

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES



JOSÉ FRANCISCO DOMINGO SILVESTRE

GUATEMALA, ABRIL 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

TESIS

AISLADO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ANTAGÓNICOS DE
NEMATODOS FORMADORES DE QUISTE DEL GÉNERO *Globodera* EN EL CULTIVO DE
PAPA EN LA REGIÓN PRODUCTORA DE LOS CUCHUMATANES, GUATEMALA, C.A.

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

JOSÉ FRANCISCO DOMINGO SILVESTRE

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, ABRIL 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



RECTOR EN FUNCIONES
M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL I	Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona
VOCAL II	Dra. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez
VOCAL III	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
VOCAL IV	Br. Carmen Aracely García Pirique
VOCAL V	Pr. Agr. Mynor Fernando Almengor Orenos
SECRETARIO	Ing. Agr. Walter Aroldo Reyes Sanabria

GUATEMALA, ABRIL 2022

Guatemala, abril 2022

Honorable Junta Directiva

Honorable Tribunal examinador

Facultad de Agronomía

Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos Miembros

De acuerdo con las normas establecidas por la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de graduación titulada:

“AISLADO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ANTAGÓNICOS DE NEMATODOS FORMADORES DE QUISTE DEL GÉNERO *Globodera* EN EL CULTIVO DE PAPA EN LA REGIÓN PRODUCTORA DE LOS CUCHUMATANES, GUATEMALA, C.A.”

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciado.

Esperando que el presente documento llene los requisitos necesarios para su aprobación agradeciendo la atención prestada a la presente.

Atentamente.

“Id y enseñad a todos”



José Francisco Domingo Silvestre

ACTO QUE DEDICO

A

DIOS:

Por guiarme, darme conocimiento y sabiduría para llegar a cumplir esta meta.

MI PADRE:

Román Domingo, por todo su apoyo, sacrificio, y consejos que me ayudaron para poder llegar hasta acá.

MI MADRE

Mercedes Silvestre, por todo su apoyo y cariño incondicional durante toda mi carrera.

MIS HERMANOS

Por acompañarme en cada día, y ser una motivación para seguir adelante.

MIS ABUELOS

Por ser una motivación para continuar cada día, por su apoyo y cariño demostrado.

MI FAMILIA

A todos los que estuvieron acompañándome durante mi proceso y a todos los que me apoyaron. Muchas gracias

TESIS QUE DEDICO

A

DIOS

MIS PADRES

MIS HERMANOS

MI FAMILIA

MI ASESOR

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA FAUSAC-UVIGER

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

AGRADECIMIENTOS

A

MIS PADRES:

Por todo el apoyo y cariño incondicional demostrado cada día, desde niño.

MIS HERMANOS:

Por ser una constante fuente de motivación, y apoyo emocional.

MI FAMILIA

a todos los que me acompañaron y dieron su apoyo durante cada fase de mi proceso académico.

MIS ABUELOS

Por todo su cariño, consejos y motivación, que me brindaron desde pequeño.

MI ASESOR

Por su supervisión y todo el tiempo invertido en la formulación de este documento, así como del apoyo prestado durante la carrera.

MIS AMIGOS

Por toda su compañía y los momentos de alegría que hemos compartidos.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

A todo el equipo de trabajo, por su apoyo y acompañamiento durante el proceso de elaboración de este documento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Marco conceptual.....	3
2.1.1 Nematodo Globodera.....	3
2.1.2 Síntomas, daños y pérdidas causados por <i>Globodera sp.</i>	8
2.1.3 Manejo integrado de nematodos del quiste	9
2.1.4 Control químico.....	12
2.1.5 Control biológico	12
2.1.6 Hongos antagonicos	13
2.1.7 Extracción de quistes de Globodera por el método de Fenwick	15
2.1.8 Aislado de hongos antagonicos de Globodera	17
2.1.9 Identificación de especies de hongo.....	19
2.2 Marco referencial	21
2.2.1 La producción de papa en Huehuetenango	21
2.2.2 El nematodo del quiste dorado en Guatemala.....	21
2.2.3 Descripción del lugar de investigación.....	22
a) Ubicación de las zonas de muestreo	22
b) Condiciones climáticas y zona de vida	22
2.2.4 Referencia del estudio de hongos antagonicos para el control de Globodera.	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 HIPÓTESIS	26

	PÁGINA
5 METODOLOGÍA	27
5.1 Aislado de hongos antagónicos asociados a quistes de Globodera.....	27
5.1.1 Recolección de muestras	27
5.1.2 Extracción de quistes	27
5.1.3 Aislado de hongos antagónicos asociados a los quistes.....	28
5.1.4 Selección de los aislados por características macroscópicas de la colonia.	28
5.2 Identificación molecular de los aislados de quistes	29
5.2.1 Extracción del ADN de los aislados.....	29
5.2.2 Identificación de los aislados por medio de cebadores específicos	30
5.2.3 Secuenciación de la región ITS2 para la identificación de los aislados obtenidos.....	33
5.2.4 Análisis de la información.....	33
5.3 Observación de la capacidad antagónica de los aislados	33
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 Aislados de hongos antagónicos de Globodera.	34
6.1.1 Selección de los aislados por caracterización macroscópica de las colonias	35
6.2 Identificación molecular de los aislados de quistes	39
6.2.1 Identificación de los aislados por medio de cebadores específicos	39
6.2.2 Secuenciación de la región ITS2 e identificación de los aislados obtenidos.....	39
6.3 Observación de la capacidad antagónica de los aislados	43
7 CONCLUSIONES	48
8 RECOMENDACIONES.....	49
9 BIBLIOGRAFÍA	50
10 ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1. Ciclo de vida del nematodo del quiste Globodera	6
Figura 2. Jarra de Fenwick para extracción de quistes de suelo.....	17
Figura 3. Estructura de la región del espaciador interno transcrito interno (ITS).....	20
Figura 4. Mapa de ubicación de las muestras	23
Figura 5. Reverso y frontal de las colonias desarrolladas en medio de PDA obtenidos de las distintas comunidades evaluadas. A. aislado 12 GP 2B, B. aislado 13 GP 2A, C. aislado 14 GP 2A, D. aislado 23 GP 2A, E. aislado 31 GP 2A, F. aislado 33 GP 1 A, G. aislado 33 GP 2 A, H. aislado 34 GP 2 B, I. aislado 34 GP 1 B, J. aislado 44 GP 3 A, K. aislado 54 GP 1 A.	38
Figura 6. Quiste de Globodera parasitado con uno de los aislados obtenidos	44
Figura 7A. Proceso de extracción de quistes por flotación, a: inmersión de suelo en agua para flotación de quistes, b. filtrado de sobrenadante y secado de muestra.	66
Figura 8A. Quiste de Globodera extraída de una muestra de suelo vista en estereoscopio	67
Figura 9A. Cultivos puros de hongos obtenidos de las diferentes muestras de suelo evaluadas.	67
Figura 10A. Revelado de gel de electroforesis para el cebador PeaF y PeaR, carril 1 marcador de peso, carril 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 correspondientes a amplificaciones positivas para P. lilacinus. En los aislados de código 12 GP 2B, 23 GP 1A, 31 GP 2A, 33 GP 1A, 33 GP	68

ÍNDICE DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1. Escala de severidad propuesta para Globodera spp en función de la pérdida de rendimiento.....	8
Cuadro 2. Composición de las diferentes soluciones buffer utilizadas en el proceso de extracción de ADN	29
Cuadro 3. Programa de termociclador para los diferentes cebadores utilizadas.	32
Cuadro 4. Total de aislados y codificación de aislados por lugar de origen.....	34
Cuadro 5. Identificación de los aislados según resultados de secuenciación de la región ITS.....	40
Cuadro 6. Resumen de especies identificadas con los marcadores específicos y resultados de secuenciación ITS según lugar de origen y código de los aislados	41

**AISLADO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ANTAGÓNICOS DE
NEMATODOS FORMADORES DE QUISTE DEL GÉNERO *Globodera* EN EL CULTIVO
DE PAPA EN LA REGIÓN PRODUCTORA DE LOS CUCHUMATANES**

**ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ANTAGONIC FUNGI OF CYST-
FORMING NEMATODES OF THE GENUS *Globodera* IN THE POTATO CULTURE OF
THE CUCHUMATANES PRODUCING REGION**

RESUMEN

El nematodo formador de quiste *Globodera sp.* es de los principales problemas en la producción de papa a nivel mundial, poseen una capacidad patogénica muy eficaz sobre el cultivo susceptible junto a una capacidad de dispersión y sobrevivencia bastante alta debido a que el quiste funciona como estructura de protección de los estados inmaduros, su presencia en los campos de producción de papa en Guatemala representa una seria amenaza sobre los rendimientos de la producción y por consiguiente de la rentabilidad de los productores.

El control de la densidad poblacional es crucial para recuperar suelos infestados y mejorar los rendimientos, técnicas como la rotación de cultivo, cultivos trampa y uso de materiales resistente se han propuesto para el control, sin embargo, estos poseen inconvenientes tanto en su eficiencia como practicidad, el control biológico; por otro lado, se presenta como una alternativa viable para el control de las poblaciones. El uso de cepas antagónicas de hongos asociadas a los quistes y huevos del nematodo representa una alternativa con buenos resultados reportados en diversas investigaciones.

La presente investigación es de carácter exploratoria y como finalidad el aislamiento e identificación de hongos antagónicos asociados a los nematodos de *Globodera*, a través de muestras de suelo provenientes de la región productora de papa de los Cuchumatanes-Huehuetenango, la identificación de especies asociadas se realizó a través del uso de cebadores específicos y la secuenciación del gen ITS, se encontraron hongos de las

especies *T. harzianum*, *P. lilacinus*, *P. cucumerina*, *V. leptobactrum* y *H. rhossiliensis*, además se observó la capacidad antagónica de aislados de los quistes del nematodo observando los mismos en un estereoscopio a 10X en busca de signos del desarrollo de hongos sobre el mismo.

1 INTRODUCCIÓN

La producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Guatemala se da principalmente por pequeños agricultores de la región occidental del país, para el año 2015 la producción podía referirse a cinco departamentos siendo Huehuetenango uno de los principales productores de papa de Guatemala representando el 32 % de la producción nacional en un 29.10 % de la superficie total de área cosechada, (MAGA, 2016). La región productora del departamento de Huehuetenango se sitúa en la meseta central de los Cuchumatanes (ICTA, 2002) y se calcula que el 92 % de la producción obtenida se destina a mercados locales según (ICTA, 2013) citando a (FAO, 2008).

El nematodo del quiste de la papa es uno de los principales problemas de la producción a nivel mundial, estos nematodos son considerados de los más efectivos en su capacidad parasítica (Evans & Stons, 1977) y se encuentran actualmente distribuidos a nivel mundial en las diferentes regiones productoras de papa (Mugniéry & Phyllips, 2007) reportando pérdidas de la producción promedio mundial de 9 % equivalente a 40 millones de toneladas (Seenivasan, Devrajan, & Selvaraj, 2007).

En Guatemala se ha reportado la presencia del nematodo de quistes *G. rostochiensis* y *G. pallida* en gran cantidad de suelos de regiones productoras de papa (N. Garcia 2015; Gustavo, Guerra, & Mijangos 2009; Roldan 2005; Salguero 2003) existiendo altas infestaciones de 5 quistes/gramo de suelo, estos niveles de densidad poblacional ponen en riesgo los rendimientos de las parcelas productoras del país (Lanza, 1996) problema que se agrava debido a la falta de un control adecuado de las poblaciones, esto reduce los rendimientos de las parcela y junto a ellos la rentabilidad de los productores e impone una restricción para el comercio internacional de la papa debido a que esta plaga es cuarentenada en varios países.

Se han propuesto diversas prácticas para el control de estos nematodos, sin embargo, muchas resultan imprácticas o inefectivas (Haydock & Evans 1998), El control biológico por otro lado se presenta como una alternativa prometedora para el control de las poblaciones de nematodos de quiste, reportándose eficiencias altas en el control de los nematodos por

parte de hongos antagonistas aislado a partir de muestras de suelo de regiones productoras de cultivares susceptibles.

La presente investigación posee un enfoque exploratorio y consiste en el aislamiento e identificación de las especies de hongos antagónicos asociados a quistes de los nematodos formadores de quiste de *Globodera* obtenidos de muestras provenientes de la región productora de papa de los Cuchumatanes-Huehuetenango, se consiguió el aislamiento de las especies de *T. harzianum*, *P. lilacinus*, *P. cucumerina*, *V. leptobactrum* y *H. rhossiliensis*, los cuales se encontraron asociados a los quistes del [nematodo](#), a la vez que se encontraron diversos reportes de estas especies como antagonistas de quistes y huevos *Globodera*.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Nematodo Globodera

A. Clasificación taxonómica

El nematodo del quiste de la papa consiste en dos especies los cuales son *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*, estos pertenecen al grupo de la familia Heteroderidae al igual que otras especies formadoras de quistes como *Heterodera*. La clasificación taxonómica de estos nematodos se presenta a continuación.

Reino: animal

Phylum: nematoda

Clase: Secementia

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Súper familia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Globodera*

Especie: *G. rostochiensis*; *G. pallida*

Fuente: (Subottin, Mundo , & Baldwin 2010).

B. Biología y Ciclo de vida

El género *Globodera* es uno de los nematodos parásitos de plantas más exitosos en su actividad parasítica, se caracteriza porque el estado activo es el segundo instar larvario luego de la eclosión de los huevos, usualmente la eclosión de estos y el desarrollo de los

estados juveniles se da por una estimulación con sustancias emanadas por las raíces de la planta hospedera (Evans & Stons, 1977).

Los nematodos a diferencia de los insectos pasan por diferentes etapas de su desarrollo sin presentar cambios sobre su aspecto externo, a estas etapas inmaduras de desarrollo se le conoce como estados juveniles existiendo para el género *Globodera* 4 estados inmaduros (Franco, 1989), el primer de ellos corresponde a los huevecillos, estos se encuentran dentro de estructuras de supervivencias llamadas quistes, estas son hembras adultas fertilizadas muertas, las larvas se desarrollan dentro de estos huevos y tienen una apariencia y estructura similar a la de los adultos, durante este estado las larvas incrementan su tamaño al paso del tiempo y pasan al siguiente estado juvenil una vez eclosionado el huevo.

La eclosión del huevo se da generalmente por la estimulación de sustancias emanadas por las raíces de las plantas hospederas, aunque existe la posibilidad de eclosión de los huevos al estado juvenil 2 aun en ausencia de un hospedante. (Evans & Stons, 1977), el estado J2 es el responsable de la infección de las plantas y lo consigue atravesando las paredes celulares con el empuje de un estilete y la secreción de enzimas catalíticas de la pared celular como celulasas, pectolasas, polygalatocidasas, etc, que son secretadas por el mismo órgano. (Sajid et al., 2009).

Una vez dentro de las raíces el nematodo inserta el estilete y la cabeza en las células del periciclo y la corteza o endodermis, comienza a alimentarse de los nutrientes de esta zona y continua haciéndolo hasta completar su desarrollo, de acuerdo a (Jones & Northcote, 1972) el nematodo obtiene su alimento tras inducir una des diferenciación celular, el nematodo forma un sincitio tras diluir las paredes celulares de varias células vecinas, de esta forma el nematodo consigue un columna de células con acceso directo al tejido vascular convirtiendo al nematodo en un sumidero de nutrientes.

