metadatos y el árbol filogenético (Calle, 2019).

Tras el procesamiento en DADA2 que iniciaba con un conjunto de archivos en formato fastq y la creación del objeto Phyloseq, los valores de prevalencia observados se muestran en la **Tabla 8**, en donde se muestran los Phylum con sus correspondientes media y suma de read counts, los

Phylum más representados globalmente corresponden a Ascomycota (716 reads), Basidiomycota (222 reads) y Mortierellomycota (103 reads), también puede observarse una gran cantidad de Phylum no asignados (553 reads), los cuales pueden corresponder a secuencias ITS no pertenecientes al reino Fungi o a variantes aún no identificadas (Ver **Identificación de variantes sin taxonomía asignada**).

Tabla 8

Tabla de prevalencias taxonómicas (Asignada por Filos).

	Phylum	1	2
1	p__Aphelidiomycota	1	8
2	p__Ascomycota	1,668998	716
3	p__Basidiobolomycota	1	1
4	p__Basidiomycota	1,405063	222
5	p__Chytridiomycota	1,28	32
6	p__Entomophthoromycota	1	1
7	p__Glomeromycota	1	3
8	p__Kickxellomycota	1	2
9	p__Mortierellomycota	1,66129	103
10	p__Mucoromycota	1,153846	15
11	p__Olpidiomycota	1,333333	4
12	p__Rozellomycota	1,285714	9
13	p__Zoopagomycota	1	1
14	NA	1,368812	553

Nota. Columna 1: media de read counts para determinado Phylum. Columna 2: suma de read counts para determinado Phylum.

Estos resultados se asemejan a lo reportado por Petrolli et al. (2021) y Vancov & Keen (2009) al emplear los cebadores ITS86F e ITS4 en muestras de corteza de árbol y suelo,

respectivamente, encontraron en estimaciones OTU selectividad por los filos Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota (en la actualidad los Zygomycota son considerados un grupo parafilético que incluye al Phylum Mortierellomycota). Estos Filos también son reportados por Benítez (2019) como más abundantes, empleando primers ITS3 e ITS4.

3.1.1.1. Análisis de abundancias

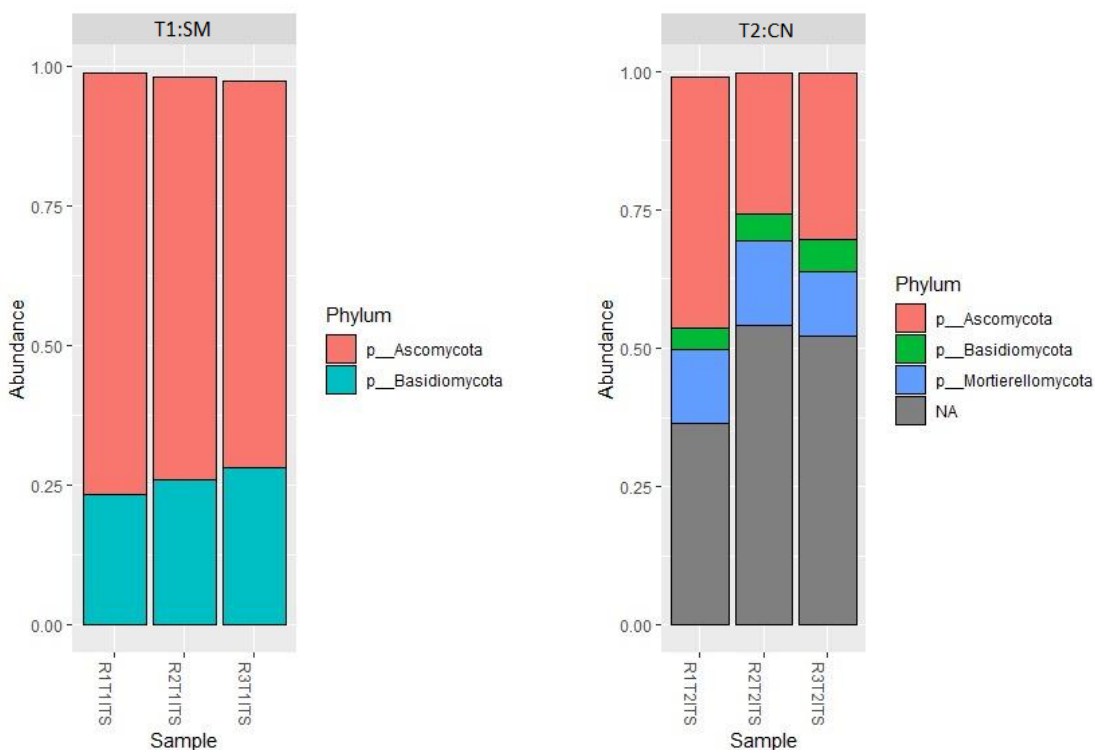
La diferencia en el tamaño de las bibliotecas fue observable en los datos de partida del presente estudio, tanto en las lecturas iniciales como en las filtradas empleadas para el procesamiento en DADA2 (**Tabla 7**), esto varió en un rango de 82692 y 119258 en las muestras iniciales R1T2ITS y R3T2ITS, respectivamente, mientras que las bibliotecas filtradas tuvieron un tamaño aún más variable, incluso entre lecturas forward y reverse de una muestra, debido a las diferencias de calidad, dejando a las lecturas forward en un tamaño entre 48553 y 101959 para las muestras R1T2ITS y R3T1ITS, respectivamente.

Dadas las variaciones entre el tamaño de biblioteca por muestra, considerando que los tratamientos fueron secuenciados por distintos laboratorios, aunque con la misma tecnología Illumina Miseq y los mismos cebadores, lo que puede inducir a un sesgo entre tratamientos, la presente investigación tuvo la necesidad imperante de normalización de datos. Para este fin fueron empleadas dos metodologías de normalización, la normalización por proporción para evaluar las abundancias relativas, sin embargo, para una diferenciación estadística entre diversidad (diversidad beta) de tratamientos se empleó la normalización de Deseq2, como se describirá posteriormente.

En la **Tabla 8** no es apreciable cuáles Phylum están más representados en cada tratamiento, para ello se realizaron los gráficos de abundancia relativa. La **Figura 25** muestra el gráfico de abundancias para los Phylum más representativos de los tratamientos de estudio con una proporción mayor al 0.1, las abundancias relativas se detallan en la **Tabla 9**. Para el tratamiento 1 se observa que los Phylum más abundantes corresponden a Ascomycota y Basidiomycota, mientras el tratamiento 2 presenta a los Phylum Ascomycota, Mortierellomycota y Basidiomycota como más abundantes. En la **Tabla 9** y **Figura 25** también es apreciable una proporción significativa de Filo NA (no asignado).

Figura 25

Gráficos de abundancias por Filos en tratamientos diferentes (T1 y T2)



Nota. T1:SM correspondiente a Tratamiento 1 – plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*.

T2:CN correspondiente a T2 – plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Tabla 9

Tabla de abundancias por Filos en tratamientos diferentes (T1 y T2)

Tratamiento 1	Filos	R1T1ITS	R2T1ITS	R3T1ITS
	Ascomycota	0,753825	0,720908	0,692218
Basidiomycota	0,234429	0,260981	0,281535	
Tratamiento 2	Filos	R1T2ITS	R2T2ITS	R3T2ITS
	NA	0,35918101	0,4997711	0,51861266
	Mortierellomycota	0,13285584	0,1532021	0,11673343
	Ascomycota	0,45340628	0,25490615	0,30083531
	Basidiomycota	0,44639768	0,88753243	0,60452804

Debido a que se descartaron los ASV de abundancia representativa no identificados (Ver **Identificación de variantes sin taxonomía asignada**), se incrementaron las proporciones de los Phylum identificados, esto es visible especialmente en el tratamiento 2, ya que el tratamiento 1 cambia mínimamente su proporción, los resultados se muestran en la **Figura 26 y abla 10**.

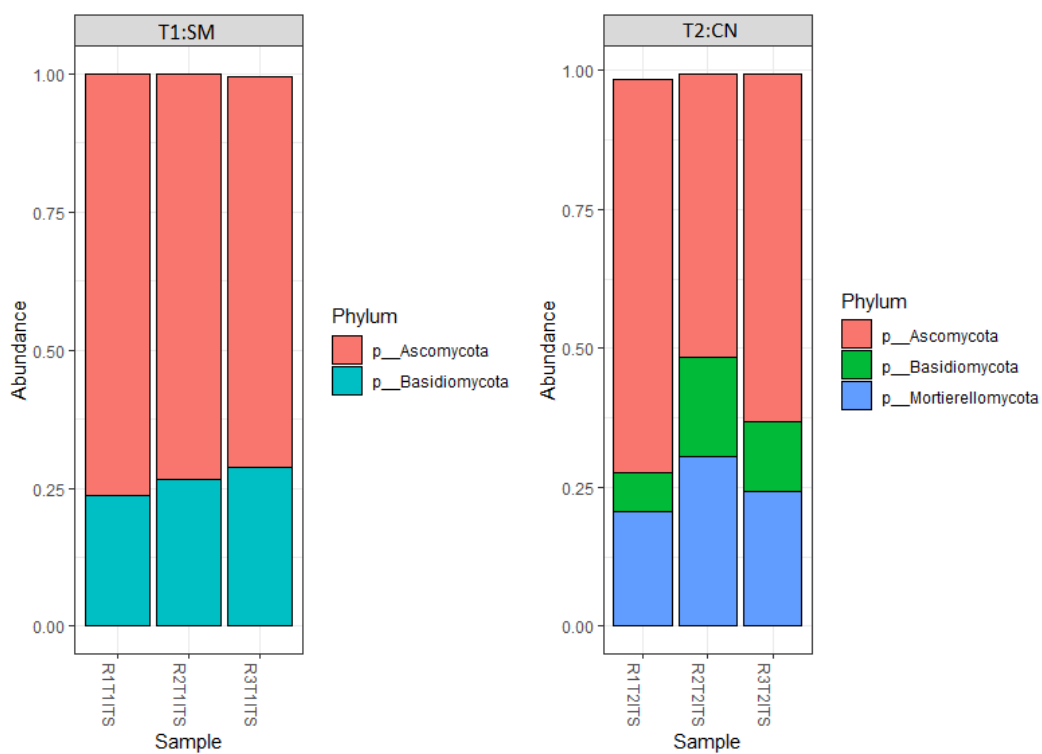
abla 10

Tabla de abundancias por Filos (sin Filos NA) en tratamientos diferentes (T1 y T2)

Tratamiento 1	Phylum	R1T1ITS	R2T1ITS	R3T1ITS
	Ascomycota	0,762434	0,733614	0,707442
Basidiomycota	0,237106	0,265581	0,287727	
Tratamiento 2	Phylum	R1T2ITS	R2T2ITS	R3T2ITS
	Mortierellomycota	0,20732195	0,30626398	0,24249376
	Ascomycota	0,70754189	0,50957901	0,624934
	Basidiomycota	0,069660495	0,17742526	0,12558038

Figura 26

Gráficos de abundancias por Filos (sin Filos NA) en tratamientos diferentes (T1 y T2)

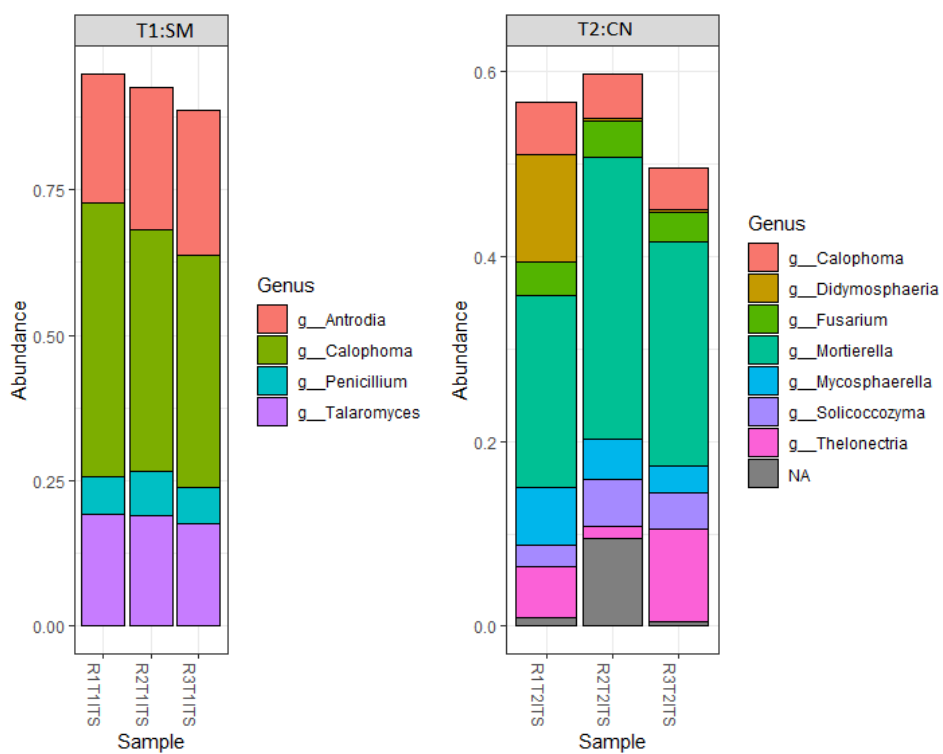


Nota. T1:SM correspondiente a Tratamiento 1 – plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*.

