

Molecular analysis of antagonist fungi isolated from plantations of cocoa (*Theobroma cacao*) from north of Santander

BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Análisis molecular de hongos antagonistas aislados de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) de Norte de Santander

German Luciano López-Barrera^{1§} 

¹Universidad Francisco de Paula Santander, Departamento de ciencias del medio ambiente, Maestría en ciencias en Biotecnología Genómica, Cúcuta, Colombia

§lucianolb@ufps.edu.co

Recibido: 26 de enero de 2021 – Aceptado: 6 de abril de 2021

Abstract

Molecular biology techniques have been used in order to obtain specific species genetic markers, find polymorphic differences and provide the necessary information for the identification of nucleotide sequences related to pathogenicity factors in species related to biological control. At present, biological control is considered indispensable in the strategies of sustainable agriculture with agroecological base in crops, growing interest in Colombia such as cocoa (*Theobroma cacao* L.). Molecularly analyze different strains of antagonistic fungi with biotechnological potential in order to elucidate genomic similarities and the search for DNA fragments related to pathogenicity factors. The technique of RAPD (Randomized Amplified Polymorphic DNA) was standardized, using 10 primers, and the *pr1* gene was amplified using the PCR technique using 6 pairs of primers. An initial classification of the population of antagonistic fungi was achieved and the diversity of the isolates was also demonstrated. In addition, three genes of the *Beauveria bassiana*, *Trichoderma yunnanense* and *Purpureocillium lilacinus* strains were amplified, which were found to encode a family of proteases designed to exert antagonistic activity against a wide range of hosts. It can be inferred that the strains under study are good initial candidates for the formulation of biopreparations destined to the biological control of plague organisms in crops of agricultural interest in the region, due to the fact that traits and genes were found that will allow to exert a wide antagonistic action.

Keywords: Antagonist, Biotechnology, Genetic diversity, PCR, RAPD.

Resumen

Las técnicas de biología molecular se han utilizado con el fin de obtener marcadores genéticos especie específicos, encontrar diferencias polimórficas y proporcionar la información necesaria para la identificación de secuencias

Como citar:

López-Barrera GL. Análisis molecular de hongos antagonistas aislados de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) de Norte de Santander. INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD. 2021;23(2):e21511154. <https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.11154>.



Este trabajo está licenciado bajo una Licencia Internacional Creative Commons Reconocimiento–NoComercial–CompartirIgual 4.0

nucleotídicas relacionadas con factores de patogenicidad en especies relacionadas con el control biológico. En la actualidad el control biológico se considera indispensable en las estrategias de agricultura sostenible con base agroecológica en los cultivos interés creciente en Colombia como el cacao (*Theobroma cacao* L.). Analizar molecularmente diferentes cepas de hongos antagonistas con potencial biotecnológico con el fin de dilucidar similitudes genómicas y la búsqueda de fragmentos de ADN relacionados con factores de patogenicidad. Se estandarizó la técnica de RAPDs, mediante el uso de 10 iniciadores, así mismo se amplificó el gen *pr1* mediante la técnica de PCR usando 6 pares de iniciadores. Se logró una clasificación inicial de la población de hongos antagonistas y así mismo se demostró la diversidad de los aislados. Además, se logró amplificar tres genes de las cepas *Beauveria bassiana*, *Trichoderma yunnanense* y *Purpureocillium lilacinus*, que resultaron codificar para una familia de proteasas destinadas a ejercer actividad antagonista contra un amplio rango de hospederos. Se pudo inferir que las cepas en estudio son buenos candidatos iniciales para formulación de biopreparados destinados al control biológico de organismos plaga en cultivos de interés agrícola en la región, debido a que se encontraron rasgos y genes que permitirán ejercer una amplia acción antagonista.

Palabras Clave: Antagonista, Biotecnología, Diversidad genética, PCR, RAPD.