Una vez fijado el nematodo a las raíces se vuelve sedentario y continua su desarrollo a través de los estados juveniles 3 y 4, en el estado juvenil 3 se definen los sexos en función de la cantidad de alimento disponible en el medio, cuando el alimento es escaso predominan los machos y cuando el alimento es abundante predominan las hembras. (Roldan 2005), a

diferencia de los nematodos causantes de nódulos en la raíz una vez que se define el sexo este es irreversible (Evans & Stons, 1977).

Los machos permanecen enrollados dentro del saco en la tercera etapa hasta que emergen de la raíz durante la muda final, estos no se alimentan después de la tercera etapa, durante esta los machos son vermiformes o alargados de aproximadamente 1 mm de longitud con una cola corta redondeada, después de la tercera muda tienen una vida activa y buscan a las hembras para fecundarlas, (Evans & Stons, 1977), las hembras por otra parte incrementan su tamaño y rompen la superficie de la raíz exponiendo sus cuerpos esféricos mientras la cabeza permanece dentro del tejido radicular, luego de exponer sus cuerpos del tejido infectado los machos las buscan para fecundarlas (Brodie, Evans , & Franco 1993).

Posterior a esto los quistes son finalmente visibles en la superficie de la raíz como pequeñas esferas de entre 500 μm - 750 μm de diámetro, los quistes de *G. pallida* son de color blanco mientras que para *G. rostochiensis* van de amarillo a dorado. Después de la copula las hembras depositan los huevos dentro de su utero y mueren posteriormente, la cutícula se oscurece y se convierte en un quiste que se libera en el suelo (Mugniéry & Phyllips, 2007).(figura 1).

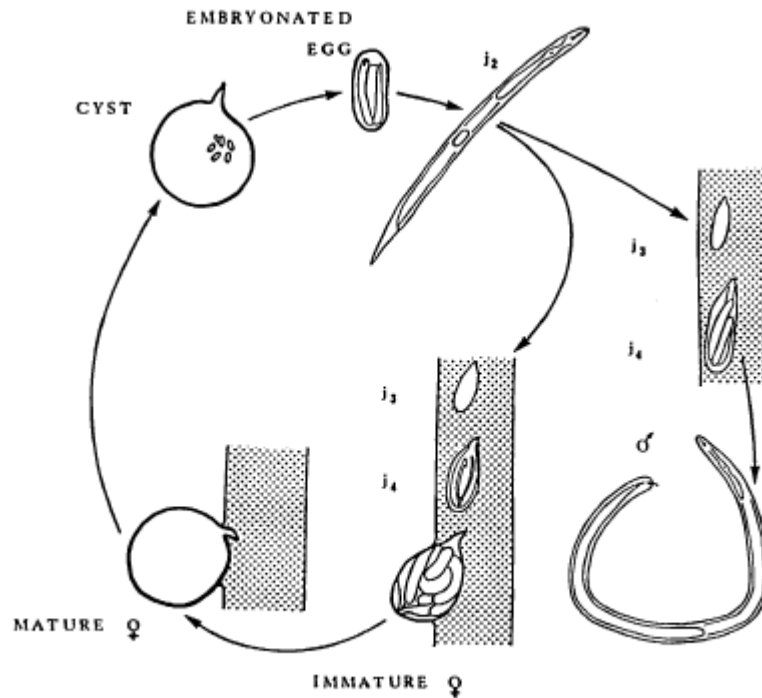


Fig. 1. Life cycle of *Globodera* spp. cyst-nematodes.

Fuente: Evans & Stons, 1997.

Figura 1. Ciclo de vida del nematodo del quiste *Globodera*.

De acuerdo a (Evans & Stons, 1977; Franco, 1989) un quiste puede tener entre 300 a 600 huevos, aunque otras literaturas indican que es posible encontrar hasta 1000 huevos cuando las condiciones de desarrollo del nematodo es ideal (Mugniéry & Phyllips, 2007).

C. Dispersión y sobrevivencia

Las especies *G. rostochiensis* y *G. pallida* son conocidos como nematodos del quistes de la papa (*S. tuberosum*), y poseen una amplia distribución a nivel mundial, se conoce que su origen fue la región andina en el Perú, Chile y Bolivia y desde este lugar se dispersó posteriormente al resto del mundo, se cree que su distribución se dio por medio del flujo de material vegetal para la reproducción (tubérculos) con residuos de suelo en los que se encontraba el nematodo, su primer reporte fue en 1881 y descritos por primera vez en 1923 por Wollember a partir de muestras obtenidas de la región de rostock Alemania (Quiñones, 1979).

Los quistes son el medio de diseminación de los nematodos de *Globodera*, estos tienen características que le permiten moverse grandes distancias por diferentes medios, su tamaño pequeño y bajo peso les permite propagarse localmente por agua, viento, maquinaria agrícola o por partículas de suelo arrastradas por el hombre al caminar por la finca, además de estos, el medio por el cual se ha dispersado mayores distancias fue por el comercio de tubérculos de papa como semillas desde un continente a otro, pues en estos tubérculos se puede encontrar residuos de suelo contaminado con los quiste. (Mugniéry & Phyllips, 2007).

Además de servir como medio de diseminación los quistes funcionan como estructuras de supervivencia permitiendo al nematodo sobrevivir hasta por 20 años en el suelo en ausencia de un hospedero susceptible (Agrios 2005), aunque se han encontrado reportes de eclosiones aleatorias de los quistes aun en ausencia de un hospedero, causando disminución en las poblaciones (Mugniéry & Phyllips, 2007; Schouten & Beniers, 1997).

Las tasas de disminución de las poblaciones por efecto de eclosiones aleatorias no son significativas como para erradicar las poblaciones a altas velocidades, además investigaciones posteriores (Haydock & Evans 1998) mencionan que algunas cepas de *Globodera sp.* desarrollan habilidades para evitar la eclosión de los quistes en ausencia de los hospedantes. (Duceppe et al., 2017) realizaron un análisis transcriptómico usando RNA-seq encontrando que, durante el periodo de latencia de los huevos, genes relacionados a la desintoxicación celular se mantienen altamente activos, mientras que, los genes relacionados a la absorción de calcio y agua se regularon hasta la exposición de los quistes a exudados de raíces hospederas.

Además de mantener en latencia los huevos y regular su eclosión, los quistes proveen a los huevos y J2 una cobertura que los aísla de condiciones ambientales adversas y de ahí la alta persistencia de los nematodos en el suelo.

2.1.2 Síntomas, daños y pérdidas causados por *Globodera sp.*

Los síntomas se presentan inicialmente como una marchitez temprana de las plantas, el daño mecánico causado por la alimentación del estado activo de los nematodos y las hembras adheridas a las raíces se expresa como una necrosis en las células de la raíz (Evans & Stons, 1977), además se presenta una hiperplasia que termina en la formación de sincitio limitando la actividad vascular y por tanto el desarrollo de la planta (Jones & Northcote, 1972), las pérdidas de rendimiento de acuerdo a (Trudgill 1986) se debe principalmente a que los nematodos del quiste disminuyen la efectividad del sistema radicular y por tanto reducen la duración del área foliar y con ella la capacidad fotosintética de la planta.

Las pérdidas de rendimiento causado por la presencia del nematodo se miden generalmente por la proporción de huevos+J2/ g de suelo existentes en los suelos, (Lanza, 1996) propone una escala de severidad del nematodo el cual se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Escala de severidad propuesta para *Globodera spp* en función de la pérdida de rendimiento.

Grado infestación suelo	Huevos + J2/ gramo suelo	Pérdidas de rendimiento (%)
Libre	0	0
Incipiente	1- 5	5
Media	5.1 - 15	13
Alta	15.1 - 35	45
Muy Alta	>35	58

Fuente: Lanza, 1996.

Esta escala indica tanto el número de huevos + J2/ gramo de suelo en relación al porcentaje de pérdida que se reporta para los nematodos en las condiciones de cultivo de Perú y Bolivia, otras investigaciones como (Contina, Dandurandy, & Knudsen, 2019), realizaron un modelo de predicción de las pérdidas de producción de papa *S. tuberosum* causado por *G. pallida* en Idaho bajo condiciones de invernadero reportando pérdidas de 44 % en

infestaciones cuyo inoculo inicial fueron de 40 huevos/g de suelo, y de 87 % en un inoculo inicial de 80 huevos/g de suelo.

De acuerdo a (Tumer & Subbotin, 2013) (Del Prado 2015) se considera como umbral de daño aceptable un inoculo inicial de 1 a 2 huevos/g de suelo, otras literaturas (Franco, 1989) indican que el umbral de daño está entre los 10 a 20 huevos por gramo de suelo cuando la calidad del suelo es baja, sin embargo suelos con alta fertilidad y contenido de humedad adecuada pueden soportar infestaciones mayores, la diferencia entre los umbrales de daños calculados se debe según (Trudgill 1986) al efecto de varios factores, entre los cuales se pueden mencionar los más importantes como el tipo de suelo, las interacciones con microorganismos, diferencias en la cría, diferencia en la tolerancia de los cultivos establecidos, el clima, rendimientos potenciales entre los sitios, entre otros.

2.1.3 Manejo integrado de nematodos del quiste

El control de los nematodos del quiste es muy complicado, una vez que el nematodo se establece en un suelo es prácticamente imposible erradicarlo debido a que los huevos permanecen en dormancia dentro de los quistes hasta por más de 20 años (Agrios 2005), sin embargo algunas prácticas se han propuesto para reducir las poblaciones a niveles tolerables por debajo del umbral de daño, al igual que todas las enfermedades la mejor estrategia para la gestión de los nematodos es la prevención de la infestación, como herramientas para el control post infestación se considera prudente el monitoreo de la densidad y composición de especies en los campos infestados (Haydock & Evans 1998).

A. Rotación de cultivos

Esta fue una de las primeras propuestas para el control de los quistes de nematodos, se fundamenta en que aun en ausencia de hospederos algunos nematodos J2 se liberan de los quistes muriendo eventualmente por la falta de alimento, este efecto causa disminuciones graduales de acuerdo a las condiciones climáticas, en Irlanda el servicio de protección fitosanitaria considera una disminución anual del 10 %, en Bretaña se han reportado reducciones de 18 % anual (Mugniéry & Phyllips, 2007) y de acuerdo a (Schlüter,

1976) en el sur de Marruecos se han encontrado disminuciones de hasta 95 % equilibrando la multiplicación anual de los nematodos.

Aun con esta disminución de las poblaciones de nematodos en los suelos infestados cuando no se cultivan hospederos de la plaga, no se obtiene una reducción rápida de los niveles de daño para encontrarse por debajo del umbral perjudicial o tolerado, además otros informes como (Evans & Stons, 1977) mencionan las estrategias desarrolladas por los nematodos del quiste para limitar la eclosión de los huevos en ausencia de sus hospedantes, permitiendo que estos persistan en el suelo durante más tiempo en ausencia de del cultivo.

(Haydock & Evans 1998) mencionan que la efectividad de la técnica de rotación se ve limitada especialmente para *G. pallida* quien tiene una disminución poblacional más lenta en ausencia de un hospedante, todo lo anterior mencionado se refleja en periodos de rotación longitud y poco prácticas para el manejo de las poblaciones y no garantiza una erradicación total sino hasta muchas décadas después de su implementación.

B. Cultivo trampa

Este consiste en el uso de cultivos hospederos que una vez que inducen la eclosión de los huevos es retirado y los J2 terminan muriendo por la falta de alimento, De acuerdo a (Westphal & Becker, 1999), esta práctica ha tenido éxito en la reducción de poblaciones de nematodos de quiste en los países bajos, sin embargo, su implementación es lento debido a que estas plantas son parte del grupo de las principales malezas en el cultivo, representando un riesgo alto de reproducción en las parcelas, otras variantes del método fue propuesta por (Ngala, Haydock, Woods, & Back, 2015) el cual consiste en el establecimiento de cultivos de cobertura como brassicas, lo cual parece prometedor pero se encuentra aún en etapas experimentales.

C. Resistencia genética

Se han encontrado genes de resistencia sobre Globodera en los centros de origen de la papa como producto de la coevolución hospedero-patógeno, algunas variedades cultivadas hoy en día se han creado con un gen dominante a la resistencia derivados de *Solanum tuberosum* spp. andigena. Sin embargo estos no son resistentes a todos los patotipos del nematodo (Johns , Carpenter , Parrott, Piedra , & Trudgill, 1970).

Esta práctica ha sido una de las más efectivas en el control sin embargo su aplicación se ve obstaculizada por la aparición de diversas poblaciones de nematodos virulentos, la base genética de la virulencia del nematodo puede diferir de acuerdo al patotipos que este en la región de interés, (Griener , Bossis , Fouville , Renault , & Mugniery, 2001).

Ya desde 1998 la práctica de uso de cultivares resistentes se estableció y los Fito mejoradores comenzaron a incluir casi rutinariamente genes de resistencia a *G. rostochiensis*, de acuerdo a (Haydock & Evans 1998) los cultivares resistentes tanto como los susceptibles son igualmente invadidos por los nematodos juveniles sin embargo en los cultivares resistentes el sitio de alimentación donde el nematodo se instituyo se degrada, esto limita la alimentación de los estados inmaduros y por tanto se reduce la formación de hembras adultas causando una disminución en la tasa de reproducción de los nematodos.

Durante estas fechas también se propuso el uso de transgénicos para el control de los nematodos del quiste en papas, (Celis et al., 2004) estudiaron el uso de cultivares genéticamente modificados para el control del nematodo del quiste de la papa en la región de los andes, esto permitiría la producción cultivares resistentes en un periodo de 5 años en lugar de los 8 años - 15 años que lleva el procedimiento convencional, sin embargo el impacto ambiental que esto representa requiere ser estudiado aún más.

Aun siendo esta una de las técnicas de control más eficaces hasta ahora, se debe considerar que el uso de la resistencia genética es solo una solución a mediano plazo pues su beneficio se basa en reducir las densidades de población de nematodos de quistes mas no erradica su presencia en los campos, y un uso excesivo de esta técnica conducirá a la selección de nematodos virulentos dentro de las poblaciones. (Haydock & Evans 1998) Como riesgo adicional a esto se debe considerar los posibles cambios en la virulencia de

los nematodos evolucionando en patotipos capaces de vencer los mecanismos de resistencia desarrollados por las plantas, lo que compromete la sostenibilidad de la resistencia como estrategia de manejo. (Schouten & Beniers, 1997).

2.1.4 Control químico

Existen dos tipos de pesticidas que se utilizan para el control de nematodos del quiste basado en su mecanismo de acción, el primero son los nematostatos los cuales se aplican previo al establecimiento del cultivo, este producto se disuelve posteriormente con la humedad del suelo y cuando el nematodo sale del quiste para intentar infectar las raíces se expone al producto el cual se absorbe por la cutícula y posteriormente inhibe la enzima acetilcolinesterasa en el sistema nervioso induciendo parálisis y reduciendo entonces la cantidad de nematodos que consiguen dañar las raíces del cultivo (Haydock & Evans 1998).