T2:CN correspondiente a T2 – plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Figura 27

Gráficos de abundancias relativas por Género en tratamientos diferentes (T1 y T2)



Nota. T1:SM correspondiente a Tratamiento 1 – plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*.

T2:CN correspondiente a T2 – plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Tabla 11

Tabla de abundancias por Géneros en tratamientos diferentes (T1 y T2).

	Phylum	Género	R1T1ITS	R2T1ITS	R3T1ITS
Tratamiento 1	Ascomycota	<i>Calophoma</i>	0,4708	0,4144	0,3981
	Basidiomycota	<i>Antrodia</i>	0,2203	0,2442	0,2501
	Ascomycota	<i>Talaromyces</i>	0,1915	0,1906	0,1761
	Ascomycota	<i>Penicillium</i>	0,0659	0,0759	0,0626
	Phylum	Género	R1T2ITS	R2T2ITS	R3T2ITS
Tratamiento 2	Mortierellomycota	<i>Mortierella</i>	0,2072	0,3063	0,2424
	Ascomycota	<i>Thelonectria</i>	0,0545	0,0133	0,1007
	Ascomycota	<i>Mycosphaerella</i>	0,0625	0,0436	0,0292
	Ascomycota	<i>Didymosphaeria</i>	0,1163	0,0022	0,0027
	Basidiomycota	<i>Solicoccozyma</i>	0,0244	0,0506	0,0382
	Basidiomycota	NA	0,0094	0,0946	0,0052
	Ascomycota	<i>Calophoma</i>	0,0564	0,0485	0,0448
	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	0,0365	0,0386	0,0331

Análisis de diversidad.

Diversidad Alfa. En la **Figura 28** se observan los resultados de la diversidad alfa con la librería Phyloseq para cada tratamiento, para ello no se trabajaron con datos normalizados, ya que la mayoría de métodos alfa son más eficaces con los valores de recuento originales (P. McMurdie & Holmes, 2021). Cada uno de los índices de diversidad muestran mayor diversidad alfa para el tratamiento 2 (con Trichoderma).

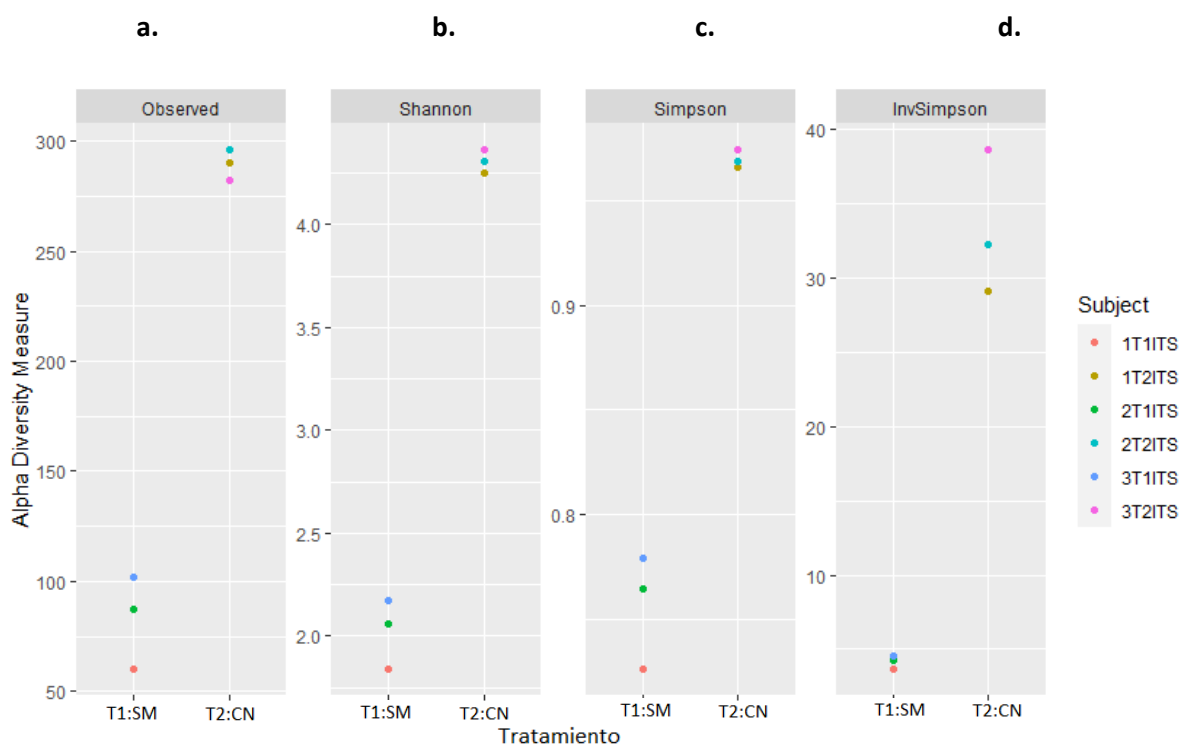
En la **Figura 28 a.** se muestra la diversidad observada, correspondientes al conteo de ASV únicos para cada muestra y es apreciable que la mayor abundancia es para el tratamiento 2, en la **Figura 28 b.**, correspondiente al índice de Shannon, el cual describe el desorden e incertidumbre de las especies individuales, por lo que la diversidad incrementa a medida que incrementa la incertidumbre, también a medida que incrementa el número de especies, debido a que se construye en base a la abundancia relativa y el número de especies (Pla, 2006), esto se asemeja a los datos de abundancia relativa (**Tabla 11**), donde se identificaron más géneros representativos para el tratamiento 2.

En la **Figura 28 c.**, el comportamiento es el mismo al previamente observado, en estos casos, el índice de diversidad Simpson, el cual informa sobre la probabilidad de encontrar dos especies iguales en un mismo hábitat cuando se seleccionan por azar, por lo que mientras más se acerca a la unidad sugiere que existe dominancia de una especie, mientras más se acerque a cero sugiere que hay mayor diversidad de especies (Sommerfield et al., 2008), es observable que el índice de Simpson está cercano a la unidad para las muestras del Tratamiento 2, lo que sugiere que en el tratamiento 2

existe dominancia de algunos taxones, en comparación con el tratamiento 1 y además existe mayor diversidad (**Figura 28 d.**), esto es apreciable en la **Figura 27**, en donde es apreciable la dominancia del género *Mortierella*, sobre otros, y existe a la vez mayor número de géneros para el tratamiento 2 en comparación con el tratamiento 1.

Figura 28

Gráficas de índices de diversidad alfa sin corrección de errores por muestra.



Nota. a. Índice de diversidad observada, b. Índice de diversidad de Shannon, c. Índice de diversidad de Simpson, d. Índice de diversidad de Simpson inverso. T1:SM correspondiente a Tratamiento 1 – plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2:CN correspondiente a T2 – plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Aunque se aprecia diferencias entre los índices de diversidad alfa entre tratamientos, no es apropiado realizar una comparación estadística entre ellos, ya que de acuerdo a Lande (1996) las estimaciones de índices de diversidad alfa subestiman la verdadera diversidad alfa, por lo que, para obtener conclusiones significativas sobre la comunidad microbiana se requiere emplear modelos de error de medición que ajusten la incertidumbre en la estimación de la diversidad alfa (Willis, 2019), por ello, para realizar una comparación entre diversidad alfa, se empleó Divnet versión 0.3.7 un método de estimación de diversidades con las cuales es posible realizar pruebas de hipótesis (Faust & Raes, 2012).

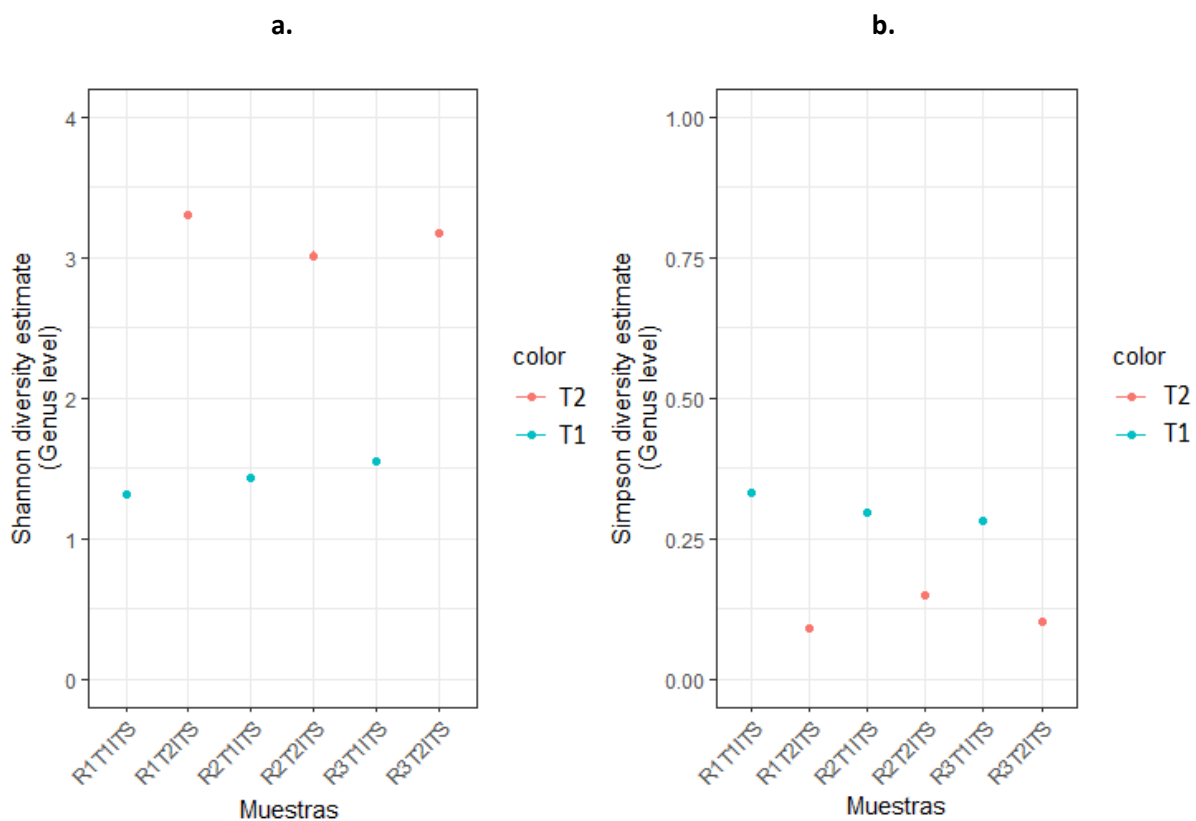
En la **Figura 29 a.** se aprecia la gráfica del índice de Shannon por muestra, aplicando el modelo de corrección de Divnet, y puede observarse que los índices de diversidad se redujeron en comparación con la **Figura 28 b.**, mientras que la tendencia de un tratamiento 2 con mayor índice de diversidad de Shannon. Por otro lado, en la **Figura 29 b.** se aprecia la gráfica del índice de Simpson por muestra, aplicando el modelo de corrección de Divnet y puede observarse que este índice es mayor para el tratamiento 1, el tratamiento sin *Trichoderma*. En general de la **Figura 29** podemos deducir que, ya que el índice de Simpson se aproxima a cero para el tratamiento 2 (0.09 – 0.15), existe una mayor diversidad de especies en las muestras, por lo que esto también estaría influyendo en el índice de diversidad de Shannon, el cual coincide ser superior para el tratamiento 2 (3.01 – 3.3) y más bajo en el tratamiento 1 (1.32 – 1.54), aunque el índice de Simpson también indica un tratamiento 1 con diversidad de especies (0.38 y 0.33).

La prueba de significancia en pares o test de diversidad llevado a cabo entre tratamientos se visualiza en la **Tabla 12**, para lo que se compararon los índices de Shannon, donde se plantea $H_0 = H^2 - H^1 = 0$, encontrándose valores p de cero, R genera esta respuesta de valor p cuando este

es demasiado pequeño, por lo que a partir de la **Tabla 12** podemos ver que con una diferencia entre índices de Shannon de $H'2 - H'1 = 1.65336$ y un $p - value \approx 0$, se rechaza la hipótesis nula, por lo que las diversidades alfa son diferentes para cada tratamiento, siendo el tratamiento con *Trichoderma* (T2) el de mayor diversidad alfa.

