



## **RED TEMÁTICA EN SALUD FORESTAL:**

*Actividad Específica:*

***Movilidad***

Informe 2016:

Informe de actividades Ivón López Pérez



**Coordinador General:**

Dr. David Cibrián Tovar

**Coordinador de línea:**

M.C. Silvia Edith García Díaz

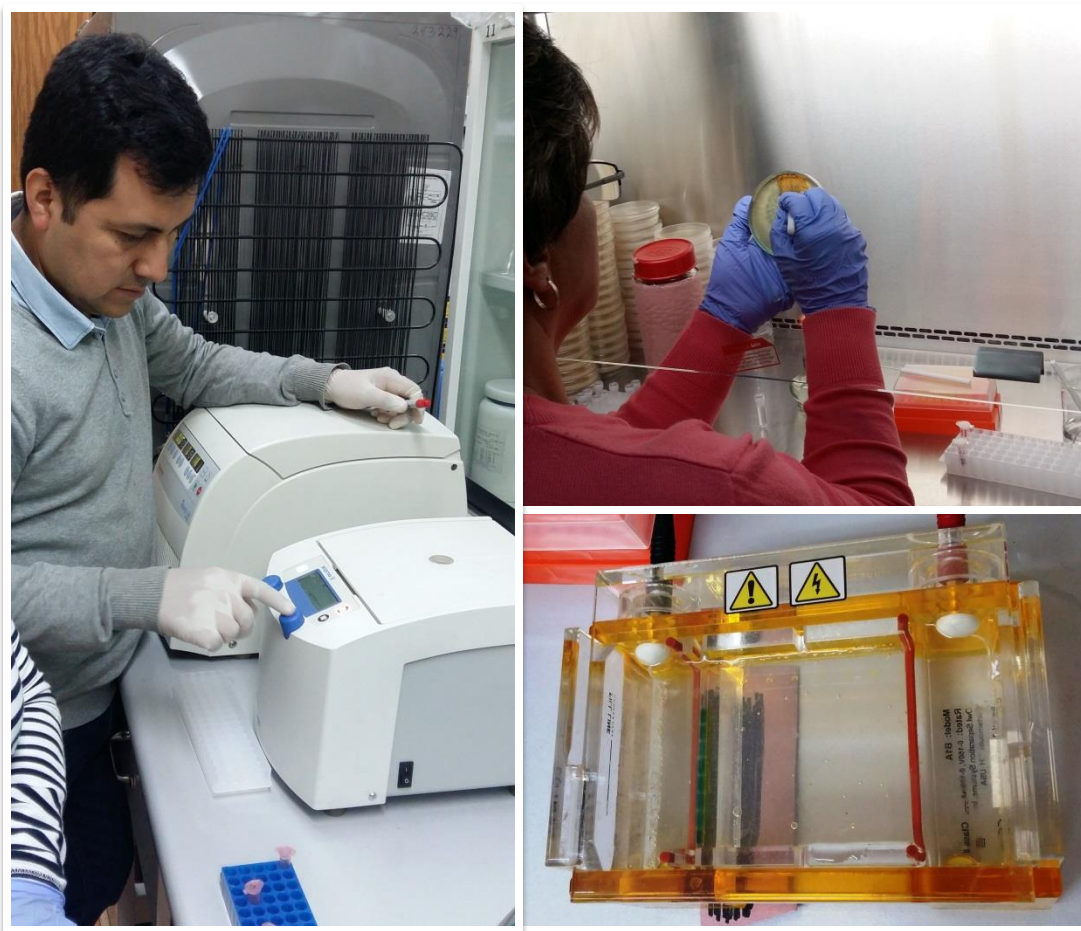
Texcoco, Edo. de México, Diciembre de 2016

# RED DE INVESTIGACIÓN DE SALUD FORESTAL

## INFORME DE MOVILIDAD

---

ESTANCIA DE CAPACITACIÓN PARA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS FORESTALES A TRAVÉS DE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**Personal capacitado:** Ing. Ivón López Pérez y Biol. Ruth Aguilar Delgado