1. Introducción

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en Colombia actualmente ocupa alrededor de 164.000 Ha, en el año 2018 se produjeron 56.867 toneladas de cacao, por debajo de los 500 kilogramos por hectárea año lo cual representa un crecimiento del 3.7 % en comparación de la producción del grano en el año 2015, en el cual se registraron 54.798 toneladas ⁽¹⁾. Estas plantaciones se han caracterizado por el uso de bajos niveles de tecnología para su manejo, lo que ha generado la reducción gradual de la productividad; que sumado a la incidencia de enfermedades como la Moniliasis, producida por el hongo *Moniliophthora roreri* ⁽²⁾, viene causando graves pérdidas económicas, siendo este otro factor limitante para la producción nacional. Adicionalmente el manejo tradicional de esta enfermedad se limita únicamente a la remoción de frutos enfermos, siendo poco conocidos y aplicados otros métodos que contribuyan al manejo biocultural.

Actualmente la Federación Nacional de Cacaoteros indican que la afectación por esta enfermedad alcanza el 80% en todo el cultivo de cacao en el departamento Norte de Santander. Una las principales razones de esta alta incidencia es el manejo poco tecnificado que se presenta en los cultivos. Está comprobado que el

control biológico es un método efectivo y una alternativa al uso de agentes químicos que contaminan suelos y fuentes hídricas, que se basa en el uso de los principios ecológicos como los organismos benéficos y/o sus productos, aprovechando así los beneficios de la biodiversidad en la agricultura ⁽³⁾. Diversos estudios realizados en Norte de Santander se han centrado en el aislamiento, identificación y conservación de microorganismos en el control de la “moniliasis” en el cultivo de cacao ⁽⁴⁻⁶⁾. Estos estudios tienen como objetivo primordial, mitigar en gran medida la incidencia de la “moniliasis” en el departamento. Sin embargo, la tendencia actual se centra en el análisis molecular de los genomas de estos microorganismos con el fin de conocer sus fortalezas genético-moleculares y así poder generar productos comerciales con alto valor agregado en la lucha contra esta enfermedad en la región.

Este trabajo tuvo como objetivo encontrar genes de interés en los procesos patogénicos llevados a cabo por hongos antagonistas, así como obtener información sobre las capacidades biotecnológicas de este tipo de cepas con el fin de poder implementar marcadores moleculares que se podrían usar en actividades de control de calidad de microorganismos antagonistas que se

producen comercialmente, los cuales son regulados mediante pruebas de patogenicidad.

2. Metodología

Se seleccionaron 6 cepas aisladas de plantaciones de cacao de Norte de Santander con actividad antagonista contra *M. roseri*, pertenecientes al banco de cepas de la facultad de ciencias agrarias y del ambiente. *Trichoderma yunnanense* (HA001), *Beauveria bassiana* (HE002-3), *Penicillium citrinum* (HD011-5), *Purpureocillium lilacinus* (GIAV 2-3), *Penicillium rubens* (HE001-5,) y *Aspergillus nidulans* (HD017-18).

2.1. Extracción de ADN

La extracción se llevó a cabo tomando micelios crecidos en caldo Dextrosa Sabouraud modificado (Dextrosa 40 g/l, extracto de levadura 5 g/l, Bactopectona 10 g/l a pH 7,5,) estos se coloraron en agitación a 28 °C por 24 - 48 horas en baño seco ⁽⁷⁾. Una vez transcurridas las 24-48h, se ejecutó el protocolo propuesto por ⁽⁸⁾, para la extracción de ADN el cual consistió en el método de solventes orgánicos (fenol-cloroformo).

2.2. Estandarización de técnica de amplificación de ADN polimórfico al Azar (RAPD)

La estandarización de la técnica de RAPD se llevó a cabo según el protocolo propuesto por ⁽⁷⁾ en un termociclador de gradiente “Multigene™ Optimax” (Labnet). La mezcla de reacción consistió en los iniciadores Operon Technology, serie E (OPE-01 - OPE-10) (Tabla 1). Se utilizó el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III, como patrón de peso molecular (100pb).

Cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1,0 % (p/v) diluida en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA 0,5M pH 8), a 100

voltios, utilizando como intercalante GelRed®. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador ChemiDoc™ Imaging Systems Bio-Rad.

Tabla 1. Iniciadores para RAPD

Iniciador*	Secuencia	Referencia
OP E-01	5'- CCC AAG GTC C - 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-02	5'- GGT GCG GGA A- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-03	5'- CCA GAT GCA C- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-04	5'- GTG ACA TGC C- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-05	5'- TCA GGG AGG T- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-06	5'- AAG ACC CCT C- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-07	5'- AGA TGC AGC C- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-08	5'- TCA CCA CGG T- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-09	5'- CTT CAC CCG A- 3'	Dávila, et al, 2001
OP E-10	5'- CAC CAG GTG A- 3'	Dávila, et al, 2001

*Los iniciadores fueron producidos por Operon Technologies Inc. ⁽⁹⁾

El análisis de los datos se realizó mediante el registro de los productos de amplificación, asignando (0) para ausencia y (1) para presencia de bandas en matrices binarias. Así mismo se construyeron matrices de distancia usando el índice de Jaccard y el dendograma mediante análisis de agrupamiento UPGMA. Por otra parte, se determinó el contenido de información polimórfica (PIC). En conjunto los análisis permitieron visualizar las relaciones genéticas entre los aislamientos. Todos los análisis se realizaron usando el programa InfoGen.

2.3. Identificación de genes de proteasas

Para la identificación de genes de proteasa en las cepas en estudio, se siguió la metodología propuesta ⁽¹⁰⁾ y ⁽¹¹⁾, usando los iniciadores para el gen *pr1A* (Tabla 2). Las cepas HB012 y HB015 se usaron como controles positivos.

Tabla 2. Iniciadores para gen de proteasa

Gen	Iniciador*	Secuencia	Referencia
<i>pr1A</i>	Pr1ALF	5'- CATCAGTGGCATGGACTACGTT- 3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1ALR	5'- GGAAGCAATGGCGCCTTT- 3'	
<i>pr1B</i>	Pr1BLF	5'AGCGCCGGCGAAGGAACA3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1BLR	5'CGCCGCCACCGAGACAAAC3'	
<i>pr1C</i>	Pr1CLF	5'CACGCCCGATCTCAGCAAGTAT3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1CLR	5'CTCAGAGCGCCCGCCAGTAATG3'	
<i>Pr1D</i>	Pr1DLF	5'CAAATAATCCGCGCCCTCCAATGT3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1DLR	5'ACGCCGTCCCTCAAACCTCC3'	
<i>pr1E</i>	Pr1ELF	5'TACCCTCGCGCCTCTTGAACATA3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1ELR	5'TCGGAATATCGGTGTCGGTAAT3'	
<i>Pr1F</i>	Pr1FLF	5'TGCTACCGGGGAGGATGACT3'	Rosas y Avalos-de-León en 2014 ⁽¹⁰⁾
	Pr1FLR	5'CTGGGGCAAAAATGGTGACA3'	

*El iniciador fue sintetizado por Isla S.A.S

La extracción de ADN de cada cepa fúngica se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. El ADN (1 µl) se colocó en un tubo de microcentrífuga que contenía 1,25 U de ADN Taq polimerasa (Promega), 1x tampón Taq, 0,2 µM de iniciador, dNTPs 0,2 mM y 14,8 µl de H₂O miliQ para un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó con un termociclador de gradiente "Multigene™ Optimax (Labnet) con un ciclo de desnaturalización inicial a 96 °C durante 2 minutos y un programa de ciclos programado para 30 ciclos (con un ciclo que consiste en desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos) recocido a 60 °C, durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min), y un paso extra de extensión a 72 °C durante 7 min. Después de la amplificación, 1 µl de muestra de cada mezcla de PCR se mezcló con 4 µl de GelRed® y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en tampón TBE 1X a 100 V durante 1 h. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador ChemiDoc™ Imaging Systems Bio-Rad.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción y visualización de ADN genómico de los hongos antagonistas