Figura 29

Gráficas de índices de diversidad alfa de Divnet por muestra.



Nota. a. Índice de diversidad de Shannon, b. Índice de diversidad de Simpson, taxón seleccionado: Género. T1: correspondiente a plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2: correspondiente a plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Tabla 12

Test de diversidad alfa (Índices de Shannon)

	Estimates	Standard Errors	p-values
(Intercept)	3,008193	0,053143	0
predictorsS	-1.65336	0,055214	0

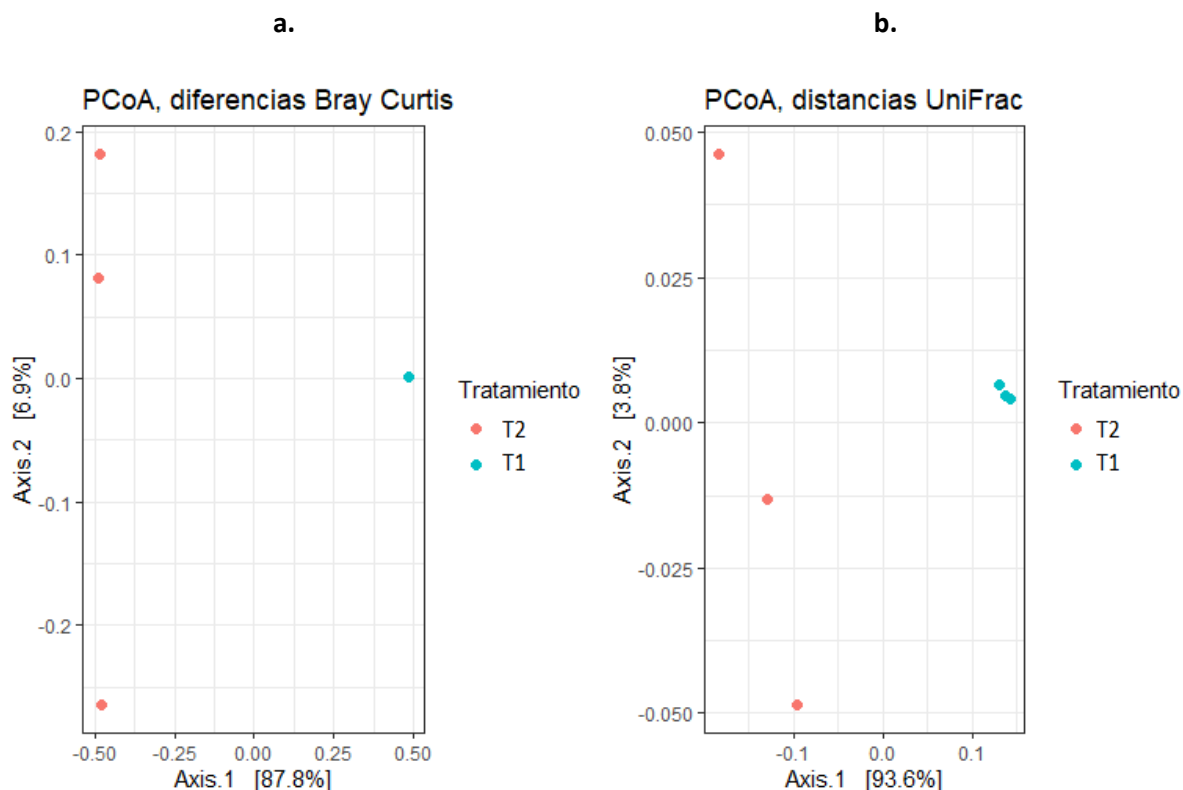
Nota. Estimates representa los índices de diversidad de Shannon para el tratamiento 1 (intercept) y tratamiento 2 (predictorsS).

Diversidad Beta. Se entiende que dos entornos o comunidades se parecen cuando su composición y estructura se parece, para comparar comunidades se suele graficar estas en un plano, a través de datos de distancias que reflejan cuán similares o distintas son entre sí, como es el caso de la distancia Bray-Curtis, la cual expresa la diferencia total en la abundancia de especies entre dos comunidades, dividido para la abundancia total de cada comunidad (Espinoza, 2019) o las distancias Unifrac, que emplean información filogenética para comparar diversidades, ambas métricas, junto con estadísticas multivariantes estándar como el análisis de coordenadas principales – PcoA, permite explicar la diversidad beta o diferencia entre comunidades (Lozupone et al., 2010).

La **Figura 30** muestra las gráficas del PcoA (Análisis de coordenadas principales), se observa agrupamiento entre las muestras del Tratamiento 1 (Sin *Trichoderma*), tanto para las diferencias Bray Curtis como para las distancias Unifrac. Las diferencias de disimilitud de Bray Curtis fueron mínimas entre el tratamiento 1 (< 0.11), lo que indica que los valores de disimilitud son extremadamente pequeños entre las muestras del tratamiento 1 (**Figura 30 a.**), mientras que las muestras del tratamiento 2 están más dispersas, lo que indica que los valores de disimilitud entre las muestras del tratamiento 2 son más grandes. También es evidenciable una separación entre localidades (tratamiento 1 y 2) (**Figura 30 a. y b**) (Buttigieg & Ramette, 2014).

Figura 30

Gráficas de PcoA (Análisis de coordenadas principales).



Nota. a. PCoA con diferencias Bray Curtis, b. PcoA con distancias UniFrac. T1: plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2: plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

La determinación de diferencias significativas en los PcoA se muestra en la **Tabla 13** y **Tabla 14**, empleando PERMANOVA, el cual es un ANOVA multivariante permutacional o Análisis Multivariado de la Varianza no paramétrico, que permite determinar de manera estadística si los centroides de un grupo de muestras difieren con los centroides de otro grupo de un análisis de ordenación como el PcoA (Lahti et al., 2021) y determinar si los grupos difieren en composición y estructura, tanto en la **Tabla 13**, como en la **Tabla 14** se observan valores de F altos, lo que significa que la suma de las distancias entre los tratamientos es mayor que la suma de distancias dentro de

los tratamientos, lo cual es evidenciable en los PcoA, debido a la formación de agrupamientos, sin embargo, en ambos casos con un $\Pr(> F) > 0.05$ por lo que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula, es decir que no se demuestra una diferencia significativa en diversidades beta entre los tratamientos 1 y 2. Por lo tanto, con la **Figura 30**, podemos observar que si bien no comparten taxones entre los tratamientos, según la **Tabla 13** y **Tabla 14** en diversidad beta no tienen diferencias significativas.

Tabla 13

PERMANOVA con distancias Bray Curtis de Divnet

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Tratamiento	1	1,39525	0,87148	27,123	0.1
Residual	4	0,20576	0,12852		
Total	5	1,60101	1		

Nota. Df: grados de libertad, SumsOfSqs: suma de cuadrados, F: estadística de permutaciones, P muestra la significancia estadística con un $P < 0.05$, $\Pr(>F)$ basado en 9999 permutaciones (P más bajo posible es 0,0001)

Tabla 14

PERMANOVA con distancias UNIFRAC (abundancias relativas)

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Tratamiento	1	0.112383	0.90602	38.563	0.1
Residual	4	0.011657	0.09398		
Total	5	0.124040	1.00000		

Nota. Df: grados de libertad, SumsOfSqs: suma de cuadrados, F: estadística de permutaciones, P muestra la significancia estadística con un $P < 0.05$, $\Pr(>F)$ basado en 9999 permutaciones (P más bajo posible es 0,0001)

Considerando que las diversidades alfa fueron significativamente diferentes entre tratamientos, siendo superior en el tratamiento 2, mientras la diversidad beta no presentó diferencia significativa entre tratamientos, esto nos sugiere que la diversidad a nivel de tratamiento o diversidad gamma en el tratamiento 2 (muestras de rizósfera tratadas con *Trichoderma*) es mayor a la del tratamiento 1, sin embargo, esta diversidad no fue estimada.

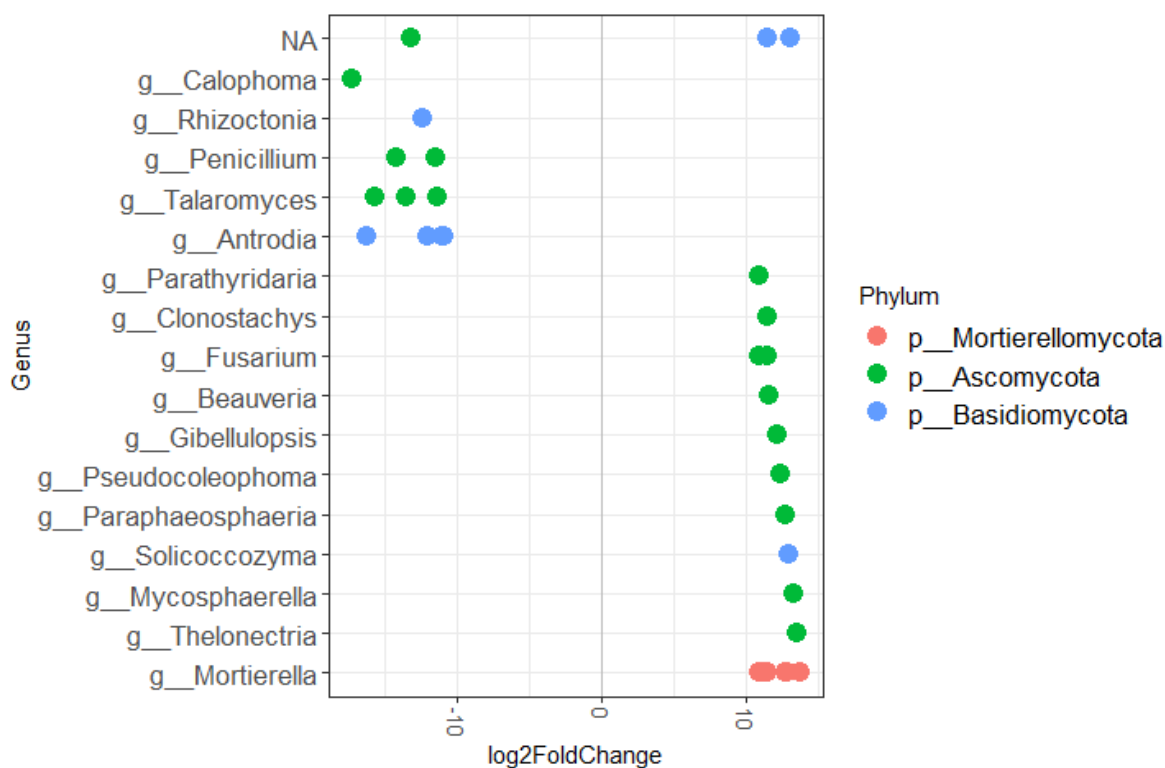
Es importante destacar que los análisis de diversidad se basan en una toma de muestras para hacer inferencia sobre el entorno que nos interesa, por lo que a medida que crece el tamaño de la muestra es posible acercarse a comprender la verdadera naturaleza de la población de estudio, lo cual quiere decir que mientras incrementa el muestreo, cualquier métrica de diversidad (M. Rosen et al., 2015), como los índices de diversidad alfa y beta llegan a aproximarse al valor de la métrica calculada en toda una población (Willis, 2019). Debido a las limitaciones de la investigación y del método de secuenciación de amplicón de genes, no podemos concluir que las métricas de diversidad estimadas, tanto para diversidad alfa como para diversidad beta describen completamente la diversidad de las poblaciones de interés, ya que se deben considerar los siguientes factores:

- El número de muestras extraídas por tratamiento fue limitado (3 por tratamiento);
- se emplearon únicamente un par de cebadores ITS86F e ITS4 que, pese a considerarse como un par de cebadores adecuado para muestras ambientales puede también estar determinando un sesgo en la reacción de amplificación, siendo preferencial para ciertos taxones del reino Fungi;
- se dio una pérdida de un alto porcentaje de datos de secuenciación que se obtuvieron a partir de dos laboratorios de análisis empleando los mismos cebadores y tecnología Illumina Miseq, luego de ser filtrados y recortados; las regiones ITS presentan longitudes variables

- entre especies lo que promueve a menudo una amplificación y secuenciación preferencial por secuencias cortas y por lo tanto, una estimación de abundancia incorrecta;
- el estudio fue netamente transversal por lo que las diferencias observadas se atribuyen únicamente al tratamiento con *Trichoderma*, cuando podría deberse a otros factores. Sin embargo, los resultados expuestos sirven como una exploración inicial de las poblaciones, para estudios posteriores.