2.1.5 Control biológico

El control biológico de acuerdo a (Pal & McSpadden, 2006) consiste en el uso intencional de organismos vivos introducidos o residentes con la intención de suprimir el efecto causado por uno o más patógenos existentes en la parcela, sin considerar el uso de hospedantes resistentes en la práctica. (Starling, 2018) Modifico el concepto de control biológico de Cook para adaptarlo al control de los nematodos, bajo su concepto el control biológico de los nematodos busca la reducción del daño causado en los hospedantes a través del uso de organismos antagonistas, ya sea, regulando la densidad de las poblaciones de nematodos o interfiriendo en su capacidad el daño aun si esto no conlleva a la muerte directa del nematodo.

Los nematodos parásitos de plantas pasan por lo menos una de sus etapas del ciclo de vida en el suelo, (Starling, 2018) el suelo a su vez es uno de los sistemas más complejos de la naturaleza, la diversidad de organismos antagónicos presentes en el suelo tienden a limitar el desarrollo de poblaciones de nematodos fitoparásitos existentes en los mismos

(Rodriguez, 1991), además de esto, (Westphal & Becker, 1999) menciona que suelos donde no se han realizado tratamientos de control biosidas se tiene un mejor efecto supresivos que aquellos en los que la diversidad biológica ha sido perturbada por tratamientos de control.

2.1.6 Hongos antagonicos

Se conoce como microorganismo antagonico a todo aquel microorganismo con la capacidad de provocar un deterioro, inhibición o muerte de otro, por diferentes mecanismos. Esta relación suele encontrarse de forma natural en el ambiente como parte de la regulación de poblaciones de parásitos, depredadores y enfermedades. (Pal & McSpadden, 2006).

Existen diversos grupos de hongos y bacterias que presentan efectos antagonicos sobre otros microorganismos, la cual es aprovechada para una forma de control biológico para fitopatógenos. (Fernández, 2001).

Los hongos antagonicos contribuyen a la disminución sistemática de los daños causados por las enfermedades o plagas en los agroecosistemas, esto se consigue por distintos mecanismos de biorregulacion, estos mecanismos en conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente son los criterios de selección como agente de control biológico (Danay, Martínez, González, & Reyes, 2009).

El uso de organismos antagonicos para el control de nematodos, se considera una práctica viable si se logra fomentar y establecer investigaciones respecto al establecimiento de hongos en suelo, o bien la producción comercial en laboratorios, (Piedra, 2008), De acuerdo a (Arauz, 1998) los organismos antagonicos de nematodos deben contar con algunas características básicas, como, no deben ser patógenos de plantas, hombres o animales, deben ser capaces de suprimir eficientemente las poblaciones de nematodos por debajo de niveles críticos, capacidad de adaptación a las condiciones de suelo, y alta tasa de reproducción.

A. Mecanismos de acción de hongos antagónicos de nematodos

Existe gran diversidad de hongos antagónicos de nematodos en el suelo (Rodriguez, 1991) menciona una clasificación de acuerdo a su mecanismo de acción, los hongos atrapadores, entre los que se encuentran hongos que desarrollan micelio con el cual capturan a los nematodos y posteriormente causan su muerte. Otro grupo de hongos son los que actúan como invasores del cuerpo del nematodo causando una septicemia y terminando en la muerte del nematodo. El último grupo de acuerdo con esta clasificación son los que producen enzimas que degradan los huevecillos o quiste de nematodos permitiéndoles penetrar dentro de ellos.

Otro sistema de clasificación de los nematodos es el propuesto por (Gray 2018) el cual consiste en una clasificación de endoparásitos y depredadores. Los endoparásitos no producen un micelio abundante, pero se encuentran en el medio con las estructuras reproductivas y se desarrolla al contacto con el nematodo ya sea adhiriéndose a él o siendo ingerido causando su muerte, mientras que los depredadores producen un abundante micelio que utiliza para capturar y penetrar el nematodo como presa.

B. Principales hongos antagónicos de nematodos

De acuerdo a las clasificaciones mencionadas anteriormente se pueden mencionar una gran variedad de hongos antagónicos de nematodos de acuerdo a la naturaleza de estos mismos, en el caso de los nematodos que pasan su desarrollo libremente en el suelo los hongos depredadores tienen una particular eficiencia, entre estos se pueden encontrar géneros como: *Arthrobotrys*, *Catenaria*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Nematoctonus*, *Dactylella*, *Dactylaria*, *Cystopage*, *Stylopaga*, *Nematophagus*, (Gray 2018; Rodriguez, 1991; Sharon et al., 2001)(Westphal & Becker, 1999) mientras que para nematodos formadores de quistes se considera también la eficacia de control de hongos endoparásitos, (Pal & McSpadden, 2006).

C. Control de nematodos formadores de quistes con hongos antagónicos

Los quistes funcionan como estructuras tanto de diseminación como de supervivencia para los nematodos en ausencia de los hospedantes (Haydock & Evans 1998), el aislamiento de los nematodos por esta estructura limita en gran parte la capacidad de hongos depredadores y parásitos para atacar los nematodos, hasta 1974 se creía que no existían hongos parásitos de los quistes, hasta que algunos estudios comprobaron el efecto de *Catenaria auxiliaris* como hongo antagónico para heterodera, (Tribe 1977), por otro lado para los nematodos *Globodera* fue hasta 1991 que se encontró que algunos hongos antagónicos de *Heterodera* se podían encontrar también en *Globodera*. (Crump 1991).

Actualmente se han encontrado gran variedad de hongos asociados a los quistes de *Globodera*, de acuerdo (Eberline et al., 2016) se citan diversos trabajos como (Crump y Flynn 1995); (Dackman 1990); (Jacobs 2000); (Morgan-Jones y Rodriguez-Kabana 1986); (Roessner 1987); (Sikora et al. 1990); (Yu y Coosemans 1998) indicando los hongos nematofagos de *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phoma exigua*, *Pochonia clamidosporuym* y otro listado de hongos con capacidades nematofagas de forma errática encontrados en las regiones productoras de papa en Europa y América del sur.

Se ha evaluado igualmente la eficiencia de control de diversos hongos, (Trifanova, 2010) reporta eficiencias de control de 40.50 % - 48.90 % por *Fusarium spp*, 29.60 % a 49.30 % por *Trichoderma spp*. (Corrion et al., 2012) Reportan a nivel de laboratorio un 100 % de control de los huevos y J2 de *G. rostochiensis* por parte de *Paecilomyces lilacinus*.

2.1.7 Extracción de quistes de *Globodera* por el método de Fenwick

Para el proceso de extracción de quistes de nematodos existe un grupo de metodologías de laboratorio utilizadas a lo largo del tiempo, sin embargo la gran mayoría están basadas en el separar los quistes aprovechando la densidad de los quistes y el principio de flotación, uno de los primeros métodos fue el proceso de extracción de quistes de nematodos de Morgan para el estudio de grandes cantidades de suelo, este consiste en sumergir hasta 10

lb de suelo secado al aire en recipientes con agua, generalmente matraces de 1 L y posteriormente agitar el material dentro del agua, los quistes salen a flote debido a su densidad diferenciada con las partículas de suelo y agua, de acuerdo a (Morgan, 1929) son suficientes 15 min para que todos los quistes de una muestra de suelo salgan a flote.

Los materiales sobre nadantes se recolectan posteriormente en un tamiz de 50 mesh. El problema con este método es que además de los quistes otra gran cantidad de materiales salen a flote al momento de sumergir el suelo en agua, tales como la materia orgánica, dejando la muestra aún bastante contaminada y dificultando su conteo.

Posteriormente (Powell, 1939) utilizó el método de Morgan para la extracción de quistes de *Heterodera schachtii* Schmidt, para esto utilizó únicamente 50 g de suelo y propuso esta medida como una suficiente para inferir la cantidad de quistes por gramo de suelo, la poca cantidad de suelo utilizada permitía también observar con mayor facilidad los quistes entre los materiales contaminantes que sobrenadaban junto a ellos pudiendo entonces rodar los quistes y separarlos para un conteo posterior.

Aun con esta variante el proceso de rodar los quistes para separarlos de los contaminantes era un proceso tedioso por lo que se comenzó a buscar métodos de separación más sencillos, esto se conseguía por medio de flotación diferencial usando dos pasos, la flotación con un material pesado agua, y luego una flotación con un material ligero que separa la mayor cantidad de sobrenadantes manteniendo los quistes a flote, para esto se usaba una solución de agua con azúcar diluyendo 23 oz de azúcar y 27 oz de agua. (Fenwick, 1940), aunque estas soluciones fueron propuestas inicialmente cualquier solución con una densidad similar podría ser utilizada para la separación de los quistes de los contaminantes sobrenadantes de procesos anteriores de extracción.

Todos los experimentos mencionados anteriormente son la base del proceso de extracción de quistes de nematodos por el método de Fenwick tal como se practica actualmente, aunque existen equipos prácticos para la extracción de los quistes, como la jarra de Fenwick (figura 2) que consiste en un embudo colocado sobre una jarra con forma trapezoidal y paredes con una inclinación de 44 grados, además de una aleta que deposita los sobrenadantes en un tamiz para su separación.



Fuente: CORFO, 2016.

Figura 2. Jarra de Fenwick para extracción de quistes de suelo.

Esta jarra fue diseñada por (Fenwick, 1940) durante sus investigaciones en un intento de obtener un método de extracción práctico, y con la facilidad de ser usado por personas sin mayor grado de experiencia en el campo y que además fuera confiable en un proceso de extracción de quistes de forma continua de grandes muestras de suelo húmedo, con este equipo se logra recuperar el 70 % de los quistes (Humphreys, 2006).

Aunque exista el equipo diseñado específicamente para esta labor es posible llevarla a cabo con el uso de cristalería tradicional de laboratorio reemplazando la jarra por un Erlenmeyer simulando la pendiente de inclinación de las paredes de la jarra con la del Erlenmeyer.

2.1.8 Aislado de hongos antagónicos de Globodera

El aislamiento de hongos antagónicos de nematodos requiere de la extracción inicial de los hospederos, el cual para el caso de Globodera, se realiza generalmente por el proceso explicado anteriormente. Una vez obtenido estos hospederos se realizan diversos procesos de aislamiento en función del organismo que se requiere aislar.

Existen metodologías enfocadas al aislamiento específico de microorganismos de interés, tal como lo plantea (Sánchez Pérez, Ruiz Chután, Berdúo Sandoval, & Melgar Valladares, 2020), en esta investigación se realiza el aislamiento de hongos con utilizando medios de

cultivo selectivo, estos medios selectivos suelen ser variaciones de un medio basal, suplementado con diferentes antibióticos o fungicidas para reducir el riesgo de desarrollo de otros microorganismos. Algunos ejemplos de medios selectivos para hongos antagónicos son:

- Medio selectivo para *T. virens*: este consiste en una variación de medio basal de PDA, suplementado con rifampicina (50 µl/ml), clorotalonil (1.25 µg/ml, y thiabendazole (0.6 µg/ml), este medio fue propuesto por (Howell, 1999).
- Medio TSM (*Trichoderma* selective médium). Este es suplementado con cloranfenicol, (50 µg/ml) y rosa de bengala (1.50 g/l) el cual fue propuesto por (Attitalla, Adbelrawaf, Saeed, El-Komy, & Sarwar, 2012) como selectivo para cepas tipo Q de *Trichoderma harzianum*.
- Medio selectivo para *Paecilomyces*: esto es un medio basal suplementado con cloranfenicol (0.01 %) y cloruro de sodio al 3 % y fue propuesto por (Chen , y otros, 2012).
- Medio PCNB, este medio es propuesto por (Indarti, Widiyanto, Kim, & Suryanti, 2010) como selectivo para *fusarium oxysporum*.

El uso de medios de cultivo permite el aislamiento de hongos antagónicos de interés particular para el control del nematodo, especialmente cuando se tienen registros de la capacidad de control de estos en el nematodo o reportes previos de los hongos en la zona, sin embargo, cuando no se conoce el microbiota de la zona, esta práctica puede limitar los hallazgos del experimento.

En estos casos, se puede realizar los aislamientos por medios de cultivo general, como un medio basal de PDA, o bien medios de agar + agua, tal como lo plantea (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal , 2016), donde estos aislaron hongos de huevos enfermos de *Globodera*. La diferencia de este método comparado con los medios de cultivo selectivo es la diversidad de microorganismos encontrados, pues en este caso se encontró una alta diversidad de microorganismos asociados, perteneciendo estos a 10 filos, 19 clases, 36 órdenes, 55 familias y 77 géneros, diferentes.

Se puede observar la diferencia de cada método de aislamiento, pues mientras que en el primer caso, se limita al aislamiento de un microorganismo específico, el segundo no tiene

límite de microorganismos a detectar, lo cual permite encontrar relaciones no reportadas previamente, aunque tiene la desventaja de poder aislar hongos de vida libre, pues como mencionan (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal, 2016) las relaciones de hongos predominantes encontrados, requieren ser explorados más a fondo previo a hacer recomendaciones de uso.

Para conseguir aislados potencialmente antagónicos es recomendable realizar los aislados de huevos o quistes enfermos del hospedero tal como lo describe (Tribe, 1977), estos síntomas son huevos, coagulados, lisados, degenerados o con lesiones.

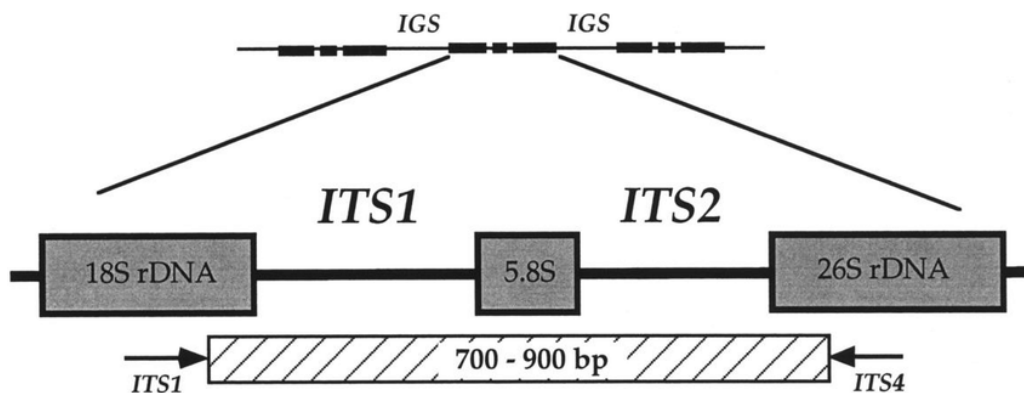
2.1.9 Identificación de especies de hongo

La identificación de especies de aislados de hongo es uno de los primeros pasos para la investigación respecto a nuevas cepas. Existen diversas opciones para realizar las identificaciones de hongos que se han desarrollado con el tiempo, siendo la primera técnica utilizada la identificación basada en caracteres morfológicos de las colonias a nivel macroscópico y microscópico. Existen muchas referencias respecto a la identificación de hongos basado en caracteres morfológicos, sin embargo, tal como indica (Maymon, y otros, 2004) y (Lieckfeldt, Samuels, Nirenberg, & Petrini, 1999) la homeoplasia en los caracteres morfológicos o existencia de especies crípticas dificulta la correcta identificación incluso para personal experimentado.