En este trabajo se realizó la extracción de ADN de 6 aislamientos de hongos antagonistas que se obtuvieron del banco de cepas de la facultad de ciencias agrarias. Un óptimo método de

extracción de ADN debe garantizar el mantenimiento de la integridad física y bioquímica de la molécula y por lo tanto incrementar sus rangos de pureza y concentración ⁽¹²⁾. Se obtuvo ADN de cada extracción según lo propuesto por Suárez ⁽¹⁾. Por medio de la corrida de electroforesis se logró visualizar una óptima calidad y cantidad de ADN de las 31 repeticiones que se realizaron de los 6 aislados (Figura 1). A partir de allí se pudo continuar con los análisis moleculares de los hongos antagonistas.

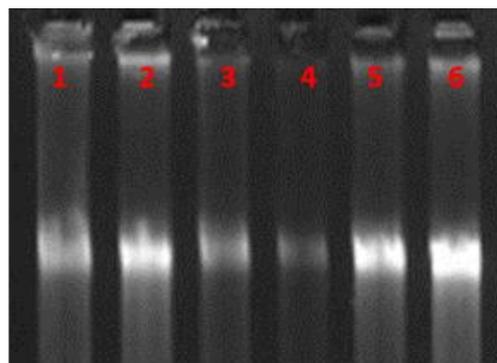


Figura 1. Gel de electroforesis de ADN en agarosa al 1,5 %. Línea 1: *Trichoderma yunnanense*; Línea 2: *Beauveria bassiana*; Línea 3: *Penicillium citrinum*; Línea 4: *Purpureocillium lilacinus*; Línea 5: *Penicillium rubens*; Línea 6: *Aspergillus nidulans*.

Se logró apreciar claramente las bandas de *Trichoderma yunnanense* (HA001), *Beauveria bassiana* (HE002-3), *Penicillium citrinum* (HD011-5), *Purpureocillium lilacinus* (GIAV 2-

3), *Penicillium rubens* (HE001-5,) y *Aspergillus nidulans* (HD017-18), demostrando satisfactoriamente la extracción de ADN genómico.

3.2. Estandarización de técnica de amplificación de ADN polimórfico al Azar (RAPD)

Los 10 iniciadores RAPD generaron 134 bandas amplificables y reproducibles (Figura 2). El iniciador OPE-09 no generó ninguna banda, lo cual indicó que, bajo las condiciones de amplificación, por lo menos una de las secuencias determinadas no existía en ninguno de los hongos para que éstos iniciadores prelinearan, por lo tanto, no se tuvo en cuenta en el análisis. Los iniciadores OPE-06 y OPE-08 generaron el mayor número de bandas polimórficas, 19 y 17, respectivamente, lo cual los sugiere como buenos iniciadores para hacer un “fingerprinting”. El contenido de información polimórfica (PIC) de los iniciadores fue similar con valores entre 0,31 y 0,34 (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos y números de alelos detectados por los iniciadores de RAPD de los 6 aislamientos de hongos antagonistas.

Iniciador	BP	BM	BT	PIC	SD
OPE_01	12	0	12	0.31	0.02
OPE_02	16	1	17	0.30	0.01
OPE_03	9	2	11	0.33	0.01
OPE_04	16	0	16	0.34	0.01
OPE_05	15	0	15	0.33	0.01
OPE_06	19	0	19	0.33	0.01
OPE_07	16	0	16	0.31	0.01
OPE_08	17	0	17	0.34	0.01
OPE_10	14	0	14	0.34	0.01
Total	134	3	134		

BM= Bandas monomórficas, BT= Bandas totales, BP= Bandas polimórficas, PIC= Contenido de información polimórfica y SD= Desviación estándar

De los nueve iniciadores utilizados se lograron observar tres de las bandas que resultaron ser monomórficas para las muestras empleadas. Esto

permitió comprobar la presencia de bandas de longitudes similares en otras especies de hongos antagonistas. Estos hallazgos podrían dar indicios de la posibilidad de utilizar los iniciadores involucrados como marcadores de factores de patogenicidad bajo condiciones específicas

