



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración.

Pérez Mejía Laura Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz

14 de marzo de 2024





Introducción



Pier Antonio Micheli

Estudio de hongos a finales del siglo XVII



Robert Whittaker

Clasificación del nuevo reino Fungi



2,2 - 3,8 millones de especies

Se conocen alrededor de 150.000

Viotá, Cundinamarca

São Luís, Maranhão, Brasil

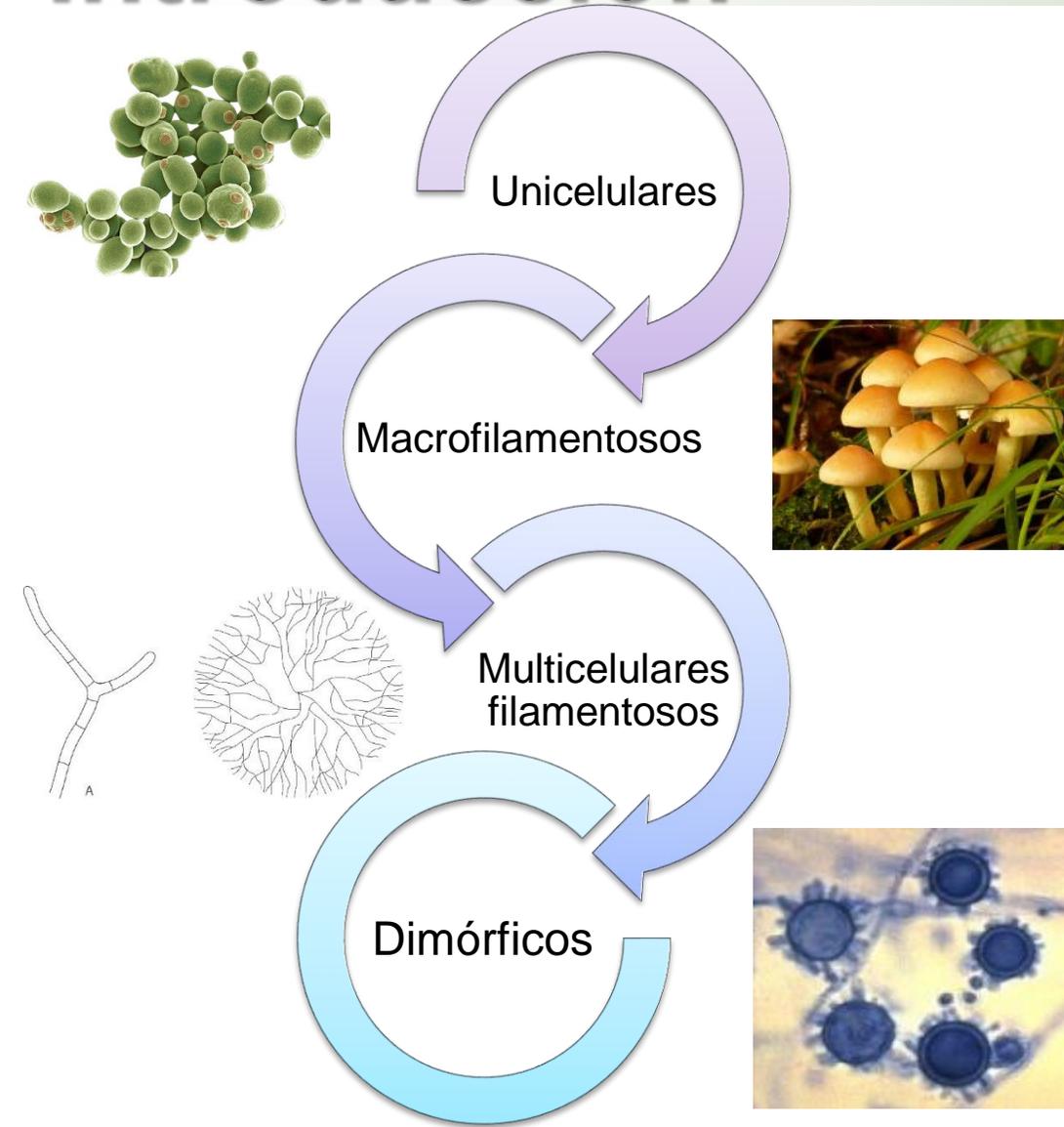
Altiplano central de Bolivia

Reserva Los Cedros, Ecuador

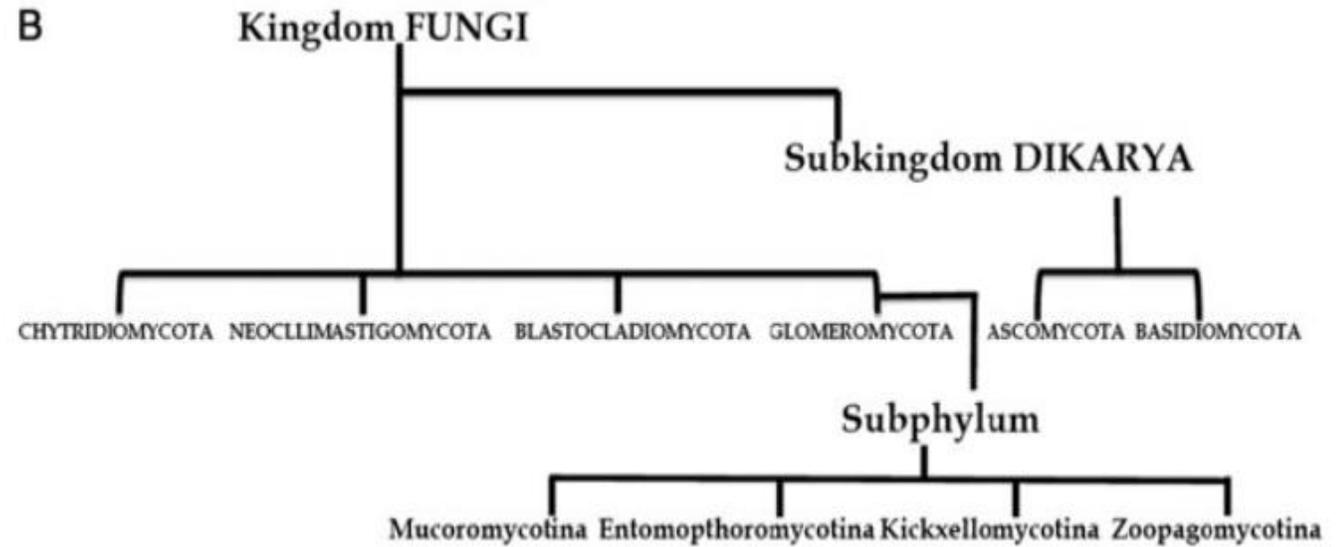
Azuay

Aspergillus,
Penicillium,
Fusarium y
Trichoderma

Introducción

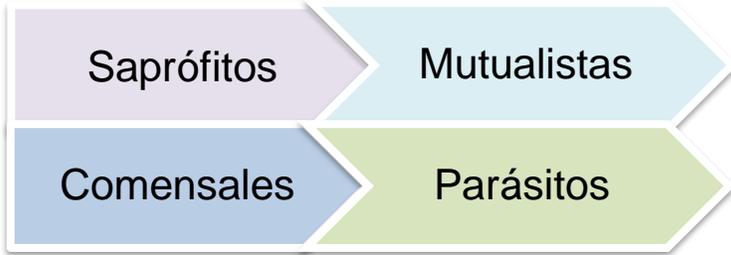


Clasificación de hongos

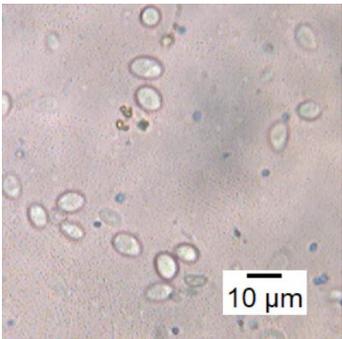


Introducción

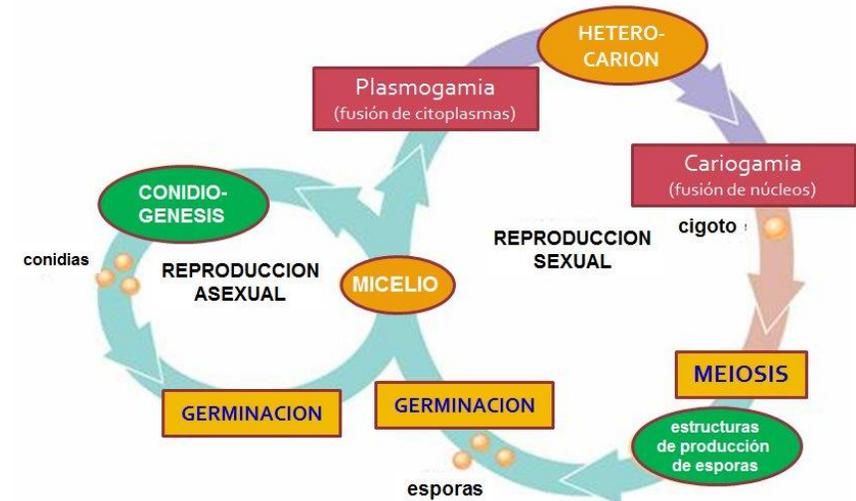
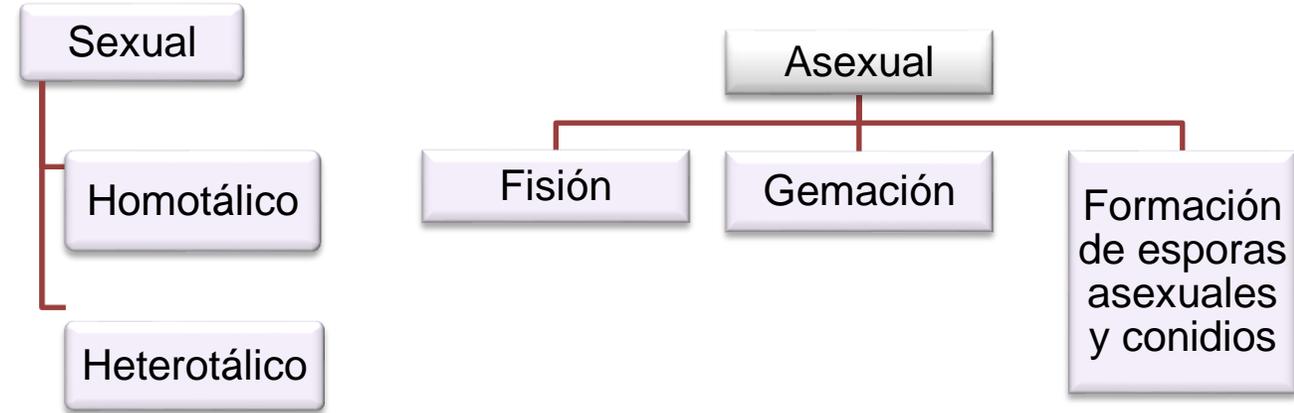
Modo de nutrición