La dificultad de la identificación por métodos morfológicos es tan importante que según (Druzhinina & Kubicek, 2005) el 50 % de los aislados depositados en colecciones, están mal identificados, por lo que se suele recomendar técnicas más precisas para la identificación de los aislados, especialmente con el uso de técnicas moleculares o análisis de ADN.

A. Identificación de especies de hongo mediante la secuenciación de la región ITS

La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) es una región genómica conservada dentro del genoma de las células eucariotas, que se encuentra separando los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S (figura 3) (Corchon, 2020). De acuerdo con (Baldwin, y otros, 1995) y (Lashermes, Combes, Trouslot, & Charrier, 1997) debido a esta característica son ampliamente utilizados para determinar relaciones a nivel inter e intra genéricos, e incluso a nivel intraespecífico. Además de esto de acuerdo con Liston 1992 la región ITS se encuentra con una alta tasa de representación dentro del genoma, lo que permite amplificar cantidades pequeñas de ADN, además que las regiones conservadas son muy útiles en el diseño de cebadores universales lo que facilita la amplificación de esta región mediante la técnica de PCR.



Fuente: Shaw, McDaniel, Werner & Ros-ESPin, 2009.

Figura 3. Estructura de la región del espaciador interno transcrito interno (ITS).

Debido a las características anteriores la secuenciación de la región ITS es una de las más utilizadas para la identificación molecular de hongos. Esto consiste en determinar la secuencia de nucleótidos de la región ITS de los aislados y compararla con bases de datos disponibles, siendo una de las principales fuentes el GenBank perteneciente a la Nacional

Center for Biotechnology Information (NCBI) basándose en el grado de similitud de las secuencias con respecto a la base de datos. (Marwi & Domenico, 2013).

2.2 Marco referencial

2.2.1 La producción de papa en Huehuetenango

Huehuetenango es uno de los principales productores de papa de Guatemala representando el 32 % de la producción nacional en un 29.10 % de la superficie total de área cosechada de acuerdo a datos reportados por (MAGA, 2016) la región productora se sitúa en la meseta central de los Cuchumatanes (ICTA, 2002) y se calcula que el 92 % de la producción obtenida se destina a mercados locales según (ICTA, 2013).

2.2.2 El nematodo del quiste dorado en Guatemala

El primer reporte del nematodo del quiste dorado de la papa en Guatemala se dio en 1980, de acuerdo a (Garcia M, 1980), se reportó la presencia de *Globodera* y *Heterodera* en los departamentos de San Marcos, Totonicapán, Quetzaltenango, Chimaltenango y Sololá, En el año 2002 el departamento Agro sanitario de Honduras detectó quistes de nematodos en un cargamento de papa (N. Garcia 2015), razón por la cual cerró temporalmente el mercado hondureño a Guatemala.

Posteriormente (Salguero 2003) reportó la presencia del género *Globodera* en suelos de Patzún Chimaltenango, (Roldan 2005) encontró densidades de 25 quistes por 300 cm³ de suelo en muestras en el municipio de Jalapa-Jalapa. (Gustavo et al., 2009) reportaron la presencia de las especies *G. rostochiensis* y *G. pallida* en los departamentos de Chimaltenango, Sacatepéquez, y Guatemala encontrando una mayor diversidad de los nematodos en el departamento de Chimaltenango, (N. Garcia 2015) reportó densidades de 20 quistes en 300 cm³ de suelo en muestras de la aldea Concepción Palencia Guatemala.

Finalmente, (Sánchez Pérez, Ruiz Chután, Berdúo Sandoval, & Melgar Valladares, 2020) realizaron una identificación molecular de quistes encontrados en suelos de cinco localidades del departamento de Quetzaltenango, encontrando la presencia de *G. rostochiensis* en los municipios de Concepción Chiquirichapa, Palestina de los altos, La Esperanza, San Juan Ostuncalco y San Martín Sacatepéquez.

2.2.3 Descripción del lugar de investigación

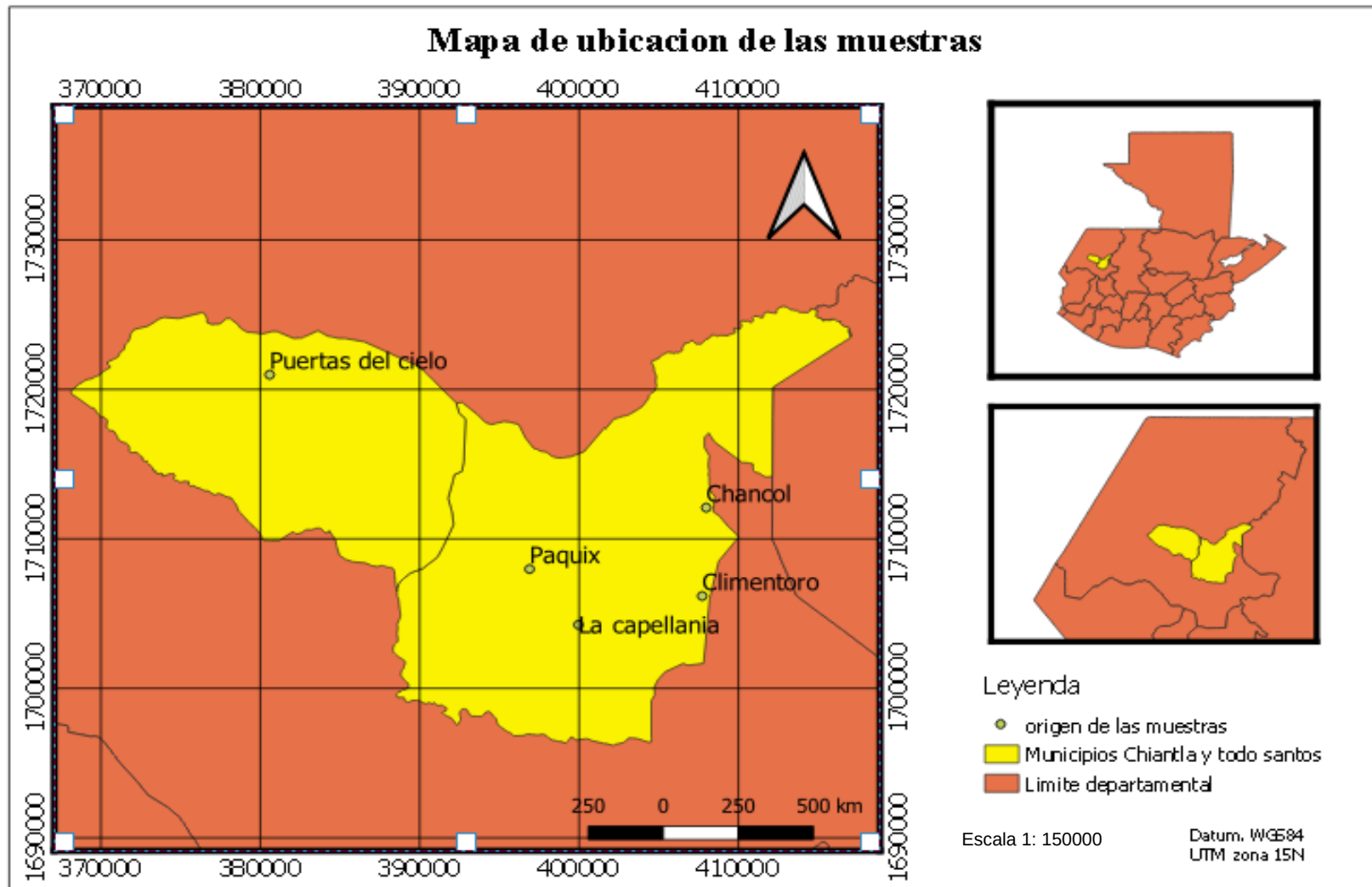
A. Ubicación de las zonas de muestreo

Las muestras de suelo evaluadas fueron obtenidas de zonas de cultivo de papa en los municipios Chiantla y Todos Santos Cuchumatanes del departamento de Huehuetenango, en los pueblos de la Capellanía, Puertas del Cielo, Paquix, Chancol y Climentoro. (figura 4).

B. Condiciones climáticas y zona de vida

El área de estudio se ubica dentro de la zona de vida de bosque pluvial sub andino tropical basado en la clasificación de Holdridge, el cual se caracteriza por una precipitación media anual entre 1,756 mm y 2,110 mm, con una temperatura media entre los 4 °C y 7 °C, una evapotranspiración promedio de 0.21 mm/mm de lluvia. (Pérez Irungaray, Maas Ibarra, Gándara Cabrera, & Rosito Monzón, 2018).

El área se encuentra en un 74.88 % sin cobertura o poca presencia de plantas, alta presencia de rocas, un 15.41 % de arbustos y matorrales, un 5.04 % cubierto por bosques, 3.70 % con pastizales y apenas un 0.57 % por agricultura anual. (Grupo Interinstitucional de monitoreo de bosques y uso de la tierra, 2014).



Fuente: elaboración propia, con datos de (MAGA, 2016).

Figura 4. Mapa de ubicación de las muestras

2.2.4 Referencia del estudio de hongos antagónicos para el control de Globodera

El aislamiento de hongos antagónicos para los quistes del nematodo *Globodera* se ha estudiado muy poco, hasta 1991 se creía que no existían antagonistas fúngicos efectivos para su control hasta que se encontraron hongos antagónicos de *Heterodera* asociados a los quistes de *Globodera* (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal, 2016) citando a (Crump, 1991).

Actualmente se han encontrado gran variedad de hongos asociados a diferentes estadios del nematodo del quiste de la papa, los cuales han sido reportados en diferentes estudios como:

- (Dackman, 1990) realizó una investigación sobre el alcance del parasitismo de *Septocylindrium*, *Exophiala*, *Cylindrocarpon destructans*, y *Verticillium suchtasporium*, *Cladosporium Cladosporoides*, asociados a los quistes de *Globodera*, basado en su capacidad de penetración de los huevos por la producción de quitinasas y proteasas.
- Posteriormente (Dackman, 1990) aisló hongos asociados a los quistes de papa de *Globodera* con la intención de desarrollar un programa de control biológico fúngico para los nematodos del quiste, en su estudio consiguió aislar *Plectosphaerella cucumerina*, *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium clamydosporium*.
- (Eberline et al., 2016) Realizaron aislados de hongos asociados a los estados juveniles y hembras de *Globodera* estos consiguieron el aislamiento de *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum*. Se encontró que los tres hongos presentaron un control efectivo sobre las poblaciones del nematodo.

El estudio de la microflora asociada a los quistes de *Globodera* ha desarrollado en la actualidad el concepto de los suelos supresores, estos consisten en suelos con cultivos constantes de una variedad susceptible a los nematodos, elevando las

densidades de la población causando un des equilibrio en los suelos y propiciando el desarrollo de hongos antagonicos como respuesta natural del sistema.

Se han realizado también estudios sobre estos suelos para determinar la dinámica de los microorganismos, (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal , 2016) realizaron procesos de aislado de hongos asociados a los estados juveniles J2 y huevos provenientes de suelos supresores consiguiendo una gran diversidad de hongos asociados al nematodo, las mayores poblaciones se atribuyeron a las especies de *Malassezia restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, además se encontraron hongos del género *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Microdochium bolleyi*, etc. Sugiriendo una actividad antagonica por parte de estos sobre los quistes.

A nivel mundial la eficiencia de control de diversos hongos nematofagos sobre los quistes de Globodera, encontrándose entre los hongos más efectivos *Fusarium* sp, *T. harzianum*, *T. virens*, *P. lilacinus*, *V. lecani*, *P. cucumerina* (Jacobs , 2000) (Eberline et al., 2016) (Trifanova, 2010)(Corrion et al., 2012). Con eficiencias de entre 40.50 % - 48.90 % para *Fusarium* sp, 49 % - 60 % para *T. harzianum*, 60 % para *P. cucumerina* y hasta 100 % en condiciones in vitro para *P. lilacinus*.

En Guatemala el único reporte de investigaciones para el control de nematodos de quiste Globodera encontrado a la fecha fue realizado a nivel in vitro con aislados provenientes del departamento de Quetzaltenango por (Sánchez Pérez, Ruiz Chután, Berdúo Sandoval, & Melgar Valladares, 2020) en esta investigación consiguieron aislar hongos de las especies de *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma virens* y *T. harzianum*, provenientes de cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango, determinando eficiencia de control de hasta un 70 % de parasitismo in vitro para *P. lilacinus*, 56.67 % para *T. virens*, y 50 % para *T. harzianum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar el aislamiento e identificación de hongos antagonistas de nematodos formadores de quiste del género *Globodera* en el cultivo de papa en la región productora de los Cuchumatanes.

3.2 Objetivos específicos

1. Aislar hongos antagonistas del nematodo formador del quiste del género *Globodera*, en muestras de suelo de la región productora de los Cuchumatanes.
2. Identificar por medio de técnicas moleculares la especie de los aislados obtenidos de quistes de *Globodera*.
3. Evaluar la capacidad antagonista de los aislados basado en la observación del crecimiento de los aislados sobre los quistes de *Globodera* y revisión bibliográfica de las especies identificadas.

4 HIPÓTESIS

De los diversos hongos antagonistas a aislar de las muestras de suelo de la región productora de papa estudiada el hongo *Paecilomyces lilacinus* es el que presentara una mejor alternativa de control sobre quistes y huevos del nematodo *Globodera* debido a la producción de enzimas que le permiten degradar la cubierta de los huevos y quistes.

5 METODOLOGÍA

5.1 Aislado de hongos antagónicos asociados a quistes de Globodera

5.1.1 Recolección de muestras

Se utilizaron muestras de suelo de la región productora de papa de los Cuchumatanes en los municipios de Chiantla y Todos Santos Cuchumatanes en los pueblos de Chancol, Paquix, Puertas del Cielo, la Capellanía y Climentoro en el departamento de Huehuetenango con reportes previos de presencia de quistes de Globodera, estas muestras de suelo fueron obtenidos de proyectos previos de investigación desarrollados en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía.

5.1.2 Extracción de quistes

La extracción de quistes de las muestras de suelo se realizó por medio de la metodología propuesta por (Corrion et al., 2012). El cual es a su vez una adaptación del método de extracción de quistes por flotación propuesto por (Fenwick, 1940).

- Para esto se tomó una muestra de 50 g de suelo seco de cada una de las localidades, dentro de un beacker de 500 ml. (figura 1A).
- Posteriormente se aforo el recipiente con agua y se dejó reposar durante 5 min.
- El sobrenadante se trasladó sobre una columna de tamices de 500 μm y 212 μm , y se recolecto los residuos del tamiz de 212 μm con una pitea sobre papel filtro.
- El material recolectado se dejó secar durante un aproximado de 12 h a 24 h, hasta observar que se retire el exceso de humedad.
- El material colectado y secado se colocó dentro de un erlenmeyer de 50 ml, y se adiciono acetona de grado industrial hasta aforar el cuello del erlenmeyer, se

dejó reposar por 5 min para permitir que los quistes floten al máximo nivel del fluido.

- Se colectaron estos con ayuda de un pincel y se dejó el material nuevamente sobre un papel filtro y se observó en un estereoscopio para la selección individual de los quistes. (figura 8A).

5.1.3 Aislado de hongos antagónicos asociados a los quistes

Para el aislamiento de los hongos se tomaron 20 quistes provenientes de cada una de las localidades, haciendo un total de 100 quistes, seguidamente de cada comunidad se prepararon 4 grupos de 5 quistes los cuales fueron posteriormente sembrados en medio de cultivo PDA suplementado con 5 % de penicilina.