**Lugar:** Laboratorio de Biología Molecular del área de patología de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo

**Instructor:** Dr. Omar Alejandro Pérez Vera

## **Programa de actividades**

La estancia de capacitación se realizó del 24 al 28 de Octubre de 2016, siguiendo el siguiente programa:

<i>Fecha</i>	<i>Actividad</i>
24 de Octubre de 2016	Revisión de muestras de hongos fitopatógenos y extracción de ADN de los hongos de interés
25 de Octubre de 2016	Extracción de ADN de colonias de <i>Fusarium</i> sp y de <i>Trichoderma</i> y hongo desconocido
26 de Octubre de 2016	Purificación de ADN de <i>Fusarium</i> sp y de <i>Trichoderma</i>
27 de Octubre de 2016	Extracción y purificación de ADN de insectos
28 de Octubre de 2016	PCR de insectos

## **Introducción**

Ante la urgencia de afrontar los problemas de deforestación ocasionados por las plagas y enfermedades forestales en el Estado de Michoacán, se requiere que la toma de decisiones sobre el manejo de éstas, sean sustentadas con la correcta identificación de las especies patógenas, este es un aspecto de especial importancia. Muchos patógenos en ocasiones son difíciles de identificar a nivel morfológico, por lo que se requiere reforzar mediante enfoques moleculares, además, los estudios taxonómicos y morfológicos requieren de tiempo considerable, sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes.

El Gobierno del Estado de Michoacán, a través de la Comisión Forestal del Estado tiene especial interés en llevar a cabo diagnósticos fitosanitarios certeros y oportunos, esto con la finalidad de realizar un buen manejo de las plagas y enfermedades forestales en el Estado. Para ello cuenta con el equipo mínimo requerido, sin embargo, la capacitación del personal es de gran relevancia por lo que esta primera etapa de capacitación fue muy importante para iniciar con la aplicación de PCR en la identificación de patógenos en el Sector Forestal del Estado de Michoacán.

## **Objetivos**

- Realizar una estancia y capacitación en el Laboratorio de Patología Forestal, que se ubica en la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo.
- Conocer y aplicar la técnica de PCR para la identificación de patógenos a través de la biología molecular en el sector forestal de Michoacán.

## **Materiales y Métodos**

### *Equipo*

- Micropipetas de diferentes capacidades
- Centrifuga refrigerada
- Centrifuga
- Vortex
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Fotodocumentador de geles
- Espectrofotometro
- Termociclador
- Refrigerador

### *Materiales*

- Kit de extracción de ADN
- Kit de purificación de ADN
- Kit de PCR
- Agarosa
- Tubos eppendorf
- Tubos para PCR
- Puntas para micropipetas color blanco, amarillo y azul (2, 20, 50 y 200  $\mu$ l)
- Guantes de nitrilo
- Gradillas
- Hielo triturado
- Baño maría
- Mortero

## Métodos

La técnica aplicada en esta estancia fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Esta técnica es la más importante en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

Se realizó práctica la extracción y purificación de ADN, así como la corrida de PCR en muestras de *Fusarium*, *Bradysia*, insectos y un hongo desconocida. Los dos primeros son los principales problemas en la producción de planta forestal.

### Proceso de Extracción de ADN.

La selección del método de extracción de ADN es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, así mismo la técnica a aplicar, como la infraestructura del laboratorio, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento.

Para esta etapa se siguió el protocolo establecidos en el kit de extracción comercial, sin embargo, también se utilizó una solución preparada previamente con reactivos adquiridos por separado.