Formación de esporas

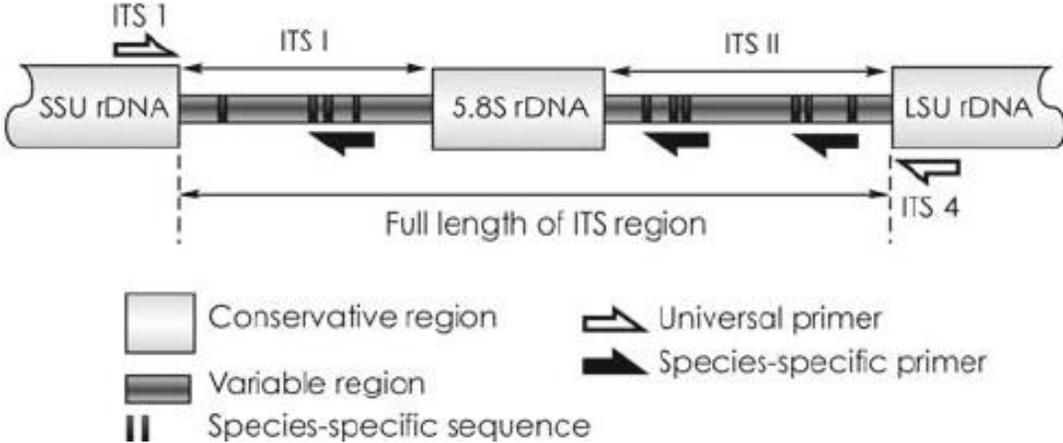


Reproducción



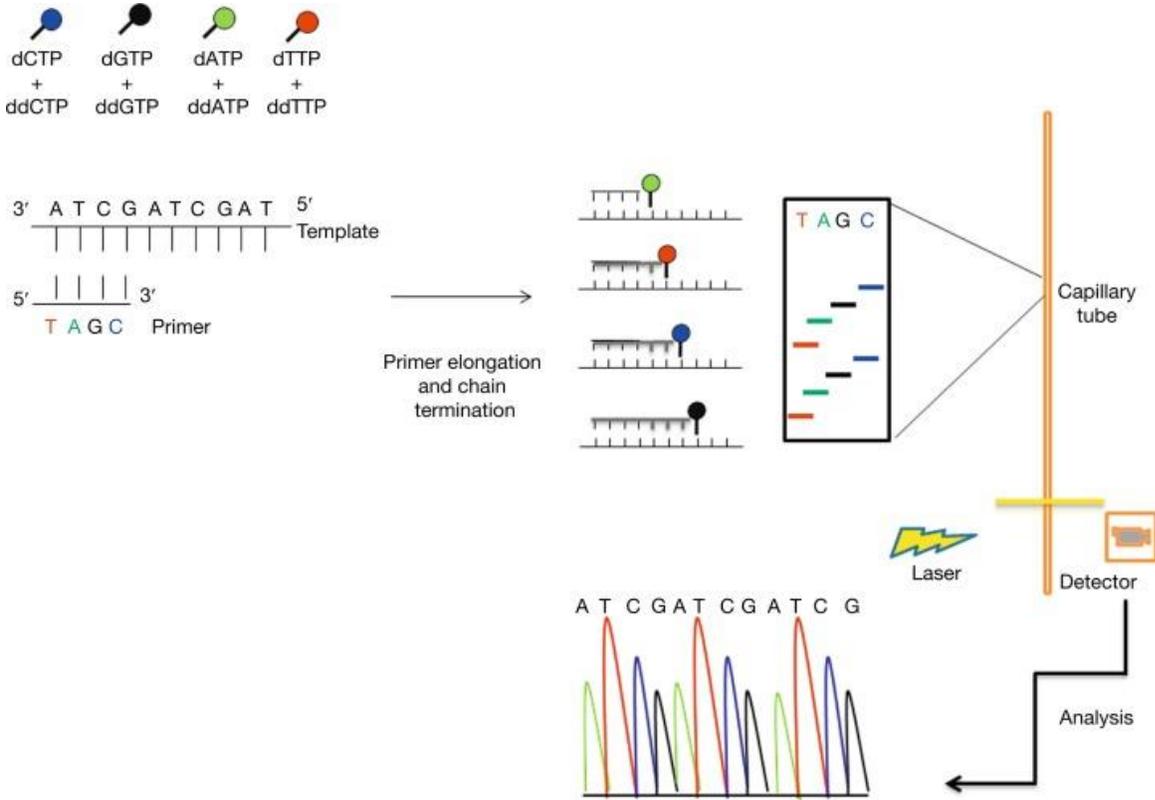
Introducción

Región ITS



Código de barras genéticos de hongos por excelencia

Secuenciación Sanger

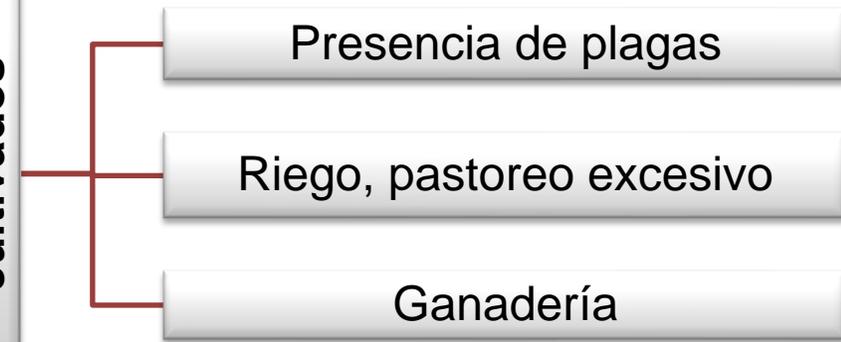


(Raja et al. 2017)

Justificación



Impactos en suelos cultivados



Hacienda "El Prado" - IASA I



- Establecimiento de una línea base de hongos filamentosos para fines de biorrecuperación.
- Diagnóstico del rol ecológico de la diversidad fúngica del sector de Horticultura y Fruticultura.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración.

Objetivos Específicos

- Identificar morfológica y molecularmente las especies de hongos filamentosos recolectados en los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura.
- Evaluar la biodiversidad presente en el suelo en base a las especies registradas.
- Establecer un cepario de microorganismos con potencial benéfico.



Hipótesis

Ho: No existe diferencia significativa entre la riqueza de especies de hongos filamentosos observada y la riqueza esperada según el estimador no paramétrico Chao 1.