Cada grupo de quistes fue colocado en una caja de petri individual con una etiqueta de su localidad de origen y fueron numeradas de forma correlativa para diferenciar el número de grupo de quistes. La siembra se realizó en cruz, colocando en los vértices de un cuadro imaginario 4 quistes y uno en el centro de dicho cuadro.

Las cajas de petri se sellaron con cinta parafilm, estas se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente durante 10 días y se examinaron diariamente para detectar el desarrollo de micelio. Los hongos crecidos fueron trasladados posteriormente a cultivos puros de PDA basal para los trabajos posteriores, con una identificación previa del lugar de origen del quiste y la repetición de quiste de donde se extrajo. (figura 9A).

5.1.4 Selección de los aislados por características macroscópicas de la colonia

De los aislados obtenidos de las placas de cultivo puro, se tomaron únicamente aquellos con características de crecimiento micelial diferentes basado en los

criterios para caracterización macroscópica de hongos propuesta por (Salvamani & Nawawi, 2014) los cuales incluyen, tasa de crecimiento, forma de la colonia, color al reverso de la placa y frontal, existencia de líneas radiales y formación de círculos concéntricos, además, se conservó aislados similares provenientes de distintas localidades.

5.2 Identificación molecular de los aislados de quistes

5.2.1 Extracción del ADN de los aislados

La extracción del ADN se realizó colectando una porción del micelio desarrollado en las placas dentro de un tubo de microcentrífuga, esta porción de ADN se sometió al proceso de extracción con el buffer CTAB (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición de las diferentes soluciones buffer utilizadas en el proceso de extracción de ADN.

Solución	Reactivo	Concentración
Buffer CTAB	CTAB	3 %
	EDTA	20 mM
	NaCl	1.4 M
	Tris HCl 1 M	100 mM
	PVP	1 %
	Mercaptoetanol	0.20 %
TE Buffer	Tris HCl 1 M	10 mM
	EDTA	1 mM

Fuente: elaboración propia, 2021.

A la muestra de micelio extraído se le agrego 500 µl de buffer de extracción CTAB y se macero la muestra con un micro pistilo hasta observar que no existen residuos del material visibles en el recipiente, seguidamente la muestra se agito en un vortex durante un minuto.

La muestra macerada y agitada se incubo durante una hora a 65 °C en baño maría, una vez transcurrido ese periodo se procedió a refrigerar la muestra a 10 °C durante 15 min.

Se dejo descongelar la muestra a temperatura ambiente y se centrifugo a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.50 ml. A esta muestra se le adiciono 500 µl de cloroformo mezclado con isomilpropanol en relación 24:1 respectivamente y se mezcló por inversión 50 veces.

Esta muestra se centrifugo por 3 min a 14,000 rpm, después de este proceso se puede observar dos fases siendo una de coloración oscura y una de color claro, la fase clara se trasladó a otro nuevo tubo eppendorf. El último proceso de centrifugado anterior se repitió 2 veces para limpiar de mejor manera las muestras de ADN.

La muestra obtenida del proceso anterior se adiciono con 400 µl de isopropanol y se mezcló por inversión 50 veces, se centrifugo la mezcla por 3 min a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante evitando tirar la pastilla de ADN, esta pastilla se lavó con etanol al 70 % usando 400 µl y centrifugando por 3 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante, y se dejó el tubo secando por 15 min de forma invertida sobre papel absorbente.

Para la rehidratación del ADN se agregó 50 µl de solución TE (Cuadro 2) y se incubo por una hora a temperatura de 65 °C, para finalmente almacenar la muestra a -20 °C hasta su uso.

5.2.2 Identificación de los aislados por medio de cebadores específicos

Se realizo una identificación de los hongos aislados usando marcadores específicos para 3 hongos principales de interés, para el caso de *Trichoderma harzianum* se usó el par de cebadores THITS-F2 (5'-CGGGTTTTTTATAATCTGAGCC-3') y THITS-R3 (5'-CATTCAGAAGTTGGGTG-3') el cual amplifica un fragmento de 400

pb como resultado positivo de acuerdo con el protocolo de (Miyazaki, Tsuchiya, & Okuda, 2009).

Para *Trichoderma virens* se usó el par de cebadores T1F (5'-CCGTTTGATGCGGGGAGTCTA-3') Y T1R (5'-GGCAAAGAGCAGCGAGGTA-3') con amplicones de 330 pb como resultado positivo de acuerdo (Chacon & Naranjo 2012).

Finalmente para *Paecilomyces lilacinus* se empleó el par de cebadores de PaeF (5' CTC AGT TGC CTC GGC GGG AA 3') y PaeR (5' GTG CAA CTC AGA GAA GAA ATT CCG 3') obteniendo fragmentos de 130 pb amplificados como respuesta positiva según el protocolo de (Mullis 1990).

A. Preparación previa de la muestra

Para poder realizar la identificación de los aislados usando los cebadores mencionados anteriormente fue necesario realizar una preparación previa de las muestras, para esto se midió la calidad de la muestra de ADN en un espectrofotómetro con una dilución de 4 µl de extracto de ADN en 196 µl de TE como reactivo blanco. Los resultados de concentración de ADN se utilizaron para calcular las diluciones respectivas para una concentración final de 100 ng/µl.

B. Amplificación de fragmentos con cebadores específicos.

Para la amplificación se utilizó la técnica de PCR usando los cebadores mencionados anteriormente, la mezcla para la amplificación de la muestra consistió en 1 µl de extracto de ADN, 1 µl de cebador A, 1 µl de cebador B, 12 µl de reactivo gotak 2x mix ® como fuente de nucleótidos y ADN polimerasa, finalmente se aforo

la mezcla a 20 µl con agua libre de nucleasas. Los tiempos de termo ciclado se presentan en el cuadro 3 para cada par de cebadores en específico.

C. Electroforesis y rebelado de gel

Se preparo una placa de gel de electroforesis con TBE al 0.5 X y 5 % de agar para electroforesis, esta placa se cargó con 2 µl de ADN y 2 µl de buffer de carga, se dejó correr las muestras durante 1 h a 80 voltios, una vez transcurrido el tiempo se revelo la placa con bromuro de etidio durante 15 min y se observó la placa bajo luz ultravioleta.

Cuadro 3. Programa de termociclador para los diferentes cebadores utilizadas.

Cebadores	Fase	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Tv1F y Tv1R	Desnaturalización inicial	2 min.	94 °C	1
	Desnaturalización	30 s	94 °C	30
	Alineación	30 s	55 °C	30
	Extensión	1 min	72 °C	30
	Extensión final	10 min	72 °C	1
THITS	Desnaturalización inicial	1 min	95 °C	1
	Desnaturalización	30 s	95 °C	30
	Alineación	1.5 min	62 °C	30
	Extensión	2 min	72 °C	30
	Extensión final	10 min	72 °C	1
PaeF	Desnaturalización inicial	2 min	95 °C	1
	Desnaturalización	1 min	94 °C	35
	Alineación	2 min	61 °C	35
	Extensión	1 min	72 °C	35
	Extensión final	5 min	72 °C	1

Fuente: elaboración propia con datos de (Miyazaki, Tsuchiya, & Okuda, 2009), (Chacon & Naranjo 2012), (Mullis 1990).

5.2.3 Secuenciación de la región ITS2 para la identificación de los aislados obtenidos

Para la identificación de las especies de los aislados no amplificado con los cebadores específicos propuestos, se procederá a secuenciación de la región ITS2 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Corrion et al., 2012) , este proceso de secuenciación fue trabajado con apoyo de la universidad de Texas.

5.2.4 Análisis de la información

Las secuencias obtenidas para los aislados de hongos asociados a quistes y huevos se someterán a una comparación en los bancos de genes del NCBI (National Center For Biotechnology Information) asignando la secuencia del ITS2 a las especies con secuencias ITS con identidades de al menos 97 % - 99 % de acuerdo a la hipótesis de especies (SH) como se define para la base de datos UNITE v6 (Devi , Prabhakaran , Kamil , Borah, & Pandey 2012).

Para el caso de la identificación de hongos por medio del uso de cebadores específicos se considerará como positivo la presencia de ampliaciones de las longitudes definidas para cada especie según los cebadores utilizados para cada uno.

5.3 Observación de la capacidad antagónica de los aislados

Posterior a 5 días de incubación de las cajas de petri, se observó los aislados con los quistes en un estereoscopio a 10 X para observar el crecimiento de los hongos sobre los quistes utilizados. Además de esto, se realizó una revisión bibliográfica sobre las especies aisladas con la finalidad de determinar si existen registros de capacidad antagónica de nematodos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislados de hongos antagónicos de Globodera.

Se consiguieron 11 aislados diferentes en total distribuidos en las 5 localidades evaluadas, siendo 3 aislados en la comunidad de puertas del cielo, 1 en Paquix, 5 Capellanía, 1 Climentoro y 1 en el municipio de Chancol. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Total, de aislados y codificación de aislados por lugar de origen.

Comunidad de origen	Cantidad de aislados	Aislado
Puertas del Cielo	3	12 GP 2B
		13 GP 2A.
		14 GP 2A.
Paquix	1	23 GP 2A.
Capellania	5	31 GP 2A.
		33 GP 1 A.
		33 GP 2 A.
		34 GP 2 B
		34 GP 1 B
Climentoro	1	44 GP 3 A
Chancol	1	54 GP 1 A

En el cuadro 4 se presenta el número de aislados correspondientes a cada localidad estudiada, la secuencia de letras y números en la tercera columna indican el código asignado a los diferentes aislados una vez que se realizó la selección.

Se encontró una mayor presencia de hongos antagónicos en la comunidad de la Capellania con un total de 5 aislados, seguido por la comunidad de Puertas del cielo con 3 aislados, y siendo para el resto de las muestras únicamente con un aislado de cada uno. De acuerdo con (Crump & Flynn, 1995) algunos suelos con altas tasas de infestación de los nematodos pueden propiciar el desarrollo de

hongos antagónicos como mecanismo natural de regulación, Este tipo de suelos son usualmente llamados suelos supresores.

De igual forma otras investigaciones como (Stirling, 1988) y (Westphal & Becker, 1999) mencionan que existe un equilibrio entre poblaciones de nematodos fitoparásitos con respecto a los organismos antagónicos en suelos no perturbados o suelos con cultivo continuo de un huésped susceptible. Por tanto, se considera que los suelos de Capellania y Puertas del Cielo pueden comportarse como suelos supresores, debido a cultivos sucesivos del hospedero *S. tuberosum* y a un manejo de cultivo que no compromete el equilibrio entre los nematodos y sus antagonistas.

Se considera prudente evaluar en mayor medida estos dos suelos pues en caso de ser catalogados como suelos supresores representan una fuente importante para el aislamiento de cepas de hongos antagónicos de Globodera.

6.1.1 Selección de los aislados por caracterización macroscópica de las colonias

A. Descripción macroscópica de los aislados

a. Aislado 12 GP 2B

Este aislado tiene un crecimiento circular uniforme, con una tasa de crecimiento lenta, la colonia es de coloración naranja en el reverso de la colonia y de color blanco en la parte superior con una tonalidad rosada degradado en los bordes, se pueden observar líneas radiales tanto en el reverso de la colonia como en la parte superior. Es de una textura algodonosa y firme. (figura 4A).

b. Aislado 13 GP 2A

El aislado dos tiene un crecimiento circular uniforme, con una tasa de crecimiento acelerado, la colonia es de coloración amarilla tanto en la parte superior como en el reverso, sin presencia de círculos ni líneas radiales, con una textura es purulenta. (figura 4B).

c. Aislado 14 GP 2A

Este aislado tiene un micelio con crecimiento circular irregular, con una coloración moteada en el reverso de la colonia con una tendencia predominancia café mientras se acerca al inóculo inicial, en la parte superior de la colonia se puede observar dos tonalidades de color siendo un color café en la parte central de la colonia y color blanco en el borde, la colonia es de textura algodonosa. (figura 4 C).

d. Aislado 23 GP 2A

El aislado 4 tiene una tasa de crecimiento acelerado, con una colonia de forma circular, de color blanquecino en el reverso y frente de la colonia, con textura algodonosa poco compactada, y un círculo hialino circunscrito en el interior de la colonia. (figura 4 D).

e. Aislado 31 GP 2A

Tiene una tasa de crecimiento medio, con una forma del micelio circular con bordes ligeramente irregulares, de color blanquecino en el frente y reverso de la colonia, sin presencia de círculos circunscritos o líneas radiales, de textura lisa poco algodonosa. (figura 4 E).

f. Aislado 33 GP 1 A

Tiene una tasa de crecimiento acelerado, con forma circular, una coloración rosada en el reverso y frente de la colonia con una tonalidad más intensa en el centro de la colonia, de una textura lisa poco algodonosa, con una red de hifas blanquecinas que se diluyen desde el centro de la colonia hasta los bordes. (figura 4 F).

g. Aislado 33 GP 2 A

Tiene una tasa de crecimiento lento, con una coloración blanquecina en el frente de la colonia y naranja en el reverso, de textura algodonosa y consistente, sin presencia de círculos circunscritos o líneas radiales, con un ligero tono grisáceo en el centro de la colonia. (figura 5 G).

h. Aislado 34 GP 2 B

Este aislado tiene una tasa de crecimiento lento, con una coloración blanquecina en la parte frontal de la colonia, la parte reversa de la colonia posee una coloración predominantemente verde oscura con un halo blanquecino en los bordes de la colonia, y una coloración oscura en el inoculo inicial. Posee una textura algodonosa y no se observa formación de líneas radiales. (figura 5 H).

i. Aislado 34 GP 1 B

Este tiene una tasa de crecimiento medio con una colonia de forma circular, de coloración café en el reverso de la colonia, con un disco blanco en el borde de la colonia, en la parte frontal se ve una coloración blanca con una textura algodonosa. (figura 5 I).

j. Aislado 44 GP 3 A

Tiene una tasa de crecimiento lento, con una coloración blanquecina en el frente de la colonia y naranja en el reverso, de textura algodonosa y consistente, sin presencia

de círculos circunscritos o líneas radiales, con un ligero tono grisáceo en el centro de la colonia. (figura 5 J).

k. Aislado 54 GP 1 A

Esta tiene una tasa de crecimiento acelerado, con una coloración rosada en el reverso y frente de la colonia, tiene una forma circular irregular, con textura esporulada ligeramente algodonosa y poco consistente. (figura 5 K).