En el análisis de los datos de la técnica se pudo evidenciar variabilidad intra e interespecífica entre los aislamientos examinados, formando 4 grupos (Figura 2). El primer grupo incluye al aislamiento *Aspergillus nidulans* (HD017-18), este se encontró ligeramente disperso de los demás aislamientos a una distancia de 0,76 lo cual indicó que comparte un 24% del reservorio genético. Además, se encontró un segundo grupo el cual se evidencio la presencia de dos aislados *Trichoderma yunnanense* (HA001), y *Beauveria bassiana* (HE002-3). La distancia de este grupo fue de 0,68, compartiendo el 32% de las características con el resto de la población. Un tercer grupo estuvo constituido por los aislados *Penicillium citrinum* (HD011-5) y *Penicillium rubens* (HE001-5), este estuvo separado 64% de los demás aislamientos, como era de esperarse al pertenecer al mismo género las especies guardan ciertas similitudes en su genoma. El último grupo estuvo formado por *Purpureocillium lilacinus* (GIAV 2-3) a una distancia de 70%.

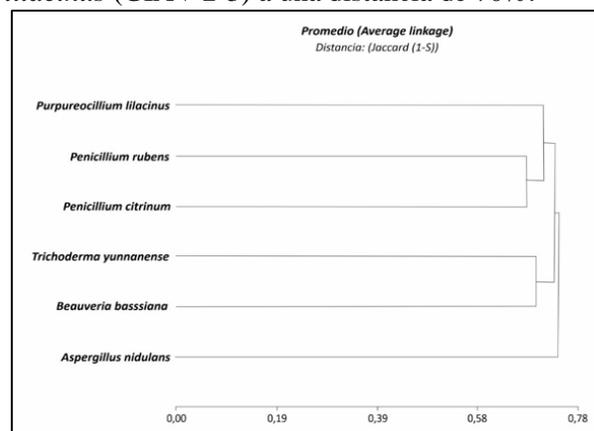


Figura 2. Dendrograma de los coeficientes de distancia (1-S de Jaccard) obtenido mediante algoritmo de UPGMA con datos de RAPDs en 6 cepas de hongos antagonistas.

Se espera que el análisis de una especie altamente heterocigota mediante la técnica RAPD subestime las distancias genéticas, ya que los marcadores RAPD son marcadores dominantes ⁽¹³⁾. La detección de loci heterocigotos utilizando técnicas de marcadores codominantes daría relaciones genéticas más realistas. Sin embargo, considerando los ahorros de tiempo y costos, los RAPD han demostrado una resolución adecuada de las variedades locales que se utilizarán con fines de reproducción ⁽¹⁴⁾. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante los marcadores RAPD se encontró una relación entre los grupos de los aislamientos con la naturaleza y característica de cada uno de ellos, esto demostró una alta variabilidad entre los mismos, lo cual indica que los RAPD son una técnica confiable para la caracterización de aislamientos de hongos antagonistas. Los resultados son corroborados por ⁽¹⁵⁾ quienes demostraron que los marcadores RAPD revelan una gran variabilidad inter e intraespecífica realizado en cepas de *Trichoderma* examinadas. Así mismo, ⁽¹⁶⁾ resaltan que el uso de RAPD permitió demostrar variabilidad entre los aislamientos de *Trichoderma*, como se indica en la Figura 3.