Figura 31

Gráfico de abundancias diferenciales por Filo y género

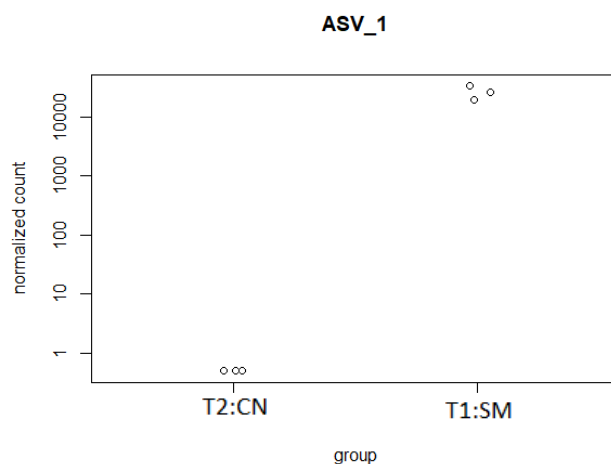


Nota. En el eje x se distribuyen hacia la izquierda los taxones de abundancia diferencial para el tratamiento 1 (plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*) y hacia la derecha los taxones de abundancia diferencial para el tratamiento 2 (plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*).

Para encontrar los taxones más diferenciados se empleó el análisis de abundancia diferencial a través de DESeq2 con un umbral de significancia $\alpha = 0.001$ (**Figura 31**) y se aprecian los Phylum Ascomycota, Basidiomycota para el tratamiento 1 y los Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Mortierellomycota para el tratamiento 2, esta tendencia se mantiene en la gráfica de abundancias relativas (**Figura 26**). Por otro lado, el género de mayor abundancia para el tratamiento 1 es *Calophoma*, representado por el ASV_1, siendo la especie *rosae* la más abundante (**Figura 32**), seguido del género *Antrodia*, especie *neotropica* representado por el ASV_3 (**Figura 33**) mientras que para el tratamiento 2 el género de mayor abundancia es *Mortierella*, principalmente representado por el ASV_7, especie *elongata* (**Figura 34**), seguido de la especie *humilis* representado por el ASV_8 (**Figura 35**). Determinar estos taxones puede proporcionarnos información importante sobre los ambientes de estudio, como se reporta posteriormente.

Figura 32

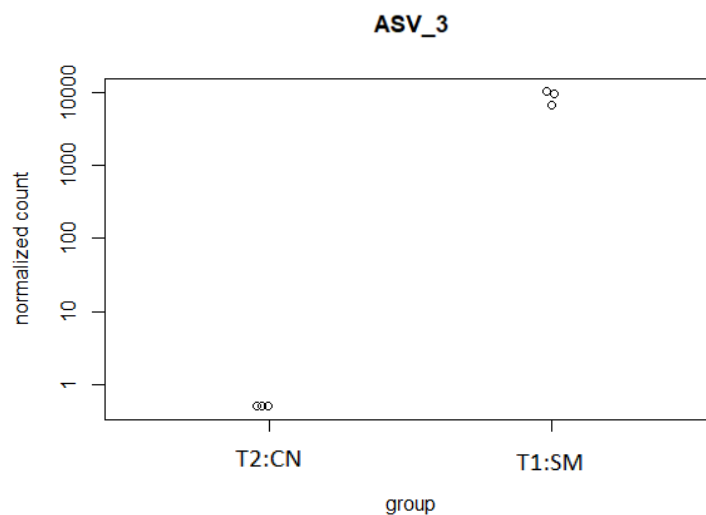
Gráfico de abundancias diferenciales ASV1 correspondiente a *Calophoma rosae*.



Nota. T1:SM plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2:CN plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Figura 33

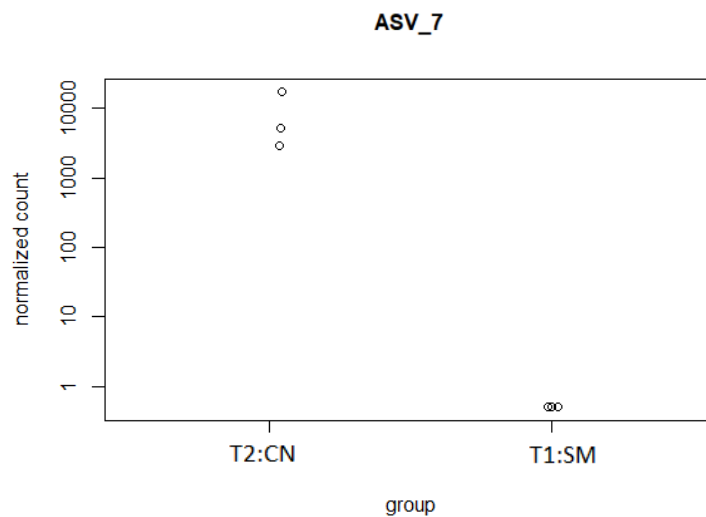
Gráfico de abundancias diferenciales ASV3 correspondiente a *Antrodia neotropica*.



Nota. T1:SM plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2:CN plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Figura 34

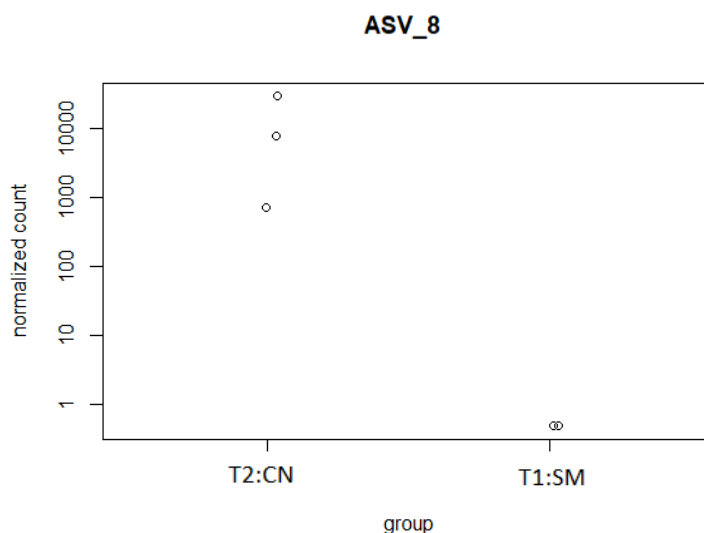
Gráfico de abundancias diferenciales ASV7 correspondiente a *Mortierella elongata*.



Nota. T1:SM plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2:CN plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Figura 35

Gráfico de abundancias diferenciales ASV7 correspondiente a *Mortierella humilis*.



Nota. T1:SM plantas con marchitez no tratadas con *Trichoderma*. T2:CN plantas sin marchitez tratadas con *Trichoderma*.

Beeck et al. (2014), reportan que el par de cebadores ITS86F e ITS4 empleados en pirosecuenciación de muestras ambientales superó en número de lecturas y OTUs identificadas a otros pares de cebadores, como ITS3- ITS4, sin embargo, es importante considerar que el actual estudio empleó las unidades estándar ASV en lugar de OTU, esto derivó en un menor número de taxones encontrados por muestra, debido a que la inferencia de ASV con DADA2 a través de su modelo de error, identifica con mayor precisión verdaderos taxones, en comparación con el método OTU, que tiende a sobreestimar taxones debido a que realiza agrupaciones de secuencias biológicas con errores (B. J. Callahan et al., 2016).

Trichoderma es un género de hongos filamentosos cosmopolitas (Druzhinina et al., 2011) del orden de los Hypocreales y phylum Ascomycota, los nichos ecológicos frecuentes de este género

incluye predominantemente la rizósfera, debido a la presencia de distintos hongos que les sirven como presa, atraídos por los nutrientes derivados de las raíces de las plantas, por ello la mayoría de hongos de este género han sido aislados precisamente en muestras de rizósfera en diversas zonas climáticas alrededor del mundo (Druzhinina et al., 2011) y de hecho son uno de los géneros más frecuentes en suelos, se caracterizan por su potencial como control biológico de fitopatógenos (Gary E. Harman et al., 2004).

Debido a que *Trichoderma* se trata de un género encontrado comúnmente, y considerando que la toma de muestras de rizósfera que pertenece a suelos tratados con *Trichoderma* del INIAP, podría esperarse que este género se identifique en al menos el tratamiento 2, el cual provenía de rizósfera de *Rubus glaucus* sin síntomas de marchitamiento tratadas con *Trichoderma* (**Figura 32**), sin embargo, este taxón no fue identificado ni siquiera en conteos bajos en ninguno de los tratamientos, esto puede deberse a sesgos en los cebadores empleados ITS86F e ITS4, ya que se ha reportado un sesgo por los Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Mortierellomycota (Petrolli et al., 2021; Vancov & Keen, 2009). Aunque *Trichoderma* pertenece al phylum Ascomycota pudo no haber sido reconocido por los cebadores empleados, así también no encontrar este género en ninguno de los tratamientos, pudo deberse a errores durante la secuenciación, derivando en la alta pérdida de lecturas debido a su baja calidad (**Tabla 7**), lo que limita la identificación de otros taxones. No encontrar géneros como *Dactylonectria* y/o *Ilyonetria*, entre otros antes descritos, asociados a la marchitez de *Rubus glaucus* (Tolosa, 2015) en el tratamiento 1, puede deberse a las mismas razones por las que no se encontró *Trichoderma* spp. en las muestras.

Por otro lado, de ser ITS86F e ITS4 un par de cebadores adecuado para el estudio de muestras ambientales debido a su alto rendimiento, es posible también, que se hayan identificado

pocos taxones debido a errores durante la secuenciación, ya que no se empleó un kit de purificación de ADN y una baja pureza en las muestras de ADN puede interferir en los resultados de secuenciación (Clooney et al., 2016). Se apoya esta hipótesis debido a que tras el filtrado de calidad en DADA2 (**Tabla 7**) se apreciaron porcentajes de pérdida de secuencias de hasta 45,21% en las lecturas forward (secuencias utilizadas), mientras que las lecturas reverse debieron ser descartadas por su baja calidad.

Aunque la información del género *Calophoma* es limitado, existen investigaciones que identifican algunas especies de este género como patógenos de plantas, como es el caso de *Calophoma complanata*, *Calophoma rosae* y *Calophoma clematidina*, entre otros. Smith & Cole (1991) ha identificado a *Calophoma clematidina* como causante del marchitamiento foliar de flores grandes y marchitez de *Clematis*, produciendo pudrición nodal o anillamiento del tallo. En Canadá se ha reportado a *Calophoma complanata* como causante del cáncer de Phoma (*Phoma complanata* es sinónimo homotípico de *Calophoma complanata* (Deb et al., 2020)) en cultivos como chiviría, provocando el tizón o marchitamiento de color marrón en las hojas que en casos severos puede conducir a la muerte de las mismas y deriva en un marchitamiento y muerte de los demás tejidos de la planta incluyendo la raíz (Cerkaskas, 2009; Howard et al., 1994), síntomas similares se reportan con *Calophoma rosae* la cual parasita a la familia *Rosaceae* (Chen et al., 2017).

El género *Antrodia*, segundo género de mayor abundancia diferencial en el tratamiento 1 (**Figura 31 y Figura 33**), es conocido por agrupar hongos parásitos, descomponedores de madera, como *Antrodia camphorata*, causantes de la podredumbre parda debido a su capacidad selectiva para degradar celulosa y hemicelulosa (Olsson et al., 2011; Rajala et al., 2012). Este hallazgo es congruente con las muestras de rizósfera del tratamiento 1, ya que fueron extraídas de plantas

marchitas, las cuales probablemente habían iniciado un proceso de descomposición, siendo un ambiente óptimo para microorganismos del género *Antrodia*.