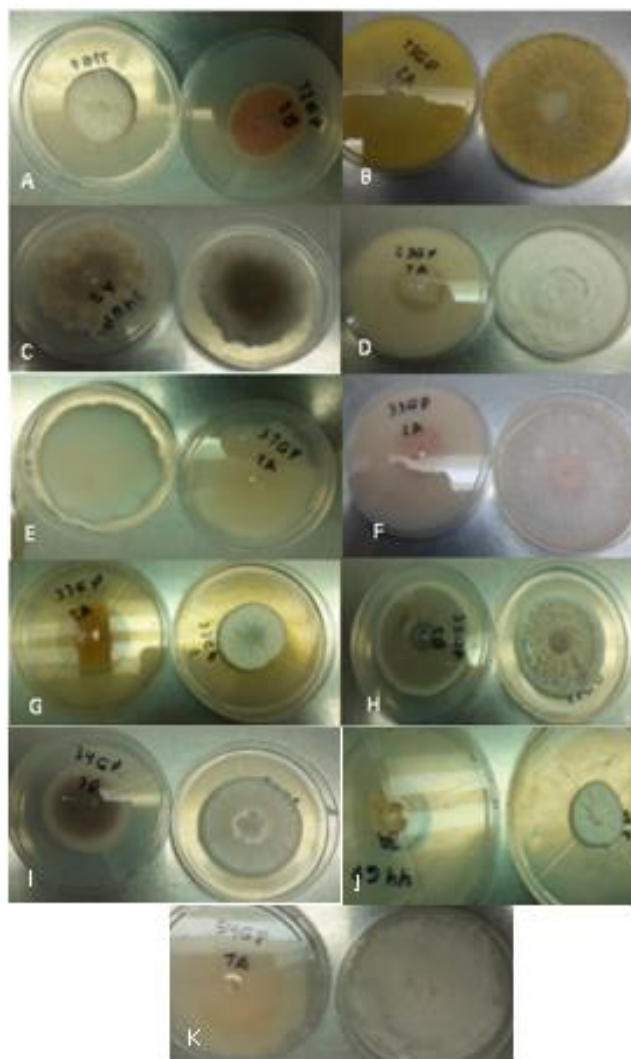


Figura 5. Reverso y frontal de las colonias desarrolladas en medio de PDA obtenidos de las distintas comunidades evaluadas. A. aislado 12 GP 2B, B.

aislado 13 GP 2A, *C. aislado* 14 GP 2A, *D. aislado* 23 GP 2A, *E. aislado* 31 GP 2A, *F. aislado* 33 GP 1 A, *G. aislado* 33 GP 2 A, *H. aislado* 34 GP 2 B, *I. aislado* 34 GP 1 B, *J. aislado* 44 GP 3 A, *K. aislado* 54 GP 1 A.

6.2 Identificación molecular de los aislados de quistes

6.2.1 Identificación de los aislados por medio de cebadores específicos

De los tres cebadores utilizados se obtuvo una amplificación positiva únicamente con el cebador para *P. lilacinus*. para los aislados 12 GP 2B, 23 GP 1A, 31 GP 2A, 33 GP 1A, 33 GP 2A, 44 GP 3A, lo que se traduce en que estos aislados son positivos para el hongo *P. lilacinus*, sin embargo, no se observa una dinámica de crecimiento micelial similar para los aislados a excepción de los aislados 12 GP 2B, 33 GP 2A y 44 GP 3A. Figura 10A.

La ausencia de amplificaciones positivas para los cebadores de *T. harzianum* y *T. virens* se interpretan como ausencia de los hongos en los aislados, sin embargo, debe considerarse la posibilidad de problemas dentro de las condiciones de la reacción de amplificación puesto que no se contaba con un control positivo para estandarizar los procedimientos de la reacción.

6.2.2 Secuenciación de la región ITS2 e identificación de los aislados obtenidos

Los aislados cuya identificación no fue posible por medio de los cebadores utilizados se determinaron por medio de las secuencias de la región ITS, comparada con la base de datos del NCBI, de igual forma las amplificaciones positivas para *P. lilacinus* se confirmaron con estos resultados. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identificación de los aislados según resultados de secuenciación de la región ITS

Aislado	Origen	Especie	Similitud (NCBI)
12 GP 2B.	Puertas del cielo	<i>P. lilacinus</i>	99.36 %
13 GP 2A.	Puertas del cielo	<i>P. cucumerina</i>	99.23 %
14 GP 2A.	Puertas del cielo	<i>T. harzianum</i>	99.45 %
33 GP 1A.	Capellania	<i>P. lilacinus</i>	99.36 %
34 GP 2B.	Capellania	<i>T. harzianum</i>	99.45 %
34 GP 1B.	Capellania	<i>V. leptobactrum</i> .	98.08 %
44 GP 3A.	Climentoro	<i>P. lilacinus</i>	99.36 %
54 GP 1	Chancol	<i>H. rhossiliensis</i>	99.38 %

En el cuadro 5 se puede observar la especie obtenida según la identificación por secuenciación de la región ITS, de acuerdo con estos resultados se consiguieron aislados de *Trichoderma harzianum* en las localidades de Puertas del Cielo y la Capellania, lo cual no fue posible por medio de los cebadores específicos.

Como resumen se presenta el cuadro 6 con el código de los aislados y las especies identificadas para cada localidad y códigos de los aislados. En este cuadro resumen se pueden presentar los aislados cuya identificación con marcadores específicos no fue obtenida, sin embargo, los datos de secuenciación consiguieron exitosamente identificar, de igual forma se tuvieron inconvenientes en la amplificación de la región ITS para ciertos aislados sin embargo estos si fueron posibles de identificar por medio de los cebadores específicos.

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 5 se pudo observar que no fue posible identificar la especie *T. harzianum* por medio de los marcadores específicos, aun cuando estos si estaban presentes en las muestras según los datos de secuenciación, cabe mencionar que los dos aislados reportados como *T. harzianum* poseen una dinámica de crecimiento micelial distinta, esto se atribuye a una variación intra especie, o bien a un error en la identificación al limitarse únicamente a la secuencia ITS, de acuerdo a (Cai & Druzhinina, 2021) la identificación de genero para *Trichoderma* es posible por la secuencia ITS, sin embargo, la identificación efectiva de las especies, requiere de las secuencias de *rbp2* y *tef1* debido a la alta similitud de este género, esto último igualmente explica la ausencia de amplificación con los marcadores evaluados.

Cuadro 6. Resumen de especies identificadas con los marcadores específicos y resultados de secuenciación ITS según lugar de origen y código de los aislados

Aislado	Marcadores específicos	Identificación con secuencias	Origen de la muestra
12 GP 2B.	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	Puertas del cielo
13 GP 2A.	NA	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Puertas del cielo
14 GP 2A.	NA	<i>T. harzianum</i>	Puertas del cielo
23 GP 1A.	<i>P. lilacinus</i>	NA	Paquix
31 GP 2A.	<i>P. lilacinus</i>	NA	Capellania
33 GP 1A.	<i>P. lilacinus</i>	NA	Capellania
33 GP 2A.	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	Capellania
34 GP 2B.	NA	<i>T. harzianum</i>	Capellania
34 GP 1B.	NA	<i>V. leptobactrum.</i>	Capellania
44 GP 3A.	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	Climentoro
54 GP 1A.	NA	<i>H. rhossiliensis</i>	Chancol

*NA: no amplificado.

En el cuadro 6 se puede observar que no fue posible identificar la especie *T. harzianum* usando los marcadores específicos, sin embargo, la identificación por medio de secuencias de ITS indico la presencia de esta especie en los aislados, cabe mencionar que los dos aislados reportados como *T. harzianum* poseen una dinámica de crecimiento micelial distinta, esto se atribuye a una variación intra especie, o bien a un error en la identificación al limitarse únicamente a la secuencia ITS, de acuerdo a (Cai & Druzhinina, 2021) la identificación de genero para *Trichoderma* es posible por la secuencia ITS, sin embargo, la identificación efectiva de las especies, requiere de las secuencias de *rbp2* y *tef1* debido a la alta similitud de este género.

De igual forma se puede confirmar la identificación molecular por marcadores específicos para *P. lilacinus*, puesto que los resultados de secuenciación reflejaron la misma especie con una similitud de 99.36 %. Igualmente, se observa que 3 aislados identificados como *P. lilacinus* no fueron posibles de identificar por medio de la secuencia ITS por problemas con la amplificación, sin embargo, estos 3 aislados tienen una característica macroscópica distintas de los aislados confirmados como *P. lilacinus*.

Esta diferencia macroscópica se atribuye a variaciones genéticas intra específicas de la especie, de acuerdo a (Haybrig, y otros, 2013) existen reportes contradictorios de esta especie relacionados a la variabilidad genética *P. lilacinus*, especialmente con aislados obtenidos de diferentes orígenes, en su estudio encontraban cepas reportadas como *P. lilacinus* basados en a las secuencias ITS que no cumplieran con la dinámica de crecimiento micelial característico de esta especie, siendo únicamente posible generar una distinción de especie usando un análisis filogenéticos más profundo, sugiriendo la especie *Purpureocillium lavendulum* para estos aislados.

Basado en lo mencionado anteriormente es posible que existan falsos positivos con respecto a la identificación de los aislados como *P. lilacinus* únicamente con los marcadores utilizados o las secuencias ITS, por lo que puede ser necesario un análisis más profundo, si se requiere una identificación más precisa.

Debe tomarse en cuenta también que este tipo de análisis filogenético usando códigos de barras genéticos como lo describe (Cai & Druzhinina, 2021) y (Marwi & Domenico, 2013) es un proceso más riguroso de identificación y con menor riesgo de error, sin embargo requiere de mayores insumos para su ejecución y equipo, por este motivo y además que el proceso de identificación a ese nivel excede los límites de los objetivos planteados para el ensayo.

Todo lo anterior sumado a que los aislados 12 GP 2B, 33 GP 2A, 44 GP 3A, concuerdan con la caracterización macroscópica de las colonias descritas por (Haybrig, y otros, 2013) como consistentes para *P. lilacinus*. y las recomendaciones de distintas literaturas sobre la efectividad de la identificación con ITS. (Baldwin, y otros, 1995), (Lashermes, Combes, Trouslot, & Charrier, 1997), (Maymon, y otros, 2004) (Marwi & Domenico, 2013) se considera que los resultados de la identificación obtenido por los marcadores específicos y secuencias ITS son efectivos y de apoyo suficiente para el análisis de este ensayo.

6.3 Observación de la capacidad antagónica de los aislados

Para esto se observo el quiste en el medio de cultivo en un estereoscopio a 10X posterior a 5 días de incubacion, en la figura 6 se puedo observar que los hongos aislados se desarrollaban efectivamente del quiste sugiriendo una actividad de asocio entre el hongo aislados y los quistes obtenidos de las diferentes localidades de muestreo.



Figura 6. Quiste de Globodera parasitado con uno de los aislados obtenidos.

Se pudo observar que los hongos aislados se desarrollaban efectivamente del quiste (figura 6) sugiriendo una actividad de asocio entre el hongo aislados y los quistes cultivados. Además el riesgo de crecimiento de hongos superficiales del quiste se reduce gracias a, que dentro del proceso de extracción de los quistes se incluye el uso de acetona, pues algunos estudios como (Raiziss, Severac, & Moetsch, 1930), mencionan que este reactivo posee ciertas propiedades germinicidas con un 79 % de éxito, de igual forma (Dadasoglu, y otros, 2011) menciona igual esta capacidad antimicrobiana usando extractos de acetona de semillas de *O. rotundifolium*.

El principal aislado obtenido fue *P. lilacinus*, en 4 de las 5 comunidades evaluadas exceptuado únicamente Chancol. Esta especie tiene una gran cantidad de reportes sobre su capacidad antagonica sobre quistes de Globodera, destacando algunos como el de (Corrion , Nuñez Sanchez , Nuñez Camargo , & López Lima , 2012), (Sánchez Pérez, Ruiz Chután, Berdúo Sandoval, & Melgar Valladares, 2020), con una eficiencia de control in vitro de 100 % para el primero de los estudios y de 57.67 % en el segundo, además de ellos existen estudios sobre la eficiencia en campo como el de (Jacobs , 2000), en este se realiza una aplicación de *P. lilacinus* en granulos de alginato reflejando una disminucion del 60 % en el aumento de la poblacion de quistes de Globodera.

Para el caso de *P. cucumerina*, existen diversos reportes igualmente de la capacidad antagonica del hongo destacando investigaciones como los de (Atkins,

Clark, Sosnowska, Hirsch, & Kerry, 2003) y (Jacobs , 2000) encontrando ambos una eficiencia de control de las poblaciones en un 60 % mientras que (Hajji, Hlaoua, Hajer, & Raouani, 2017) reporto una eficiencia de control entre 76 % y 83 % lo que demuestra ser un potencial agente de control de poblaciones de nematodos de quiste Globodera. De igual forma (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal , 2016) encontraron una alta presencia de este hongo en huevecillos con sintomatología de enfermedades, lo que sugiere su capacidad antagonica para los huevecillos de este nematodo y no unicamente sobre los quistes.

Es importante resaltar en el caso de estudios como el de (Jacobs , 2000) los efectos de la interaccion en campo de mas de una especie de hongo, pues en este estudio durante las evaluaciones individuales de *P. lilacinus* y *P. cucumerina*, se observaron resultados similares con un 60 % de disminucion en la tasa de aumento de las poblaciones de nematodo del quiste en campo. Sin embargo una aplicación conjunta de estos hongos redujo significativamente el efecto de la aplicación. Esto es importante debido a que se puede observar que en la comunidad de Puertas del Cielo se cuenta con esta interaccion de forma natural, lo que lo combierte en una zona de estudio interesante para evaluar la interaccion natural de este conjunto de hongos.

La segunda especie identificada con mayor presencia en las comunidades evaluadas fue *T. harzianum*, este hongo tiene registros de su capacidad antagonica sobre quistes de globodera a nivel de campo, (Trifanova, 2010) reporta una eficiencia de 29.60 % a 49.30 %, estos resultados son consistentes con los reportados por (Sánchez Pérez, Ruiz Chután, Berdúo Sandoval, & Melgar Valladares, 2020) a nivel in vitro con un 50 % de eficiencia, este aislado se encontro de igual forma en las dos localidades con una mayor cantidad de aislados que son Puertas del cielo y la Capellania.

Se considera importante evaluar el comportamiento conjunto de estos hongos en las localidades de origen ya que al ser estos con una alta tasa de control reportada individualmente podrian ser utilizados en aplicaciones conjuntas, ya que contrario a

los que sugieren los resultados de (Jacobs , 2000), si se observa un asocio natural de estas cepas, para la localidad de Puertas del Cielo y la Capellania.

Para *H. rossoliensis* se encontraron registros de aislados de huevecillos enfermos de nematodo *Globodera* como el de (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal , 2016), estos encontraron un alto numero de secuencias asociadas a este hongo aislados de huevos enfermos provenientes de suelo suelos de la region de Chabornay en Idaho, sugiriendo que existia cierta participacion de este hongo sobre la sintomatologia encontrada de los huevecillos, sin embargo, no se cuenta con registros de la eficiencia de control de este hongo sobre los quistes o huevos de *Globodera*. Por otra parte si se encuentran reportes de su capacidad nematofaga en nematodos de quiste del genero *Heterodera*, controlando casi en su totalidad las poblaciones de nematodos existentes (Chen & Xingzhong, 2005),

Esto ultimo supone una capacidad nematofaga del hongo sobre nematodos formadores de quiste, lo que a su vez sugiere que existe una capacidad de control sobre quistes de *Globodera*, ya que como se reporta por (Crump, 1991), hongos con capacidades antagónicas sobre *Heterodera* se han encontrado parasitando quistes de *Globodera* anteriormente.

Finalmente, para el caso de los aislados de *V. leptobactrum* se tienen reportes de su capacidad como nematofagos principalmente en *Meloidogyne incognita* (Regaieg, Ciancio, Horriegue, Grasso, & Rosso, 2010), además se encuentran reportes de un nivel de control para *G. pallida* como el de (Hajji, Hlaoua, Hajer, & Raouani, 2017) donde se encontró una capacidad de control de 61 % a 66 %.