Materiales y métodos

Área: 86.951,81 m²



Figura 1

Área de estudio del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I



Preparación de trampas microbianas



Instalación de trampas microbianas



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

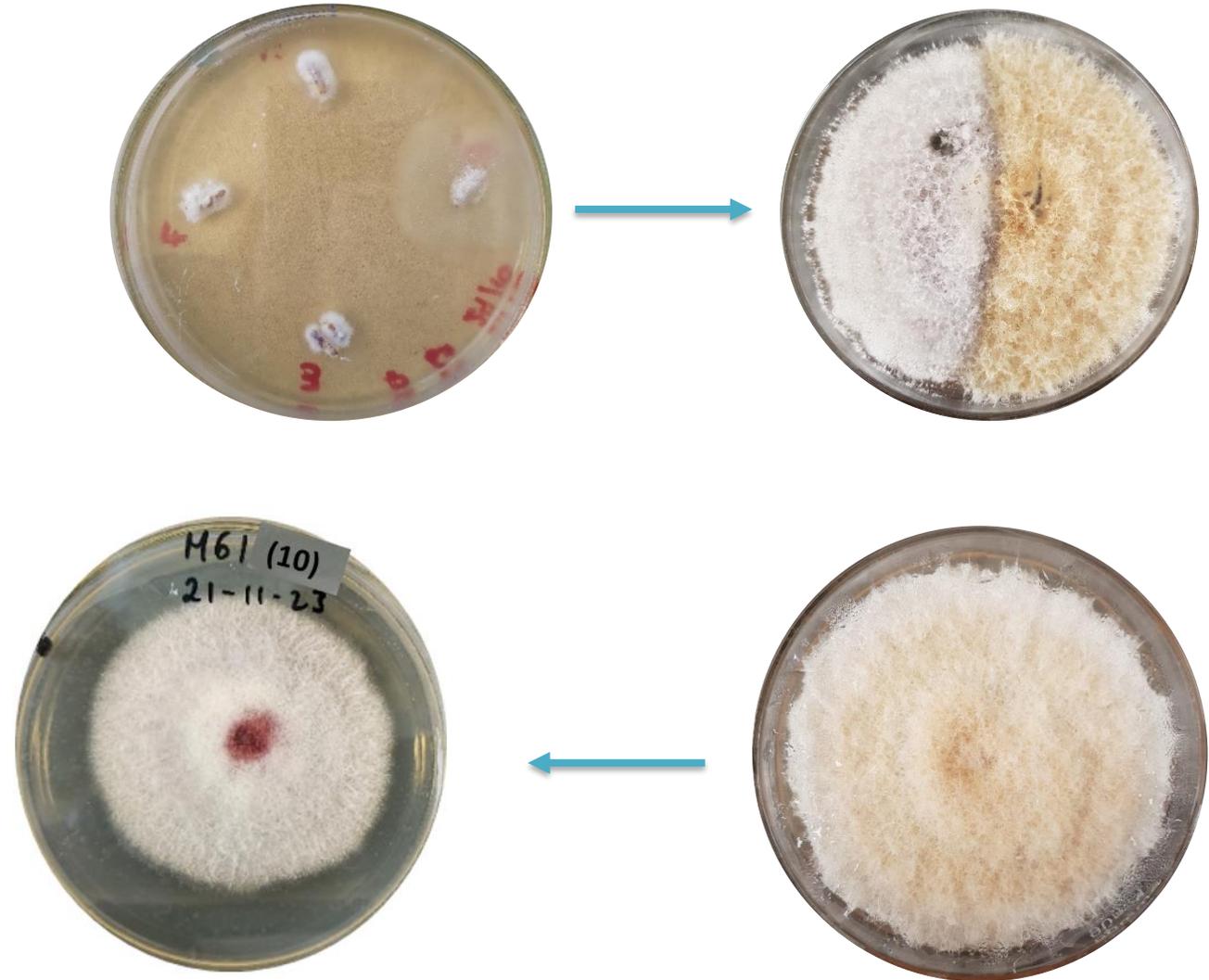
Materiales y métodos

Aislamientos y purificaciones de hongos

Tabla 1 .
Códigos de colores de hongos

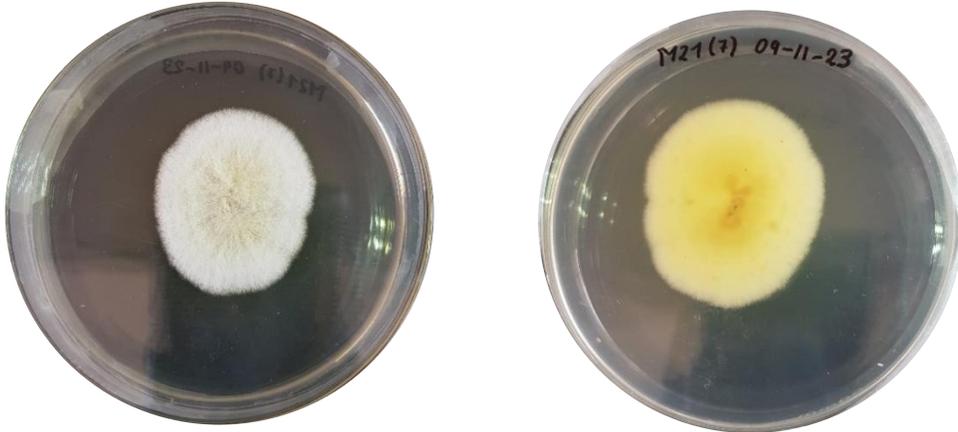
| CÓDIGO | COLOR |
|--------|----------|
| 1 | Rojo |
| 2 | Morado |
| 3 | Lila |
| 4 | Gris |
| 5 | Blanco |
| 6 | Verde |
| 7 | Amarillo |
| 8 | Negro |
| 9 | Beige |
| 10 | Naranja |
| 11 | Café |

Obtención de
cultivos puros



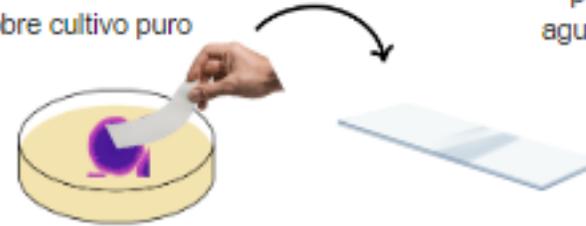
Materiales y métodos

Identificación morfológica macroscópica



Identificación morfológica microscópica

Se presionó cinta adhesiva de 2 cm sobre cultivo puro



Se colocó sobre el portaobjetos con agua destilada o azul de metileno de metileno

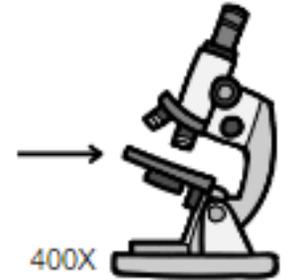
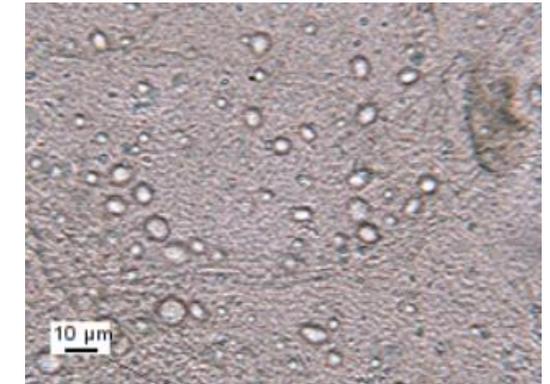


Tabla 2 .
Características macroscópicas

| ANVERSO | | | |
|-----------------------|------------|---------------------|-----------|
| COLOR | CENTRO | ALTURA MICELIO | ALTO |
| | MEDIO | | MEDIO |
| | ANILLO | | BAJO |
| | BORDE | | IRREGULAR |
| TEXTURA DE MICELIO | ALGODONOSA | TIPO DE CRECIMIENTO | DENSO |
| | POLVOSA | | REGULAR |
| COLOR DE ESPORULACIÓN | | | TENUE |
| REVERSO | | | |
| COLOR | CENTRO | COLOR EXUDADO | |
| | MEDIO | | |
| | BORDE | | |



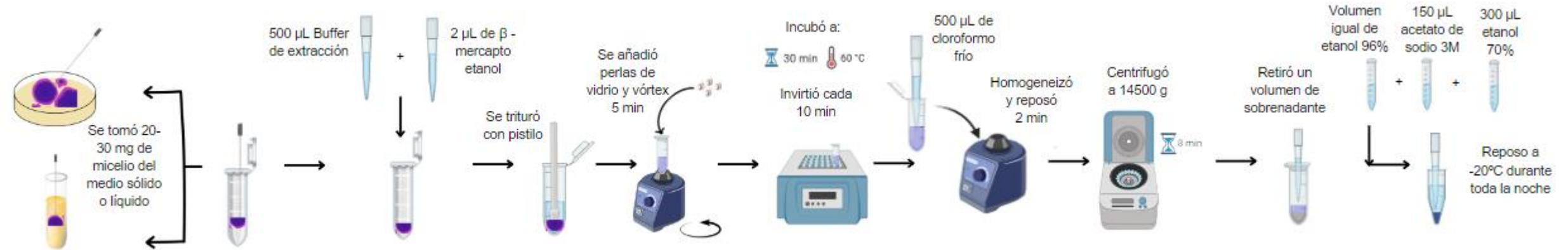
Clasificación de aislamientos por morfoespecies

Materiales y métodos

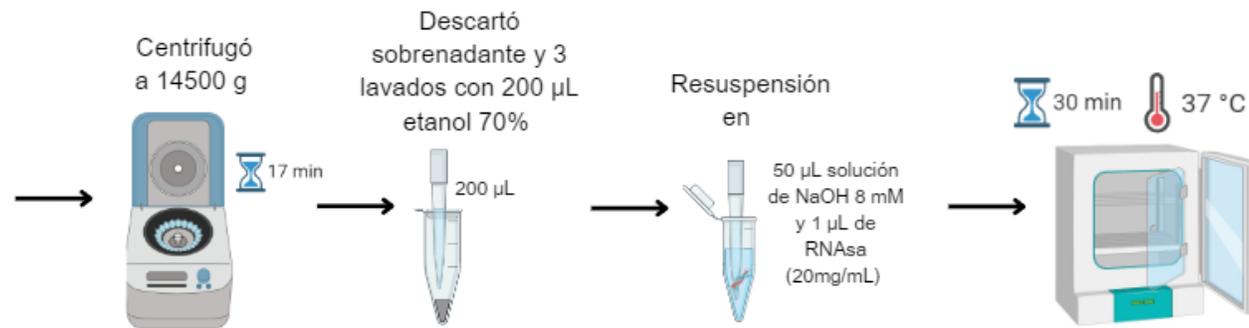
Extracción de ADN

Método orgánico

I Parte

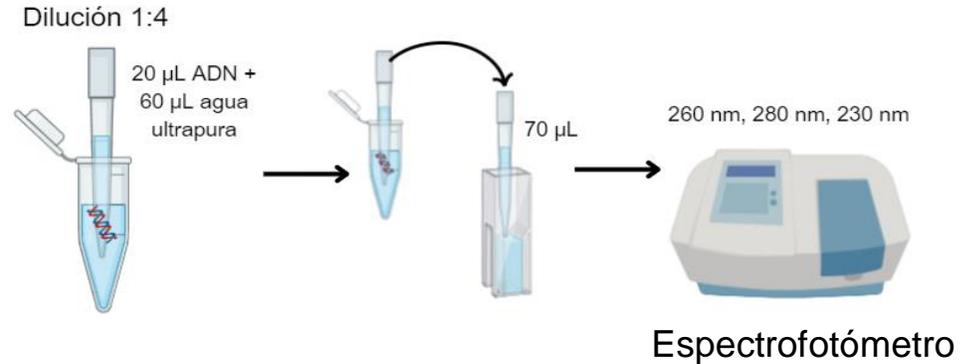


II Parte



Materiales y métodos

Cuantificación de ADN y estimación de pureza



Cálculo de concentración:

$$[ADN] \text{ (ug/mL)} = A_{260} \times 50 \frac{\text{ug}}{\text{mL}} \times FD_{ADN}$$

$$[ADN] \text{ (ug/mL)} = A_{260} \times 50 \frac{\text{ug}}{\text{mL}} \times \frac{V_{TD}}{V_{ADN}}$$

Tabla 3

Crterios de pureza en muestras de ADN

| Análisis | Rangos | Criterios |
|-------------------|------------------|--|
| A_{260}/A_{280} | $\geq 1,8 - 2,1$ | Pureza óptima |
| | $\geq 1,6 - 1,7$ | Pureza aceptable |
| | $< 1,6$ | Contaminación con compuestos aromáticos como fenoles y proteínas |
| | $> 2,1$ | Contaminación con ARN |
| A_{260}/A_{230} | $> 2 - 2,2$ | Pureza óptima |
| | $> 1,8$ | Pureza aceptable |
| | $< 1,8$ | Contaminación con sales, fenoles, hidratos de carbono |
| | $< 1,5$ | Altamente contaminado con sales, fenoles, carbohidratos |

Nota. Ratios válidos para concentraciones de ADN $> 50 \text{ ug/uL}$
Adaptado de Banco Nacional de ADN Carlos III (2020)