3.3. Identificación de genes de proteasas.

La Figura 4 muestra un gel de agarosa que representa una correcta amplificación del control positivo (*Metarhizium anisopliae*) con un tamaño aproximado de 1400 pb ⁽¹¹⁾. De las seis cepas en estudio tres de ellas *Beauveria bassiana*, *Trichoderma yunnanense* y *Purpureocillium lilacinus* evidenciaron la presencia de una banda de 300, 400 y 320 pb aproximadamente. Esta amplificación se produjo mediante el uso de los oligos pr1BF-R y pr1CF-R respectivamente. Los resultados indicaron que las tres cepas albergan el gen *pr1*. Este gen ha sido reportado pertenecer a una familia

multigénica de 11 isoformas encontradas en el género *Metarhizium* ⁽¹⁷⁾. La presencia de este gen podría representar una ventaja en comparación con otras cepas de antagonistas en la capacidad patogénica y de control de plagas y enfermedades

La interacción entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, se da de forma natural en el medio ambiente, la acción directa de los antagonistas repercute de forma directa a mitigar las enfermedades asociadas a los cultivos de interés agrícola ⁽¹⁸⁾. Las condiciones medioambientales naturales propician un equilibrio dinámico de los microorganismos en la superficie de las plantas y en el suelo. Diversos mecanismos de acción de los antagonistas como antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia, se han descrito para controlar el desarrollo de patógenos ⁽¹⁹⁾.

Entre los antagonistas existe un tipo de interacción directa con los patógenos llamado parasitismo. El parasitismo es una simbiosis antagónica entre organismos en la que uno vive a expensas de otro. En este proceso están involucradas una serie de enzimas extracelulares tales como B1,3-glucanasa quitinasa, proteasa y celulasa, las cuales escinden las estructuras de virus, bacterias y hongos parasitados. Existen varias evidencias de hongos hiperparásitos como lo son *Trichoderma sp.*, *Beauveria* y *Metarhizium*, los cuales utilizan el parasitismo como el mecanismo más importante. Uno de los géneros más estudiado con actividad antagónica hacia organismos patógenos ha sido *Trichoderma* en contra de *Rhizoctonia solani*, un patógeno de suelos agrícolas, además ya se encuentran en el mercado diversas formulaciones desarrolladas a partir de ellos ⁽²⁰⁾.