Aunque los distintos reportes de la capacidad antagonica de los hongos aislados en este ensayo, sugieren que pueden ser utilizados como agentes de biocontrol, tal hipotesis no se ha comprobado a profundidad, por lo que se sugiere realizar las evaluaciones correspondientes a nivel in vitro y campo para confirmar esta capacidad, pues en caso de comprobarse dicha hipotesis su uso en las zonas de cultivo cercanas a la ubicación de los muestreos podria ser de gran importancia ya que como menciona (Eberline, Heuer, Vidaly, & Westphal , 2016) un microbioma específico adaptado a las condiciones microambientales del nicho de las

poblacione de Globodera permitiria manejar las densidades poblacionales y conseguir una supresion de este nematodo y por tanto la produccion sostenible del cultivo de papa *S. tuberosum*.

7 CONCLUSIONES

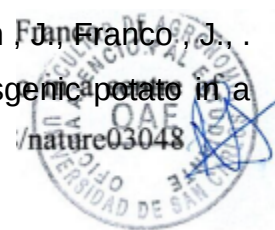
1. Los suelos con mayor cantidad de aislados distintos obtenidos fueron La Capellania y Puertas del Cielo con 5 y 3 aislados respectivamente, lo que sugiere un comportamiento de suelos supresores.
2. Se identificaron 5 especies de hongos siendo estas *P. lilacinus*, *T. harzianum*, *V. leptobactrum*, *H. rhossiliensis*, *P. cucumerina* en las 5 comunidades evaluadas siendo la de mayor frecuencia *P. lilacinus* seguido por *T. harzianum*.
3. Se observó el crecimiento inicial de los aislados a partir de los quistes extraídos de las muestras de suelo evaluadas, lo que junto a la revisión bibliográfica de las especies identificadas sugieren una capacidad antagónica de dichos aislados sobre los quistes de Globodera.

8 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar las evaluaciones correspondientes a nivel in vitro y campo para confirmar la capacidad antagonica de los aislados obtenidos en este ensayo y cuantificar su eficiencia de control, con la finalidad de incluirlos dentro de programas de biocontrol del nematodo del quiste de la papa.
2. Realizar un análisis más profundo sobre la dinámica microbiológica en los suelos de La Capellania y Puertas del Cielo, ya que en estos se observó la presencia de una mayor cantidad de hongos antagónicos, sugiriendo una dinámica de tipo supresor, lo cual puede ser de gran importancia para la obtención de aislados con mayor potencial de control en la zona de producción o regiones con microclimas similares.
3. Se recomienda realizar un análisis filogenético más profundo para los aislados de *P. lilacinus* y *T. harzianum* obtenidos debido la discrepancia de la dinámica de crecimiento micelial observada con respecto a los resultados de identificación molecular, con la finalidad de descartar errores en la identificación producto de la estrecha relación entre estas especies y otras del mismo género.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios , G. (2005). Plant diseases caused by nematodes . En *Plant Pathology* (quinta ed.).
2. Arauz, C. (1998). *Fitopatología. Un enfoque agroecológico* (Primera ed.). Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
3. Atkinks , S., Clark, I., Pande , S., Hirsch, P., & Kerry , B. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 257-264. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.002
4. Atkins, S., Clark, I., Sosnowska, D., Hirsch, P., & Kerry, B. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4788-4793. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4788-4793.2003>
5. Baldwin, B., Sanderson, M. J., Mark, J., Wojciechowski, M. F., Campbell, C., & Donoghue, M. (1995). The ITS Region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. 82(2), 247-277. https://donoghuelab.yale.edu/sites/default/files/052_baldwin_annmisbotgard95.pdf
6. Brodie, B., Evans , K., & Franco , J. (1993). Nematode parasites of potatoes chapter 3. En C. International, *In plant parasitic nematoda in temperate agricultura* (págs. 87-132).
7. Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bisett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoherma*. *Fungal Diversity*, 107, 1-69. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>
8. Celis, C., Scurrah, M., Cowgill , S., Chumbiua, S., Green , J., Franco , J., . . . Howard , J. (2004). Environmental biosafety and transgenic potato in a



- centre of diversity for this crop. *Nature*, 432, 222-225. <https://doi.org/10.1038/nature03048>
9. Chacon , C., & Naranjo , R. (2012). Capacidad parasitica de hongos contra el nematodo de quistes de la papa (*Globodera* spp). *Alcances tecnologicos*, 9(1), 3-10. <https://doi.org/10.35486/at.v9i1.45>
 10. Chen , P., Chan , S., Wong, S., Eng, L., Jiwan , M., Kundat, F., & Majid , N. (2012). Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistics activity against *meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14, 197-203.
 11. Chen, S., & Xingzhong, L. (2005). Control of the soybean cyst nematode by the fungi *Hirsutella rhossiliensis* and *Hirsutella minnesotensis* in greenhouse studies. *Biological Control*, 32(2), 208-219. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964404001872?via%3Dihub>
 12. Contina, J. B., Dandurandy, L. M., & Knudsen, G. R. (2019). A predictive risk model analysis of the potato cyst nematode *globodera pallida* in idaho. *Plant Disease*, 109(12), 317-329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0717-RE>
 13. Corchon, L. (2020). *Ribosomas, estructura y composicion*. Recuperado el 21 de 10 de 2021, de Asturnatura: <https://www.asturnatura.com/articulos/ribosomas-membranas/ribosomas.php>
 14. Corrion , G., Nuñez Sanchez , A., Nuñez Camargo , M. D., & López Lima , J. D. (2012). Evaluacion de la patogenicidad in vitro de *purpureocillium lilacinum* sobre *Globodera rostochiensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 15(2), 126-134. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=939/93924626017>
 15. Crump , & Flynn, C. (1995). Isolation and screeening of fungi for the biological control of potato cyst nematodes. *Nematologica*, 41(4), 628-638. <https://doi.org/10.1163/003925995X00567>

16. Dackman, C. (October de 1990). Fungal parasites of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*: isolation and reinfection. *Journal of Nematology*, 22(4), 594-597. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619076/pdf/594.pdf>
17. Dadasoglu, F., Aydin, T., Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., . . . Mete, E. (2011). Antibacterial activities of extract and essential oils of three origanum species against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *journal of plant pathology*, 93(2), 271-282. <https://www.jstor.org/stable/41998997>
18. Danay, I., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de accion de Trichoderma frente hongos fitopatogenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
19. Del Prado , I. (2015). *Nematodo dorado Globodera rostochiensis*. Ficha tecnica , Organismo Internacional Regional De Sanidad Agropecuaria. <https://www.oirsa.org/contenido/documentos/FICHA%20TECNICA%20NEMATODO%20DORADO.pdf>
20. Devi , T., Prabhakaran , N., Kamil , D., Borah, J., & Pandey , P. (2012). Development of Species Specific Markers For Detection of Trichoderma Species. *Vegetos*, 25(2), 207-217.
21. Druzhinina, I., & Kubicek, C. (2005). Species concepts and biodiversity in trichoderma and Hypocrea from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B, 100-112.
22. Duceppe, M., Lafond, J., Palomares, E., Sabeh, M., Blok , V., Moffett, P., & Mimee, B. (8 de mayo de 2017). Analysis of survival and hatching transcriptomes from potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Sci Rep*, 7(3882). doi:10.1038/s41598-017-03871-x

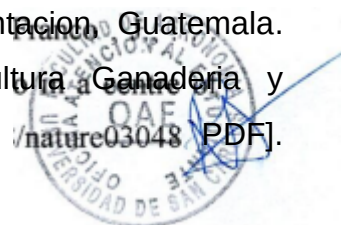
23. Eberline, C., Heuer, H., Vidaly, S., & Westphal, A. (Enero de 2016). Microbial Communities in *Globodera pallida* Females Raised in Potato Monoculture Soil. *Phytopatology*, 106, 581-590.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-07-15-0180-R>
24. Evans, K., & Stons, R. (1977). A review of the distribution of the cyst-nematode *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *International Journal of Pest Management*, 23(2), 178-189. doi:10.1080/09670877709412426
25. Fenapapa (Federación nacional de la papa, Guatemala). (2018). *Aportes de la innovación tecnológica al cultivo de la papa*. Fenapapa. [Archivo PDF]
<https://agrequima.com.gt/site/wp-content/uploads/2018/05/presentacioncongreso.pdf>
26. Fenwick. (diciembre de 1940). Fenwick, D. W. (1940). Methods for the Recovery and Counting of Cysts of *Heterodera schachtii* from Soil. *Journal of Helminthology*, 18(04), 155. doi:10.1017/s0022149x00031485 .
27. Fernández, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas*(62), 96-100.
<http://201.207.189.89/bitstream/handle/11554/6578/A2120e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. Franco, J. (1989). *Nematodos del quiste de la papa, Globodera spp.* Boletín de información técnica , Centro internacional de la papa .
<http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/TIBes20558.pdf>
29. García, M. (1980). *Estudio analítico taxonómico de los nematodos de quistes (Heterodera spp) en Guatemala*. [Tesis de pregrado , Universidad De San Carlos De Guatemala].
30. García, N. (2015). *Distribución y presencia del complejo de nemátodos de quiste en el cultivo de papa (solanum tuberosum L.) en la aldea concepción palencia Guatemala y servicios realizados en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario MAGA, Barcenillas Villa nueva, Guatemala*. [Tesis de licenciatura

- , Universidad De San Carlos De Guatemala].
<http://www.repositorio.usac.edu.gt/2395/>
31. Gray , N. (2018). Fungi attacking vermiform nematodes. En G. Poinar , & H. Jansson (Edits.), *Diseases of nematodes* (Vol. II, págs. 4-32). Taylor & Francis Group.
 32. Griener , E., Bossis , M., Fouville , D., Renault , L., & Mugniery, D. (1 de marzo de 2001). Molecular approaches to the taxonomic position of Peruvian potato cyst nematodes and gene pool similarities in indigenous and imported populations of Globodera. *Nature*, 86, 277-290.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00826.x>
 33. Grupo Interinstitucional de monitoreo de bosques y uso de la tierra. (2014). *Mapa de cambio de uso de la tierra 2001 a 2010 para estimacion de emisiones de gases de efecto invernadero*. Documento informativo, Guatemala.
http://www.sia.marn.gob.gt/publicaciones/otros/Documento%20informativo_GIMBOT_oct2014.pdf
 34. Gustavo , Á. V., Guerra , T., & Mijangos , R. (2009). *Biodiversidad de nematodos de quiste, Tylenchida, Heteroderinae, asociados a cultivos de importancia economica en la region central de Guatemala*. Universida De San Carlos De Guatemala, Direccion General De Investigacion (DIGI), Guatemala. <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puirna/INF-2009-050.pdf>
 35. Hajji, L., Hlaoua, W., Hajer, R., & Raouani, N. (2017). Biocontrol Potential of *Verticillium leptobactrum* and *Purpureocillium lilacinum* Against *Meloidogyne javanica* and *Globodera pallida* on Potato (*Solanum tuberosum*). *American Journal of Potato Research*, 94, 178-183.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12230-016-9554-0>
 36. Haybrig, P., Cano, J., Gené, J., García, D., Hernández, M., & Guarro, J. (2013). Polyphasic analysis of *Purpureocillium lilacinum* isolates from

- different origins and proposal of the new species *Purpureocillium lavendulum*. *Mycologia*, 105(1), 151-161.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/11-190>
37. Haydock, P., & Evans, K. (1998). Management of Potato Cyst Nematodes in the UK: An Integrated Approach? *Outlook on Agriculture*, 27(4).
<https://doi.org/10.1177/003072709802700408>
38. Howell, C. (1999). Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *trichoderma virens* with differential media. *Mycologia*, 91(6), 930-934. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061103>
39. ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnologia Agricola, Guatemala). (2002). *El cultivo de la papa en guatemala*. Instituto de ciencia y tecnologia agricola. [Archivo PDF].
<https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Papa/El%20cultivo%20de%20la%20papa%20en%20Guatemala,%202002.pdf>
40. ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnologia Agricola, Guatemala). (2013). *Manual para la produccion de semilla certificada de papa*. Instituto de Ciencia y Tecnologia Agricola, Guatemala. [Archivo PDF].
<https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Papa/manualpapaproduccion2013.pdf>
41. Indarti, Widiyanto, Kim, & Suryanti. (2010). Survey of Egg-and Cyst-Parasitic fungi of potato cyst nematode in indonesia. *The Plant Pathology Journal*, 26(1), 32-36. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.1.032>
42. INE (Instituto Nacional de Estadística, Guatemala). (2016). *Encuesta nacional agropecuaria superficie cultivada y produccion 2015*. Informe ejecutivo ENA 2015, Instituto nacional de estadística de Guatemala, Guatemala. [Archivo PDF].
<https://www.ine.gob.gt/sistema/uploads/2016/10/04/PqrbKvoTCXA0f3A1TR7rlwL7R545pAZ4.pdf>



43. Jacobs , H. (2000). *Development of a fungal biological control agent for potato cyst nematodes in Jersey*. [PhD thesis, University of Luton]. <http://hdl.handle.net/10547/313987>
44. Johns , F., Carpenter , J., Parrott, D., Piedra , A., & Trudgill, D. (25 de marzo de 1970). Nematodo del quiste de la papa ¿una especie o dos? *Nature*(227), 83-84. <https://doi.org/10.1038/227083a0>
45. Jones, M., & Northcote, D. (25 de noviembre de 1972). Nematode-Induced syncytium-a multinucleate transfer cell. *Cell Science*, 10(3), 789-809. <https://jcs.biologists.org/content/10/3/789>
46. Kõljalg, U., Nilsson , H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor , A., Bahram, M., . . . Bengtsson , P. (november de 2013). Towards a unifiend paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular ecology*, 22(21), 5271-5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>
47. Lanza. (1996). *Distribucion de Nacobbus aberrans, y Globodera spp en zonas paperas de siete provincias del departamento de potosi*. Universidad autonoma Tomas Frias, Facultad de ciencias Agricolas y Pecuarias .
48. Lashermes, P., Combes, M., Trouslot, P., & Charrier, A. (1997). Phylogenetic relationship of coffe-tree species (Correa L) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. 94, 947-953. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_47-48/010011020.pdf
49. Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H., & Petrini, O. (1999). A morphological & molecular perspective of Trichoderma viride. Is it one or two species. *Applied Environmental Microbiology*, 24, 18-2428. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.65.6.2418-2428.1999>
50. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Alimentacion, Guatemala. (2016). *El Agro En Cifras* . Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Alimentacion. [Archivo [nature03048 PDF](https://www.maga.gob.gt/download/El%20agro16.pdf)]. <https://www.maga.gob.gt/download/El%20agro16.pdf>