Materiales y métodos

Evaluación de integridad de ADN

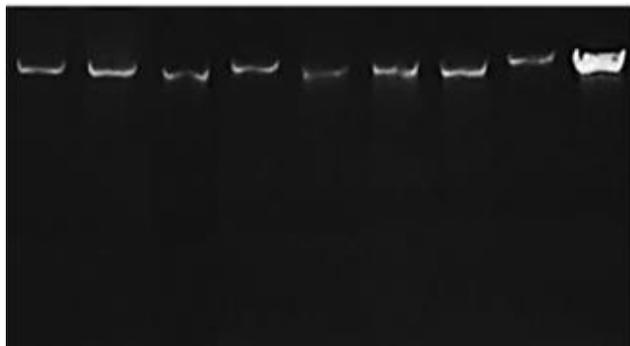
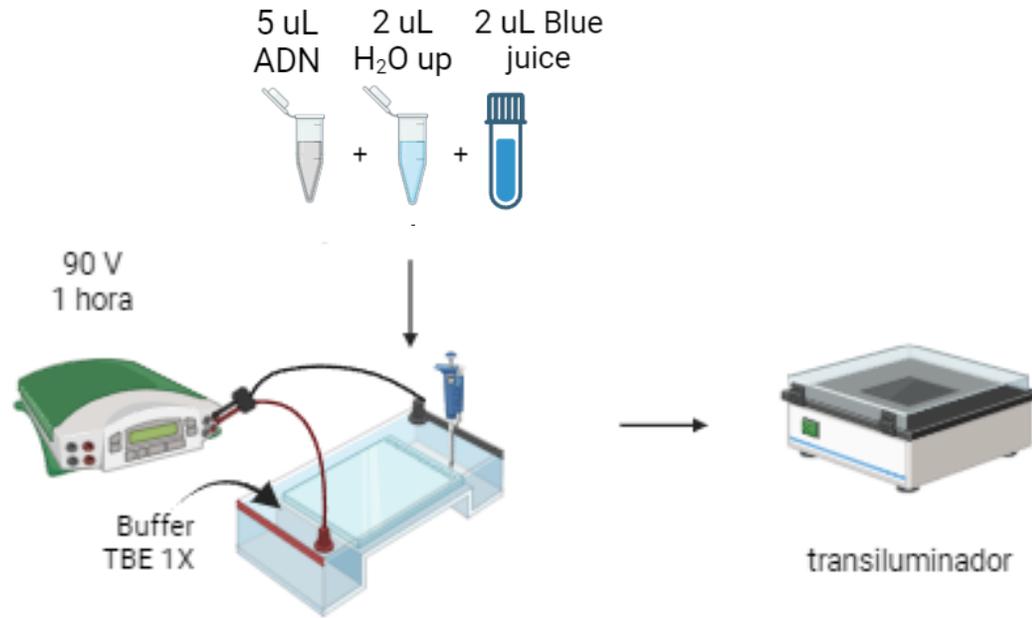


Tabla 4

Criterios de integridad de ADN en gel de agarosa

| Criterios | Descripción |
|-----------------------------------|---|
| Integridad alta | Banda definida en parte superior |
| Integridad adecuada | Presencia de banda en la parte superior y ligero smear |
| Integridad parcialmente degradada | Ausencia de banda definida y smear concentrado en la parte superior |
| Totalmente degradado | Smear concentrado en parte inferior del gel |

Nota. Adaptado de Banco Nacional de ADN Carlos III (2020)



Materiales y métodos

Amplificación de región ITS mediante PCR convencional

kit Platinum Taq DNA Polymerasa

Tabla 5

Primers utilizados para amplificación de región ITS

| Cebador | Secuencia del cebador | Tamaño amplificado (pb) |
|---------|-----------------------|-------------------------|
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | 600 |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 600 |

Nota. pb: pares de bases. Adaptado de White et al. (1990)

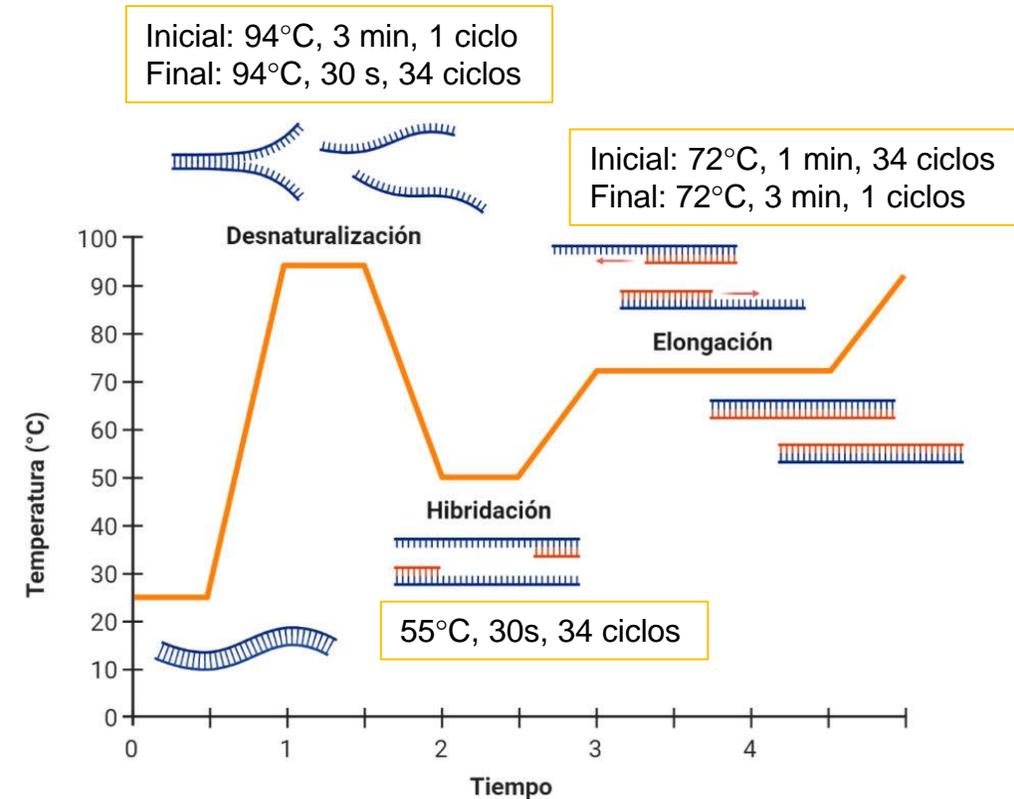
Tabla 6

Ajuste de master mix para un volumen de reacción de 25 µL

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen de reacción (1X) |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| Agua ultrapura | - | - | 19.15 |
| PCR Buffer sin Mg ²⁺ | 10X | 1X | 2.5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1.5 mM | 0.75 |
| dNTP's mixture | 10 mM | 0.2 mM | 0.5 |
| Primer forward (ITS1) | 10 µM | 0.2 µM | 0.5 |
| Primer reverse (ITS4) | 10 µM | 0.2 µM | 0.5 |
| Taq Polimerasa | 5 µ/µL | 0.025 U/ µL | 0.1 |
| ADN | - | - | 1 |

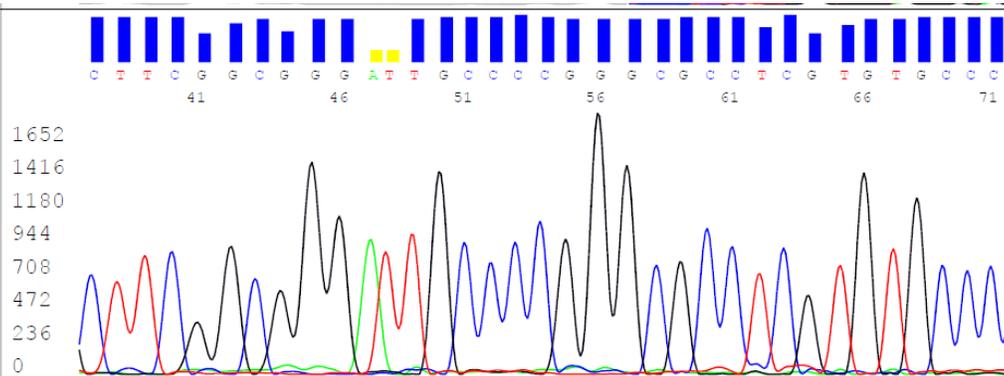
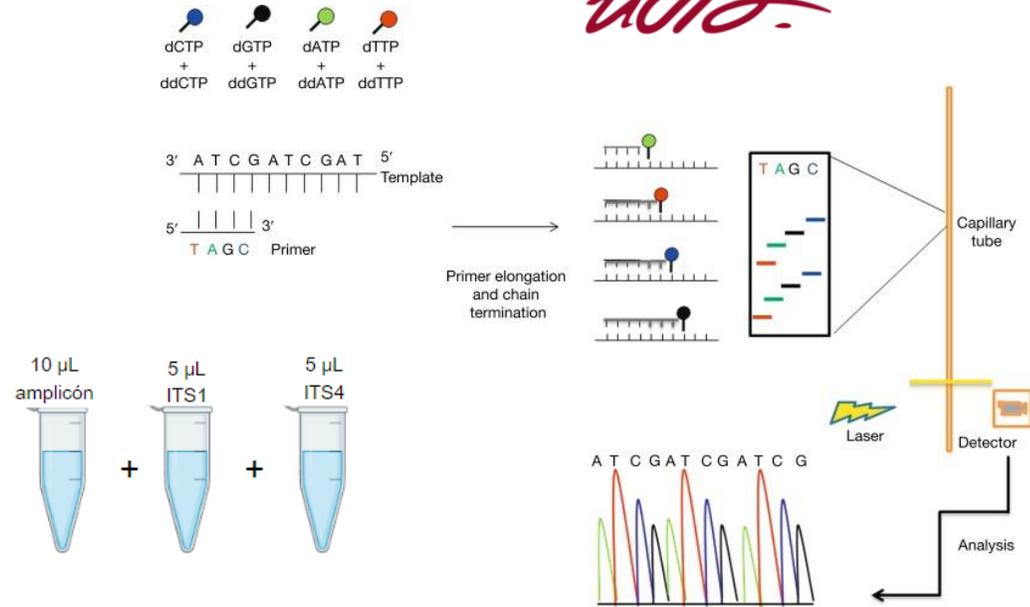
Figura.