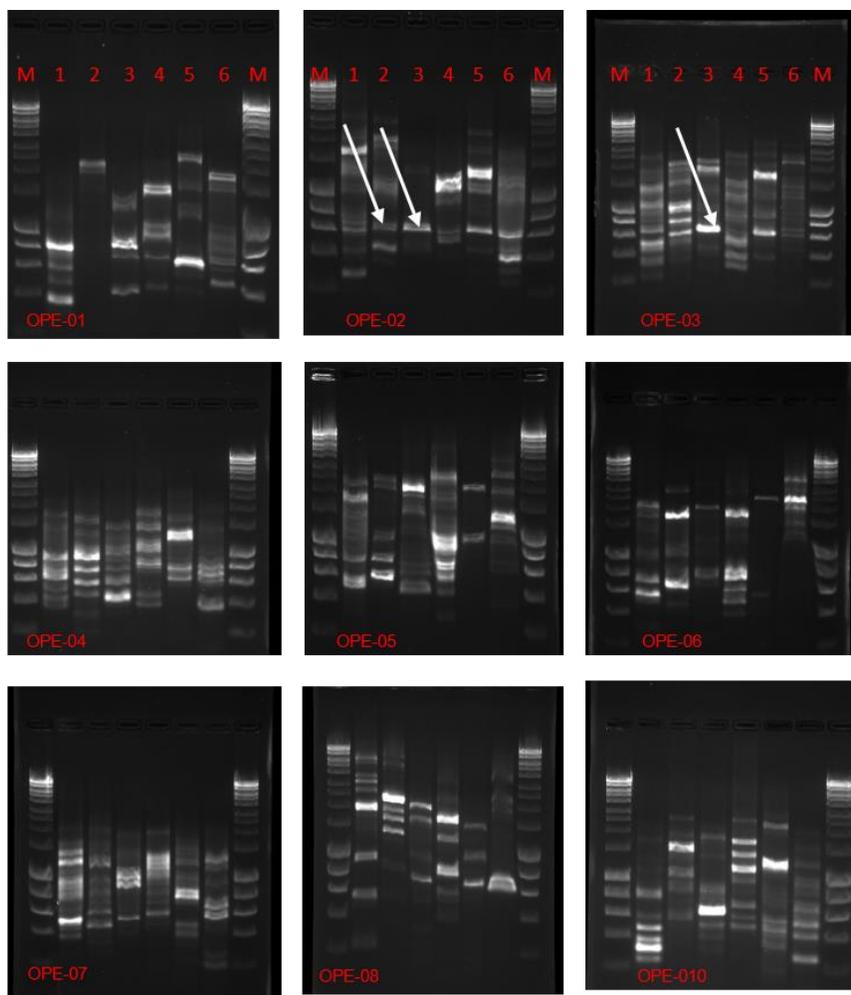


Figura 3. Patrones de bandeo en gel de electroforesis al 1%. **Carril 1:** *Beauveria bassiana*; **Carril 2:** *Penicillium Rubens*; **Carril 3:** *Penicillium citrinum*; **Carril 4:** *Aspergillus nidulans*; **Carril 5:** *Purpureocillium lilacinus*; **Carril 6:** *Trichoderma yunnanense*; **Carril M:** marcador de 1 kb. Primers OP_E01 hasta OP_E10

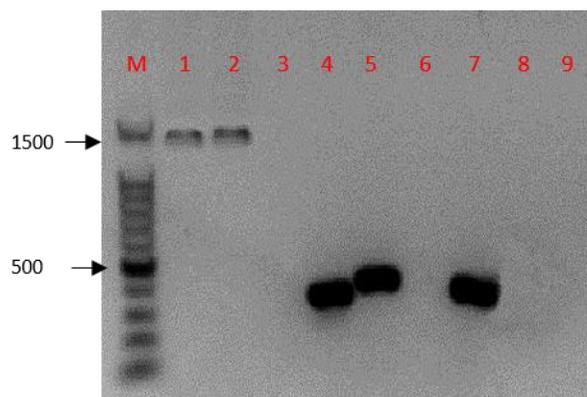


Figura 4. Gel de electroforesis al 1,5%. **Carril M:** marcador de peso molecular (100 pb); **Carriles 1 y 2:** control positivo; **Carril 3:** control negativo (agua); **Carril 4:** *Beauveria bassiana*; **Carril 5:** *Trichoderma yunnanense*; **Carril 6:** *Aspergillus nidulans*; **Carril 7:** *Purpureocillium lilacinus*; **Carril 8:** *Penicillium citrinum*; **Carril 9:** *Penicillium Rubens*

Diversos hongos antagonistas y entomopatógenos excretan una gran variedad de enzimas como son proteasas, quitinasas, fosfolipasas, lipasas, esterases, fosfatasa, etc., que se encargan de causar antibiosis y de hidrolizar la cutícula de los insectos ⁽²¹⁾. Dentro de las proteasas se encuentran las del tipo de las subtilisina. Muchas de estas proteasas son sintetizadas cuando el hongo es cultivado en medios con cutícula de insecto, y se consideran entre los principales factores de virulencia ⁽¹⁷⁾.

La evolución de las subtilisinas (Pr1) ha dado como resultado un número relativamente alto de isoformas en diversos hongos, actualmente se han reportado 11 genes de subtilisinas en los cuales el número y el nivel de expresión varía ampliamente ⁽²¹⁾. Múltiples isoformas del gen pr1 con diferencias sutiles en la especificidad pueden actuar sinérgicamente en la degradación de la proteína cuticular de los insectos y demás organismos plaga, permitiendo al hongo operar en condiciones ambientales cambiantes ⁽²²⁾.

4. Conclusiones

Por medio del uso de la técnica de RAPDs, se logró una clasificación inicial de la población de hongos antagonistas aislados e identificados en el laboratorio de Biotecnología Molecular Así mismo se demostró la diversidad de los aislados. Además, se pudo amplificar tres genes de las cepas *Beauveria bassiana*, *Trichoderma yunnanense* y *Purpureocillium lilacinus*, que resultaron codificar para una familia de proteasas destinadas a ejercer actividad antagonista contra un amplio rango de hospederos. Gracias a la amplificación de estos genes se puede inferir que las cepas en estudio son buenos candidatos iniciales para formulación de biopreparados destinados al control biológico de organismos plaga en cultivos de interés agrícola en la región.