51. Marwi, V., & Domenico, P. (2013). Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* spp. por métodos moleculares. *Faraute de ciencias y tecnologia*, 8(2), 1-9.
https://www.researchgate.net/publication/316605282_Identificacion_de_cepas_del_hongo_Trichoderma_spp_por_metodos_moleculares.
52. Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y., & Freeman, S. (2004). Identification of trichoderma biocontrol isolates to clades according to ap-PCR & ITS sequence analyses. *Phytoparasitica*, 32, 370-375.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02979848>
53. Miyazaki, K., Tsuchiya, Y., & Okuda, T. (2009). Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *Mycoscience*, 50(2), 94-99.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1340354009702384>
54. Morgan, D. (1929). Investigación on eelworm in potatoes in south Lincolnshire. *Journal Of Helminthology*, 185-192.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X00002017>
55. Mugniéry, D., & Phyllips, M. (2007). The nematode parasites of potato. En *potato biology and biotechnology* (págs. 569-594). doi:10.1016/b978-044451018-1/50068-3
56. Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific american*, 262(4), 56-65.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
57. Nash, S. M., & Snyder, W. C. (1962). Quantitative estimations of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*, 52, 567-572.
58. Ngala, B. M., Haydock, P. P., Woods, S., & Back, M. A. (Junio de 2015). Biofumigation with *Brassica juncea*, *Raphanus sativus* and *Eruca sativa* for the management of field populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Pest Management*, 71(5), 759-769. <https://doi.org/10.1002/ps.3849>

59. Pal , K., & McSpadden, G. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02
60. Pérez Irungaray, G., Maas Ibarra, R. E., Gándara Cabrera, G., & Rosito Monzón, J. C. (2018). *Ecosistemas de Guatemala basado en el sistema de clasificacion de zonas de vida*. Universidad Rafael Landivar, Instituto de investigaciones y proyeccion sobre ambiente natural y sociedad. [Archivo PDF]. <http://www.infoiarna.org.gt/wp-content/uploads/2019/02/Ecosistemas-de-Guatemala-final.pdf>
61. Piedra, R. N. (2008). Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en marcha*, 21(1), 123-132. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1345/1247
62. Powell, A. (1939). Investigation upon the pea strain of heterodera schachtii schmidt and its role in the causation of pea-sickness. *Annal of Aplied Biology*, 26(2), 572-584. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06989.x>
63. Quiñones. (1979). *Comprobacion morfometrica de tres poblaciones mexicanas de Globodera y las especies descritas del mismo*. [Tesis de maestria, Universidad De Chapingo, Mexico].
64. Raiziss, G., Severac, M., & Moetsch, J. (1930). Metaphen como germicida y desinfectante de la piel. *The Journal of the American Medical Association*, 94(16), 1199-1201. doi:Doi:10.1001/jama.1930.027104200110
65. Regaieg, H., Ciano, A., Horriegue, N., Grasso, G., & Rosso, L. (2010). Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2285-2289. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0397-4>
66. Rodriguez, R. (17 de marzo de 1991). Control Biologico de nematodos parasitos de plantas. *Nematropica*, 21(1). <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/64003>



67. Roldan , E. (2005). *Estudio de los nematodos formadores de quiste en papa Solanum Tuberosum L. para descartar la presencia del nematodo dorado de la papa en el municipio de Jalapa, Jalapa*. [Tesis de grado, Universidad de San Carlos De Guatemala]. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2173.pdf
68. Sajid, B., Butterbach, P., Popeijus, H., Davis, E., Jones, J., Goverse, A., . . . Smant , G. (2009). Identification and characterization of the most abundant cellulases in stylet secretion from *Globodera rostochiensis*. *Phytopathology*, 194-202. doi: 10.1094/PHYTO-99-2-0194.
69. Salguero , M. (2003). *Deteminacion de la presencia de nematodos de quiste asociados al cultivo de papa Solanum tuberosum L. en el municipio de patzicia Chimaltenango*. [Tesis de pregrado, Universidad De San Carlos De Guatemala].
70. Salvamani, S., & Nawawi, N. (5 de mayo de 2014). Macroscopic and microscopic approaches for identification of fungi from plant soils of Cameron Highlands. *Bioremediation science & technology research*, 2(1), 14-18. <https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/BSTR/article/view/68>
71. Sánchez Pérez, G. A., Ruiz Chután, J. A., Berdúo Sandoval, J. E., & Melgar Valladares, S. A. (2020). *Evaluacion de cinco especies de microorganismos como estrategias de control biologico sobre quistes de Globodera rostochiensis y G. pallida*. Informe final, Universidad de San Carlos de Guatemala, Direccion general de investigacion, Guatemala. [Archivo PDF]. <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puicb/INF-2019-26.pdf>
72. Schouten , H., & Beniers, J. (1997). Durability of Resistance to *Globodera pallida* I. Changes in Pathogenicity, Virulence, and Aggressiveness During Reproduction on Partially Resistant Potato Cultivars. *Phytopatolohy*, 87(8), 862-867. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.8.862>
73. Seenivasan, N., Devrajan, K., & Selvaraj, N. (2007). Management of potato cyst nematodes, *Globodera* spp. through biological control. *Indian Journal of*

- Nematology*, 37(1), 27-29.
<https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijn&volume=37&issue=1&article=006>
74. Sharon , E., Bar, E., Chet, A., Herrera , E., Kleifeld, O., & Spiegel. (2001). Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91(7), 687-693.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.687>
75. Shaw, A., McDaniel, S., Werner, O., & Ros-Espín, R. (2009). Phylogeography and phylodemography. *The Bryologist*(105), 373-383.
https://www.researchgate.net/publication/232686406_Phylogeography_and_Phylodemography
76. Starling, G. (2018). Biological control of plant-parasitic nematodes. En G. Poinar , & H. Jansson (Edits.), *Disease of nematode* (págs. 93-132).
77. Stirling, G. R. (1988). *Biological control of plant-parasitic Nematodes: progress problem and prospects* (Primera ed.).
<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781351071468-9/biological-control-plant-parasitic-nematodes-stirling>
78. Subottin, S., Mundo , O., & Baldwin , J. (2010). *Sistematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae)* (Vol. VIII). Brill leiden-Boston.
79. Tribe , H. (1977). PATHOLOGY OF CYST-NEMATODES. *biological review*, 52(4), 477-507. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1977.tb00857.x>
80. Trifanova, Z. (2010). Studies on the efficacy of some bacteria and fungi for control of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Agricultural Sciences*, 37-44.
doi:10.2298/JAS1001037T
81. Trudgill , D. L. (1986). Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and prospects for improvements. *Annals of applied biology*, 108(1). <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb01979.x>

82. Tumer , S., & Subbotin. (2013). Cyst nematode. En R. N. Perry (Ed.), *Plant Nematology* (segunda ed., págs. 109-143). CAB international.
83. Westphal , A., & Becker, J. (1999). Biological Suppression and Natural Population Decline of *Heterodera schachtii* in a California Field. *Nematology*, 89(5), 434-440. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.5.434>



10 ANEXOS

Anexos 1. Secuencia de los aislados obtenidos

I. 12 GP 2B

TTACCTCAGTTGCCTCGGCGGGGAACGCCCCGGCCGCCTGCCCCCGCGCCGG
CGCCGGACCCAGGCGCCCCG
CCGCAGGGACCCCAAACCTCTCTTGCATTACGCCAGCGGGCGGAATTTCTTC
TCTGAGTTGCACAAGCAA
AAACAAATGAATCAAACTTTCAAGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCGCCAGCA
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCAACCCTCGAGCCCCCCCCG
GGGGCCTCGGTGTTGGGGG
ACGGCACACCAGCCGCCCCCGAAATGCAGTGGCGAGCCCCGCCGCAGCCTC
CCCTGCGTAGTAGCACACAC
CTCGCACCGGAGCGCGGAGGCGGTACGCCGTAAAACGCCCAACTT.

m. 13 GP 2A

AAGGATCATTACTGAGTACTACACTCTCTACCCTTTGTGAACTATTATACCTGT
TGCTTCGGCGGCGCCC
GCGAGGGTGCCCGCCGGTCTCATGCAGAATCTCTGTTTTCGAACCCGACGAT
ACTTCTGAGTGTTCTTAGC
GAACTGTCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAACGCGATA
TGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACACT
GGCGCCTTCCAGTATCCTG
GGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCTGTGGCCCG
GCGTTGGGGATCTGCCACG
GCAGGCCCTAAAACAGTGGCGGACCCGAAGGCCCTCTCCTTTGCGCAGT
AGCATCAGCCTCGCATTGG

GATCCCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCACAAGTCCGCTGCCGGCGGC
 ACCAAGGTTGACCTCGGATC
 AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

n. 14 GP 2A

TGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGC
 GCCCGCCGGAGGACCAACCA
 AACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCGTTCTCG
 GCGCCTCTCGTAGGCGT
 TTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
 GAAGAACGCAGCGAAAT
 GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
 ACATTGCGCCCGCCAGT
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAATCCCCTCC
 GGGGGGTGCGCGTTGGGGA
 TCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTACTCGC
 CGCAGCCTCTCCTGCGCAGT
 AGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTAAACACC
 CAACTTCTGAAATGTTGAC
 CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAG
 GAAA

o. 33 GP 2A

TTACCTCAGTTGCCTCGGCGGGAACGCCCCGGCCGCCTGCCCCCGCGCCGG
 CGCCGGACCCAGGCGCCCG
 CCGCAGGGACCCCAAACCTCTCTTGATTACGCCAGCGGGCGGAATTTCTTC
 TCTGAGTTGCACAAGCAA
 AAACAAATGAATCAAACTTTCAAGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
 GAAGAACGCAGCGAAATG
 CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
 CATTGCGCCCGCCAGCA

TTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTTCAACCCTCGAGCCCCCCCCG
GGGGCCTCGGTGTTGGGGG
ACGGCACACCAGCCGCCCCCGAAATGCAGTGGCGAGCCCCGCCGCAGCCTC
CCCTGCGTAGTAGCACACAC.

p. 34 GP 2B

TGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGC
GCCCCGCCGGAGGACCAACCA
AAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCGTTCTCG
GCGCCTCTCGTAGGCGT
TTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCGCCAGT
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAATCCCCTCC
GGGGGGTTCGGCGTTGGGGA
TCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTACTCGC
CGCAGCCTCTCCTGCGCAGT
AGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTAAACACC
CAACTTCTGAAATGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAG
GAAA.

q. 34 GP 1 B

GTTATTCAACTCCCAAACCCTATGTGAACTTACCACTTGTTGCTTCGGCGCGC
GCTTCGGCGCCGCCGAG
GACACTTAACTCTTTGTTTTTATAAGCATTTCTGAGTGGCCGAAAGGCAAAAA
TACAAATGAATCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCA
TTCTGGCGGGCATGCCT

GTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCCCGACTCTTCGGAGGACGGCTCGGC
 GTTGGGGGACGGCAGACT
 CCCCCCGGCATCTCGCCGGGGACGCCGCCCCCGAAATTTAGTGGCGGCCCT
 CCAAGGCGACCTCTGCGTA
 GTAAC TTGTTCTCGCACCGGAAAGCTCAGAGCAGCCACTCCGTAGAACCCCA
 ACTTTTTTTTAGGTTGACC
 GCCAATCACGTACGACTACCCGACTGAACTTA.

r. 44 GP 3 A

TTACCTCAGTTGCCTCGGCGGGAAACGCCCCGGCCGCCTGCCCCGCGCCGG
 CGCCGGACCCAGGCGCCCG
 CCGCAGGGACCCCAAACCTCTTGCATTACGCCAGCGGGCGGAATTTCTTC
 TCTGAGTTGCACAAGCAA
 AAACAAATGAATCAAACTTTCAAGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
 GAAGAACGCAGCGAAATG
 CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
 CATTGCGCCCGCCAGCA
 TTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCAACCCTCGAGCCCCCCCCG
 GGGGCCTCGGTGTTGGGGG
 ACGGCACACCAGCCGCCCCCGAAATGCAGTGGCGAGCCCCGCGCAGCCTC
 CCCTGCGTAGTAGCACACAC
 CTCGCACCGGAGCGCGGAGGCGGTACGCCGTAAAACGCCCAACTT.

s. 54 GP 1A

ACCACACACGTTGCCTCGGCGGGACCGCCCCGGCGCCCTCGCGGCCCGGA
 CCAAGGCGCCCGCCGGAGGA
 CCACCAGACTCTCCTGTCGCAGTGGAATTTCTCTCCGAGCTCAAGCAAGCAA
 AATGAATCAAACTTTCAA
 CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
 GTAATGTGAATTGCAGAA

TTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTACTCTGG
CGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCGAGCCCGTCTCGGGTGTTGGGGGCCCCACGGCCG
CGAGGCCGCCCCCGAAATGC
ATTGGCGACCCCGCCGCGGCCTCCCCTGCGCAGTAGCTACCCAGAGAACCT
CGCACCGGAAACGCGGAGGC
GGTCACGCCGTAAAACAACCTCTCCTCCTGGAAGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GGATA.



Figura 7A. proceso de extracción de quistes por flotación, a: inmersión de suelo en agua para flotación de quistes, b. filtrado de sobrenadante y secado de muestra.



Figura 8A. Quiste de Globodera extraída de una muestra de suelo vista en estereoscopio



Figura 9A. Cultivos puros de hongos obtenidos de las diferentes muestras de suelo evaluadas.

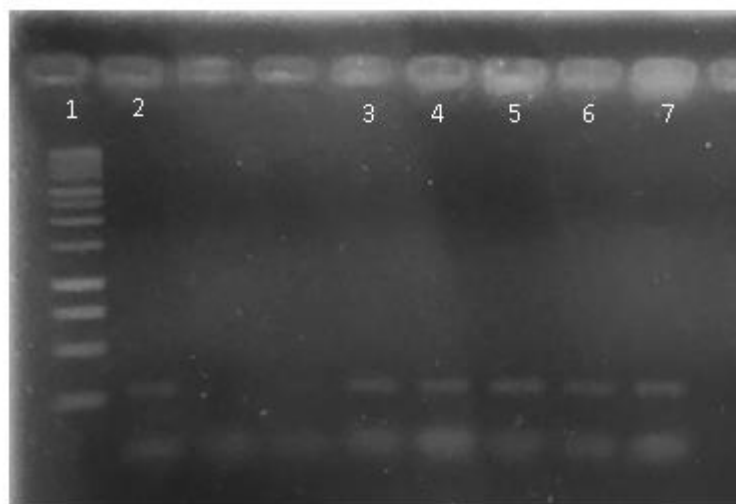


Figura 10A. Revelado de gel de electroforesis para el cebador PeaF y PeaR, carril 1 marcador de peso, carril 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 correspondientes a amplificaciones positivas para *P. lilacinus*. En los aislados de código 12 GP 2B, 23 GP 1A, 31 GP 2A, 33 GP 1A, 33 GP.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA -FAUSAC-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 04/2022

LA TESIS TITULADA:

"AISLADO E IDENTIFICACION MOLECULAR
DE HONGOS ANTAGONICOS DE NEMATODOS
FORMADORES DE QUISTE DEL GENERO
Globodera EN EL CULTIVO DE PAPA EN LA
REGION PRODUCTORA DE LOS
CUCHUMATANES, GUATEMALA, C.A.,
GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

JOSÉ FRANCISCO DOMINGO SILVESTRE

CARNE:

201703482

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Edin Alejandro Gil Esturban
Dr. Luis Rodolfo Montes Osorio

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las
Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San
Carlos de Guatemala.

Dr. Gregorio Amilcar Sánchez Pérez
A S E S O R

Ing. Agr. Carlos Fernando López Bueco
DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
D E C A N O



CFLB/nm
c.c. Archivo