Condiciones de amplificación de la región ITS



Materiales y métodos

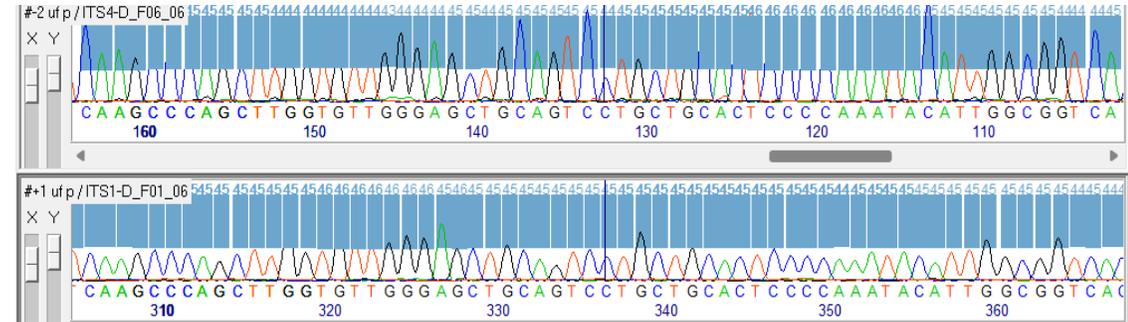
Secuenciación Sanger



Análisis bioinformático



Staden Package



Mega X

| | |
|------------------------------|---|
| 1. Clonostachys rosea | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 2. Clonostachys solani | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 3. Epicoccum nigrum | A G C T T G A A G G T A C A A A T G A C G C T C G A A C A G G C A T G C C C A T G G A A T A C - - |
| 4. Fusarium culmorum | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 5. Fusarium equiseti | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 6. Fusarium oxysporum | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 7. Fusarium sp. | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 8. Linnemannia elongata | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G C T C G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 9. Mucor hiemalis | A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T C G C A T - - - C G A T G A A G A A C G T |
| 10. Mucor irregularis | A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T C G C A T - - - C G A T G A A G A A C G T |
| 11. Mucor janssenii | A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T C G C A T - - - C G A T G A A G A A C G T |
| 12. Mucor moelleri | A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T C G C A T - - - C G A T G A A G A A C G T |
| 13. Trichoderma asperellum | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 14. Trichoderma koningiopsis | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |
| 15. Trichoderma sp. | A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C - T T G G T T C T G G C A T - - - C G A T G A A G A A C G C |



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Materiales y métodos

Evaluación de biodiversidad

Cultivo o aislado puro considerado una entidad individual

Abundancia relativa (p_i):

$$p_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1 \dots n} n_i} = \frac{n_i}{N}$$

Índice de diversidad de Shannon (H'):

$$H' = - \sum \left(\frac{n_i}{N} \right) \ln \frac{n_i}{N} = - \sum (p_i) \ln p_i$$

Índice de diversidad Simpson (D'):

$$1 - \sum (p_i)^2$$

Índice no paramétrico Chao1 (S_{Chao1}):

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F^2}{2G} * \frac{N-1}{N}$$

Índice de Margalef (D_{Mg}):

$$D_{Mg} = \frac{(S-1)}{\ln N}$$

Índice de dominancia de Simpson (D):

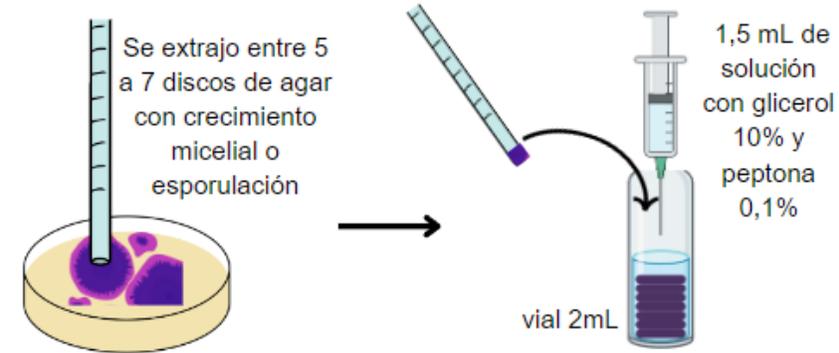
$$D = \sum \left(\frac{n_i}{N} \right)^2 = \sum (p_i)^2$$

Índice de equidad de Pielou (J'):

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}} = \frac{H'}{\ln S}$$

Determinación del rol ecológico en base a literatura

Cepario



Almacenamiento en ultracongelador a -80°C



Resultados y discusión

Tabla 7

Hongos aislados por subparcelas

| ID Subparcela | Coordenadas geográficas | N° hongos aislados | Código asignado u observación |
|---------------|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | 0°22'53"S 78°24'55"W | 1 | P1 - H1 - C11 |
| 3 | 0°22'53"S 78°24'52"W | - | Trampa no recuperada |
| 7 | 0°22'53"S 78°24'47"W | - | Contaminación por gusanos en trampa |
| 9 | 0°22'54"S 78°24'56"W | 1 | P9 - H2 - C3 |
| 10 | 0°22'54"S 78°24'55"W | - | Humedad excesiva en trampa |
| 11 | 0°22'54"S 78°24'54"W | 2 | P11 - H3 - C3 P11 - H4 - C7 |
| 13 | 0°22'54"S 78°24'52"W | - | Trampa no recuperada |
| 15 | 0°22'54"S 78°24'50"W | - | Humedad excesiva en trampa |
| 17 | 0°22'54"S 78°24'49"W | 2 | P17 - H5 - C5 P17 - H6 - C8 |
| 19 | 0°22'54"S 78°24'47"W | - | Contaminación por gusanos en trampa |
| 21 | 0°22'55"S 78°24'56"W | 2 | P21 - H7 - C7 P21 - H8 - C10 |
| 22 | 0°22'55"S 78°24'55"W | - | Contaminación por larvas en trampa |
| 23 | 0°22'55"S 78°24'54"W | 1 | P23 - H9 - C11 |

| | | | |
|----|----------------------|---|--|
| 25 | 0°22'55"S 78°24'52"W | 1 | P25 - H10 - C7 |
| 27 | 0°22'55"S 78°24'50"W | - | Trampa no recuperada |
| 29 | 0°22'55"S 78°24'48"W | - | Humedad excesiva en trampa |
| 31 | 0°22'56"S 78°24'56"W | - | Contaminación por gusanos en aislado |
| 33 | 0°22'56"S 78°24'55"W | - | Trampa no recuperada |
| 35 | 0°22'56"S 78°24'53"W | - | Humedad excesiva en trampa |
| 37 | 0°22'56"S 78°24'51"W | - | Humedad excesiva en trampa |
| 39 | 0°22'55"S 78°24'49"W | 1 | P39 - H11 - C5 |
| 41 | 0°22'55"S 78°24'47"W | - | Trampa no recuperada |
| 43 | 0°22'57"S 78°24'55"W | - | Trampa no recuperada |
| 45 | 0°22'57"S 78°24'53"W | - | Contaminación por larvas en trampa |
| 49 | 0°22'57"S 78°24'49"W | - | Trampa no recuperada |
| 51 | 0°22'56"S 78°24'47"W | - | Contaminación por larvas y gusanos en trampa |
| 53 | 0°22'58"S 78°24'54"W | 2 | P53 - H12 - C10 P53 - H13 - C10 |
| 57 | 0°22'58"S 78°24'50"W | - | Humedad excesiva en trampa |

50% restante perdido:

- contaminación por gusanos y larvas
- exceso de humedad.

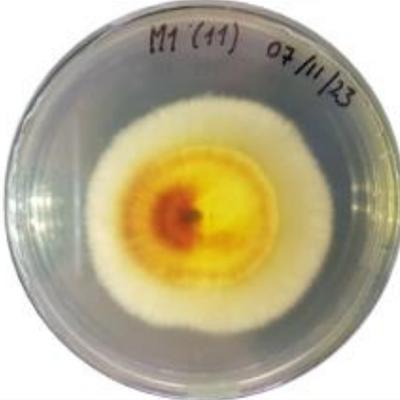
Se obtuvieron 43 cepas aisladas del 50% de subparcelas recuperadas.

Nota. P: ID Subparcela, H: hongo aislado, C: código de color



Resultados y discusión

Tabla 2
Agrupación de hongos por morfoespecie

| Orden | Crecimiento en PDA (anverso) | Crecimiento en PDA (reverso) | Caracterización microscópica (400X) | Hongos aislados |
|-------|--|---|--|---------------------------|
| 1 |  |  |  | P1-H1-C11 * |
| 2 |  |  |  | P23-H9-C11* P61-H15-C3 |

3



P53-H13-C10 *
P72-H19-C3
P72-H20-C7

6



P25-H10-C7*

4



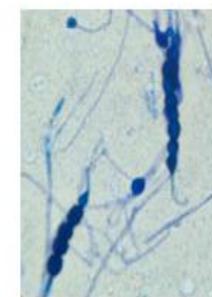
P61-H16-C10 *

7



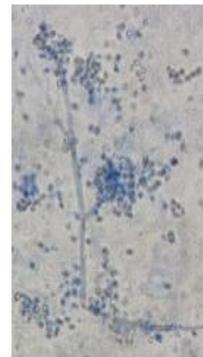
P9-H2-C3 *

5



P72-H21-C8
P72-H22-C9*

8



P81-H26-C7*



9



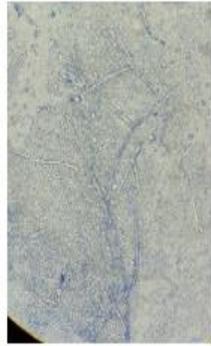
P21-H7-C7 *

12



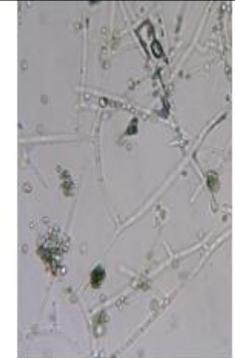
P11-H3-C3
P11-H4-C7 *
P21-H8-C10
P91-H33-C2
P91-H34-C5
P99-H42-C7

10



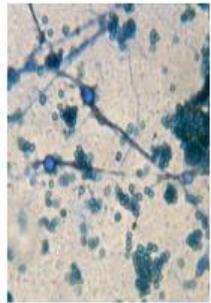
P85-H27-C5 *

13



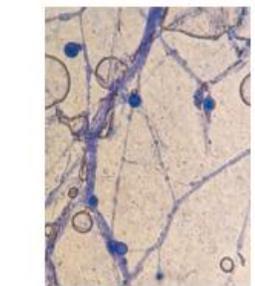
P59-H14-C1
P67-H18-C2
P77-H25-C5
P85-H28-C7
P87-H29-C3
P87-H30-C10
P91-H35- C11 *
P95-H41-C10