### Extracción de ADN mediante un Kit comercial (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA)

Se trabajó con las muestras de *Fusarium* y *Trichoderma* aislados de muestras de *Pinus oaxacana* procedentes de Oaxaca, para lo cual se realizó lo siguiente:

#### *Obtención de la muestra de ADN*

- Se utilizó micelio que se obtuvo de colonias puras desarrolladas en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Se requirió aprox.  $\leq 20$  mg de micelio y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml
- Se adicionó 400  $\mu$ l de bufferAP1 y 4  $\mu$ l de RNasa A.
- Se mezcló en el vortex por 30 seg
- Se incubó por 10 min a 65 °C, invirtiendo el tubo 2 o 3 veces durante la incubación.
- Posteriormente se adicionaron 130  $\mu$ l de Buffer P3. Se mezcló y se incubó por 5 min en hielo.
- Se centrifugó el lisado por 5 min a 14 000 rpm

- Se pipeteó el lisado en una columna (QIA ahredder Mini Spin Column) de 2 ml.
- Se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm
- Se transfirió el filtrado a un nuevo tubo de 2 ml sin tocar la pastilla, solo cuando ésta se observó en el fondo del tubo.
- Se adicionaron 1.5 volúmenes del buffer AW1 y se mezcló por pipeteo.
- Se transfirieron 650 µl de la mezcla a una nueva columna (DNeasy Mini Spin Column) de 2 ml y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.
- Se descartó el filtrado y se repitió el mismo paso para el resto de la muestra.
- Se colocó la columna (DNeasy Mini Spin Column) de 2 ml dentro de un nuevo tubo colector de microcentrifuga de 2 ml.
- Se adicionaron 500 µl del buffer AW2y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.
- Se descartó el filtrado
- Se adicionaron otros 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm
- Se transfirió la columna DNeasy Mini Spin Column a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
- Se adicionaron 100 µl del buffer AE.
- Se incubó por 5 min a temperatura ambiente (15 a 25 °C) y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.
- Se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml y se adicionaron 100 µl del buffer AE. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente (15 a 25 °C) y posterior a ello, se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.
- Se almacenó la muestra de ADN a 4 °C, en un refrigerador.

#### *Verificación de ADN en la muestra*

Este paso se realizó en el espectrofotómetro, teniendo presente que las lecturas de absorbancia deben estar entre 1.8 a 2.0 ng/µl (banda 260 a 280).

Para el caso de *Fusarium*, los resultados mostraron la presencia de este en la muestra, sin embargo, para *Trichoderma*, los datos refirieron la ausencia de ADN.

#### *Extracción de ADN por el método AP*

Se utilizaron muestras de *Fusarium* y de *Trichoderma* de Oaxaca y del hongo negro desconocido aislado de raíz de pino de Durango.

- Para la muestra de *Fusarium* se vertieron 250 µl de solución AP (previamente preparada) en la caja de Petri. Se raspó rápidamente el micelio para evitar que la solución AP sea absorbida por el medio de cultivo. El producto de este raspado, se retiró con una pipeta y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se le agregaron 500 µl de solución AP, para hacer un total de 750 µl.

Se pasó por el vortex durante 30 seg y dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

- Para el caso de *Trichoderma*, se raspó el micelio en seco con una aguja de disección curva y se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml. Posteriormente se pasó a un mortero frío proveniente del ultracongelador (- 86 °C). La muestra se macero rápidamente en el mortero y el polvo resultante se retiró y colocó en un tubo eppendorf. Se le agregaron 500 µl de solución AP, se pasó por el vortex durante 30 seg y dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Para el hongo negro de Durango, se vertieron 500 µl de solución AP (previamente preparada) en la caja de Petri. Se raspó rápidamente el micelio para evitar que la solución AP sea absorbida por el medio de cultivo. Sin embargo, debido a la poca cantidad de micelio, se tuvo que trabajar con dos cajas de Petri, la primera se trabajó con la solución AP y la segunda el raspado fue en seco. El producto de este raspado, se retiró con una pipeta y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se le agregaron 500 µl de solución AP, para hacer un total de 750 µl. Se pasó por el vortex durante 30 seg y dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El siguiente procedimiento se les aplicó a las tres muestras