El género *Mortierella*, taxón de mayor abundancia diferencial en el tratamiento 2 (plantas sin síntomas de marchitamiento y tratadas con *Trichoderma* (**Figura 31, Figura 34 y Figura 35**)) alberga especies de importancia agrícola. *Mortierella* incluye hongos promotores del crecimiento vegetal y se encuentran tanto en suelo a granel como rizosférico e incluso en tejidos de las plantas, capaces de incrementar la eficiencia de absorción de nutrientes, mientras apoyan el desempeño de otros microorganismos benéficos (Ozimek & Hanaka, 2020), presentan actividad antimicrobiana y mejoran la tolerancia al estrés de la planta huésped al producir moléculas señalizadoras de defensa conservada, como el ácido araquidónico (Wani et al., 2017). Tagawa et al. (2010) y Xiong et al. (2017) han reportado al género *Mortierella* como importantes antagonistas de patógenos como la sarna de la papa (causada por bacterias del género *Streptomyces*) y la marchitez en vainilla (causada por *Fusarium*), respectivamente. *Mortierella elongata*, la especie de mayor abundancia diferencial en el tratamiento 2, fue reportado por Li et al. (2018) como una especie capaz de degradar sustancias tóxicas, mejorando la salud del suelo y por K. Zhang et al. (2020) como una especie capaz de incrementar la biomasa vegetal. Mientras, *M. humilis* es una especie de hongos saprotófica, común en suelos, especialmente en ambientes con madera descompuesta, debido a su capacidad para degradar celulosa y lignina (Mäkipää et al., 2017; Varnaité et al., 2008), lo cual mejora la actividad biológica de los suelos (Nguyen et al., 2019). Además, se ha visto que tratamientos con *Trichoderma virens* incrementa la abundancia de *Mortierella* en suelos de rizósfera de *Pinus sylvestris* (Halifu et al., 2019), así también, Fu et al. (2020) reportaron en plantaciones de maíz en China, que los suelos tratados con *Trichoderma* mostraron un incremento significativo en la abundancia relativa del género *Mortierella* y otros géneros considerados beneficiosos para el suelo.

Pese a que no se ha reportado el género *Calophoma* en enfermedades de mora de Castilla u otros cultivos en el Ecuador, al estar este taxón presente diferencialmente en el tratamiento 1 (plantas con síntomas de marchitamiento y no tratadas con *Trichoderma*) podría estar asociado a los síntomas encontrados en la planta, este hallazgo es relevante considerando que la especie de mayor abundancia diferencial fue *Calophoma rosae*, el cual parasita a la familia *Rosaceae*, a la cual pertenece *Rubus glaucus*. Por otra parte, es importante recalcar que se observó la presencia en mayor abundancia diferencial del género *Mortierella* en el tratamiento 2 (plantas sin síntomas de marchitamiento y tratadas con *Trichoderma*), género que no fue encontrado en el tratamiento 1, lo que puede indicarnos que el tratamiento de suelos con *Trichoderma* puede incrementar la abundancia de *Mortierella*, como lo han reportado Halifu et al. (2019) y Fu et al. (2020), género de gran importancia en la agricultura.

3.1.1.2. Identificación de variantes sin taxonomía asignada

Al realizar una búsqueda de BLAST con aquellos ASV de mayor abundancia y que no obtuvieron una asignación de Phylum pudo observarse que para el ASV_2 de 272 pares de bases, el cual fue más abundante ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. se alineó con porcentajes de identidad sobre 99.63% al género *Rubus*, el mayor porcentaje de identidad lo logró con *Rubus glaucus*, con una cobertura de consulta del 96%, ya que el alineamiento visto en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., muestra cómo la secuencia se cubre totalmente por el espaciador transcrito 2 y parte del espaciador transcrito 1. Debido a que su alineamiento contó con el 100% de identidad con *Rubus glaucus* y que todos los alineamientos con un alto porcentaje de identidad y cobertura de consulta corresponden a espaciadores internos transcritos 2 de diferentes

especies de *Rubus* ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., lo cual puede esperarse, debido a que el estudio se basa en rizósfera de *Rubus glaucus*.

La búsqueda de BLAST para el ASV_4 de 271 pares de bases ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. se alineó con porcentajes de identidad y cobertura de consulta del 100% con 14 secuencias de espacios internos transcritos que incluyen a especies como *Halochlorella rubescens*, *Scotiellopsis reticulata*, *Scenedesmus sp.*, *Tetradasmus sp.*, *Scotiellopsis sp.* y *Tetradasmus dissociatus*, se muestra el alineamiento con *Scotiellopsis reticulata* FACHB-2317 como ejemplo ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Todas las especies antes mencionadas pertenecen a una de las tres clases de algas verdes de mayor diversidad de especies, la clase Chlorophyceae, perteneciente al Phylum Chlorophyta, los cuales pueden estar presentes en toda clase de ambientes, mientras exista luz y humedad (Fučíková et al., 2019), por lo cual es común encontrar Chlorophyceae no únicamente en agua sino también en suelos, incluso en suelos áridos, como lo reporta Terlova & Lewis (2019).

La búsqueda de BLAST para el ASV_6 de 271 pares de bases ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. se alineó con porcentajes de identidad y cubierta de consulta del 100% con 4 secuencias de espacios internos transcritos que incluyen a especies como *Halochlorella rubescens*, *Scotiellopsis reticulata*, *Scenedesmus dissociatus* y *Uncultured Sphaeropleales*, se muestra el alineamiento con *Halochlorella rubescens* cepa KNUA042 como ejemplo ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Todas pertenecen a la clase Chlorophyceae, del Phylum Chlorophyta.

Los alineamientos antes expuestos, empleando las secuencias ASV_2, ASV_4 y ASV_6 de importancia proporcional significativa (>0.1) no corresponden al reino Fungi y por tanto fueron

excluidas en el estudio de diversidad posterior, así como las secuencias que no tuvieron una asignación de Filo de importancia proporcional no significativa, ya que pueden tratarse de secuencias no pertenecientes al Reino Fungi, por lo que no forman parte de los objetivos de la presente investigación. Este tipo de ASV pese a haberse empleado cebadores del Reino Fungi se presentan debido a que tanto plantas como algas poseen espacios transcritos internos

Capítulo V. Conclusiones

La investigación actual presenta una exploración inicial del efecto del tratamiento con *Trichoderma* spp. sobre las poblaciones microbianas fúngicas de la rizósfera de cultivos de mora de Castilla (*Rubus glaucus*).

Se estimaron las diversidades taxonómicas, a partir de índices de diversidad alfa, e indicadores de la diversidad beta entre tratamientos, encontrándose que existe diferencia significativa ($p \approx 0, \alpha = 0.05$) en la diversidad alfa entre los tratamientos con y sin *Trichoderma*, siendo superior en el tratamiento con *Trichoderma* y no existe diferencia significativa en la diversidad beta ($\Pr(> \mathbf{F}) = 0.1, \alpha = 0.05$) entre los tratamientos con y sin *Trichoderma*.

El análisis de abundancia diferencial realizado permitió identificar a los taxones de mayor abundancia diferencial ($\alpha = 0.001$) para cada tratamiento, encontrándose a los géneros *Calophoma* y *Antrodia* en el tratamiento 1 (plantas marchitas no tratadas con *Trichoderma*), miembros de los phylum Ascomycota y Basidiomycota, respectivamente; y al género *Mortierella* en el tratamiento 2 (plantas no marchitas tratadas con *Trichoderma*), perteneciente al phylum Mortierellomycota.

No se encontró evidencia de la presencia de algunos ascomicetos de importancia para el presente estudio, tales como *Trichoderma*, y/o hongos patógenos de relevancia para los cultivos de *Rubus glaucus* en el Ecuador en ninguno de los tratamientos, como *Botrytis cinerea*, causante del moho gris o pudrición blanda; *Dactylonectria* e *Ilyonectria* causantes de la enfermedad del pie negro; y ascomicetos del orden Erysiphales, causantes del mildiu polvoso.

El presente estudio encontró un potencial patógeno de *Rubus glaucus*, *Calophoma rosae*, relacionado con la marchitez en plantas de la familia Rosaceae, el cual ha sido poco estudiado y no se ha identificado aún en cultivos del Ecuador.

El presente estudio encontró al género *Mortierella* como taxón de abundancia diferencial en muestras de suelo tratadas con *Trichoderma*, el cual puede ser un componente clave en la salud de los suelos tratados con *Trichoderma*.

Las variantes (ASV) sin taxonomía asignada en el reino Fungi y de mayor abundancia relativa correspondieron a secuencias del espaciador transcrito de *Rubus glaucus* y de algas verdes de la clase Chlorophyceae, phylum Chlorophyta.

Capítulo VI. Recomendaciones

El análisis del microbioma se ve afectado por las condiciones experimentales y por los análisis posteriores computacionales, por lo que, para obtener conclusiones más ajustadas a la diversidad y abundancia microbiana real en las poblaciones de interés se recomienda que:

- Se aplique un muestreo significativo y aleatoriamente con un mayor número de tratamientos, que permita mejorar la estimación de variabilidad en los datos, lo que permitirá la identificación de señales biológicas débiles y disminuirá significativamente falsas interpretaciones y sesgos en los resultados.
- Se realicen estudios longitudinales, que permitan contemplar un mayor número de factores y efectos, lo que mejoraría la robustez de las conclusiones.
- Se emplee un kit de purificación de ADN, que permita lograr muestras de óptima pureza, de tal modo que los posibles contaminantes no puedan interferir en las reacciones de secuenciación.
- Se empleen varios juegos de cebadores con distintos objetivos en la secuencia, que pueden implicar diferentes genes, lo que permitirá disminuir sesgos en la amplificación de ciertos microorganismos.
- Se realice la secuenciación de las mismas muestras en diferentes laboratorios o cambiando librerías, ya que variaciones en las metodologías de secuenciación

podrían inducir a sesgos y podría estimarse si existe variabilidad significativa en los resultados de secuenciación.

- Se recomienda emplear otras técnicas de secuenciación, como secuenciación de una única molécula de ADN, que no requiere amplificación por PCR y por lo tanto reduce el sesgo en este paso.

Se recomienda que se investigue más acerca de *Calophoma rosae*, para determinar si esta especie poco descrita está relacionada con síntomas los de marchitez en *Rubus glaucus* en los suelos del Ecuador.

Se recomienda que se estudie más sobre el género *Mortierella* y los mecanismos que pueden influir en la mejora de la calidad de suelos cultivables en el Ecuador.

Para lograr una mejor comprensión de las relaciones entre la diversidad microbiana y las funciones del suelo se recomienda realizar un análisis de alta resolución para detectar células microbianas activas e inactivas en la rizósfera.

Capítulo VII. Apéndices

Capítulo VII. Bibliografía

Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R. H., & Kõljalg, U. (2020).

UNITE general FASTA release for Fungi 2. *UNITE Community*.

<https://plutof.ut.ee/#/doi/10.15156/BIO/786369>

Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D.,

Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H.,

Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy

platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update.

Nucleic Acids Research, 46(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY379>

Aitchison, J., & Egozcue, J. (2005). Compositional Data Analysis: Where Are We and Where Should

We Be Heading? *Mathematical Geology* 2005 37:7, 37(7), 829–850.

<https://doi.org/10.1007/S11004-005-7383-7>

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection

of Individual Microbial Cells without Cultivation. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 59(1), 143–169.

<http://mibr.asm.org/>

Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome*

Biology 2010 11:10, 11(10), 1–12. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-10-R106>

Arias, S. M., Álvarez, G. E. G., & Patiño, P. A. G. (2020). Diagrammatic scale for measuring severity of

gray mould in thornless Castilla blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Ciência Rural*, 50(11), 1–7.

<https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20190859>

Arozarena, Í., Ortiz, J., Hermosín-Gutiérrez, I., Urretavizcaya, I., Salvatierra, S., Córdova, I., Marín-

Arroyo, M. R., Noriega, M. J., & Navarro, M. (2012). Color, Ellagitannins, Anthocyanins, and

Antioxidant Activity of Andean Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) Wines. *Agricultural and Food*

Chemistry, 7463–7473. <https://doi.org/10.1021/jf300924z>

Babraham Institute. (2020, January 15). *Babraham Bioinformatics - FastQC Una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento.*

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>

Baker, Gillian C., Gaffar, S., Cowan, D. A., & Suharto, A. R. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1), 103–109.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10700.x>

Baker, R., Elad, Y., & Chet, I. (1984). *The Controlled Experiment in the Scientific Method with Special Emphasis on Biological Control.* 1019–1021.

Banco Nacional de ADN. (2020). *PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN*
PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN. [https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite CIT- QC PF Saint-](https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-QC%20PF%20Saint-)

Barth, M., Zhou, C., Mercier, J., & Payne, F. (1995). Ozone Storage Effects on Anthocyanin Content and Fungal Growth in Blackberries. *Journal of Food Science*, 60(6), 1286–1288.

<https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1995.TB04575.X>

Bartscht, K., Cypionka, H., & Overmann, J. (1999). Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3), 249–

259. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00580.x>

Beeck, M. Op De, Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies.