11



P17-H5-C5 *

14



P93-H38-C8
P
99-H43-C3*



15



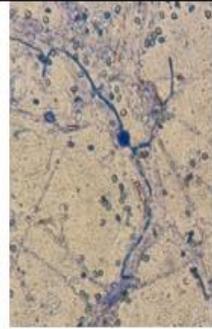
P39-H11-C5*
P95-H40-C7

18



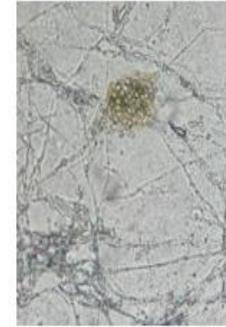
P53-H12-C10 *

16



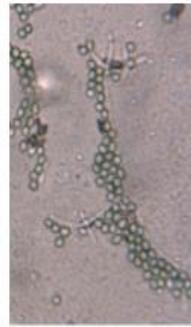
P17-H6-C8 *

19



P93-H39- C10 *

17



P76-H24-C5
P92-H36-C9*

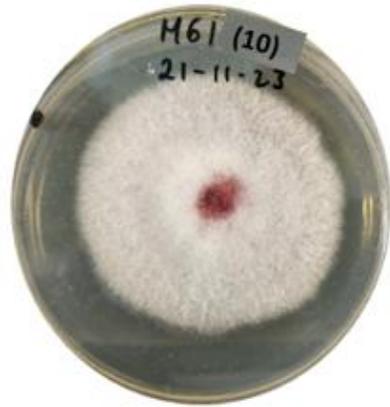
20



P75-H23-C7 *



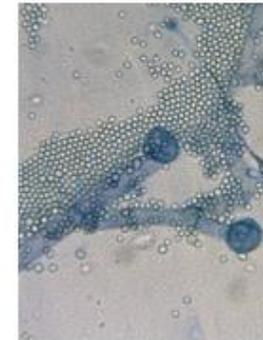
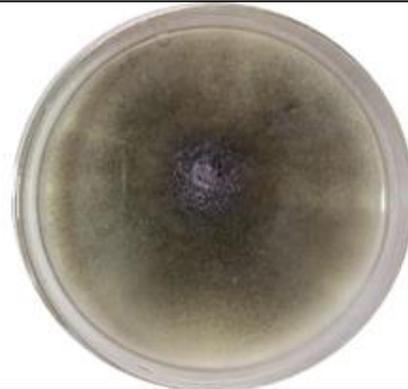
21



P61-H17-C10

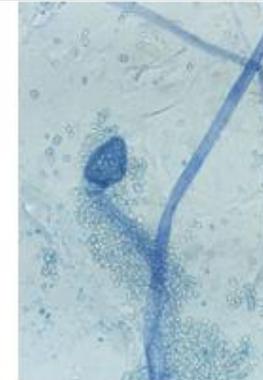
P89-H31-C3

22



P89-H32-C10

23



P93-H37-C2*



Resultados y discusión

Tabla 4

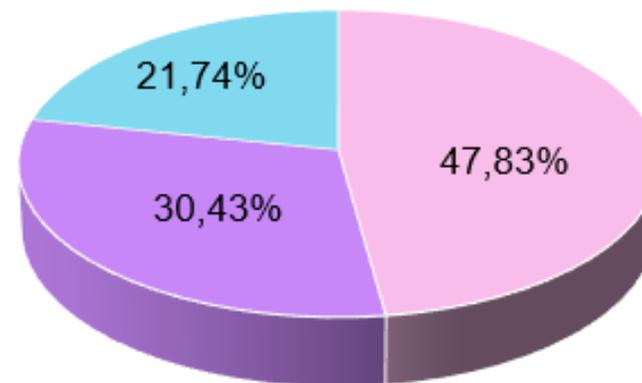
Agrupación de hongos por morfoespecie

| Orden | Concentración (µg/mL) | Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀) | Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₃₀) |
|-------|-----------------------|--|--|
| 1 | 293,2 | 2,0 ⁺⁺ | 1,3 |
| 2 | 335,6 | 1,4 | 0,9 |
| 3 | 273,0 | 1,9 ⁺⁺ | 1,1 |
| 4 | 186,0 | 1,7 ⁺ | 0,9 |
| 5 | 329,8 | 1,5 | 0,9 |
| 6 | 95,0 | 1,6 ⁺ | 0,6 |
| 7 | 143,0 | 1,7 ⁺ | 0,6 |
| 8 | 135,8 | 1,9 ⁺⁺ | 0,8 |
| 9 | 257,2 | 2,0 ⁺⁺ | 1,1 |
| 10 | 120,2 | 1,7 ⁺ | 0,8 |
| 11 | 178,4 | 1,8 ⁺⁺ | 0,8 |
| 12 | 326,8 | 1,7 ⁺ | 1,0 |
| 13 | 318,4 | 1,5 | 0,9 |
| 14 | 146,2 | 1,7 ⁺ | 0,8 |
| 15 | 321,0 | 1,9 ⁺⁺ | 1,1 |
| 16 | 156,4 | 1,8 ⁺⁺ | 0,8 |
| 17 | 248,2 | 1,9 ⁺⁺ | 1,0 |
| 18 | 234,8 | 2,1 ⁺⁺ | 1,2 |
| 19 | 198,4 | 1,7 ⁺ | 0,8 |
| 20 | 336,0 | 1,4 | 0,9 |
| 21 | 89,6 | 2,0 ⁺⁺ | 0,8 |
| 22 | 351,0 | 1,5 | 0,9 |
| 23 | 260,0 | 2,0 ⁺⁺ | 1,1 |

23 hongos representativos seleccionados para identificación molecular

Concentración promedio de 231,9 ± 86,52.

A260 / A280



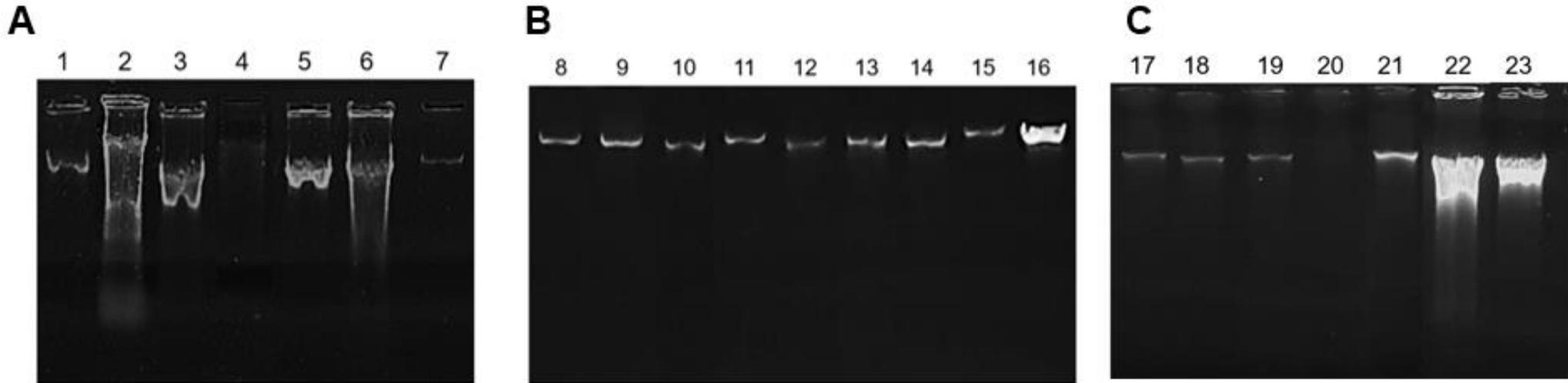
- Pureza óptima
- Pureza aceptable
- Comp. Aromáticos

A260 / A230

100% altamente contaminado por compuestos orgánicos como sales y carbohidratos

Nota. pureza óptima, ++, [1,8 – 2,1] y pureza aceptable, +, [1,6 – 1,7].

Figura 1
Evaluación de integridad de ADN



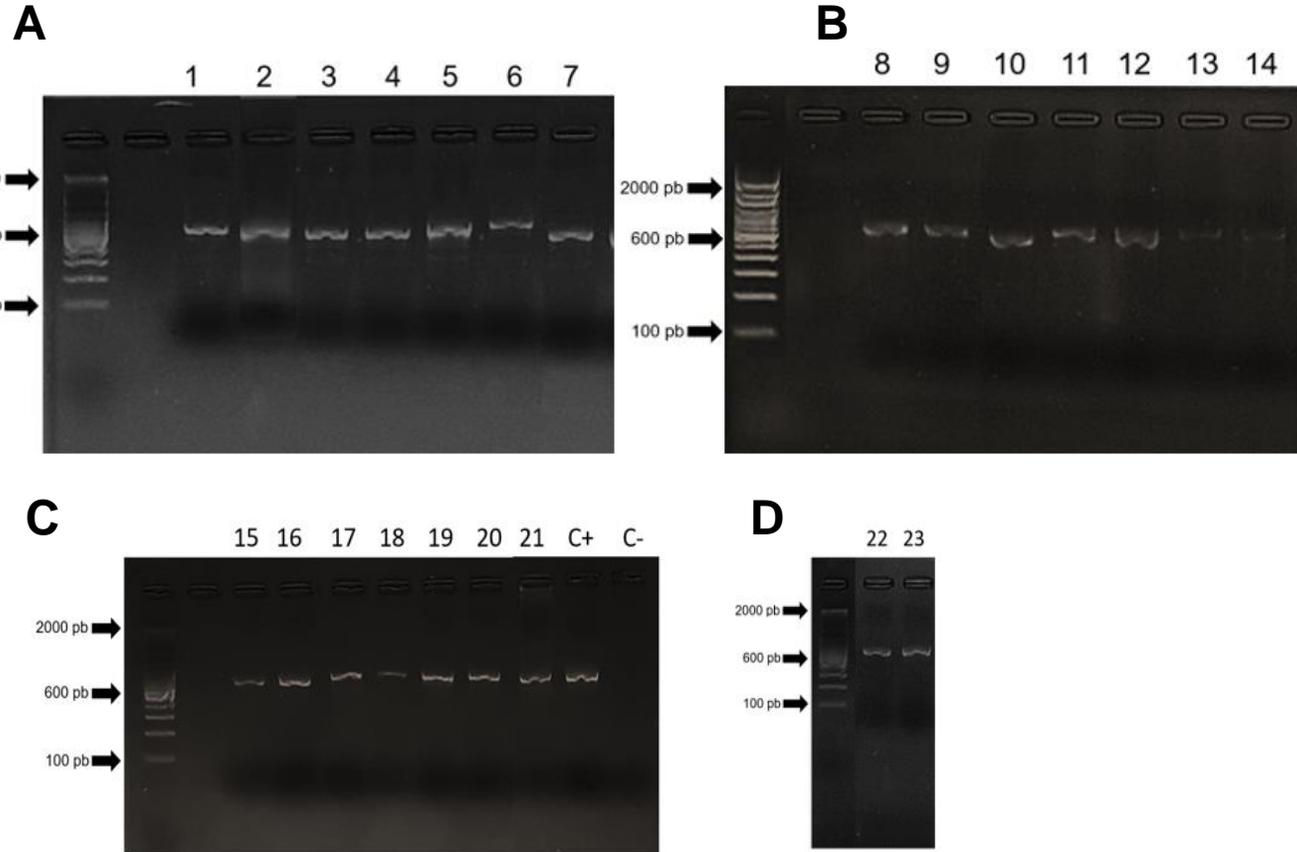
Nota. Carril 1,8,9: *Clonostachys rosea*; Carril 2: *Mucor moelleri*; Carril 3: *Fusarium culmorum*; Carril 4,7: *Fusarium equiseti*; Carril 5: *Linnemannia elongata*; Carril 6: *Fusarium sp.*; Carril 10: *Clonostachys solani*; Carril 11,16: *Trichoderma koningiopsis*; Carril 12,13,15,17: *Trichoderma asperellum*; Carril 14: *Trichoderma sp.*; Carril 18: *Epicoccum nigrum*; Carril 19: *Mucor griseocyanus*; Carril 20: *Mucor irregularis*; Carril 21: *Fusarium oxysporum*; Carril 22: *Mucor janssenii*; Carril 23: *Mucor hiemalis*