- Centrifugado a 12 000 rpm por 1 min.
- Retirar el sobrenadante y se pasó a otro tubo eppendorf.
- Se agregaron 500 µl de fenol –cloroformo y se pasó por el vortex 3 seg
- Se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 3 min (en este paso se formaron 3 capas, se retiró cuidadosamente la solución intermedia)
- Recuperar la fase acuosa (intermedia) con una micropipeta de 200 µl y pasarla a un tubo limpio. Se retiró la máxima cantidad posible, evitando tomar de las capas superior e inferior (cuando esto sucedió, se regresó la solución pipeteada y se centrifugó nuevamente por aprox. 20 seg.)
- Nuevamente se agregaron 500 µl de fenol –cloroformo y se pasó por el vortex 3 seg.
- Se volvió a centrifugar a 12 000 rpm por 3 min.
- Se recuperó la fase acuosa (intermedia) con una micropipeta de 200 µl y se pasó a un tubo limpio.
- Posteriormente, se agregaron 500 µl de isopropanol y 50 µl de acetato de amonio 10 M.
- Con la mano, se invirtió el tubo suavemente de 10 a 15 veces.
- Se pasó a la centrifuga a 12 000 rpm durante 10 min.
- Se tiró el sobrenadante, solo se conservó la pastilla.

- Para la ver la pastilla, se adicionaron 50  $\mu$ l de etanol al 70%.
- Se pasó al Vortex hasta despegar la pastilla.
- Posteriormente se centrifugó por 3 min a 12 000 rpm
- Se tiró el etanol
- Se lavó la pastilla nuevamente con 50  $\mu$ l de etanol al 70%.
- Se pasó por el Vórtex hasta despegar la pastilla.
- Se centrifugó por 3 min a 12 000 rpm
- Se tiró el etanol
- Se colocó el tubo boca abajo en una toalla interdoblada para eliminar el exceso de etanol.
- Esperamos que secará la pastilla. (En este caso, para agilizar el secado se centrifugó por 10 seg y posteriormente, con una micropipeta de 10  $\mu$ l se retiró el resto de etanol).
- Esperamos aproximadamente 40 min.
- El último paso fue resuspender la pastilla en 70  $\mu$ l de agua libre de nucleasa. Pasamos al vortex por 5 seg.
- Para verificar la presencia de ADN en la muestra, se colocó una microgota (2  $\mu$ l ) en el espectrofotómetro.

#### *Verificación de ADN en la muestra*

- Este paso se realizó en el espectrofotómetro, teniendo presente que las lecturas de absorbancia deben estar entre 1.8 a 2.0 ng/ $\mu$ l (banda 260 a 280).
- Con este método de extracción de ADN, para las tres muestras trabajadas los resultados de presencia de ADN fueron positivos.

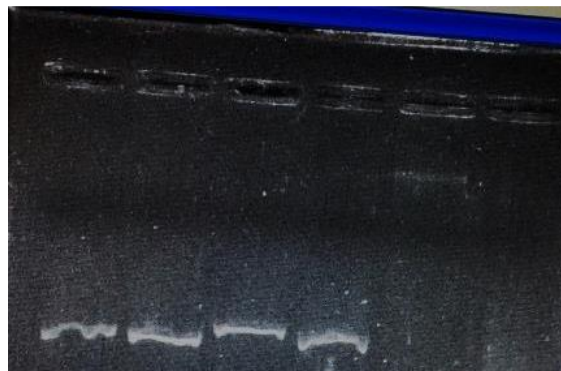
#### Elaboración de gel de agarosa

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ . Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y  $>200$  nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN.



Para el caso de los hongos trabajados, se preparó un gel de agarosa al 1% de la siguiente manera:

- Se pesaron 0.5 g de agarosa
- Se midieron 50 ml de solución buffer TBE 1X y se vertieron en un matraz
- Se agregó la agarosa a la solución buffer TBE 1X
- Se calentó esta solución en el horno de microondas por 30 seg. Los primeros 25 continuos y los 5 restantes pausados para evitar derrames. El indicador de que la solución esta lista, es que se observa completamente cristalina.
- Se adicionaron 1.8 µl de gel red
- Esperamos a que la solución se enfriara hasta tolerar al tacto.
- Mientras tanto, se preparó la cámara de electroforesis y se verificó que las paredes quedaran bien selladas y se colocó el peine correctamente.
- El siguiente paso fue vaciar cuidadosamente la solución de agarosa en la cámara de electroforesis para evitar la formación de burbujas y esperamos a que solidificara (aprox. 25 min).
- Una vez que el gel se solidificó, se adicionó solución buffer TBE 1X hasta cubrir un poco arriba de las marcas de la cámara de electroforesis.
- Se retiró el peine cuidadosamente para no romper los pozos.
- En una tira de papel parafilm, se colocó una gota de 8 µl de solución buffer verde (viene en el kit de PCR) por muestra. En este caso, se colocaron dos gotas de 8 µl de solución buffer verde, una para *Fusarium* y la otra para *Trichoderma*.
- Con la pipeta de 20 µl se tomaron 8 µl de los tubos Eppendorf con ADN (*Trichoderma* y *Fusarium*).
- Con la pipeta se mezcló la gota de solución buffer verde, con la de la solución del ADN
- Se pipeteó los 16 µl de la solución resultante y se depositaron en un pozo del gel de agarosa.
- Se utilizó un pozo por muestra.
- Una vez que se concluyó con el depósito de todas las muestras, se corrió el gel a 95 voltios.

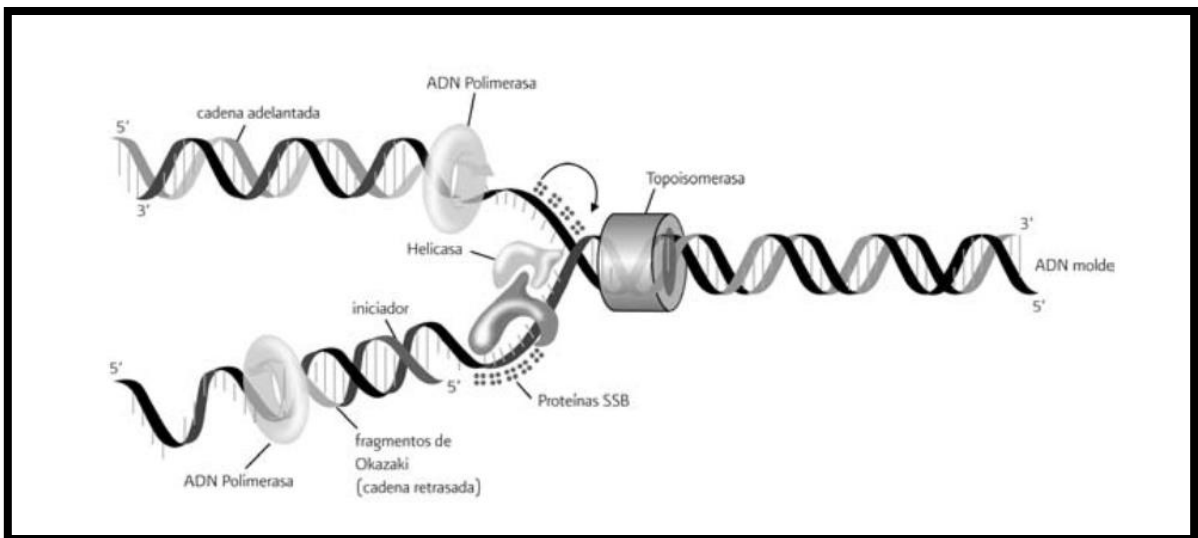


## Amplificación de ADN

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores.