5. Declaración de financiación

La presente investigación estuvo financiada por el Fondo de Investigaciones Universitarias

FINU-048 de la Universidad Francisco de Paula Santander.

6. Referencias

- (1) FEDECACAO. Economía Nacional [Internet]. 2019. Available from: <https://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>.
- (2) Evans HC. Cacao diseases - the trilogy revisited. *Phytopathology*. 2007;97(12):1640-1643. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1640>.
- (3) Alves S. Hongos entomopatógenos. In: Alves S, editor. Control microbiano de insectos. Piracicaba: FEALQ; 1998. p. 289–381.
- (4) Suarez L, Rangel A. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*. 2013;62(4):370–378. Available from: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/36211.
- (5) Suarez L, Cabrales CP. Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp., y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo patógeno nativo *Moniliophthora roreri* de la región nororiental en el departamento Norte de Santander. *Respuestas*. 2008;13(1):45-56.
- (6) Suarez L. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Respuestas*. 2006;11(1):3-9.
- (7) Zambrano-Bullones K, Dávila M, Castillo M. Detección de fragmentos de ADN de

- hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 2002;19(3):185-193.
- (8) Suárez-contreras LY. Extracción y purificación del ADN de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en norte de Santander. *Respuestas*. 2016;10(2):4-8.
- (9) Dávila, Martha, Zambrano, Karla, Castillo, Miguel A., Uso de la técnica RAPD para la identificación de fragmentos de ADN posiblemente relacionados con virulencia en hongos entomopatógenos. *Bioagro* [Internet]. 2001;13(3):93-98.
- (10) Rosas-García NM, Avalos-de-León O, Villegas-Mendoza JM, Mireles-Martínez M, E, Barboza-Corona JE, et. al. Correlation between pr1 and pr2 Gene Content and Virulence in *Metarhizium anisopliae* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;24(11): 1495-1502. <https://doi.org/10.4014/jmb.1404.04044>.
- (11) Avalos-de León O. Identificación y análisis de los genes productores de proteasas tipo subtilisina y tipo tripsina en el hongo *Metarhizium anisopliae*, como factores de virulencia para su aplicación en el control biológico de insectos plaga [Master's Thesis]. Reynosa: Centro de Biotecnología genómica. 2011.
- (12) Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: CSHL Press; 2001. 2344 p.
- (13) Vega-Contreras NA, Galvis-Serrano NF, Salazar-Mercado SA. Relaciones evolutivas de los peces *Prochilodus reticulatus* y *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae). *Revista de ciencias*. 2017;21(1):163-173. <https://doi.org/10.25100/rc.v21i1.6348>.
- (14) Gwanama C, Labuschagne M, Botha AM. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified. *Euphytica*. 2000;113:19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1003936019095>
- (15) Latha J, Mukherjee P. PCR fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections a need for re-identification of these economically important fungi. *Current Science*. 2002;83(4):372-375. Available from: <https://www.jstor.org/stable/24106834>.
- (16) Góes L, Lima-Da-Costa A, López-De-Carvalho-Freire L, Tinti-De-Oliveira N. Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2002;45(2):151-160. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000200005>.
- (17) Bagga S, Hu G, Screen S, Leger RJ. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 2004;324:159-169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.031>
- (18) Hernandez-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle G, Hernández-Rodríguez A. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de patología*. 2007;25(1):66-74.
- (19) Cano MA. Interacción De Microorganismos Benéficos En Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Revista U.D.C.A*

- Actualidad & Divulgación Científica. 2011;14(2):15-31.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>.
- (20) Fernández-Larrea OV. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-sintéticos*. 2001;62:96-100.
- (21) Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, Leger RJ. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect host. *Microbiology*. 2003;149(Pt 1):239-47. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25761-0>.
- (22) Charnley A. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical*. 2003;40:241-321. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)40006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40006-3).