PLOS ONE, 9(6), e97629. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0097629>

- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Benhamou, N., & Chet, I. (1993). *Hyphal Interactions Between Trichoderma harzianum and Rhizoctonia solani: Ultrastructure and Gold Cytochemistry of the Mycoparasitic Process*. 1062–1071.
- Benítez, E. (2019). *Caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de castilla (Rubus glaucus Benth), tratadas y no tratadas con Trichoderma spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro*. [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/20456/T-ESPE-039280.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. P. (2000). Revisión Factores de patogenicidad de Botrytis cinerea. *Revista Iberoamericana de Micología*, *17*, 43–46.
- Bent, A. F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, *45*(1), 399–436. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427>
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2005). Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8), 4203–4213. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4203-4213.2005>
- Berry, M., White, J., Davis, T., Jain, S., Johengen, T., Dick, G., Sarnelle, O., & Denef, V. (2017). Are Oligotypes Meaningful Ecological and Phylogenetic Units? A Case Study of Microcystis in Freshwater Lakes. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00365>

- Bharti, R., & Grimm, D. G. (2021). Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 22(1), 178–193. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBZ155>
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma* . II. Infrageneric classification . *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357–2372. <https://doi.org/10.1139/b91-297>
- Botero, M., Ríos, G., Franco, G., Romero, M., Pérez, J., Morales, J., Gallego, J., & Echeverry, D. (2002). *Identificación y espacialización de enfermedades asociadas a los cultivos de mora (Rubus glaucus Benth), en el eje cafetero*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/21302>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 2017 11:12, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3869>
- Callahan, B., McMurdie, J., & Holmes, S. (2020, April 8). *Introduction to dada2*. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS>
- Calle, M. L. (2019). Statistical Analysis of Metagenomics Data. *Genomics & Informatics*, 17(1). <https://doi.org/10.5808/GI.2019.17.1.E6>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pěa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010, May). *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F.303>
- Carlucci, A., Lops, F., Mostert, L., Halleen, F., & Raimondo, M. L. (2017). Occurrence fungi causing

- black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(1), 10–39. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18769
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castaño, J., & Arango, R. (2008). CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL, MANZANO Y MORA. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 32(January), 145–156. https://www.researchgate.net/profile/Jairo_Zapata/publication/257652278_Caracterizacion_d_el_Agente_Causal_de_la_Antracnosis_en_Tomate_de_Arbol_Manzano_y_Mora/links/5501dd650cf24cee39fad77d/Caracterizacion-del-Agente-Causal-de-la-Antracnosis-en-Tomate-de-A
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Pino, H., & Espinoza, W. (2004). *Cylindrocarpon destructans* VAR. *destructans* AND *Neonectria discophora* VAR. *rubi* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT ROT ON BLACKBERRY (*Rubus glaucus* BENTH.) IN MÉRIDA, VENEZUELA. *Asociación Interciencia Caracas*, 29(8), 455–460. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909509>
- Cerkauskas, R. F. (2009). Phoma canker severity and yield losses in parsnip. <https://doi.org/10.1080/07060668709501863>, 9(4), 311–318. <https://doi.org/10.1080/07060668709501863>
- Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., & Baker, R. (1986). Increased Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 70(2), 148. <https://doi.org/10.1094/pd-70-145>
- Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, 87, 105–159. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2017.06.002>
- Chugh, J. K., & Wallace, B. A. (2001). *Peptaibols : models for ion channels*. 565–570.

www.cryst.bbk.ac.uk

- Chutrakul, C., Alcocer, M., Bailey, K., & Peberdy, J. F. (2008). The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chemistry and Biodiversity*, *5*(9), 1694–1706. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890158>
- Clooney, A. G., Fouhy, F., Sleator, R. D., Driscoll, A. O., Stanton, C., Cotter, P. D., & Claesson, M. J. (2016). Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. *PLOS ONE*, *11*(2), e0148028. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0148028>
- Corcoll, N., Österlund, T., Sinclair, L., Eiler, A., Kristiansson, E., Backhaus, T., & Eriksson, K. M. (2017). *Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing.*
- Dahllöf, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), 3376–3380. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3376-3380.2000>
- De Liphay, J. R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., & Sørensen, S. J. (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, *36*(10), 1607–1614. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.011>
- De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., & Hebbbar, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, *46*(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.010>
- De Tender, C., Schlundt, C., Devriese, L. I., Mincer, T. J., Zettler, E. R., & Amaral-Zettler, L. A. (2017). Analytical Methods A review of microscopy and comparative molecular-based methods to

characterize “Plastisphere” communities. *Analytical Methods*, 8, 11.

<https://doi.org/10.1039/C7AY00260B>

Deb, D., Khan, A., & Dey, N. (2020). Phoma diseases: Epidemiology and control. *Plant Pathology*, 69(7), 1203–1217. <https://doi.org/10.1111/PPA.13221>

Delgado Alcaide, M. (2015). MODELO DE REGRESIÓN BINOMIAL NEGATIVA [Universidad de Sevilla]. In *Universidad de Sevilla*. [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/40815/Alcaide Delgado Mario TFG.pdf?sequence=1](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/40815/Alcaide%20Delgado%20Mario%20TFG.pdf?sequence=1)

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. . *Annals of Microbiology*, 64(3), 363–369. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80050-5)

Druzhinina, I., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B., Kenerley, C., Monte, E., Mukherjee, P., Zeilinger, S., Grigoriev, I., & Kubicek, C. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(10), 749–759.

<https://doi.org/10.1038/NRMICRO2637>

Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21), 3476–3482.

<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV401>

Edger, P. P., Tang, M., Bird, K. A., Mayfield, D. R., Conant, G., Mummenhoff, K., Koch, M. A., & Pires, J. C. (2014). Secondary Structure Analyses of the Nuclear rRNA Internal Transcribed Spacers and Assessment of Its Phylogenetic Utility across the Brassicaceae (Mustards). *PLOS ONE*, 9(7), e101341. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0101341>

Eren, A., Borisy, G., Huse, S., & Mark Welch, M. (2014). Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1409644111>

Eren, A. M., Maignien, L., Sul, W. J., Murphy, L. G., Grim, S. L., Morrison, H. G., & Sogin, M. L. (2013).

Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data.

Methods in Ecology and Evolution, 4(12), 1111–1119. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12114>

Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015).

Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal*, 9, 968–979.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195>

Eren, A. M., Sogin, M. L., & Maignien, L. (2016). Editorial: New Insights into Microbial Ecology through Subtle Nucleotide Variation. *Frontiers in Microbiology*, 0(AUG), 1318.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01318>

Espín, W. (2010). *PREVENCIÓN DE OIDIO (Oidium sp.) EN EL CULTIVO ESTABLECIDO DE MORA (Rubus glaucus Benth) MEDIANTE EL EMPLEO DE INMUNIZADORES*. [UNIVERSIDAD TÉCNICA DE UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO].

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/4324/1/Tesis-47agr.pdf>

Espinoza, C. (2019, October). *Similitud de Comunidades biológicas*. Similitud de Comunidades Biológicas. <https://ciespinosa.github.io/Similitud/distancias-entre-sitios.html#distancia-bray-curtis>

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048.

<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW354>

Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews*.

Microbiology, 10(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2832>

Ferro, S. A. (2008). *Caracterización y control de Cylindrocarpon spp. agente causal del pie negro de la vid*.

- Filippis, F. De, Laiola, M., Blaiotta, G., & Ercolini, D. (2017). Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17).
<https://doi.org/10.1128/AEM.00905-17>
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). Proactive control of petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease*, 88(11), 1241–1245.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1241>
- Fourie, P., Halleen, F., Van Der Vyver, J., & Schreuder, W. (2001). *Effect of Trichoderma treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery*. 473–478.
<https://sci-hub.se/http://fupress.net/index.php/pm/article/download/1619/1554>
- Fu, J., Xiao, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Yang, K. (2020). *Trichoderma asperellum* improves soil microenvironment in different growth stages and yield of maize in saline-alkaline soil of the Songnen Plain Citation. *Plant, Soil and Environment*, 639–647.
<https://doi.org/10.17221/456/2020-PSE>
- Fučíková, K., Lewis, P. O., Neupane, S., Karol, K. G., & Lewis, L. A. (2019). Order, please! Uncertainty in the ordinal-level classification of Chlorophyceae. *PeerJ*, 7(5), e6899.
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.6899>
- Fundación Botánica de los Andes. (2019). *Plantas Nativas de la Hoya de Quito*.
<http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/emblematicas/1-rubus-glaucus>
- Gao, P., Qin, J., Li, D., & Zhou, S. (2018). Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 13(1), e0190932. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190932>
- Global Biodiversity Information Facility. (2021, June). *Oidium Link*.
<https://www.gbif.org/es/species/7975765>
- Gomes, N. C. M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L., & Smalla,

- K. (2003). Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3758. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3758-3766.2003>
- Gómez, B., & Guerrero, A. (2020). *Bioinformática microbiana - 2. Limpieza de lecturas*. <https://sites.google.com/a/ciad.mx/bioinformatica/home/genomica/limpieza-de-lecturas>
- Gorissen, A., Tietema, A., Joosten, N. N., Estiarte, M., Peñuelas, J., Sowerby, A., Emmett, B. A., & Beier, C. (2004). Climate change affects carbon allocation to the soil in shrublands. *Ecosystems*, 7(6), 650–661. <https://doi.org/10.1007/S10021-004-0218-4>
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407), 1476–1481. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1476>
- Gunata, Y., Bayonove, C., Baumes, R., & Cordonnier, R. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Chromatography*, 331, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., De La Cruz, V. F., Waters, A. P., & McCutchan, T. F. (1987). Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in plasmodium. *Science*, 238(4829), 933–937. <https://doi.org/10.1126/science.3672135>
- Hadwiger, L. A., & Beckman, J. M. (1980). Chitosan as a Component of Pea-Fusarium solani Interactions. *Plant Physiology*, 66(2), 205. <https://doi.org/10.1104/PP.66.2.205>
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of Two Trichoderma Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of Pinus sylvestris var. mongolica Annual Seedlings. *Forests 2019, Vol. 10, Page 758, 10(9)*, 758. <https://doi.org/10.3390/F10090758>
- Halleen, F., Schroers, H.-J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., & Si, H. S. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). In *STUDIES IN MYCOLOGY* (Vol. 50).

- Harman, G., & Björkman, T. (1998). *Potential and existing uses of Trichoderma and Gliocladium for plant disease control and plant growth enhancement* (pp. 229–265).
https://www.researchgate.net/publication/278018604_Potential_and_existing_uses_of_Trichoderma_and_Gliocladium_for_plant_disease_control_and_plant_growth_enhancement
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, *84*(4), 377–393.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>
- Harman, Gary E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43–56.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hein, J. W., Wolfe, G. V., & Blee, K. A. (2007). Comparison of Rhizosphere Bacterial Communities in *Arabidopsis thaliana* Mutants for Systemic Acquired Resistance. *Microbial Ecology* *2007* *55*:2, *55*(2), 333–343. <https://doi.org/10.1007/S00248-007-9279-1>
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2014). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma*. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 125–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, *52*(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.06.003>
- Hincapié, O., Saldarriaga, A., & Díaz, C. (2017). Biological, botanical and chemical alternatives for the control of blackberry (*Rubus glaucus* benth.) diseases. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *70*(2), 8169–8176. <https://doi.org/10.15446/rfna.v70n2.64521>
- Hoeberichts, F. A., Ten Have, A., & Woltering, E. J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*, *217*(3),

517–522. <https://doi.org/10.1007/S00425-003-1049-9>

Howard, R. J., Allan, J., & Seaman, W. L. (1994). *Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada. The Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada.*

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. In *Plant Disease* (Vol. 87, Issue 1, pp. 4–10). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>

Hückelhoven, R., & Panstruga, R. (2011). Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 738–746. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2011.08.002>

Illumina. (2014, April 2). *Intro to Sequencing by Synthesis: Industry-leading Data Quality - YouTube.* <https://www.youtube.com/embed/HMyCqWhwB8E?iframe&rel=0&autoplay=1>

Jaulneau, V., Lafitte, C., Corio-Costet, M. F., Stadnik, M. J., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M. T., & Dumas, B. (2011). An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 131(3), 393–401. <https://doi.org/10.1007/S10658-011-9816-0>

Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and blackberries : their breeding, diseases and growth.* Academic Press.

Khosla, C. (2009). Structures and mechanisms of polyketide synthases. In *Journal of Organic Chemistry* (Vol. 74, Issue 17, pp. 6416–6420). <https://doi.org/10.1021/jo9012089>

Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. In *Crop Protection* (Vol. 35, pp. 64–70). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>

Kim, J. G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1071–1087. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1071>

- Kopylova, E., Navas-Molina, J. A., Mercier, C., Xu, Z. Z., Mahé, F., He, Y., Zhou, H.-W., Rognes, T., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2016). Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art. *MSystems*, *1*(1). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00003-15>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, *12*(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E. F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Kuč, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, *107*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1023/A:1008718824105>
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Angulo, Y. (2017). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, *21*, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.01.009>
- Kume, T., Nagasawa, N., & Yoshii, F. (2002). Utilization of carbohydrates by radiation processing. *Radiation Physics and Chemistry*, *63*(3–6), 625–627. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00558-8](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00558-8)
- La Hora. (2018a). *Producción de mora un potencial en Tungurahua*. <https://lahora.com.ec/tungurahua/noticia/1102187169/produccion-de-mora-un-potencial-en->

tungurahua-

La Hora. (2018b). *Se prepara Congreso Provincial de mora*. 4. <https://www.pressreader.com/>

Labastidas, A. (2019, March 8). *Análisis de datos de Secuenciación Masiva de ADN (Aurora Labastida)*

- *YouTube*. <https://www.youtube.com/watch?v=yIxVS0H1nFI&t=1013s>

Lahti, L., Shetty, S., Ernst, F., Huang, R., Borman, T., Braccia, D. C., & Corrada Bravo, H. (2021).