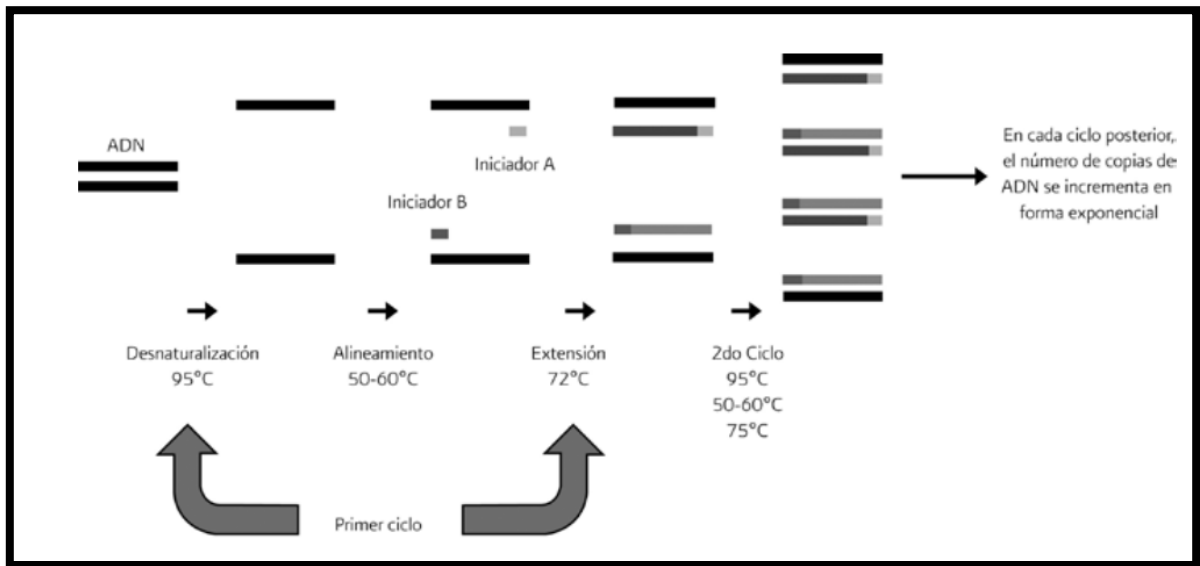
Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias.

Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes (Ilustración 2), dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Espinosa 2007).



**Ilustración 1.** Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN Polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación.

Modificada de [www.biologia.edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif](http://www.biologia.edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif).



**Ilustración 2 .** Amplificación de ADN mediante PCR. Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. Teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula.

Modificada de [https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/Bt51A/1/material\\_docente/objeto/244484](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/Bt51A/1/material_docente/objeto/244484).

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un co-factor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores. La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Espinosa 2007).

- Cuando se trabaja con la técnica de PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, un tubo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde, para poder monitorear posibles contaminaciones. También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que sabemos amplifica sin problemas bajo las condiciones establecidas. Este control es muy útil para asegurarnos que los reactivos ocupados se encuentran en condiciones apropiadas.
- Es importante utilizar siempre materiales consumibles (tubos, puntas, etc.) nuevos y estériles. Para aplicaciones muy sensibles a la contaminación se recomienda emplear puntas con filtro.
- Se recomienda usar pipetas exclusivas para PCR y tener áreas exclusivas para extracción de ADN, PCR y electroforesis.

- Los reactivos de PCR son sensibles a la temperatura, por lo cual durante su uso se deben mantener en hielo e inmediatamente después de utilizarlos se les debe regresar al congelador. Es recomendable hacer alícuotas de todos los reactivos, si se tiene alguna contaminación o hidrólisis se puede tomar una nueva alícuota.

### Práctica de PCR

El PCR se trabajó con cinco muestras (2 de *Fusarium*, 2 de *Trichoderma* y 1 hongo desconocido). Como ya se detalló anteriormente, el ADN se extrajo mediante dos técnicas 1) kit comercial y 2) Solución AP.

De cada uno de los tubos con muestra de ADN, se transfirieron 2 µl a un tubo de PCR, previamente etiquetados de la siguiente manera:

No. de tubo	Muestra
1	<i>Fusarium</i> (Kit)
2	<i>Fusarium</i> (Solución AP)
3	<i>Trichoderma</i> (Kit)
4	<i>Trichoderma</i> (Solución AP)
5	Hongo oscuro (Solución AP)
6	Positivo
7	Negativo (agua)

- En un tubo eppendorf de 2 ml y etiquetado como mix, se adicionaron los reactivos calculados en la columna 3 del siguiente cuadro:

Componente	1X	8X
Agua	27	216
Buffer	10	80
MgCl <sub>2</sub>	5	40
dNTP	1	8
ITS4	2	16
ITS5	2	16
Taq	1	8

- En el caso del componente Taq, se midió y depositó rápidamente en el tubo mix, se nos recomendó que se añadiera al final de los demás componentes.
- Una vez que el tubo mix contenía todos los componentes, se pasó por el vortex e inmediatamente se depositó en hielo.
- De este tubo mix, se midieron 48 µl y se agregaron al tubo 1 y así sucesivamente hasta concluir con el tubo 7. De esta manera, cada tubo tenía 50 µl.

- Se pasaron al vortex durante 2 segundos cada uno y posteriormente a la microcentrífuga otros 2 segundos.
- Todas las muestras se colocaron en el termociclador de punto final, bajo el siguiente programa:

Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos
95	5	1
95	1	
57	1	32
72	1	
72	12	1

El programa seleccionado para la amplificación de ADN, tardó aproximadamente 2.5 horas.



**Ilustración 3.** Programa para amplificación de ADN mediante PCR en muestras de *Fusarium* y *Trichoderma* en termociclador de punto final.

Como método de análisis, la manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado

mediante electroforesis en geles de agarosa es recomendable cargar el 50% del volumen del control negativo con el objetivo de visualizar cualquier amplificación que nos pueda dar indicio de una probable contaminación de los reactivos de PCR. En caso de que no haya producto amplificado o que éste tenga un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador.

Una vez que el termociclador concluyó, se retiraron las siete muestras y para visualizar los fragmentos amplificados, se realizó lo siguiente:

- Se preparó el gel de agarosa al 1%
- En una tira de papel parafilm se colocaron 8 gotas de buffer color verde de 5  $\mu$ l
- De cada uno de los siete tubos, se tomaron 5  $\mu$ l de la muestra
- Cada gota fue mezclada con la gota de buffer verde, de tal manera que la solución mezclada quedó de 10  $\mu$ l, los cuales se tomaron con la micropipeta y se colocaron en cada uno de los pozos del gel de agarosa.
- Una vez colocadas todas las muestras, se corrió el gel a 95 volts
- Posteriormente, el gel se pasó al fotodocumentador de geles para observar las bandas.
- Los resultados mostraron que la muestra negativa (agua) tuvo un error, ya que esta no debía amplificar, sin embargo, si amplificó, lo que pudiera deberse a errores de manipulación en las muestras por parte del operador.



**Ilustración 4.** Visualización de las bandas en gel de agarosa

## **Proceso de purificación del ADN**

En el mercado existen kits de purificación de ADN y se siguen los protocolos establecidos en estos. El proceso de purificación del ADN tiene el objetivo de separar al ADN de otras moléculas constitutivas de la célula al momento de la extracción.

Existen diferentes formas de llevar a cabo la purificación del ADN, aunque el proceso en general es como sigue:

- Se deben romper las membranas de la célula lisándola.
- Se lleva a cabo un proceso de centrifugación que permita obtener sólo la fase acuosa del ADN y separa las membranas.
- Se deben separar las proteínas con la finalidad de obtener solamente los ácidos nucleicos. Esto se lleva a cabo tratando la muestra con fenol o con proteasas.
- Es necesario separar el ARN del ADN, esto se lleva a cabo mediante un tratamiento con ribonucleasas.
- Finalmente, se comprueba la purificación del ADN en un equipo llamado espectrofotómetro y se corre un gel en la cámara de electroforesis.

Cuando se tienen el nivel de purificación adecuado, el ADN puede ser analizado y utilizado sin problemas de contaminación. Así que puede mandarse a secuenciar para obtener la cadena que nos permitirá llegar a identificar el patógeno de interés.

## **Resultados**

El entrenamiento, capacitación y uso de herramientas moleculares en el sector forestal, para la correcta identificación de patógenos.



## ANEXO FOTOGRÁFICO