65,22% integridad alta
13,04% integridad adecuada
13,04% degradación parcial
8.70% presencia tenue de banda

Resultados y discusión

Identificación molecular de hongos

Figura 2
Amplificación de la región ITS



60,87% bandas definidas y 39,13% bandas inespecíficas

Tabla 5
Productos de PCR mediante la amplificación de la región ITS

| Orden del hongo representativo | Producto de PCR (pb) | Observación |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 539 | Presencia de banda inespecífica |
| 2 | 609 | Presencia de banda inespecífica |
| 3 | 531 | Presencia de banda inespecífica |
| 4 | 524 | Presencia de banda inespecífica |
| 5 | 610 | Presencia de banda inespecífica |
| 6 | 523 | Presencia de banda inespecífica |
| 7 | 536 | Presencia de banda inespecífica |
| 8 | 543 | Presencia de banda definida |
| 9 | 541 | Presencia de banda definida |
| 10 | 543 | Presencia de banda definida |
| 11 | 577 | Presencia de banda definida |
| 12 | 576 | Presencia de banda definida |
| 13 | 594 | Presencia de banda definida |
| 14 | 589 | Presencia de banda definida |
| 15 | 577 | Presencia de banda definida |
| 16 | 571 | Presencia de banda definida |
| 17 | 571 | Presencia de banda definida |
| 18 | 603 | Presencia de banda definida |
| 19 | 605 | Presencia de banda definida |
| 20 | 601 | Presencia de banda definida |
| 21 | 547 | Presencia de banda definida |
| 22 | 600 | Presencia de bandas inespecíficas |
| 23 | 539 | Presencia de bandas inespecíficas |

Nota. Carril 1,8,9: *Clonostachys rosea*; Carril 2: *Mucor moelleri*; Carril 3: *Fusarium culmorum*; Carril 4,7: *Fusarium equiseti*; Carril 5: *Linnemannia elongata*; Carril 6: *Fusarium sp.*; Carril 10: *Clonostachys solani*; Carril 11,16: *Trichoderma koningiopsis*; Carril 12,13,15,17: *Trichoderma asperellum*; Carril 14: *Trichoderma sp.*; Carril 18: *Epicoccum nigrum*; Carril 19: *Mucor griseocyanus*; Carril 20: *Mucor irregularis*; Carril 21: *Fusarium oxysporum*; Carril 22: *Mucor janssenii*; Carril 23: *Mucor hiemalis*

Resultados y discusión

Tabla 6

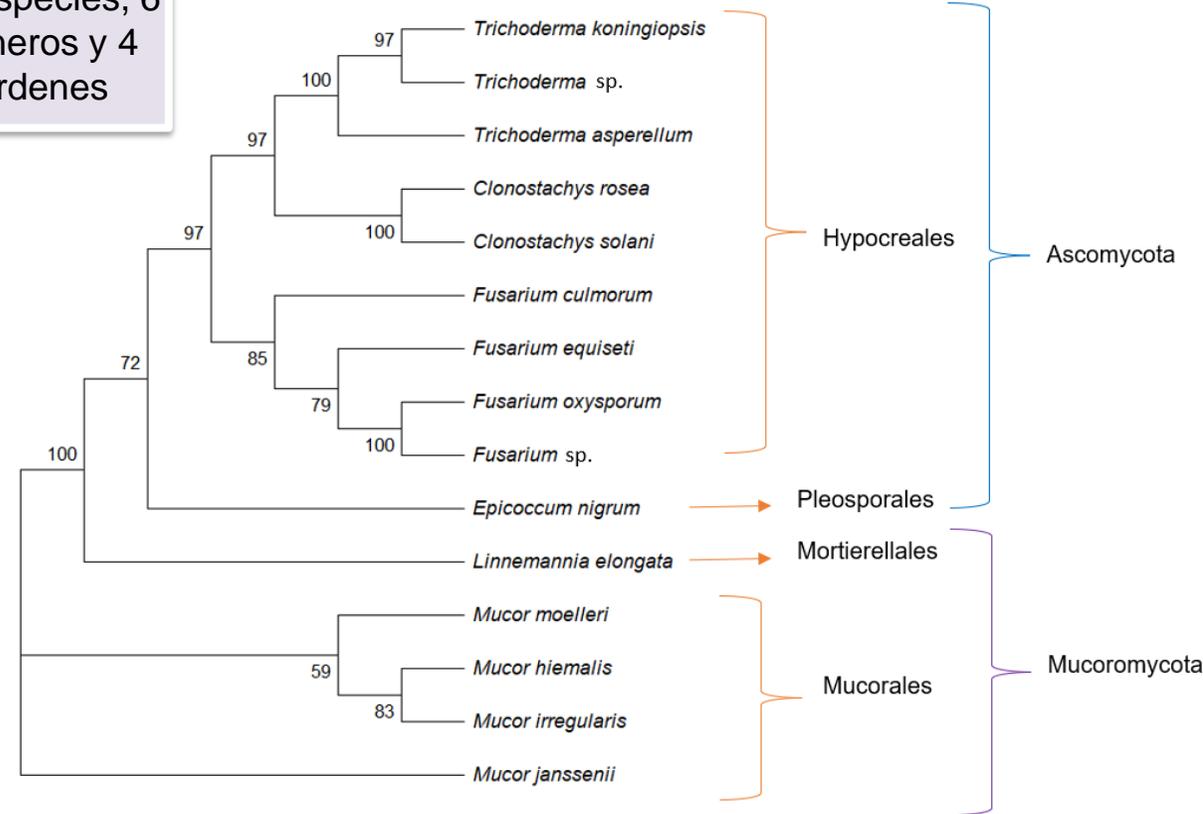
Microorganismos identificados mediante secuencia de la región ITS

| Muestra | Longitud (pb) | Organismo | % Identidad | N° Accesoión |
|---------|---------------|---------------------------------|-------------|----------------------------|
| 1 | 539 | <i>Clonostachys rosea</i> | 100,00% | MK752439.1 |
| 2 | 609 | <i>Mucor moelleri</i> | 99,67% | OP346778.1 |
| 3 | 525 | <i>Fusarium culmorum</i> | 100,00% | MH681154.1 |
| 4 | 532 | <i>Fusarium equiseti</i> | 100,00% | OR911525.1 |
| 5 | 610 | <i>Linnemannia elongata</i> | 99,84% | MT365987.1 |
| 6 | 523 | <i>Fusarium sp.</i> | 99,81% | MH862657.1 |
| 7 | 536 | <i>Fusarium equiseti</i> | 100% | MK780235.1 |
| 8 | 543 | <i>Clonostachys rosea</i> | 99,81% | MT945204.1 |
| 9 | 541 | <i>Clonostachys rosea</i> | 99,81% | MT945204.1 |
| 10 | 543 | <i>Clonostachys solani</i> | 99,82% | MH855181.1 |
| 11 | 577 | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | 100% | MN856356.1 |
| 12 | 576 | <i>Trichoderma asperellum</i> | 100% | MT133310.1 |
| 13 | 594 | <i>Trichoderma asperellum</i> | 99,83% | MK841027.1 |
| 14 | 589 | <i>Trichoderma sp.</i> | 100% | MK871236.1 |
| 15 | 577 | <i>Trichoderma asperellum</i> | 100% | MH892840.1 |
| 16 | 573 | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | 99,83% | MT111912.1 |
| 17 | 571 | <i>Trichoderma asperellum</i> | 100% | MK841003.1 |
| 18 | 522 | <i>Epicoccum nigrum</i> | 100% | MT582797.1 |
| 19 | 605 | <i>Mucor griseocyanus</i> | 99,67% | MH857592.1 |
| 20 | 601 | <i>Mucor irregularis</i> | 96,38% | ON209714.1 |
| 21 | 547 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 100% | MN856310.1 |
| 22 | 600 | <i>Mucor janssenii</i> | 99,67% | MH855051.1 |
| 23 | 608 | <i>Mucor hiemalis</i> | 99,35% | LC413619.1 |

16 especies, 6 géneros y 4 órdenes

Figura 3

Árbol filogenético de las secuencias ITS identificadas



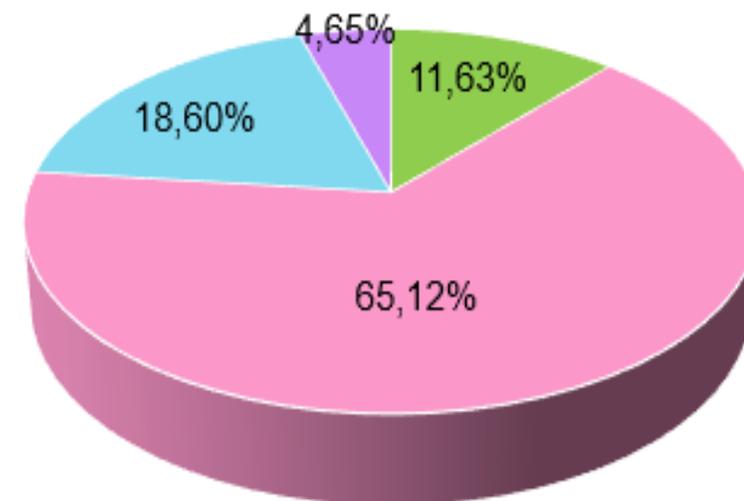
Nota. Historia evolutiva analizada por el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura Nei con Bootstrap de 1000 réplicas.