Comparaciones grupales de la composición del microbioma. Microbiome.

<https://microbiome.github.io/tutorials/PERMANOVA.html>

Lakshmanan, V., Ray, P., & Craven, K. D. (2017). Rhizosphere sampling protocols for microbiome

(16S/18S/ITS rRNA) library preparation and enrichment for the isolation of drought tolerance-promoting microbes. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1631, pp. 349–362). Humana Press

Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7136-7_23

Lande, R. (1996). Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple

Communities. *Oikos*, 76(1), 5. <https://doi.org/10.2307/3545743>

Lande, R., DeVries, P. J., & Walla, T. R. (2000). When species accumulation curves intersect:

Implications for ranking diversity using small samples. *Oikos*, 89(3), 601–605.

<https://doi.org/10.1034/J.1600-0706.2000.890320.X>

Latorre, B., & Rioja, M. E. (2001, January). (PDF) *Eficacia de los Tratamientos Fungicidas para el*

Control de Botrytis Cinerea de la Vid en Función de la Época de Aplicación.

[https://www.researchgate.net/publication/28136227_Eficacia_de_los_Tratamientos_Fungicidas](https://www.researchgate.net/publication/28136227_Eficacia_de_los_Tratamientos_Fungicidas_para_el_Control_de_Botrytis_Cinerea_de_la_Vid_en_Funcion_de_la_Epoca_de_Aplicacion)

[as_para_el_Control_de_Botrytis_Cinerea_de_la_Vid_en_Funcion_de_la_Epoca_de_Aplicacion](https://www.researchgate.net/publication/28136227_Eficacia_de_los_Tratamientos_Fungicidas_para_el_Control_de_Botrytis_Cinerea_de_la_Vid_en_Funcion_de_la_Epoca_de_Aplicacion)

Lee, M. (2019). Happy Belly Bioinformatics: an open-source resource dedicated to helping biologists

utilize bioinformatics. *Journal of Open Source Education*, 2(19), 53.

<https://doi.org/10.21105/JOSE.00053>

Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., & Li, W. (2018). Mortierella

elongata's roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degradation & Development*, 29(6), 1642–1651. <https://doi.org/10.1002/LDR.2965>

Lloyd, K. G., Steen, A. D., Ladau, J., Yin, J., & Crosby, L. (2018). Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *MSystems*, 3(5).
<https://doi.org/10.1128/msystems.00055-18>

Lo, C. T., Nelson, E. B., & Harman, G. E. (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 80(7), 736–741.
<https://doi.org/10.1094/PD-80-0736>

Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2010). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* 2011 5:2, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>

Luan, Le Q., Ha, V. T. T., Nagasawa, N., Kume, T., Yoshii, F., & Nakanishi, T. M. (2005). Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41(1), 49. <https://doi.org/10.1042/ba20030219>

Luan, Le Quang, & Xo, D. H. (2018). In vitro and in vivo fungicidal effects of γ -irradiation synthesized silver nanoparticles against *Phytophthora capsici* causing the foot rot disease on pepper plant. *Journal of Plant Pathology*, 100(2), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0064-4>

Luo, A., Bai, J., Li, R., Fang, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, L., Liang, J., Huang, T., & Kou, L. (2019). Effects of ozone treatment on the quality of kiwifruit during postharvest storage affected by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Journal of Phytopathology*, 167(7–8), 470–478.
<https://doi.org/10.1111/JPH.12819>

- Mäkipää, R., Rajala, T., Schigel, D., Rinne, K. T., Pennanen, T., Abrego, N., & Ovaskainen, O. (2017). Interactions between soil- and dead wood-inhabiting fungal communities during the decay of Norway spruce logs. *The ISME Journal* 2017 11:9, 11(9), 1964–1974.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.57>
- Martin, F. (2013). The Ecological Genomics of Fungi. In *The Ecological Genomics of Fungi*. Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118735893>
- Martínez, A., Vásquez C., W., Viteri D., P., Ochoa L., J., Villacrés, M., & Ayala, G. (2000). Manejo de enfermedades e insectos plaga de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Repositorio Digital INIAP*, 1. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3318>
- Martínez, A., Villacís, L., Viera, W., Jácome, R., Espín, M., León, O., & Santana, R. (2019). Evaluación de nuevas tecnologías de producción limpia de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), en la zona Andina de Ecuador, para un buen vivir de los fruticultores. *SciELO*, 7(1).
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592019000100007&lng=es&nrm=iso
- McElroy, K., Zagordi, O., Bull, R., Luciani, F., & Beerenwinkel, N. (2013). Accurate single nucleotide variant detection in viral populations by combining probabilistic clustering with a statistical test of strand bias. *BMC Genomics* 2013 14:1, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-501>
- McMurdie, P., & Holmes, S. (2021, May 19). *phyloseq Frequently Asked Questions (FAQ)*. Bioconductor.
<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/phyloseq/inst/doc/phyloseq-FAQ.html#should-i-normalize-my-data-before-alpha-diversity-analysis>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Computational Biology*, 10(4), e1003531.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1003531>

Menardo, F., Praz, C. R., Wyder, S., Ben-David, R., Bourras, S., Matsumae, H., McNally, K. E., Parlange, F., Riba, A., Roffler, S., Schaefer, L. K., Shimizu, K. K., Valenti, L., Zbinden, H., Wicker, T., & Keller, B. (2016). Hybridization of powdery mildew strains gives rise to pathogens on novel agricultural crop species. *Nature Genetics*, *48*(2), 201–205.

<https://doi.org/10.1038/NG.3485>

Meteoblue. (2021). *Clima Píllaro - meteoblue*.

https://www.meteoblue.com/es/tiempo/historyclimate/climatemodelled/pillaro_ecuador_3653159

Mettler Toledo. (2020, October 10). *Targeted Enrichment & Mutation Analysis using Illumina Sequencing Platform (Short Reads ~300 bps)*. BIOCHEMISTRY, BIOMEDICINE & PHARMACEUTICS. <https://www.medicalbiochemist.com/2020/10/target-enrichment-mutation-analysis-miseq.html>

Mettler Toledo. (2021). *260/280 Ratio | 260/230 Ratio | DNA Analysis by Spectroscopy*.

<https://www.mt.com/es/es/home/library/applications/lab-analytical-instruments/Uv-vis-dna-analysis.html>

Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Engineering Reviews*, *5*(2), 77–106.

<https://doi.org/10.1007/S12393-013-9064-5>

Monroy, D., Cardona, W., García, M., & Bolaños, M. (2019). Relationship between variable doses of N, P, K and Ca and the physicochemical and proximal characteristics of andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Scientia Horticulturae*, *256*.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.055>

Moret, A., Muñoz, Z., & Garcés, S. (2009). CONTROL OF POWDERY MILDEW ON CUCUMBER

COTYLEDONS BY CHITOSAN. *Journal of Plant Pathology*, 2, 375–380.

<http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0209/020912.pdf>

Mulaw, T. B., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Atanasova, L. (2013). Novel endophytic trichoderma spp. isolated from healthy coffea arabica roots are capable of controlling coffee tracheomyces. *Diversity*, 5(4), 750–766. <https://doi.org/10.3390/d5040750>

Neefs, J.-M., Van De Peer, Y., Hendriks, L., & De Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *PMC*, 18, 2237–2317.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC331875/>

Neufeld, J. D., & Mohn, W. W. (2006). Assessment of Microbial Phylogenetic Diversity Based on Environmental Nucleic Acids. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes* (pp. 219–259). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-31292-5_7

Nguyen, T. T. T., Park, S. W., Pangging, M., & Lee, H. B. (2019). Molecular and Morphological Confirmation of Three Undescribed Species of Mortierella from Korea.

<https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1551854>, 47(1), 31–39.

<https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1551854>

O’Geen, A. (2013). *Soil Water Dynamics | Learn Science at Scitable*. The Nature Education Knowledge Project . <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/soil-water-dynamics-103089121/>

Olsson, J., Jonsson, B. G., Hjältén, J., & Ericson, L. (2011). Addition of coarse woody debris - The early fungal succession on Picea abies logs in managed forests and reserves. *Biological Conservation*, 144(3), 1100–1110. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2010.12.029>

Osorio, C., Hurtado, N., Corinna, D., Hofmann, T., Heredia, F., & Morales, A. (2012). Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus*

glaucus Benth.) fruits. *Food Chemistry*, 1915–1921.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.026>

Ozimek, E., & Hanaka, A. (2020). Mortierella Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. *Agriculture 2021*, Vol. 11, Page 7, 11(1), 7.

<https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11010007>

PacBio. (2021, May 10). *Sequencing 101: DNA Extraction – Tips, Kits, & Protocols - PacBio*. PACBIO.

<https://www.pacb.com/blog/sequencing-101-dna-extraction/>

Pal, K K, & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *Biological Control*.

<https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

Pal, Kamal Krishna, & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. *Biological Control*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

Pașca, M., Cojocariu, L., Marinel, H., Bordean, D.-M., Nica, D., Marioara Nicoleta, F., Iosif, G., & Breica Borozan, A. (2012). CHANGES IN THE STRUCTURE OF ACTINOMYCETE POPULATIONS IN THE RHIZOSPHERE OF VICIA SATIVA SPECIES. *Review on Agriculture and Rural Development*, 1, 352–357.

Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Woo, S. L., & Lorito, M. (2017). Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>

PDyOT. (2014). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN SANTIAGO DE PILLARO*.

Persoon, C. H. (1794). Dispositio methodica fungorum. *Neues Magazin Für Die Botanik*, 1, 81–128.

Petrolli, R., Vieira, C. A., Jakalski, M., Bocayuva, M. F., Vallé, C., Cruz, E. D. S., Selosse, M.-A., Martos, F., & Kasuya, M. C. M. (2021). A fine-scale spatial analysis of fungal communities on tropical tree bark unveils the epiphytic rhizosphere in orchids. *New Phytologist*, 231(5), 2002–2014.

<https://doi.org/10.1111/NPH.17459>

Piekkielek, W. P., & Fox, R. H. . (1992). Use of a Chlorophyll Meter to Predict Sidedress Nitrogen.

Agronomy Journal, 84(1), 65. <https://doi.org/10.2134/agronj1992.00021962008400010013x>

Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. *Journal of Science and Research*, 6.

<https://doi.org/10.5281/ZENODO.4917695>

Pinhassi, J., Zweifel, U. L., & Hagstro, Å. (1997). Dominant Marine Bacterioplankton Species Found among Colony-Forming Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 63(9),

3359–3366. <https://aem.asm.org/content/aem/63/9/3359.full.pdf>

Pla, L. (2006, August). *Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza*. SciELO.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008

Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W. J. G. M., Liu, W., Lu, T., Hu, B., Chen, J., Chen, J., Lin, Z., & Qian, H.

(2020). Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5024–5038.

<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.0C00073>

Quinatoa, N. (2015). *EVALUACIÓN DEL CONTROL DE BOTRYTIS (Botrytis cinérea) EN EL CULTIVO DE*

MORA (Rubus glaucus Benth) MEDIANTE EL USO DE TRICHODERMA Y EMAS EN LA COMUNIDAD DE MISQUILLÍ DE LA PARROQUIA SANTA ROSA, PROVINCIA DE TUNGURAHUA

[Universidad Técnica de Ambato].

[https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18281/1/Tesis-108](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18281/1/Tesis-108%20Ingeniería) Ingeniería

Agronómica -CD 352.pdf

Rajala, T., Peltoniemi, M., Pennanen, T., & Mäkipää, R. (2012). Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal

forests. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(2), 494–505. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2012.01376.X>

Rebuffat, S., Duclouhier, H., Auvin-Guette, C., Molle, G., Spach, G., & Bodo, B. (1992). Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V. *FEMS Microbiology Letters*, 105(1–3), 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05886.x>

Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., & Philips, A. (2000). *Involvement of Phaeoacremonium spp. and Cylindrocarpon destructans with grapevine decline in Portugal*. 76–79. https://www.researchgate.net/publication/282493844_Involvement_of_Phaeoacremonium_spp_and_Cylindrocarpon_destructans_with_grapevine_decline_in_Portugal

Ribera, A. (2007). *EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA ESPECIE QUILLAJA SAPONARIA MOL. CULTIVADA IN VITRO EN BOTRYTIS CINEREA PERS.* - PDF Descargar libre [Universidad de la Frontera]. <https://docplayer.es/207854945-Evaluacion-y-caracterizacion-de-la-actividad-antifungica-de-la-especie-quillaja-saponaria-mol-cultivada-in-vitro-en-botrytis-cinerea-pers.html>

Rideout, J. R., He, Y., Navas-Molina, J. A., Walters, W. A., Ursell, L. K., Gibbons, S. M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J. C., Gilbert, J. A., Huse, S. M., Zhou, H.-W., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2014). Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ*, 2(1), e545. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.545>

Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica | Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *ELSEVIER*, 22(4), 238–245. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28->

articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055

- Romero J., C. A., & Yépez V., B. D. (2015). Ultrasound as pretreatment to convective drying of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.06.011>
- Rosen, M., Davison, M., Bhaya, D., & Fisher, D. (2015). Microbial diversity. Fine-scale diversity and extensive recombination in a quasisexual bacterial population occupying a broad niche. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6238), 1019–1023. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA4456>
- Rosen, M. J., Callahan, B. J., Fisher, D. S., & Holmes, S. P. (2012). Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC Bioinformatics* 2012 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-283>
- Saldarriaga, A., Germán, C., Cipriano, F., Díaz Diez, A., Emilia, G., & Uribe, M. (2017). *Manual de campo para reconocimiento, monitoreo y manejo de las enfermedades de la mora (Rubus glaucus Benth.)*. www.corpoica.org.co
- Salinas, J., Warnaar, F., & Verhoeff, K. (1986). Production of Cutin Hydrolyzing Enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Phytopathology*, 116(4), 299–307. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0434.1986.TB00924.X>
- Samuels, G. J. (1996). Trichoderma: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Sánchez, J., Iturralde, P., Koch, A., Tello, C., Martínez, D., Proaño, N., Martínez, A., Viera, W., Ayala, L., & Flores, F. (2019). *Dactylonectria* and *Ilyonectria* Species Causing Black Foot Disease of Andean Blackberry (*Rubus Glaucus* Benth) in Ecuador. *MDPI*, 11(11), 218. <https://doi.org/10.3390/d11110218>
- Saravanakumar, K., Li, Y., Yu, C., Wang, Q. Q., Wang, M., Sun, J., Gao, J. X., & Chen, J. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium Stalk*

- rot. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01680-w>
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., & Chen, J. (2016). Synergistic effect of Trichoderma-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Scheck, H., Vasquez, S., Fogle, D., & Gubler, W. D. (1998). Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture*, 52(4), 19–23. <https://doi.org/10.3733/ca.v052n04p19>
- Schillmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.008>
- Seifert, K. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9(SUPPL. 1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/J.1755-0998.2009.02635.X>
- SENAE. (2019). *Exportaciones – Servicio Nacional de Aduana del Ecuador*. <https://www.aduana.gob.ec/exportaciones/>
- Severin, A., Chudalayandi, S., Masonbrink, R. E., Sayadi, M., Seetharam, A. S., Chang, J., & Menon, S. (2021). *Metagenomics - Bioinformatics Workbook*. <https://bioinformaticsworkbook.org/dataAnalysis/Metagenomics/Dada2.html#gsc.tab=0>
- Sharma, V., & Salwal, R. (2017). *Molecular Markers and Their Use in Taxonomic Characterization of Trichoderma spp* (pp. 37–52). https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4_2
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., & Doucette, C. (2009). Effects of ozone treatment on botrytis cinerea and sclerotinia sclerotiorum in relation to horticultural product quality. *Journal of Food Science*, 74(6). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2009.01234.X>
- Shi, M., Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., Sun, C. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., & Zhang, Y. Z. (2012). Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce

programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology*, 158(1), 166–175.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.052670-0>

Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 21–43.

<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>

Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Osorio, C., & Schieberle, P. (2013). Quantitation of the odour-active compounds in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) fruit using the molecular sensory approach. *European Food Research and Technology*, 236(2), 373–378. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1883-8>

Smith, G. R., & Cole, A. L. J. (1991). *Phoma clematidina*, causal agent of leafspot and wilt of Clematis in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 1991 20:2, 20(2), 67–72.

<https://doi.org/10.1071/APP9910067>

Somerfield, P. J., Clarke, K. R., Warwick, R. M., & Dulvy, N. K. (2008). Average functional distinctness as a measure of the composition of assemblages. *ICES Journal of Marine Science*, 65(8), 1462–1468. <https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FSN118>

Steen, A. D., Crits-Christoph, A., Carini, P., DeAngelis, K. M., Fierer, N., Lloyd, K. G., & Cameron Thrash, J. (2019). High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME Journal*, 13(12), 3126–3130. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0484-y>

Stevanović, M., Vojvodić, M., Kovačević, S., Aleksić, G., Živković, S., & Bulajić, A. (2021). First report of powdery mildew of blackberry caused by *podosphaera aphanis* in Serbia. *Plant Disease*, 105(2), 503. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1171-PDN>

Streb, P., Schaub, H., & Feierabend, J. (1996). Latent Oxidative Stress Responses of Ozone-Fumigated Cucumber Plants Are Enhanced by Simultaneous Cold Exposures. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 51(5–6), 355–362. <https://doi.org/10.1515/ZNC-1996-5-612>

- Stummer, B. E., Francis, I. L., Zanker, T., Lattey, K. A., & Scott, E. S. (2005). Effects of powdery mildew on the sensory properties and composition of Chardonnay juice and wine when grape sugar ripeness is standardised. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 66–76.
<https://doi.org/10.1111/J.1755-0238.2005.TB00280.X>
- Tagawa, M., Tamaki, H., Manome, A., Koyama, O., & Kamagata, Y. (2010). Isolation and characterization of antagonistic fungi against potato scab pathogens from potato field soils. *FEMS Microbiology Letters*, 305(2), 136–142. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2010.01928.X>
- Tamayo Molano, P. J., & Peláez, A. (2000). *Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth.) en Antioquia*.
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/21213>
- Tamayo, P. J. (2001). Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. In *Corpoica*.
https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1175/40596_25996.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Tay, L.-F., Khoh, L.-K., Loh, C.-S., & Khor, E. (1993). Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(4), 449–454.
<https://doi.org/10.1002/bit.260420407>
- Ten Have, A. (2000). *The Botrytis cinerea endopolygalacturonase gene family* [Wageningen Universiteit]. <https://edepot.wur.nl/121240>
- Terlova, E. F., & Lewis, L. A. (2019). A new species of Tetrademus (Chlorophyceae, Chlorophyta) isolated from desert soil crust habitats in southwestern North America. *Plant and Fungal Systematics*, 64(1), 25–32. <https://doi.org/10.2478/PFS-2019-0004>
- Tewari, A. K., & Mukhopadhyay, A. N. (2001). Testing of different formulations of *Gliocladium virens*

against chickpea wilt-complex. In *Indian Phytopath* (Vol. 54, Issue 1).

ThermoFisher. (2021). *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers*.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000#/ND-2000>

Tikhonov, M., Leach, R., & Wingreen, N. (2015). Interpreting 16S metagenomic data without clustering to achieve sub-OTU resolution. *The ISME Journal*, 9(1), 68–80.

<https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2014.117>

Tolosa, V. (2015). *Identificación de especies de Dactylonectria e Ilyonectria asociadas al pie negro de la vid en Castilla La Mancha*. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.

Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal Activity of Lipopeptides From Bacillus XT1 CECT 8661 Against Botrytis cinerea. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1315.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01315>

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. (2006). Chitosan Stimulates Defense Reactions in Grapevine Leaves and Inhibits Development of Botrytis Cinerea. *European Journal of Plant Pathology* 2006 114:4, 114(4), 405–413. <https://doi.org/10.1007/S10658-006-0005-5>

Turenne, C. Y., Sanche, S. E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. A., & Kabani, A. M. (1999). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1846–1851.

<https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1846-1851.1999>

Van de Peer, Y., Chapelle, S., & De Wachter, R. (2013). Complete Genome Sequence of the Sesbania Symbiont and Rice. *Nucleic Acids Research*, 1(1256879), 13–14. <https://doi.org/10.1093/nar>

Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 91–96. [https://doi.org/10.1111/J.1574-](https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2009.01621.X)

[6968.2009.01621.X](https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2009.01621.X)

Vander, P., Vårum, K. M., Domard, A., Gueddari, N. E. El, & Moerschbacher, B. M. (1998).

Comparison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves. *Plant Physiology*, 118(4), 1353.

<https://doi.org/10.1104/PP.118.4.1353>

Varnaitė, R., Paškevičius, A., & Raudonienė, V. (2008). Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. *EKOLOGIJA*, 54(1), 29–31.

<https://doi.org/10.2478/V10055-008-0006-0>

Vasyukova, N. I., Zinov'eva, S. V., Il'inskaya, L. I., Perekhod, E. A., Chalenko, G. I., Gerasimova, N. G., Il'ina, A. V., Varlamov, V. P., & Ozeretskovskaya, O. L. (2001). Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(1), 103–109.

<https://doi.org/10.1023/A:1002865029994>

Viera, W., Noboa, M., Martínez, A., Báez, F., Jácome, R., Medina, L., & Jackson, T. (2019).

Trichoderma asperellum increases crop yield and fruit weight of blackberry (*Rubus glaucus*) under subtropical Andean conditions. *Vegetos*, 32(2), 209–215.

<https://doi.org/10.1007/s42535-019-00024-5>

Villares, M., Martínez, A., Viteri, P., Viera, W., Jácome, R., Ayala, G., & Noboa, M. (2016). *INIAP- Estación Experimental Santa Catalina*.

Villavicencio, A., & Vásquez C., W. (2008). Guía técnica de cultivos. In *INIAP*. Quito, EC: INIAP, 2008.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/851>

Viteri, P., Vásquez, W., Viera, W., Sotomayor, A., & Mejía, P. (2016). *Ecología del desarrollo y crecimiento de la mora* (D. Galarza, S. Garcés, J. Velásquez, V. Sánchez, & J. Zambrano (eds.)). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4051/1/iniapscCD104p19.pdf>

Vizcaino, J. A., Cardoza, R. E., Dubost, L., Bodo, B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2006). Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT

2413. *Folia Microbiologica*, 51(2), 114–120. <https://doi.org/10.1007/BF02932165>

Waghunde, R. R., Shelake, R. M., & Sabalpara, A. N. (2016). Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22), 1952–1965.

<https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10584>

Walker-Simmons, M., Hadwiger, L., & Ryan, C. A. (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 110(1), 194–199. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91279-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91279-2)

Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., & Shafer, R. (2007). Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Research*, 17(8), 1195–1201. <https://doi.org/10.1101/GR.6468307>

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>

Wani, Z. A., Kumar, A., Sultan, P., Bindu, K., Riyaz-Ul-Hassan, S., & Ashraf, N. (2017). *Mortierella alpina* CS10E4, an oleaginous fungal endophyte of *Crocus sativus* L. enhances apocarotenoid biosynthesis and stress tolerance in the host plant. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08974-z>

Wardle, D. A., Parkinson, D., & Waller, J. E. (1993). Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia*, 94(2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/BF00341313>

- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Kan, J. A. L. Van. (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00417.X>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 0(OCT), 2407. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02407>
- Willis, A. D., & Martin, B. D. (2018). DivNet: Estimating diversity in networked communities. *BioRxiv*, 305045. <https://doi.org/10.1101/305045>
- Woese, C., & Olsen, G. (1993). *Ribosomal RNA: a key to phylogeny; Ribosomal RNA: a key to phylogeny*. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422957>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3)
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Xiong, W., Li, R., Ren, Y., Liu, C., Zhao, Q., Wu, H., Jousset, A., & Shen, Q. (2017). *Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla Fusarium wilt disease*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.010>
- Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 65, Issue 3). <http://aem.asm.org/>

- Zhang, C., & Huang, Z. (2013). Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*, *159*, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.013>
- Zhang, K., Bonito, G., Hsu, C.-M., Hameed, K., Vilgalys, R., & Liao, H.-L. (2020). *Mortierella elongata* Increases Plant Biomass among Non-Leguminous Crop Species. *Agronomy* 2020, Vol. 10, Page 754, *10*(5), 754. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10050754>
- Zhang, N., Castlebury, L. A., Miller, A. N., Huhndorf, S. M., Schoch, C. L., Seifert, K. A., Rossman, A. Y., Rogers, J. D., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., & Sung, G.-H. (2006). An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, *98*(6), 1076–1087. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832635>
- Zuckerlandl, E., & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, *8*(2), 357–366. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90083-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90083-4)