Resultados y discusión

Tabla 7

Abundancia y clasificación de especies de hongos filamentosos

| Especie | N° Individuo | Abundancia relativa (pi) | Categoría |
|---------------------------------|--------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Clonostachys rosea</i> | 3 | 0,0698 | Antagonista |
| <i>Clonostachys solani</i> | 1 | 0,0233 | Saprófito |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | 1 | 0,0233 | Antagonista |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 3 | 0,0698 | Fitopatógeno |
| <i>Fusarium equiseti</i> | 2 | 0,0465 | Fitopatógeno |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 2 | 0,0465 | Fitopatógeno |
| <i>Fusarium sp.</i> | 1 | 0,0233 | Fitopatógeno |
| <i>Linnemannia elongata</i> | 2 | 0,0465 | Saprófito |
| <i>Mucor griseocyanus</i> | 1 | 0,0233 | Patógeno oportunista |
| <i>Mucor hiemalis</i> | 1 | 0,0233 | Saprófito |
| <i>Mucor irregularis</i> | 1 | 0,0233 | Patógeno oportunista |
| <i>Mucor janssenii</i> | 1 | 0,0233 | Saprófito |
| <i>Mucor moelleri</i> | 2 | 0,0465 | Antagonista |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | 18 | 0,4186 | Antagonista |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i> | 2 | 0,0465 | Antagonista |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 2 | 0,0465 | Antagonista |



- saprófitos
- antagonistas
- fitopatógenos
- patógenos oportunistas



Resultados y discusión

Evaluación de diversidad

Tabla 8

Índices de diversidad de hongos filamentosos

| Medidores de diversidad | | Valor |
|-------------------------|-----------------------|-------|
| Abundancia | (N) | 43 |
| Riqueza esperada | (S) | 23 |
| Índice de Margalef | (D _{Mg}) | 5,85 |
| Shannon- Wiener | (H') | 2,21 |
| Dominancia de Simpson | (D) | 0,20 |
| Diversidad de Simpson | (D') | 0,80 |
| Equidad de Pielou | (J') | 0,70 |
| Chao1 | (S _{Chao1}) | 27 |

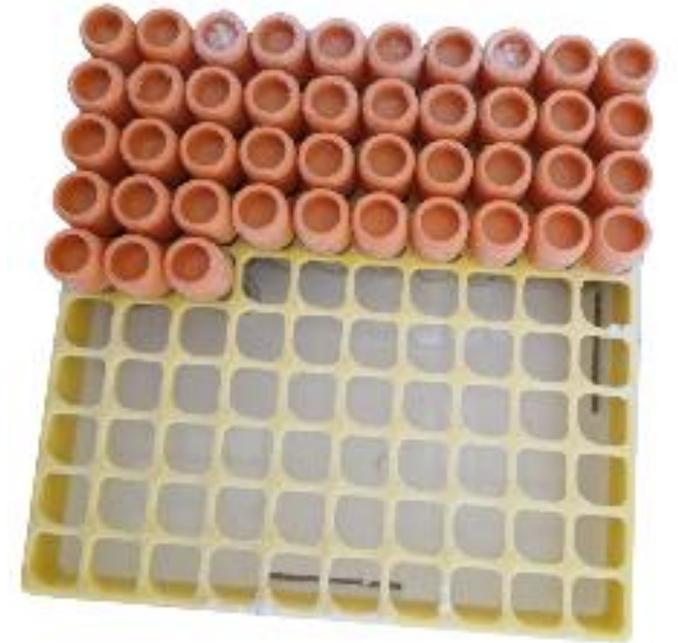
- Alta diversidad (DMg = 5,85, D' = 0,80)
- Ausencia de especies dominantes, homogeneidad entre especies (D = 0,20 J' = 0,70; H' = 2,21)

- Estimador no paramétrico Chao1 con un valor de especies esperadas de 27 y una proporción de F de 43,8%.

Resultados y discusión

Cepario

Crioconservación de 23 especies de hongos filamentosos



Discos de agar colonizados

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

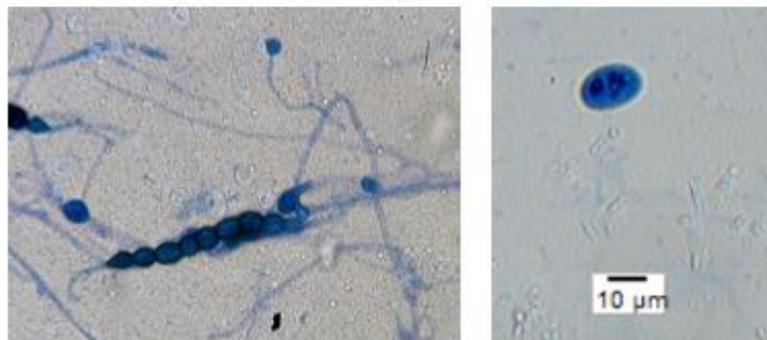
| | | | |
|-------------------------|--|--------------------------------------|------------------|
| Fecha: 05 de marzo 2024 | | Especie: <i>Linnemannia elongata</i> | |
| Orden | 5 | Código | P72-H22-C9 |
| Tiempo | 7 días | | |
| Anverso |  | Color anverso | Centro: amarillo |
| | | | Medio: blanco |
| | | | Anillo: - |
| | | | Borde: blanco |
| Textura | Algodonosa | X | |
| | Polvosa | | |
| Aspecto | Irregular | X | |
| | Radiado | | |
| Reverso |  | Altura del micelio | Alto |
| | | | Medio |
| | | | Bajo |
| | | | Irregular |
| Tipo de crecimiento | Denso | X | |
| | Regular | | |
| | Tenue | | |
| Color de esporulación: | | - | |
| Semanas después |  | Color reverso | Centro: naranja |
| | | | Medio: crema |
| | | | Borde: crema |
| | | Exudado | Si |
| Color exudado | Naranja | | |

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

| | | | | | | |
|-------------------------|--|-------------------------------------|------------------|------|----|--|
| Fecha: 05 de marzo 2024 | | Especie: <i>Fusarium equiseti</i> . | | | | |
| Orden | 7 | Código | P9-H2-C3 | | | |
| Tiempo | 7 días | | | | | |
| Anverso |  | Color anverso | Centro: Amarillo | | | |
| | | | Medio: Blanco | | | |
| | | | Anillo: - | | | |
| | | | Borde: Blanco | | | |
| Textura | Algodonosa | X | | | | |
| | Polvosa | | | | | |
| Aspecto | Irregular | X | | | | |
| | Radiado | | | | | |
| Reverso |  | Altura del micelio | Alto | | | |
| | | | Medio | | | |
| | | | Bajo | X | | |
| | | | Irregular | | | |
| Tipo de crecimiento | Denso | | | | | |
| | Regular | X | | | | |
| | Tenue | | | | | |
| Color de esporulación: | | - | | | | |
| Color Reverso | Centro: café | Exudado | Si | X | No | |
| | Medio: amarillo | | Color exudado | café | | |
| | Borde: blanco | | | | | |

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

| | | | |
|-------------------------|---|--------------------------------------|------------|
| Fecha: 05 de marzo 2024 | | Especie: <i>Linnemannia elongata</i> | |
| Orden | 5 | Código | P72-H22-C9 |



| | | | | | |
|---------------|---------------|---|------------------|---------------|--|
| Hifa | Septada | | Espora | Ascosporas | |
| | No Septada | X | | Basidiosporas | |
| | Pseudohifas | | | Conidias | |
| Tamaño espora | 14,4 ± 1,3 µm | | Esporangiosporas | X | |

Clave para Zygomycota

| | | | | | |
|-------------|--|---|-------------|---|---|
| Vesículas | Formadas entre esporangióforo y esporangio | | Esporangios | Con hipótesis | |
| | No formado | X | | Sin apótesis | X |
| Esporangios | Forma de matraz | | | Columela | |
| | Forma globosa | X | | Sin o pobre en columela <i>(Linnemannia)</i> | X |

Clave para especie de *Linnemannia*

| | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---|------------------------|---|---|
| Esporangiosporas | Formadas | X | Esporangióforo | Verticilado, esporas debajo de 2 µm de diámetro | |
| | No Formadas | | | Simpodial, esporas sobre 5 µm de diámetro | X |
| Esporangióforos | Simple | | Clamidospora | Sobre 60 µm de diámetro | |
| | Ramificado | X | | Debajo 25 µm de diámetro | X |
| Esporangióforos | Ramificado sobre la parte media | | Altura esporangióforos | 220-350 µm de largo | |
| | Debajo de la parte media | X | | Debajo de 200 µm de largo <i>L. elongata</i> | X |
| Cantidad Esporangiosporas | 1-3 por esporangio | | | | |
| | numerosos por esporangio | X | | | |

Recomendaciones



Se recomienda el uso de la línea base establecida en la presente investigación, con el fin de diseñar estrategias de biorrestauración y control biológico.

Se recomienda emplear la amplificación de marcadores de códigos de barras secundarios β -Tubulina y factor de elongación 1α en casos donde la amplificación de la región ITS delimita la identificación de ciertos hongos.



Se recomienda la aplicación de técnicas más sensibles como secuenciación de siguiente generación (NGS), para la identificación de especies fúngicas no cultivables en condiciones *in vitro* o de difícil recolección.





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración.

**Laboratorio de Agrobiotecnología
Laboratorio de Microbiología
Hacienda “El Prado” - IASA I
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**

Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz
Ing. Ariana Michelle Drouet
Ing. Gabriela Morales
Dr. Carlos Chiriboga

A mis padres, familia, pareja y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA