



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

Terán Gutiérrez, José Gabriel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo

Dr. Rueda Ortiz, Darwin Arturo

5 de marzo de 2024

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Plagiarism and AI Content Detection Report

José_Gabriel_Terán_Proyecto UIC_A.d...

Scan details

Scan time:
March 5th, 2024 at 18:16 UTC

Total Pages:
79

Total Words:
19682

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.3%	67
Minor Changes	0.1%	26
Paraphrased	1%	187
Omitted Words	36.5%	7181

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	12501

[Learn more](#)



Firmado electrónicamente por:
DARWIN ARTURO RUEDA
ORTIZ

Dr. Rueda Ortiz, Darwin Arturo

Director del proyecto de integración curricular



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración”**, fue realizado por el señor **Terán Gutiérrez, José Gabriel**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de marzo de 2024



Firmado electrónicamente por:
**DARWIN ARTURO RUEDA
ORTIZ**

.....
Dr. Rueda Ortiz, Darwin Arturo

C.C.: 0400688727



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Terán Gutiérrez, José Gabriel**, con cédula de ciudadanía n° 0402105266, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 5 de marzo de 2024



Firmado electrónicamente por:
JOSE GABRIEL TERAN
GUTIERREZ

Terán Gutiérrez, José Gabriel

C.C.: 0402105266



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Terán Gutiérrez, José Gabriel**, con cédula de ciudadanía n° 0402105266, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Título: “Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 5 de marzo de 2024



Firmado electrónicamente por:
**JOSE GABRIEL TERAN
GUTIERREZ**

Terán Gutiérrez, José Gabriel

C.C.: 0402105266

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado con todo el amor, a mis padres, Patricio y Cristina, quienes me han brindado su apoyo incondicional durante toda mi formación académica y me guiaron en el camino de la perseverancia, disciplina y responsabilidad.

A mis hermanas, María Belén y Abigail, por ofrecerme su cariño durante cada etapa de mi vida.

A mis abuelitas, Hilda y Mariana, por enseñarme la importancia de enfrentar con humildad y amor cada dificultad presentada en el camino.

A toda mi familia, quienes han aportado valiosas enseñanzas y han confiado en mí para cumplir mis objetivos.

A mis amigos, que me han acompañado en buenos y malos momentos, por darme fortaleza para seguir adelante.

José Gabriel Terán Gutiérrez

Agradecimiento

En primer lugar, extiendo mi sincero agradecimiento al Dr. Darwin Rueda por otorgarme la posibilidad de trabajar en este proyecto de investigación, por los conocimientos impartidos, su colaboración y la confianza depositada en todo el desarrollo del estudio. De igual forma, agradecer a la Ing. Ariana Drouet, por su apoyo, enseñanza y asesoramiento tanto en el trabajo práctico como teórico.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", a los docentes del Departamento de Ciencias de la Vida y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por la formación académica ofrecida.

A mi familia, por todo el constante apoyo manifestado en todo el proceso y sentirme motivado para desarrollo de esta investigación.

A mi primo, Andrés, por ayudarme, aconsejarme y animarme en los buenos y malos momentos.

A la familia Ramírez Pazmiño, por acogerme en su hogar durante los meses de desarrollo de este proyecto.

A mis amigos, Mishell, Dustin, Uwe, Nadin, Melany, Lisette, Sebastian y Kevin, por su amistad sincera durante mi vida universitaria.

A mis compañeras, Laura y Romina, por la conformación de un grupo cooperativo de trabajo y ayuda en este estudio.

Y a todos aquellos que contribuyeron en mayor o menor medida a cumplir este objetivo, estaré por siempre agradecido.

José Gabriel Terán Gutiérrez

Índice de contenidos

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos ...	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Capítulo I.....	15
Antecedentes.....	15
Justificación	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Capítulo II.....	18
Revisión de Literatura.....	18
Hacienda el Prado – IASA I.....	18
Generalidades de los hongos	18
Clasificación general	19
Hongos en los suelos	21
Aislamiento de hongos filamentosos	22
Extracción de ADN de hongos.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23

Secuenciación Sanger.....	24
Identificación de hongos filamentosos	24
Métodos de conservación de hongos filamentosos	26
Índices de abundancia y diversidad biológica	27
Estimador no paramétrico de riqueza de Chao.....	29
Análisis filogenético y métodos inferencia filogenética.....	30
Capítulo III.....	31
Materiales y Métodos.....	31
Muestreo	31
Práctica experimental.....	33
Preparación de medios de cultivo.....	33
Aislamiento de hongos filamentosos	33
Caracterización macro y microscópica	35
Extracción de ADN	35
Cuantificación y estimación de pureza de ADN por espectrofotometría.....	37
Evaluación de integridad de ADN por electroforesis en agarosa	37
Amplificación de la región ITS por PCR convencional	38
Secuenciación del fragmento amplificado.....	40
Análisis bioinformático.....	40
Análisis de biodiversidad	41
Análisis filogenético.....	42
Crioconservación.....	42
Cepario.....	43
Capítulo IV	44
Resultados.....	44

Identificación morfológica y molecular de las cepas de hongos filamentosos recolectados en los suelos del sector de avicultura.....	44
Evaluación de la biodiversidad presente en el suelo.....	60
Capítulo V	66
Discusión	66
Capítulo VI	72
Conclusiones	72
Recomendaciones	73
Bibliografía.....	74
Apéndices	98

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Guía de denominación de colores de crecimiento fúngico en los granos de arroz</i>	34
Tabla 2 <i>Primers para amplificación de regiones de ADNr fúngico</i>	38
Tabla 3 <i>Ajuste del master mix de reacción para un volumen final de 25 µL</i>	39
Tabla 4 <i>Condiciones del programa de termociclador para amplificación de la región ITS por PCR</i>	39
Tabla 5 <i>Descripción de aislamientos obtenidos en las subparcelas muestreadas</i>	44
Tabla 6 <i>Morfología macroscópica y microscópica de aislamientos de hongos filamentosos presentes en el suelo del sector de avicultura de la Hacienda “El Prado” – IASA I</i>	48
Tabla 7 <i>Resultados de estimación de pureza y cuantificación de ADN por espectrofotometría</i> 55	
Tabla 8 <i>Hongos filamentosos identificados mediante búsqueda en BLAST del ensamblaje de lecturas del fragmento de la región ITS</i>	59
Tabla 9 <i>Abundancia de especies de hongos filamentosos identificados</i>	61
Tabla 10 <i>Resultados de la evaluación de biodiversidad de hongos filamentosos presente en el suelo</i>	64

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Árbol filogenético del reino Fungi</i>	20
Figura 2 <i>Descripción esquemática de la región ITS de hongos</i>	26
Figura 3 <i>Esquema de vista satelital ubicación geográfica del sector de avicultura de la Hacienda el Prado - IASA I dividido en subparcelas</i>	32
Figura 4 <i>Alineamiento de secuencia forward y reverse del fragmento de la región ITS y limpieza de extremos(Valdez et al., 2018)</i>	41
Figura 5 <i>Evaluación de integridad de ADN genómico por electroforesis de material genético extraído de aislados de hongos filamentosos</i>	56
Figura 6 <i>Amplificación de la región ITS a partir de ADN genómico de aislamientos de hongos filamentosos</i>	57
Figura 7 <i>Árbol filogenético de especies identificadas de hongos filamentosos del suelo del sector de Avicultura de la hacienda “El Prado” – IASA I</i>	65

Resumen

Los hongos filamentosos desempeñan un papel esencial en el funcionamiento de los ecosistemas del planeta, de los que se destaca su rol como patógenos, descomponedores o mutualistas. Sin embargo, el equilibrio ecológico se ha visto afectado por actividades como el monocultivo, compactación de suelos y uso extendido de fertilizantes químicos. En el presente estudio se desarrolló la caracterización morfológica e identificación molecular de hongos filamentosos presentes en el suelo del sector de avicultura de la Hacienda “El Prado” IASA – I. El aislamiento de las cepas se realizó mediante la captura con trampas microbianas con arroz como sustrato. Se purificaron las cepas empleando medio de cultivo PDA y se identificaron mediante claves taxonómicas de acuerdo con sus estructuras microscópicas. La identificación molecular empleó extracción convencional de ADN genómico con CTAB, amplificación de la región ITS por PCR convencional y secuenciación Sanger. Se obtuvieron 51 aislamientos puros agrupados en 24 morfoespecies, de las cuales 20 se identificó a nivel de especie y 4 a nivel de género, distribuidos en 9 géneros y 7 órdenes. Los géneros con más especies identificadas fueron *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma*. La evaluación de la biodiversidad del suelo mostró que el sector de avicultura presenta una alta biodiversidad ($D_{mg} = 5.85$, $H' = 3.03$), y homogeneidad de abundancia entre especies de hongos filamentosos ($D = 0.055$, $D' = 0.945$ y $J' = 0.954$). El estimador no paramétrico de riqueza Chao 1 (29 especies) y la proporción de singletons y doubletons (70.8%), indican que la técnica de recolección tiene limitaciones para la captura de especies poco frecuentes. Se estableció el cepario morfo-molecular a partir de aislados criopreservados en discos de agar colonizados con solución protectante de glicerol (10%) y peptona (0.1%). Se clasificaron los aislamientos puros en antagonistas (41.18%), fitopatógenos (35.29%), patógenos oportunistas de animales (3.92%) y saprófitos (19.61%).

Palabras clave: Hongos filamentosos, identificación molecular, criopreservación, espaciador transcrito interno.

Abstract

Filamentous fungi play an essential role in the functioning of the planet's ecosystems, particularly their role as pathogens, decomposers or mutualists. However, the ecological balance has been affected by activities such as monoculture, soil compaction and the widespread use of chemical fertilizers. In this study, we carried out morphological characterization and molecular identification of filamentous fungi present in the soil of the poultry sector of the Hacienda "El Prado" IASA - I. The isolation of the strains was done by capturing microorganisms with microbial traps with semi-cooked rice as a substrate. The strains were purified using PDA culture medium and identified by taxonomic keys according to their microscopic structures. Molecular identification employed conventional genomic DNA extraction with CTAB, amplification of the ITS region by conventional PCR and Sanger sequencing. We obtained 51 pure isolates grouped into 24 morphospecies, of which 20 were identified to species level and 4 to genus level, distributed in 9 genera and 7 orders. The genera with the most species identified were *Fusarium*, *Mucor* and *Trichoderma*. The evaluation of soil biodiversity showed that the poultry sector presents high biodiversity ($D_{mg} = 5.85$, $H' = 3.03$), and homogeneity of abundance among species of filamentous fungi ($D = 0.055$, $D' = 0.945$ and $J' = 0.954$). The non-parametric Chao 1 richness estimator (29 species) and the proportion of singletons and doubletons (70.8%) indicate that the collection technique has limitations for the capture of rare species. The morpho-molecular strain was established from isolates cryopreserved on agar discs colonized with protective solution of glycerol (10%) and peptone (0.1%). Pure isolates were classified into antagonists (41.18%), phytopathogens (35.29%), opportunistic animal pathogens (3.92%) and saprophytes (19.61%).

Key words: Filamentous fungi, molecular identification, cryopreservation, internal transcribed spacer.

Capítulo I

Antecedentes

El uso de hongos en Ecuador se remonta al conocimiento ancestral de los pueblos y nacionalidades indígenas nativos incidiendo activamente en su salud, dieta, visión del mundo y su relación con la naturaleza (González-Rivadeneira et al., 2018; Zent & Zent, 2012). En el siglo XX, se inició el estudio de hongos microscópicos en el país con la contribución de Hans Sydow (1939), cuyas muestras se describieron como especies nuevas entre ascomicetos y hongos imperfectos. Más adelante, Harry Evans en 1973 realizó colecciones de hongos fitopatógenos y entomopatógenos, a partir de muestras de la región amazónica y las islas Galápagos (Læssøe & Petersen, 2011). Ya en la última década, en el contexto nacional, el estudio de la biodiversidad de hongos filamentosos del suelo se ha acelerado, considerando diferentes perspectivas y metodologías de muestreo, características macro y microscópicas; así como también, caracterización molecular con amplificación de regiones de ADN o metagenómica. El objetivo ha sido generar las bases para su aplicabilidad en diversas áreas, registrado la diversidad fúngica terrestre en las provincias de Guayas (Carreño Bulgarin & Quijije Franco, 2021), Azuay (Ávila Minga & Quito Arias, 2019; Delgado et al., 2021; Ortiz Paucay, 2016), Chimborazo (Sandoval et al., 2020), Cañar (Valdez & Covarrubias, 2021), entre otras (Amancha, 2023; Medina et al., 2019; Vandegrift et al., 2023).

En la literatura también se presentan trabajos de investigación enfocados a la diversidad de hongos rizosféricos de especies arbóreas (Chiriboga, 2023; Quinsasamín, 2019; Remache, 2020), a cepas de especies entomopatógenas como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (García et al., 2011), *Cordyceps* spp. y *Paecilomyces* sp. (Ortiz Villacís, 2021) y a hongos fitopatógenos como *Botrytis* spp. (Soria Guerra, 2015; Tomalo Guanoluisa, 2015), *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. (Avilés Guzmán & Granja Valle, 2014), *Colletotrichum* spp. (Jacome Garrido, 2023), entre otros ejemplos.

Justificación

La biodiversidad de los hongos se ve afectada tanto por factores bióticos, donde incide la presencia del tipo de especies de cubierta vegetal y la interacción con otros microorganismos (Fraç et al., 2018); así como de factores abióticos, incluyendo la cantidad de materia orgánica soluble, pH, presencia de contaminantes, sales, la porosidad y densidad aparente (Doula & Sarris, 2016). Sin embargo, dicho equilibrio ecológico se ha visto comprometido por el uso inadecuado de suelo de las actividades antropogénicas como el monocultivo, compactación de suelos y uso ampliamente extendido de fertilizantes químicos, provocando que el suelo se degrade continuamente (Costa et al., 2012; Schneider et al., 2010).

Actualmente, existe una brecha de conocimiento acerca de la biodiversidad de hongos filamentosos, prevalente en los sectores de la Hacienda “El Prado” – IASA I, puesto que se trata de un centro integral de formación superior agropecuario, donde se lleva a cabo actividades agrícolas para producción de campo, docencia e investigación (Barahona, 2013; Quito Betancourt, 2008). Es de fundamental importancia conocer la diversidad fúngica con el objetivo de reconocer los patógenos presentes, así como el potencial de la diversidad de los hongos nativos para su empleo en procesos de biorrecuperación, bioremediación y control biológico.

El presente estudio pretende brindar información de la comunidad microbiológica de los hongos presentes en el sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado”; además, guías de identificación morfológica y una línea base como punto de partida para la aplicación de estas especies nativas en proyectos posteriores. Esta propuesta pretende la biorrestauración del suelo y fomentar prácticas sustentables en las actividades agrícolas, incrementando al mismo tiempo su productividad (Magan et al., 2022). El uso de hongos para control de plagas y enfermedades requiere una mejor comprensión de la diversidad e interacción ecológica de comunidades fúngicas, de forma que sean aplicables con fines industriales, agrícolas, energéticos y de gestión ambiental (Singara Charya, 2015). Por ende, es fundamental partir de

datos de referencia de las cepas nativas del suelo en el país, bien caracterizados a nivel morfológico y molecular.

La metodología trampas para la captura de hongos es aplicable en este contexto, puesto presenta resultados favorables para el estudio de la comunidad fúngica en el suelo y microorganismos eficientes (Enriquez Brito & Viera Briones, 2010; Escobar Pardo, 2014; Rueda Moreno & Caiza Sánchez, 2017). Además, se trata de un enfoque de bajo costo que puede ser replicado con facilidad para otros sectores (Cubillos et al., 2014). Por su parte, la caracterización morfológica de las cepas aisladas (Watanabe, 2010), en conjunto con las técnicas moleculares de secuenciación de la región ITS, representan herramientas confiables para la determinación de géneros y especie de los microorganismos (Schoch et al., 2012). Sin embargo, el estudio se limita a las especies cultivables que comprenden menos del 2% de microorganismos del suelo (A.Ali et al., 2018; Hofer, 2018; Wade, 2002), por lo cual se considera que sigue siendo una aproximación de la biodiversidad fúngica real del sector.

Hipótesis

H₀: No existe diferencia significativa entre la riqueza de especies de hongos filamentosos observada y la riqueza esperada según el estimador no paramétrico Chao 1.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente los hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura 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 Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I.
- Evaluar la biodiversidad presente en el suelo en base a las especies registradas.
- Establecer un cepario de microorganismos con potencial benéfico.

Capítulo II

Revisión de Literatura

Hacienda el Prado – IASA I

La Hacienda el Prado se encuentra ubicada en el cantón Rumiñahui en provincia de Pichincha. Cuenta con una extensión de 554.66 hectáreas que corresponden a instalaciones académicas y productivas enfocadas al área agropecuaria (Barahona, 2013). Este territorio está ubicado a 2748 msnm , posee un clima húmedo temperado y corresponde a la zona de vida de bosque húmedo, piso altitudinal de bosque montano bajo, entre los pisos zoogeográficos temperado y alto-andino (Arce Carriel, 2009; Pachacama Méndez, 2010; Pozo Cueva, 2010). Presenta temperaturas entre 11° a 22°C, periodo precipitaciones de octubre a mayo, mostrando aumentos en los meses de marzo-abril y noviembre-diciembre, registrando precipitación de 1332,72 mm/año y humedad relativa de 73,5% (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología [INAMHI], 2017; Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Rumiñahui, 2021). Los suelos presentan una textura franco-arcillosa a franca arcillo-limosa o arcillo-arenosa, pH ácido a ligeramente ácido, así como contenido materia orgánica y buen drenaje (Luna Ludeña, 2012).

Generalidades de los hongos

Los hongos representan uno de los grupos de organismos vivos más diversos en el planeta, estimaciones del número de especies con el uso enfoques filogenéticos y estadísticos sugieren que existen alrededor de 2.2 a 3.8 millones de especies de hongos (Hawksworth & Lücking, 2017), sin embargo, en la actualidad solo se han descrito cerca de 173 660 especies dentro de este reino (GBIF-Secretariat, 2023). Estos organismos eucariotas desempeñan un papel esencial en el funcionamiento de los ecosistemas. El nicho ecológico de estos

organismos comprende funciones como patógenos, descomponedores o mutualistas, lo que ha contribuido en la evolución, productividad y sostenibilidad de la vida en la tierra (Boddy, 2016).

El reino Fungi representa una gran diversidad de organismos, sin embargo, de forma general se caracterizan por ser eucariotas quimioheterótrofos, con nutrición mediante absorción, reproducción sexual o asexual, aclorófilos y pared celular conformada mayoritariamente por quitina o celulosa (Webster & Weber, 2007).

La reproducción se da a partir de esporas unicelulares o pluricelulares, móviles o inmóviles, asexuales o sexuales. En su mayoría estos organismos son descritos como filamentosos con crecimiento apical, de forma que acceden a fuentes de alimento mediante el desarrollo de estructuras vegetativas a manera de tubos ramificados denominados hifas, que colectivamente forman una red interconectada denominada micelio (Webster & Weber, 2007).

No todas las especies de hongos desarrollan hifas, algunas crecen como células individuales como es el caso de quitridios unicelulares y levaduras, generalmente son comunes cuando no se requiere infiltración eficiente al sustrato (Speers & Forbes, 2015). En ocasiones los hongos presentan desarrollo dimórfico, alternando entre una forma micelial a una fase de levadura en respuesta a cambio en las condiciones ambientales (Singara Charya, 2015).

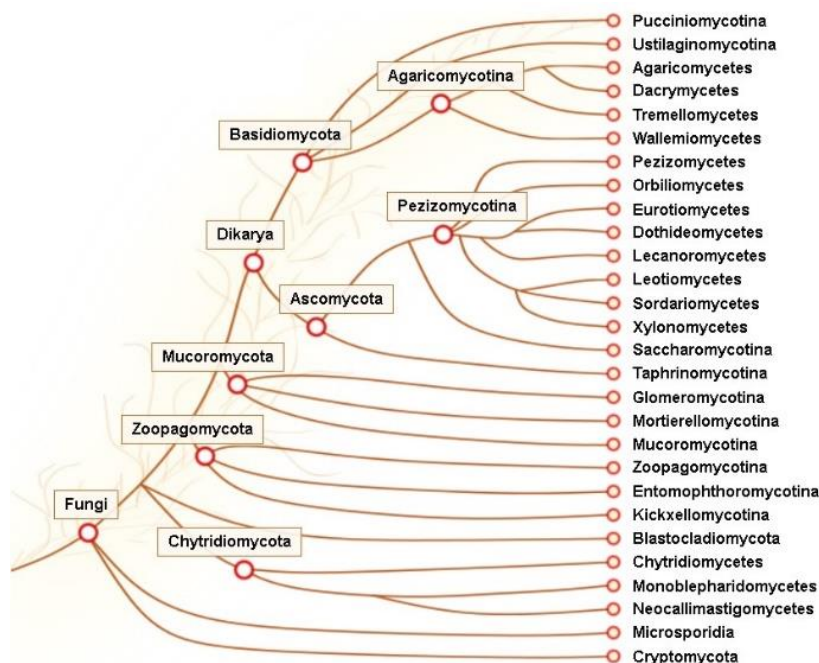
Clasificación general

La clasificación del reino Fungi se basa en 12 filos que abarcan 224 órdenes monofiléticos, que reflejan taxones estables con características identificables, cuya filogenia se puede representar por la presencia de grupos taxonómicos principales como se muestra en la figura 1 (Hibbett et al., 2007; Zhou & May, 2023). De forma general, se puede reconocer seis grupos principales, el primer grupo corresponde al subreino Dikarya, que en términos de diversidad abarca cerca del 97% de las especies descritas, se compone de Ascomycota, Basidiomycota y Entorhizomycota, que se caracterizan por reproducción sexual conocida,

células heterocarióticas y núcleos no fusionados que se dividen de forma conjugada (James et al., 2020).

Figura 1

Árbol filogenético del reino Fungi



Nota. El árbol MycoCosm ilustra las relaciones entre los principales grupos de hongos. Tomado de *MycoCosm, the JGI's Fungal Genome Portal for Comparative Genomic and Multiomics Data Analyses* (pp. 271-291), por S. Ahrendt et al., 2023, *Methods Mol Biol*.

Los hongos con menor diversidad se clasifican en los grupos de Mucoromycota, Zoopagomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota y Opisthosporidios. Además, existen microorganismos filamentosos morfológicamente similares a los hongos correspondientes al filo Oomycota, sin embargo corresponde al reino Protista (McGowan & Fitzpatrick, 2020). Por su parte, los hongos sin una fase sexual registrada se denominan anamórficos o Deuteromicetos mitospóricos (Singara Charya, 2015; Watanabe, 2010), del cual alrededor del 90% de ellos tienen corresponden al filo Ascomycota (Volk, 2013) y en menor proporción al filo Basidiomycota (Sutton, 2014).

Por su parte, la clasificación funcional de hongos de acuerdo con su rol ecológico consta de controladores biológicos, reguladores de ecosistemas y organismos que actúan en la descomposición de la materia orgánica (Gardi & Jeffery, 2009). Los controladores biológicos producen enfermedades, plagas o incluso el crecimiento de otros seres vivos (Bagyaraj & Ashwin, 2017), a diferencia de los reguladores del ecosistema que son responsables de la conformación de la estructura del suelo y modificación del hábitat a través de mecanismos fisiológicos (Fraq et al., 2018).

Hongos en los suelos

Estos organismos eucariotas son de particular interés en el suelo por su capacidad de colonización a partir de sus esporas. La biodiversidad de hongos se concentra generalmente en las capas superficiales del suelo, debido a una disponibilidad de recursos y microclimas favorables para el desarrollo de estos microorganismos (Fraq et al., 2018). La variedad de especies de hongos incide al uso agrícola del suelo que habitan, de manera que afecta tanto a los ciclos y fijación de nutrientes, así como procesos como la fertilidad y productividad (Yang et al., 2022). Sin embargo, ciertas especies de hongos generan pérdidas significativas de cultivos debido a enfermedades fúngicas o deterioro de alimentos, afectando al sector agrícola y a las economías locales (Amza, 2018; Tournas, 2005).

Por otro lado, el potencial de la biodiversidad de los hongos filamentosos es relevante al tener potencial de acelerar procesos de descomposición de materia orgánica, degradación de contaminantes (Magnoli et al., 2023), control biológico, solubilización de minerales y regulación de la salinidad del suelo, de forma que colectivamente se equilibre la microbiota del suelo logrando obtener mejores características para el aprovechamiento agrícola aumentando el rendimiento y la calidad de los cultivos (Díaz-Urbano et al., 2023; Singara Charya, 2015). La diversidad fúngica de los suelos en este contexto no es importante solo por su riqueza, sino

además por una mayor producción de biomasa a comparación de las bacterias presentes en el mismo (Pacasa-Quisbert et al., 2017).

La calidad del suelo puede ser definida como el potencial de mantener productividad animal y vegetal, al igual que mejorar o mantener la calidad de agua y aire. Dicha calidad está condicionada por procesos microbiológicos y su diversidad, de manera que la estructura de la microbiota del suelo sirve como indicador sensible de procesos de degradación de suelo (Pedraza et al., 2010).

Aislamiento de hongos filamentosos

La captura de microorganismos filamentosos del suelo puede realizarse ya sea por diluciones seriadas o trampa microbiana. El método por dilución se realiza suspendiendo una pequeña muestra representativa de suelo en agua destilada estéril para realizar diluciones en serie (10^{-1} a 10^{-5}), para finalmente colocar 1 mL de cada dilución en agar papa dextrosa (PDA) con estreptomycin al 1% (Alsohaili & Bani-Hasan, 2018). Por otro lado, la técnica de trampas extractoras de microorganismos consisten en emplear recipientes con sustrato basado en cereal o leguminosas, comúnmente empleado arroz semicocido y previamente esterilizado, como fuente de carbohidratos donde los hongos son capturados (Escobar Pardo, 2014; Yáñez Yáñez, 2014). Las trampas se ubican a 20 cm de profundidad de la superficie que muestre cobertura vegetal sana, de manera que se coloca hojarasca y se establece un tiempo de dos semanas para la colonización de los microorganismos y crecimiento de micelio, mostrando eficiencia para aislamiento de microorganismos eficientes (Cubillos et al., 2014; Vega Acosta, 2016). A continuación, se examina el crecimiento basándonos en color, forma y estructura morfológica, para colocar una muestra de micelio representativo en medio PDA (Escobar Pardo, 2014).

Los medios de cultivo nutritivos como PDA y extracto de malta favorecen el crecimiento de gran diversidad de hongos, a su vez el tiempo de incubación sugerido es de una semana de

oscuridad a 28°C (Alsohaili & Bani-Hasan, 2018) y la inducción de esporulación con la exposición a luz indirecta (Nevalainen et al., 2014).

Extracción de ADN de hongos

El empleo de ADN para procesos de PCR requiere cantidad y calidad del material genético. En específicos la extracción de ADN en hongos se presenta dificultades para romper la pared celular rígida sin comprometer la integridad de las hebras de ADN, al igual que presenta abundancia polisacáridos y compuestos fenólicos inhibidores (Kumar & Mugunthan, 2018). El protocolo de extracción consta de dos pasos principales que consisten en la ruptura de las paredes, para continuar con el aislamiento y purificación de ADN (Zhang et al., 2010). La lisis celular suele emplear métodos como homogenización con nitrógeno líquido, lisis enzimática o rotura mecánica con perlas de vidrio, seguido de un tratamiento químico con Tritón, Tween 80, CTAB o SDS (Bellemare et al., 2018). Por su parte, el proceso de purificación de ADN implica la eliminación de proteínas contaminantes con fenol o cloroformo, precipitación con alcohol y resuspensión en una solución tamponada (Serna-Domínguez et al., 2018). El uso de kit comerciales se ha extendido ya que proporcionan un entorno libre de sustancias químicas nocivas, menor cantidad de tejido requerido, alta reproducibilidad y facilidad de manejo de múltiples muestras con menor mano de obra. Sin embargo, los altos costos frente a métodos convencionales y el bajo rendimiento limitan el uso (Kumar & Mugunthan, 2018).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica PCR se basa en ciclos de desnaturalización de las hebras de ADN, hibridación de cebadores oligonucleótidos y extensión de la polimerasa, con el objetivo de amplificar una secuencia específica (Ma & Michailides, 2007). Los cebadores únicos para secuencias diana deben cumplir ciertos criterios tales como la longitud en pb, porcentaje de

guanina-citocina, temperatura de hibridación y fusión, estabilidad del extremo 5', especificidad del extremo 3' (Bustin et al., 2020). Los marcadores moleculares apoyados en PCR han permitido su aplicación en el análisis de la diversidad genética, filogenética molecular, gestión de bancos de genes y diagnóstico de especies (Pokharel et al., 2023). Para obtener mejores resultados en cuanto a bandas de amplificación y productos de PCR, es necesario optimizar las condiciones de temperatura de annealing, duración y número de ciclos, para la amplificación eficiente del fragmento de ADN (Siddique et al., 2022).

Secuenciación Sanger

La técnica de secuenciación Sanger o terminación de cadena, emplea trifosfatos de didesoxi ribonucleótidos radiomarcados que carecen del grupo hidroxilo 3' como sustrato, los cuales impiden la formación de un nuevo enlace fosfodiéster, de esta forma, se logra detener la actividad de la polimerasa al momento de la hibridación de un didesoxi nucleótido con la plantilla de ADN (Valencia et al., 2013). En principio se empleaba un gel de poliacrilamida en 4 carriles paralelos para identificar fragmentos con diferente longitud. Más adelante, se realizó modificaciones como la inclusión de tintes fluorescentes para cada didesoxi nucleótido para aumentar la precisión y eficiencia del proceso, culminando en el desarrollo del secuenciador capilar y con ello automatización de la secuenciación (Verma et al., 2017).

Identificación de hongos filamentosos

La identificación de acuerdo con caracteres morfológicos dentro de este reino se basa principalmente en las similitudes en las estructuras reproductivas (Singara Charya, 2015). A partir estas características fenotípicas se ha construido la base de la taxonomía del reino. La determinación del género y en ocasiones de especie, es posible con el uso adecuado de claves taxonómicas presentes en la literatura (Watanabe, 2010), que consideran características del fenotipo microscópico incluyendo la forma de esporas, hifas, ramificaciones y disposición de las

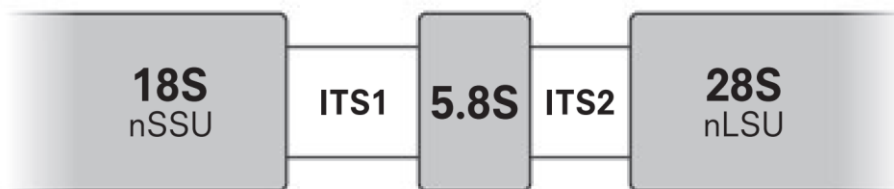
estructuras, de manera sistemática para reducir en cada paso campo de búsqueda de las especies candidatas (Montoya-Castrillón et al., 2021). Sin embargo, la morfología y caracteres fenotípicos resultan inestables, proporcionando información limitada (Zhang et al., 2017). Por ende, la clasificación de los hongos ha considerado métodos fisiológicos, bioquímicos (Guarro et al., 1999) y moleculares ya sea basado en pocos genes (Schoch et al., 2009) o análisis filogenético (Spatafora et al., 2016). Por consiguiente, es un campo de constante desarrollo con el descubrimiento de nuevas especies y ajustes de las ramas del árbol filogenético (Arenas Guzmán, 2014).

Identificación molecular basada en amplificación de ADN. En el contexto de herramientas de biología molecular, el locus ampliamente usado para estudios de relaciones filogenéticas en hongos ha sido los genes del ADN ribosómico (ADNr) y en particular, la región no codificante del espaciador transcrito interno (ITS), debido a su alta tasa de discriminación de especies y géneros, considerándose de esta manera como un código de barras universal, rápido y preciso de identificación a partir de ADN fúngico (Schoch et al., 2012).

En eucariotas existen dos regiones ITS, ITS1 (~180 pb) se encuentra entre los genes ARNr 18S y 5.8S, mientras ITS2 (~170 pb) se ubica entre los genes ARNr 5.8S y 28S (Figura 2), ambas regiones son altamente variables (Nilsson et al., 2010; Sharma et al., 2023). Se cree que la región ITS está implicada en la transcripción de genes ribosomales aguas arriba e influye en la biogénesis ribosómica, sin embargo, se desconocen detalles de su función biológica exacta (Zhang et al., 2021).

Figura 2

Descripción esquemática de la región ITS de hongos



Nota. El gen 5.8S, muy conservado, se encuentra entre los espaciadores ITS1 e ITS2. Tomado de *An open-source chimera checker for the fungal ITS region*, por R. Nilsson et al., 2010, Molecular ecology resources.

El proceso de identificación continúa con la elección de cebadores adecuados para la amplificación de la región mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Schoch et al., 2012), más adelante se realiza la secuenciación del fragmento, cuya secuencia resultante se procesa mediante software bioinformático para la identificación de especies en función de bases de datos biológicas (Sharma et al., 2023).

Métodos de conservación de hongos filamentosos

La preservación tiene como fin evitar en lo posible el deterioro, la pérdida de viabilidad, manteniendo al mismo tiempo las características genéticas hasta el punto de volver a multiplicar la cepa conservada. Este objetivo se logra con la disminución de la actividad metabólica microbiana (Rohadi et al., 2020). De esta manera se pueden emplear diferentes técnicas que se seleccionaran en base a las necesidades de conservación y especie empleada (Nakasone et al., 2004). En el caso de almacenamiento a corto plazo, el subcultivo periódico a medios frescos manteniendo el hongo un crecimiento constante en temperaturas entre 5 a 20 °C. Entre las técnicas de bajo costo de almacenamiento encontramos el aceite mineral, parafina líquida, tierra estéril, agua esterilizada, perlas de porcelana, etc (Al-Bedak et al., 2019). El secado por su parte, es una técnica útil para conservación de esporas u otras estructuras

que entren en periodo de latencia, utilizando como sustrato gel de sílice, perlas de vidrio y tierra, permitiendo conservar hongos viables hasta por 11 años (Moore & Millar, 2020).

Además, existen métodos basados en metabolismos inactivos como la criopreservación y liofilización, manteniendo cepas viables por periodos largos siempre y cuando se mantengan las condiciones de temperatura, puesto que el metabolismo activo normal del hongo genera metabolitos que llegan a ser tóxicas para las células, aumentando así la mortalidad (Rohadi et al., 2020). La liofilización resulta útil en cultivos que presentan mitosporas, cuyo su procedimiento consta de congelación y secado al vacío por debajo de los -135°C . La criopreservación por su parte se fundamenta en el uso de compuestos denominados crioprotectores que protegen a las células frente al daño por la congelación causado por la formación de cristales de hielo (Singh & Baghela, 2017). Los agentes crioprotectores pueden tener acción de forma intracelular o extracelular, manteniendo en ambos casos la resistencia de la membrana plasmática. La concentración de los crioprotectores más usados se constituyen de 10% en volumen de glicerol, 5% de DMSO y de 15 a 20% de sacarosa (Sankha, 2018). En el caso de hongos filamentosos se recomienda utilizar discos de agar en viales estériles para conservación con solución de 10% glicerol y 0,1 % peptona, dejando en refrigeración por 20 minutos y almacenamiento posterior a -80°C , logrando viabilidad de microorganismos hasta 20 años (Rugeles Barandica et al., 2021).

Índices de abundancia y diversidad biológica

La diversidad biológica representa la heterogeneidad diferentes organismos vivos que ocupan y se interrelacionan en un ecosistema, considerando variedad de especies y diversidad genética presente (Andermann et al., 2022). La biodiversidad fúngica del suelo puede evaluarse considerando su composición, y estructura de la comunidad incluyendo tanto riqueza y abundancia.

Abundancia. Indica el número de individuos de cada especie o grupo taxonómico presente en un área geográfica determinada (Feranchuk et al., 2018).

Riqueza o diversidad de especies (s). Corresponde al número de especies que se encuentran en una región determinada o unidad muestreada, sin tomar en cuenta la abundancia o uniformidad (Costa et al., 2012; Valle et al., 2019).

Índice de diversidad específica de Margalef (D_{mg}). Se refiere a una medida empleada en ecología para estimar la diversidad de una comunidad en base a la distribución de organismos de diferentes especies en función al número de individuos de la muestra y se expresa como, $D_{mg} = \frac{(s-1)}{\ln(N)}$, donde, N es el número total de individuos muestreados. Generalmente se considera valores mayores a 5 como una región de alta biodiversidad (Valdez et al., 2018).

Abundancia relativa (p_i). Determina la proporción de una especie o grupo taxonómico respecto a toda la diversidad de especies presentes en el mismo espacio, expresándose como $p_i = \frac{n_i}{N}$, donde, n_i representa el número de individuos de dicha especie o grupo taxonómico (Pla, 2006).

Índice de Shannon-Wiener (H'). Se define como estimación de la biodiversidad específica (H'), cuya fórmula se muestra cómo, $H' = -\sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln(p_i)$, reflejando la heterogeneidad de una comunidad, es decir, si existe la presencia de especies o grupos taxonómicos dominantes con mayor número de individuos (biodiversidad baja $H' < 1$) o si por el contrario el número de individuos no emparentados se presentan de forma uniforme (biodiversidad alta $H' > 2$) (Costa et al., 2012; Pla, 2006; Xu et al., 2021).

Índice de dominancia de Simpson (D). Cuantifica la biodiversidad representando la probabilidad que, al escoger dos especies seleccionadas al azar, pertenezcan a la misma especie, por lo que valores cercanos a cero representan mayor biodiversidad (Valdez et al.,

2018). De igual manera, se define el índice de diversidad de Simpson (D'), como la probabilidad de al escoger dos especies seleccionadas al azar, estas pertenezcan a especies diferentes.

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

$$D' = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Índice de equidad de Pielou (J'). Este parámetro mide la proporción de la diversidad observada o real con respecto a la diversidad máxima esperada. Se presenta con la expresión $J' = H' / \ln(S)$, por lo que emplea el índice de Shannon para su determinación. Los valores resultantes se encuentran en el rango de 0 a 1, donde 1 representa que las especies son igual de abundantes y 0 señala ausencia total de uniformidad (Valdez et al., 2018).

Estimador no paramétrico de riqueza de Chao

Con el fin de determinar el número esperado de especies a partir de una muestra heterogénea Anne Chao (1984), desarrollo dos estimadores que consideran los datos sin un tipo distribución específica, ni una serie de supuestos que se ajusten al modelo, basado en abundancias (Chao 1) y en base a incidencia (Chao 2) (Chiu et al., 2014). Al tratarse el presente estudio de un único sector de muestreo como el sector de avicultura, se considera el estimador Chao 1 para determinar el número esperado de especies de hongos filamentosos.

Chao 1. El estimador Chao 1 considera que existen especies que solo están representadas pocas veces en la muestra, ya sea por un individuo (singletons) o solo dos individuos (doubletons), representándose con la fórmula, $S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F^2}{2 \cdot G}$, donde S_{Chao1} representa el número de especies esperadas, S_{obs} es el número de especies observado en la muestra, F el número de singletons y G es número de doubletons (Kim et al., 2017). En el caso

de que el número de individuos muestreados sea pequeño se utiliza la expresión: $S_{Chao1} =$

$$S_{obs} + \frac{F^2}{2 \cdot G} \cdot \frac{N-1}{N} \text{ (Espinoza, 2003).}$$

Análisis filogenético y métodos inferencia filogenética

La clasificación filogenética permite evaluar la relación genética entre especies, con el objetivo de reconstruir y monitorear los parentescos naturales en los procesos evolutivos (Kapli et al., 2020). Bajo este contexto se han desarrollado varios métodos de inferencia filogenética que se clasifican en aquellos basados en la distancia genética y los caracteres. Los métodos de distancia como el algoritmo de Neighbour Joining, se fundamentan en el cálculo de la distancia genética entre cada par de especies con sus secuencias alineadas para crear una matriz que será usada de forma iterativa para construir un árbol (Saitou & Nei, 1987). Sin embargo, los métodos de distancia no son recomendables para especies lejanamente relacionadas debido a la dificultad de la estimación a mayores escalas (Kapli et al., 2020; Zhang & Sun, 2008).

Por su parte, los métodos basados en caracteres incluyen máximo parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. El método de máxima parsimonia calcula el número mínimo de cambios de bases nitrogenadas que se requieren para explicar los datos a partir de la topología de los árboles posibles, seleccionando el árbol consenso aquel que presente el menor número de cambios (Hartigan, 1973). Sin embargo, implica suposiciones poco realistas sobre el proceso evolutivo por lo que conduce a errores sistemáticos (Felsenstein, 1983). Para el método de máxima verosimilitud, se realiza iteraciones de topología del árbol, de manera que para cada una de ellas se optimizan los parámetros de sustitución considerando la evolución de las secuencias, lo que finalmente conduce a una topología con mayor probabilidad (Kozlov et al., 2019; Trifinopoulos et al., 2016). El método bayesiano se diferencia del enfoque de máxima verosimilitud, en que implica distribuciones estadísticas para evaluar las incertidumbres de los parámetros (Kapli et al., 2020).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Muestreo

El presente estudio puede ser catalogado como de línea base, al evaluar el ecosistema y diversidad fúngica en un contexto global, identificando de esta manera características relevantes en su estructura ecológica (Ramírez González, 2005). Debido a las características del análisis de la biodiversidad de hongos filamentosos se ha empleado un tipo de muestreo aleatorio simple (Albert et al., 2010), lo que a su vez permite el establecimiento de homogeneidad dentro del estudio.

Tamaño de muestra y ubicación geográfica del área de estudio. El área total para el análisis fue de 84 760 m² perteneciente al sector de avicultura ubicado en la longitud 78°24'44" W, latitud: 0°23'20" S, altitud 2748 msnm. El área fue dividida en 100 subparcelas con el uso del plugin Polygon Divider del software QGIS (Graser et al., 2017), de las cuales 50 fueron seleccionadas de forma aleatoria como se muestra en la figura 3, con el fin de obtener una muestra representativa para la caracterización de la biodiversidad en el lugar de estudio.

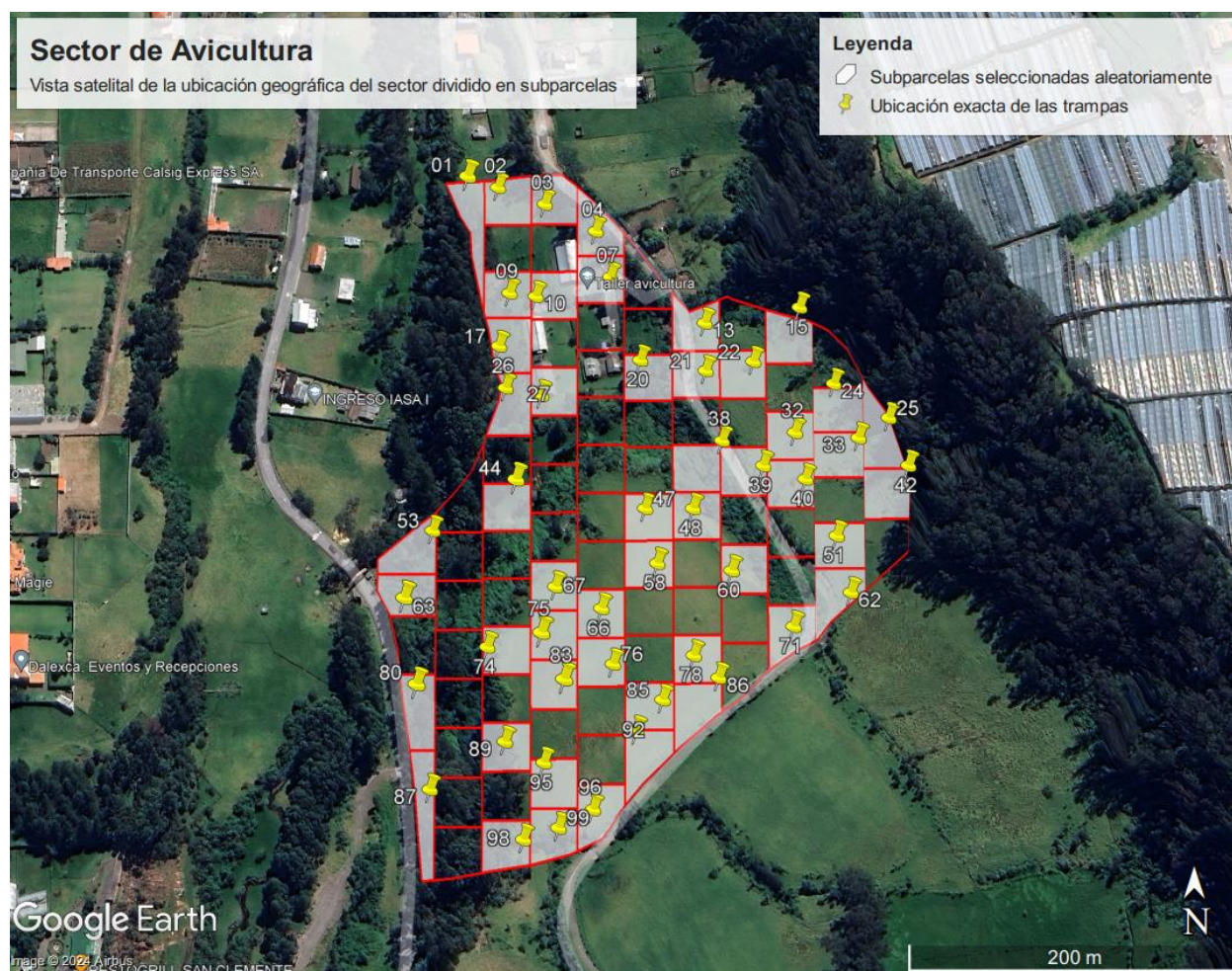
Preparación e instalación de trampas microbianas. Las trampas para la captura de microorganismos se elaboraron a partir de bolsas de arroz semicocido que fueron esterilizadas en autoclave (TRIDENT) a 121°C, durante 15 minutos y 1 atm de presión. Posteriormente, se dispuso 50 g arroz en vasos plásticos de 200 mL que fueron cubiertos con dos capas de tela nylon asegurado con ligas plásticas.

A continuación, se transportaron las trampas en cada una de las subparcelas, procurando que se cuente con cobertura vegetal saludable y no exista exceso de humedad. La instalación de las trampas se dispuso boca abajo a una profundidad de 20 cm de la superficie, se añadió una bolsa plástica entre la trampa y la superficie, para finalmente cubrir con hojas secas. Se registró la ubicación exacta de cada trampa con el uso de Google Earth (Yu & Gong,

2012) y se colocó una bandera para facilitar el proceso de recolección. Se estableció un tiempo de incubación de 15 días de las trampas para la captura de hongos filamentosos. Después de dos semanas se recolectó las trampas, que presentaron crecimiento microbiano, descartando aquellos ejemplares que presentaban contaminación con insectos, larvas y descomposición. Las trampas se almacenaron en un lugar fresco y protegido de la luz.

Figura 3

Esquema de vista satelital ubicación geográfica del sector de avicultura de la Hacienda el Prado - IASA I dividido en subparcelas



Nota. Se encuentran representadas de blanco a las subparcelas muestreadas y en amarillo los marcadores con la ubicación exacta de las trampas microbianas. Esquema elaborado en Google Earth Pro (Britt et al., 2019).

Práctica experimental

Todos los protocolos, análisis y métodos experimentales relacionados a microbiología para el aislamiento y purificación de cepas de hongos filamentosos, microscopía para caracterización morfológica y técnicas de biología molecular tanto extracción de ADN como para amplificación por PCR de la región ITS, se realizaron en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda “El Prado” – IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”.

Preparación de medios de cultivo

Medio PDA. La preparación de medio de cultivo PDA (BD Difco™) se realizó en base a las indicaciones del fabricante (39 g de medio por cada litro de agua destilada) en función del número de cajas Petri requeridas. El volumen de agua destilada utilizado se trasvasa a frascos de tapa rosca (BOECO) y se diluye el medio de cultivo por calentamiento en horno microondas, para finalmente esterilizar el medio de cultivo en autoclave.

Una vez que el medio alcance 50°C colocar en cámara de flujo laminar (ESCO) se incluye 1 mL antibiótico (penicilina-estreptomicina 1 mg/mL o tetraciclina clorhidrato 1 mg/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo. Inmediatamente después, se dispensó 25 mL de medio de cultivo en cajas Petri estériles.

Medio líquido. El medio de cultivo líquido para este caso se utilizó 5 g de peptona y 20 g de dextrosa por cada litro de agua destilada, de acuerdo con el volumen requerido. A continuación, se dispensó 10 mL de medio en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave. Posteriormente se almacenaron los tubos de ensayo con medio líquido en refrigeración a 4°C.

Aislamiento de hongos filamentosos

A partir de la evaluación del crecimiento en las trampas microbianas se seleccionaron de 5 a 6 granos de arroz con visibles diferencias en el desarrollo de los hongos en base al color

y apariencia que se forma alrededor de los granos de arroz. En la selección de granos de arroz para el aislamiento, resultó en el registro en total 10 colores como se muestra en la tabla 1. Se realizó la siembra con ayuda de pinzas estériles sobre el medio de cultivo PDA y se incubó a 28°C en oscuridad durante 5 días.

Tabla 1

Guía de denominación de colores de crecimiento fúngico en los granos de arroz

Color	Número de identificación
Café	0
Rojo	1
Morado	2
Rosado	3
Gris	4
Blanco	5
Verde	6
Amarillo	7
Negro	8
Anaranjado	9

Purificación y refrescamiento en medio de cultivo semisólido. Se realizó el aislamiento y purificación de los diferentes tipos de crecimiento registrado, para lo cual se cortó segmentos de micelio de 5 x 5 mm y se inoculó en medio de cultivo PDA fresco. Se descartaron los cultivos contaminados por crecimiento bacteriano y se realizó refrescamientos hasta obtener cultivos puros. La incubación se realizó 28°C durante 5 días y 2 días en luz para inducir la esporulación.

Inoculación en medio de cultivo líquido. Para aquellos cultivos puros que no desarrollaron abundante micelio, se extrajo micelio con el asa de inoculación y se colocó en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido (0.5% peptona, 2% dextrosa, 10 µg/mL amoxicilina) con las mismas condiciones de incubación.

Caracterización macro y microscópica

Al finalizar este periodo, se registró las características macroscópicas de crecimiento según Watanabe (2010) en el anverso para describir características relevantes como: a) el color de la superficie central, del medio y el contorno de la colonia, b) textura del micelio, c) apariencia de la colonia, d) altura del micelio, e) tipo de crecimiento en relación a la densidad de micelio visible y f) presencia de esporulación. Con respecto al reverso se consideran las características tanto color de la zona interior, media y borde de la colonia como coloración del pigmento exudado.

Para las observaciones microscópicas de las cepas aisladas de hongos filamentosos se usó el procedimiento descrito por Rojas Triviño (2011), para lo cual se presionó suavemente la muestra procurando extraer micelio aéreo de la placa. A continuación, se ubica una gota de agua destilada y una gota de azul de metileno sobre el portaobjetos en la que se ubica la muestra, procurando evitar la formación de burbujas de aire, se observó y se registró tanto las características morfológicas del micelio como de estructuras reproductivas con el objetivo 40x. La identificación de los posibles géneros de hongos filamentosos se fundamentó en las características microscópicas, comparando las observaciones con las descripciones de las claves taxonómicas disponibles en la literatura (Barnett & Hunter, 1998; Watanabe, 2010). Tanto las observaciones morfológicas macroscópicas como microscópicas fueron registradas a manera de fichas de identificación con las características anteriormente mencionadas para cada caso.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se empleó el método propuesto por Flores (2021) modificado por Chiriboga (2023), basado en el protocolo que emplea en una serie de tratamientos con el detergente no iónico Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) descrito por Ausubel et al. (2003), pensado en principio para la extracción de ácidos nucleicos de

células vegetales. El protocolo utiliza el tensioactivo CTAB para lisar células y purificar el ADN, recuperando el material genético de la solución mediante precipitación con etanol. Este método implica poca manipulación y logra rendimientos altos por gramo de tejido fresco, aunque mayor presencia de contaminantes a comparación con otras alternativas, pero adecuado para aplicaciones en biología molecular (Watanabe et al., 2010).

Para extracción se utilizó como material de punto de partida micelio ya sea proveniente de medio de cultivo líquido o semisólido PDA. En primer lugar, se extrajo cuidadosamente la muestra con un asa de punción o de inoculación en tubos Eppendorf estériles de 2 mL.

A continuación, se añadió 500 μ L de buffer de extracción (2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris·Cl, 20 mM EDTA, 1.4M NaCl, pH 8.0). La lisis celular del micelio se realizó con la inclusión de tres perlas de vidrio al tubo y maceración con pistilo estéril hasta que la muestra se haya triturado. A continuación, se añadió 2 μ L de β -mercaptoetanol y se homogeneizó mediante vórtex por 1 minuto. Se incubó la muestra a 60°C durante 30 minutos en termobloque (LABNET) invirtiendo los tubos cada 10 minutos.

Posteriormente, se añadió 500 μ L de cloroformo frío, se homogeneizó por vórtex por 5 segundos, se mantuvo los tubos a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a 14700 g por 8 minutos. Se obtuvo en este paso un sobrenadante que contiene ácidos nucleicos, por lo que se recupera cuidadosamente de la parte superior de la solución alrededor de 300 a 400 μ L en un tubo de 1.5 mL, procurando no retirar las fases o sedimentos de la zona inferior, los cuales contienen residuos contaminantes. Se añadió etanol absoluto frío en igual proporción de volumen de sobrenadante, 150 μ L de acetato de sodio 3 M y 300 μ L de etanol al 70% frío para promover la precipitación de ADN, para lo cual se almacenaron las muestras a -20°C por toda la noche.

Pasado este tiempo se centrifugó las muestras a 14 700 g por 17 minutos y se desechó cuidadosamente el sobrenadante. A continuación, se lavó tres veces con 200 μ L de etanol al 70%, centrifugando en el primer lavado por 1 minuto a 14700 g para precipitar el ADN y se

retiró todo el etanol posible del tubo. Se dejó secar 30 minutos las muestras con la ayuda del flujo de aire de cámara de flujo o hasta evidenciar que no existen residuos de etanol. El pellet resultante se hidrató con la adición de 70 μL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 8 mM en agua ultrapura. Por último, se añadió 1 μL de RNasa y se dejó incubar a 37°C por 30 minutos antes de su almacenamiento a -20°C.

Cuantificación y estimación de pureza de ADN por espectrofotometría

En un tubo estéril de 0.2 mL se preparó una dilución 1:4 de ADN en agua ultrapura, más un tubo adicional con 80 mL de agua ultrapura. A continuación, se colocó la dilución en las celdas de muestras y el blanco, en el espectrofotómetro (THERMO ELECTRON) se mide las absorbancias de las longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. La estimación de la concentración de ADN se calculó usando la expresión $[ADN]_{(\mu\text{g}/\text{mL})} = A_{260} \cdot 50 \mu\text{g}/\text{mL} \cdot FD_{ADn}$, donde FD_{ADn} corresponde al factor de dilución empleado. De igual forma, se usa las absorbancias para obtener las relaciones de pureza 260/230 y 260/280. Los resultados de la relación de absorbancias 260/280 se clasificaron de acuerdo con los criterios de validez propuestos por el Banco Nacional de ADN Carlos III (2020), en cuatro categorías como pureza óptima [≥ 1.8 ; <2.1], pureza aceptable [≥ 1.6 ; <1.8], ADN contaminado con compuestos aromáticos [< 1.6] y contaminación con ARN [≥ 2.1]. De igual forma, para la relación 230/260 se clasificó como de pureza óptima [≥ 2 ; <2.2], pureza aceptable [≥ 1.8 ; <2.0], ADN contaminado [≥ 1.5 ; <1.8] y altamente contaminado [< 1.5] con sales e hidratos de carbono.

Evaluación de integridad de ADN por electroforesis en agarosa

La integridad del ADN genómico extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Invitrogen) al 0.7 %, en 60 mL de dilución 1:10 de TBE 10X (0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 0.05 M EDTA.Na₂, pH 8.3 \pm 0.2.) y colorante de tinción de ácidos nucleicos (Diamond Nucleic Acid Dye) en dilución 1:15 000. Cada pocillo se cargó con 5 μL de ADN, 3 μL

de agua ultrapura y 2 μ L de buffer de carga (Blue Juice). En la cámara de electroforesis se corrió el gel a 90 V por una hora y se observó en el transiluminador UV (ALPHA INNOTECH). Finalmente, se registró los resultados en cinco categorías como integridad alta, integridad adecuada, parcialmente degradado, totalmente degradado y sin la presencia de barrido o bandas, de acuerdo con los criterios de validez propuestos por el Banco Nacional de ADN Carlos III (2020).

Amplificación de la región ITS por PCR convencional

Para el proceso de amplificación por PCR de la región ITS de ADNr nuclear, se utilizó los primers ITS1 e ITS4 diseñados por White et al. (1990) y la tabla 2 describe sus secuencias.

Tabla 2

Primers para amplificación de regiones de ADNr fúngico

Primer	Secuencia	T_m (°C)
ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~65
ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~58

Nota. Los primers se presentan en dirección 5'-3'. Tomado de *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* (p. 317), por T. White et al., 1990, Academic Press.

La master mix de la PCR se elaboró en base a la guía de usuario del fabricante del kit Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), de acuerdo con la tabla 3 para un volumen de reacción de 25 μ L. El mix de reacción se preparó desde el mayor a menor volumen para el número de muestras establecido, incluyendo un control negativo sin ADN y un control positivo. Se dispensó 24 μ L del master mix en cada tubo de PCR, se colocó 1 μ L de muestra y 1 μ L de agua ultrapura en el control negativo.

Tabla 3

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

Componente	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen por reacción 1x (µL)
Agua ultrapura	–	–	19.15
Platinum II PCR Buffer	10x	1x	2.5
dNTPs mix	10 mM	0.2 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Primer forward	10 µM	0.2 µM	0.5
Primer reverse	10 µM	0.2 µM	0.5
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/µL	1 U/µL	0.1
Plantilla de ADN	varia	<500 ng/rxn	1

El programa en termociclador (TECHNE) para las condiciones de amplificación se muestra en la tabla 4, de forma que se establecieron de acuerdo con las características del fragmento amplificado, los primers y la *Taq* polimerasa utilizada.

Tabla 4

Condiciones del programa de termociclador para amplificación de la región ITS por PCR

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	34
Hibridación	55	30 s	34
Extensión	72	1 min	34
Extensión final	72	3 min	1
Almacenamiento	4	-	

Tomado de *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* (p. 317), por T. White et al., 1990, Academic Press.

Evaluación de presencia y longitud de amplicones. El producto amplificado se sometió al proceso de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, TBE y colorante de

tinción de ácidos nucleicos en dilución 1:15 000. Se cargó en el gel un volumen de 5 μ L de los amplicones, junto a 2 μ L de buffer de carga y 3 μ L de agua ultrapura. Además, se utilizó 1.5 μ L el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) con 1.5 μ L de buffer de carga TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer (Invitrogen) y 3 μ L de agua ultrapura. El gel de agarosa se corrió en la cámara de electroforesis por una hora a 90 V. Finalmente, el gel se observó en el transiluminador UV y se registró los resultados.

Secuenciación del fragmento amplificado

Se utilizó 10 μ L de producto amplificado por PCR junto a 5 μ L de alícuota de los primers ITS1 e ITS4 (2 μ M) que se envió al Laboratorio de Investigación de biología molecular de la Universidad de Las Américas (UDLA), donde se realizó purificación enzimática y secuenciación por la técnica Sanger de las dos hebras del fragmento de ADN.

Análisis bioinformático

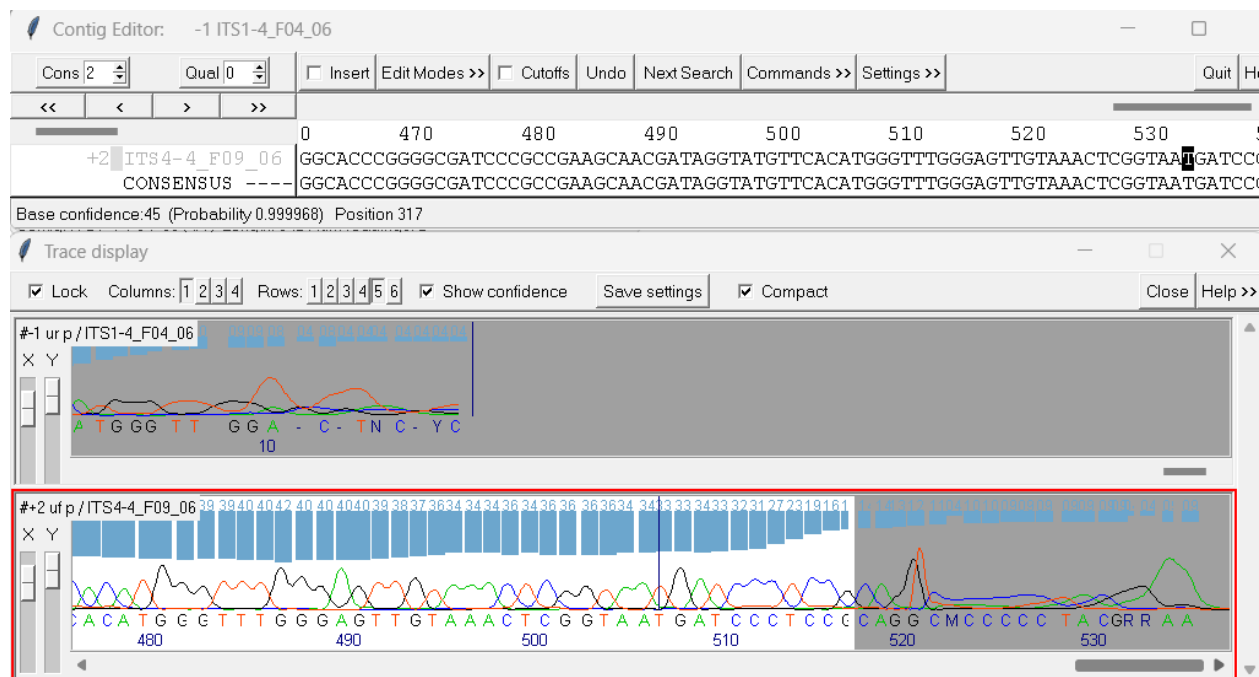
Evaluación de calidad y eliminación de fragmentos. Las secuencias se procesaron usando el componente Prepag4 del software de código abierto de Staden Package (Bonfield et al., 1995), para la asignación de bases, evaluación de calidad y eliminación de extremos. En la interfaz se ajustó el recorte de secuencias a partir de valores de confianza para conservar las bases a las cuales se hayan presentado un índice de confianza mayor a 15. Así, se obtuvo secuencias consenso con el uso de Gap4 Shotgun Assembly generando archivos base para el ensamblaje.

Ensamblaje y análisis de secuencias. Con el uso del programa Gap4 de Standen Package (Bonfield et al., 1995), se realizó el análisis del contig de forma que se detectaron inconsistencias en el ensamblaje, los cuales se ajustó en base a la información de los electroferogramas, para mantener en la secuencia consenso las bases consideradas como de

buena calidad, como se observa en la figura 4. Este proceso dio como resultado una secuencia consenso en formato FASTA.

Figura 4

Alineamiento de secuencia forward y reverse del fragmento de la región ITS y limpieza de extremos (Valdez et al., 2018)



Nota. Las bases nitrogenadas que se asignan de forma errónea son eliminadas de la secuencia consenso en Gap4.

Identificación de hongos en bases de datos. El conjunto de secuencias consenso fueron empleadas para realizar la búsqueda de coincidencias con la base de datos de GenBank (NCBI) mediante la herramienta BLASTn (Zhang et al., 2000), para identificación de las especies de hongos filamentosos a partir de accesiones con mayor porcentaje de identidad, tanto en la base de datos completa como en la base de datos de organismos tipo.

Análisis de biodiversidad

Puesto que la definición de individuo dentro de hongos filamentosos es un tema de debate dentro de la comunidad científica, se realizó una estimación aproximada de la

abundancia tomando como referencia cada unidad de aislamiento puro como individuo, esto de acuerdo con los supuestos de medición de biodiversidad establecidos por Magurran (2004), en donde se establece igualdad de todos los individuos y registro de abundancia se realizan empleando unidades apropiadas y comparables, de forma análoga a la metodología utilizada en ensayos anteriores (Kasi et al., 2021; Unterseher et al., 2008).

Se clasificó las cepas aisladas y se registró el número de individuos a partir de la identificación de tipos de crecimiento en base a las características morfológicas del crecimiento en medio de cultivo PDA. A partir de esta información y la posterior identificación molecular, se determinó la riqueza (s), abundancia (N), abundancia por especie (n_i), abundancia relativa (p_i), índice de Margalef (D_{mg}), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de dominancia de Simpson (D), índice de diversidad de Simpson (D') e índice de equidad de Pielou (J'). La determinación de la riqueza esperada de especies de hongos filamentosos cultivables en el suelo del sector de Avicultura se realizó con el uso del estimador no paramétrico Chao1.

Análisis filogenético

Las secuencias consenso se analizaron y alinearon mediante la herramienta MUSCLE del software MEGA11 (Tamura et al., 2021). A continuación, se elaboró en el programa un árbol filogenético usando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo de Tamura-Nei para la determinación de la distancia genética. Se estableció el árbol consenso mediante la configuración de bootstrap con 500 réplicas y se eliminó aquellos agrupamientos de taxones presentes en menos del 40% de las iteraciones.

Crioconservación

Para el mantenimiento de los aislados obtenidos a largo plazo se realizó el proceso de crioconservación de acuerdo al protocolo propuesto por Rugeles Barandica et al. (2021). Para ello, se cortó segmentos circulares de 5 mm de diámetro en los medios de cultivo semisólido,

con el fin de desprender de tres a cinco discos cilíndricos para ubicarlos en viales previamente esterilizados. Se preparó 5 mL solución protectante por cada vial criogénico con peptona al 0,1% y glicerol al 10% de acuerdo con el número de aislados seleccionado. A continuación, se refrigeró las muestras durante 20 minutos y finalmente se almacenaron en el ultracongelador (SANYO) a -80°C.

Cepario

Las cepas crioconservadas identificadas e inventariadas se almacenaron en las instalaciones del laboratorio de agrobiotecnología de la Hacienda “El Prado” – IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”. Además, el registro de las cepas incluye la ficha respectiva de identificación morfológica y molecular, para su aplicación en estudios posteriores.

Capítulo IV

Resultados

Identificación morfológica y molecular de las cepas de hongos filamentosos recolectados en los suelos del sector de avicultura

Aislamiento de hongos filamentosos. De las 50 trampas utilizadas se recuperaron 39, las 11 trampas faltantes fueron descartados por contaminación por gusanos (2), moscas (2), exceso de humedad (4) o porque la trampa no fue encontrada debido a factores medioambientales (3). En la tabla 5 se describe los 51 aislamientos de cepas de hongos filamentosos de acuerdo con su subparcela de origen.

Tabla 5

Descripción de aislamientos obtenidos en las subparcelas muestreadas

ID subparcela	Coordenadas de la subparcela	N° hongos aislados	Código asignado/ Observación
1	0°22'39"S 78°25'01"W	0	Trampa
2	0°22'39"S 78°25'00"W		contaminada con gusanos
3	0°22'39"S 78°24'59"W	2	P03-H1-C5 P03-H2-C7
4	0°22'40"S 78°24'58"W	3	P04-H1-C2 P04-H2-C6 P04-H3-C6
7	0°22'41"S 78°24'58"W	1	P07-H1-C6
9	0°22'41"S 78°25'00"W	2	P09-H1-C6 P09-H2-C5

10	0°22'41"S 78°24'59"W	1	P10-H1-C8
13	0°22'42"S 78°24'56"W	0	
15	0°22'41"S 78°24'54"W		Trampa con exceso de humedad
			P17-H1-C9
17	0°22'42"S 78°25'00"W	3	P17-H2-C7 P17-H3-C6
20	0°22'42"S 78°24'57"W	0	
21	0°22'43"S 78°24'56"W	0	
22	0°22'42"S 78°24'55"W	1	P22-H1-C2
24	0°22'43"S 78°24'53"W		Trampa con exceso de humedad
25	0°22'44"S 78°24'52"W		Trampa con exceso de humedad
26	0°22'43"S 78°25'00"W	0	
			P27-H1-C5
27	0°22'43"S 78°24'59"W	2	P27-H2-C5
			Trampa
32	0°22'44"S 78°24'54"W		contaminada con moscas
33	0°22'44"S 78°24'53"W	1	P33-H1-C5
38	0°22'44"S 78°24'55"W		Trampa no encontrada
			P39-H1-C5
39	0°22'45"S 78°24'55"W	2	P39-H2-C7

			P40-H1-C3
40	0°22'45"S 78°24'54"W	3	P40-H2-C3 P40-H3-C2
42	0°22'45"S 78°24'52"W	0	
44	0°22'45"S 78°25'00"W		Trampa contaminada con gusanos
47	0°22'45"S 78°24'57"W	1	P47-H1-C6
48	0°22'45"S 78°24'56"W		Trampa contaminada con moscas
51	0°22'46"S 78°24'53"W	3	P51-H1-C4 P51-H2-C6 P51-H3-C3
53	0°22'46"S 78°25'01"W	1	P53-H1-C5
58	0°22'46"S 78°24'57"W	2	P58-H1-C5 P58-H2-C2
60	0°22'47"S 78°24'55"W	2	P60-H1-C2 P60-H2-C7
62	0°22'47"S 78°24'53"W	2	P62-H1-C2 P62-H2-C6 P62-H3-C4
63	0°22'47"S 78°25'02"W	0	
66	0°22'47"S 78°24'58"W	0	
67	0°22'47"S 78°24'59"W	1	P67-H1-C2

			P71-H1-C4
71	0°22'48"S 78°24'54"W	3	P71-H2-C3 P71-H3-C2
74	0°22'48"S 78°25'00"W	1	P74-H1-C8
75	0°22'48"S 78°24'59"W	2	P75-H1-C0 P75-H2-C5
76	0°22'48"S 78°24'58"W	0	
78	0°22'48"S 78°24'56"W	1	P78-H1-C7
80	0°22'49"S 78°25'02"W	1	P80-H1-C6
83	0°22'49"S 78°24'59"W	1	P83-H1-C5
85	0°22'49"S 78°24'57"W	1	P85-H1-C2
86	0°22'49"S 78°24'56"W		Trampa con exceso de humedad
87	0°22'51"S 78°25'01"W		Trampa no encontrada
89	0°22'50"S 78°25'00"W		Trampa no encontrada
92	0°22'50"S 78°24'57"W	3	P92-H1-C9 P92-H2-C6 P92-H3-C6
95	0°22'50"S 78°24'59"W	3	P95-H1-C5 P95-H2-C2 P95-H3-C3
96	0°22'51"S 78°24'58"W	1	P96-H1-C5
98	0°22'52"S 78°24'59"W	0	




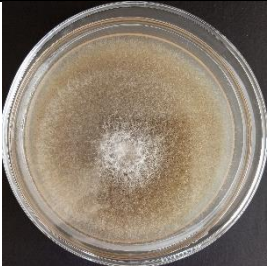
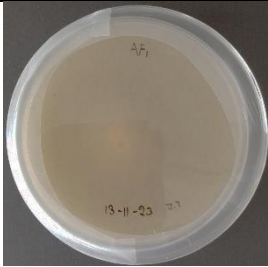
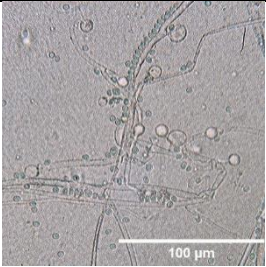
99 0°22'52"S 78°24'59"W 0

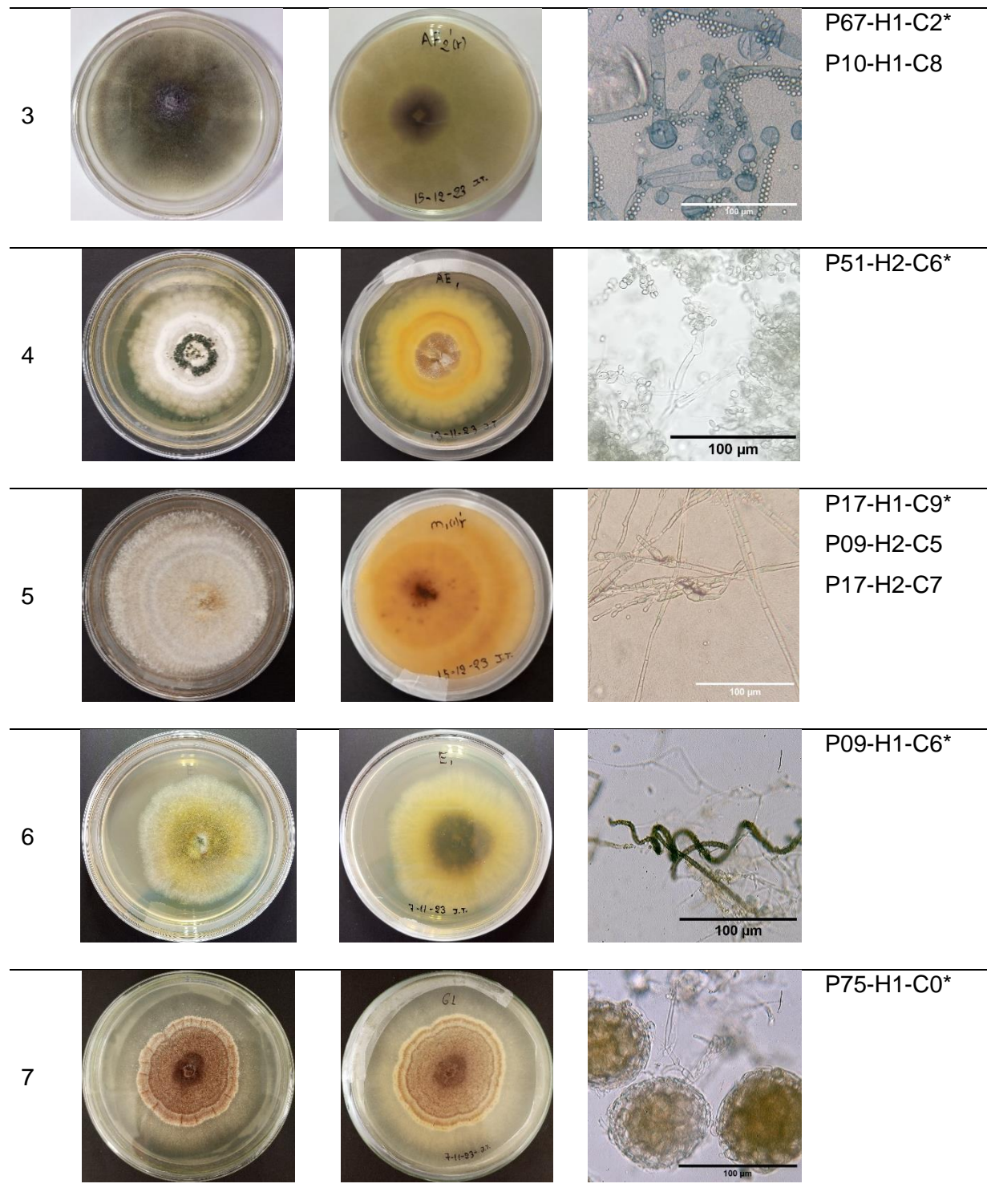
Nota. Código asignado: P, subparcela de origen; H, número de aislado de la trampa; C, denominación de colores (ver tabla 1). Las fotografías de los cultivos primarios se encuentran en el anexo A.

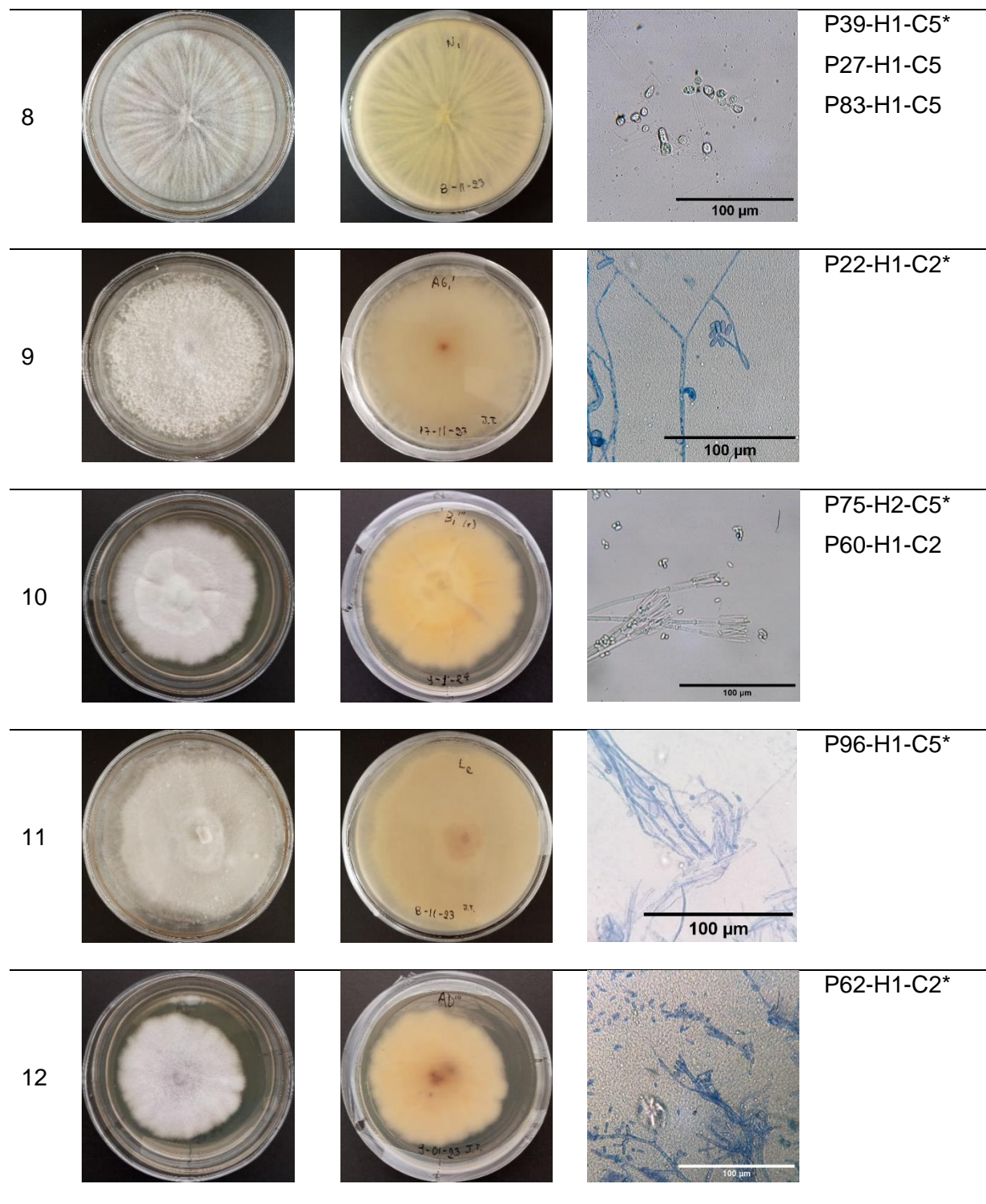
Caracterización macro y microscópica. En la tabla 6 se presenta el crecimiento de hongos filamentosos tanto en el anverso y reverso del medio de cultivo PDA, su morfología microscópica y los aislamientos agrupados en base a sus rasgos macroscópicos. La descripción de las características morfológicas de los aislados se muestra de forma detallada en el anexo B.

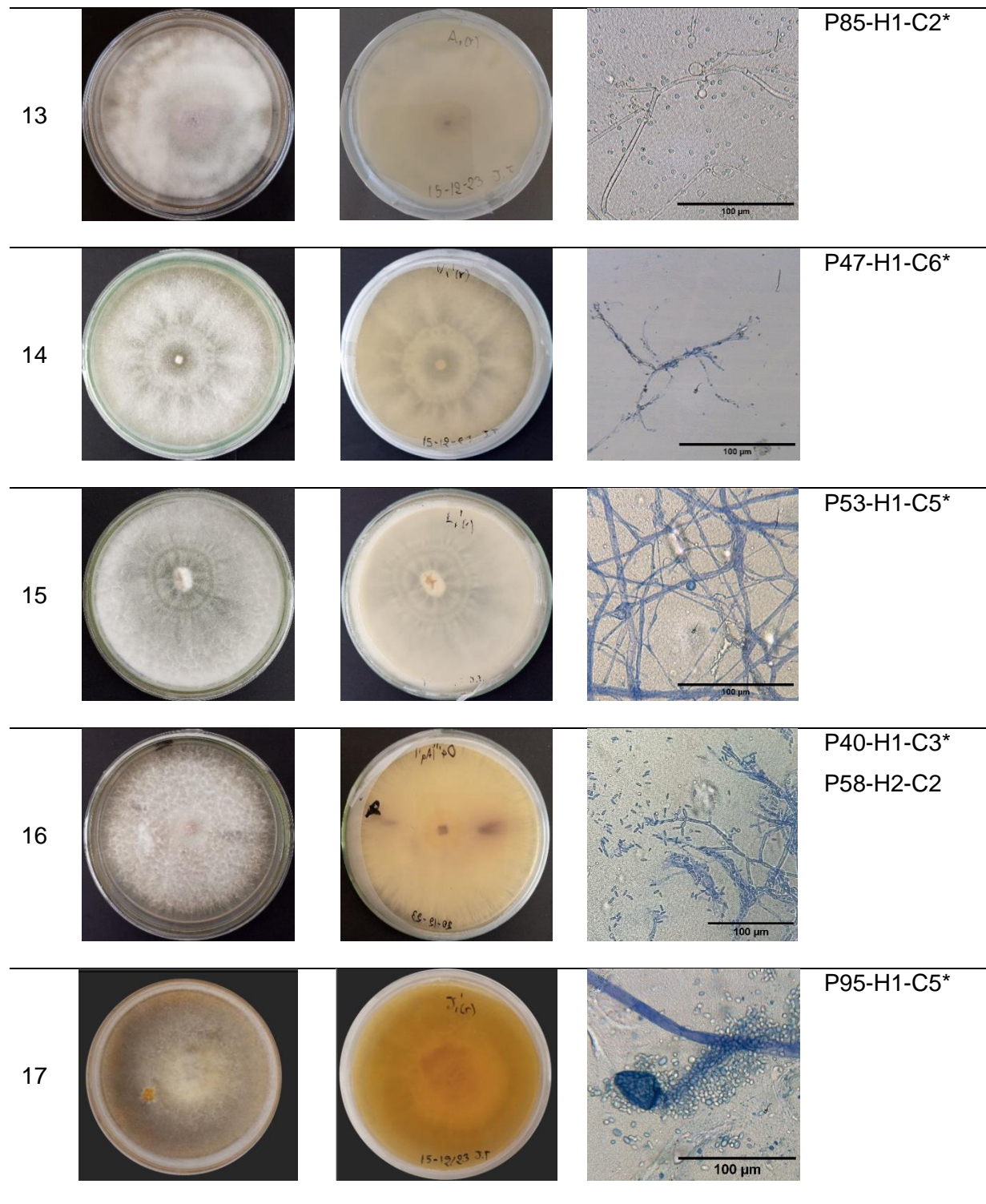
Tabla 6

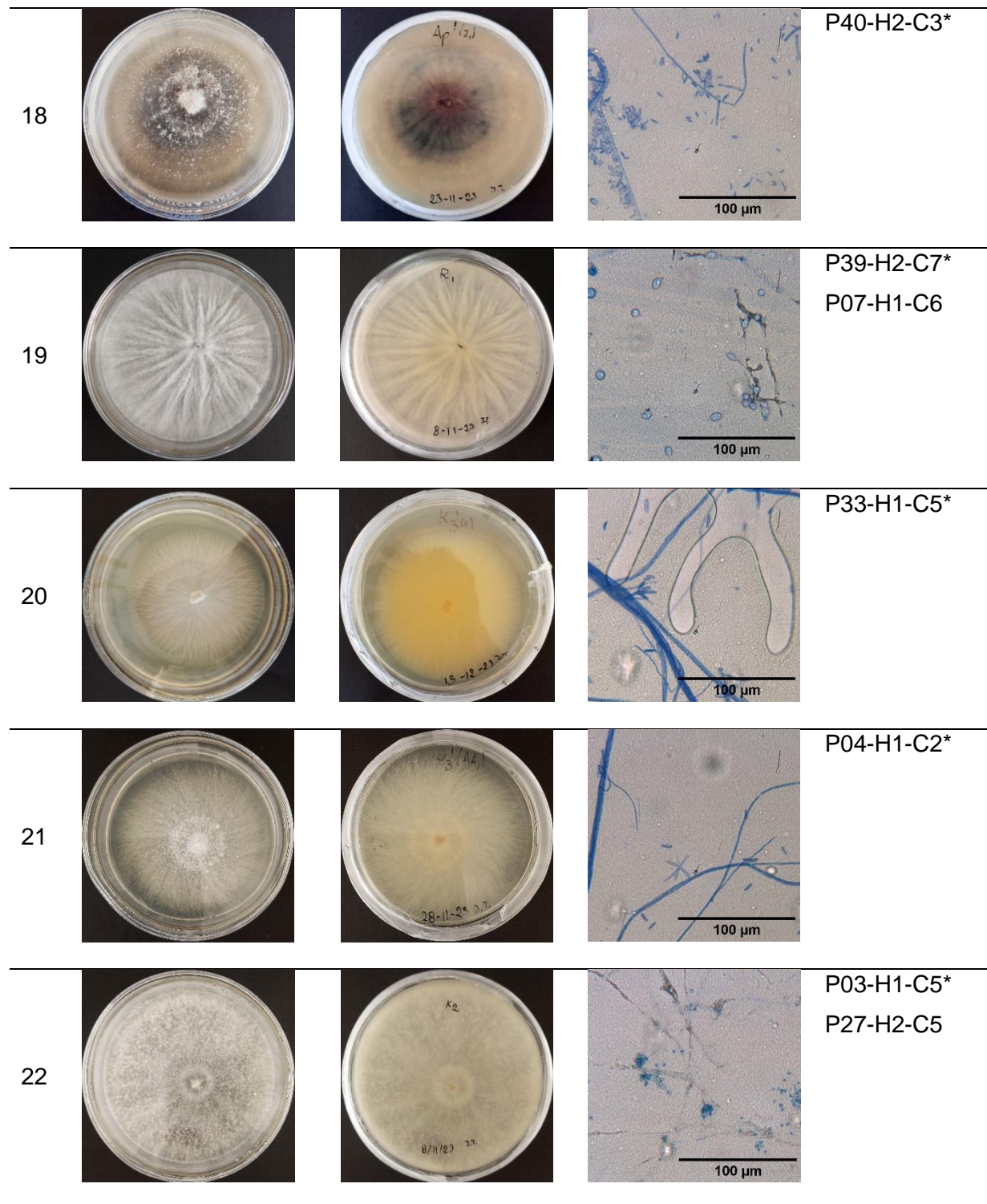
Morfología macroscópica y microscópica de aislamientos de hongos filamentosos presentes en el suelo del sector de avicultura de la Hacienda "El Prado" – IASA I

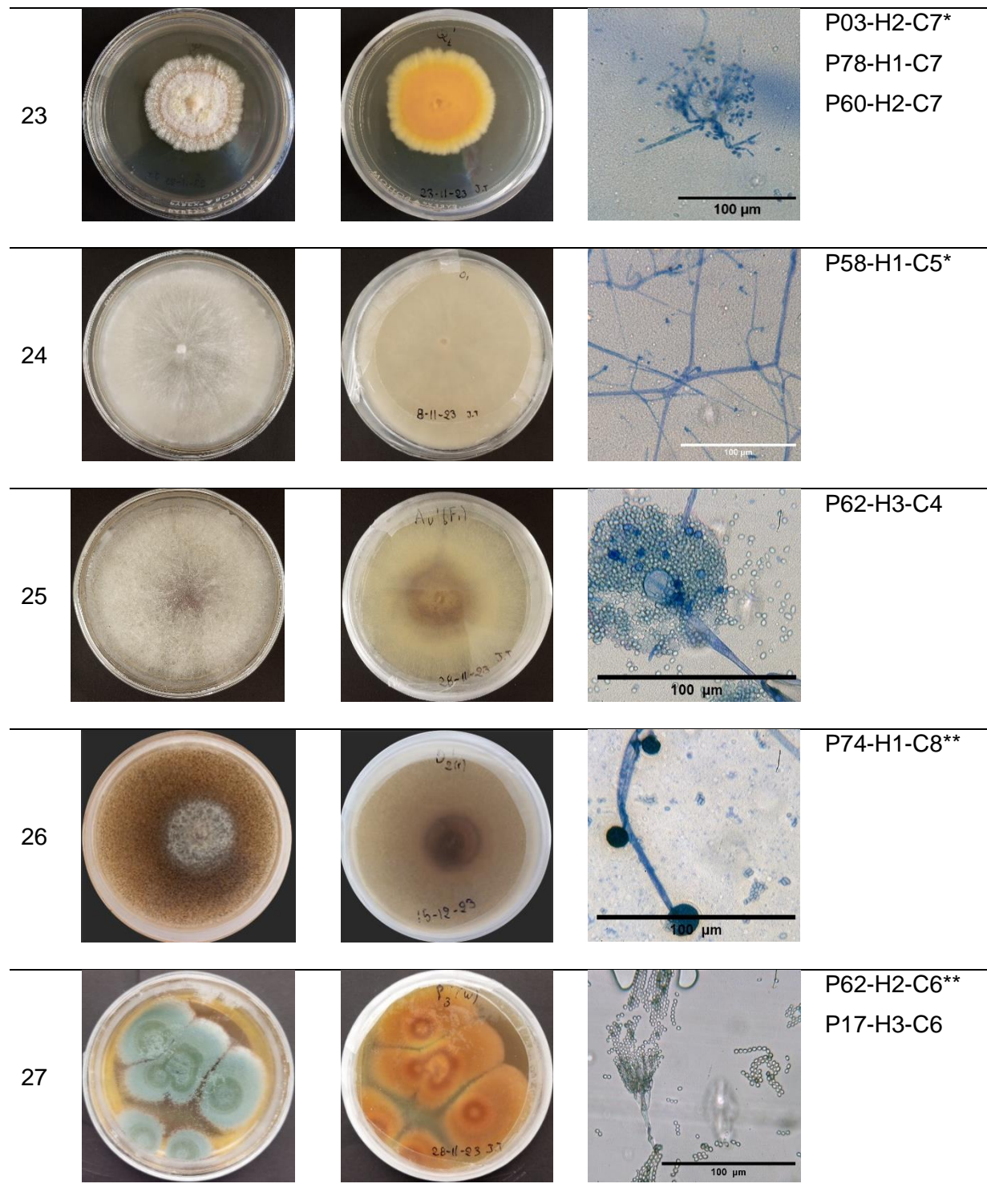
N°	Crecimiento en medio PDA		Morfología microscópica	Cepas asociadas
	Anverso	Reverso		
1				P51-H1-C4*
2				P71-H1-C4*

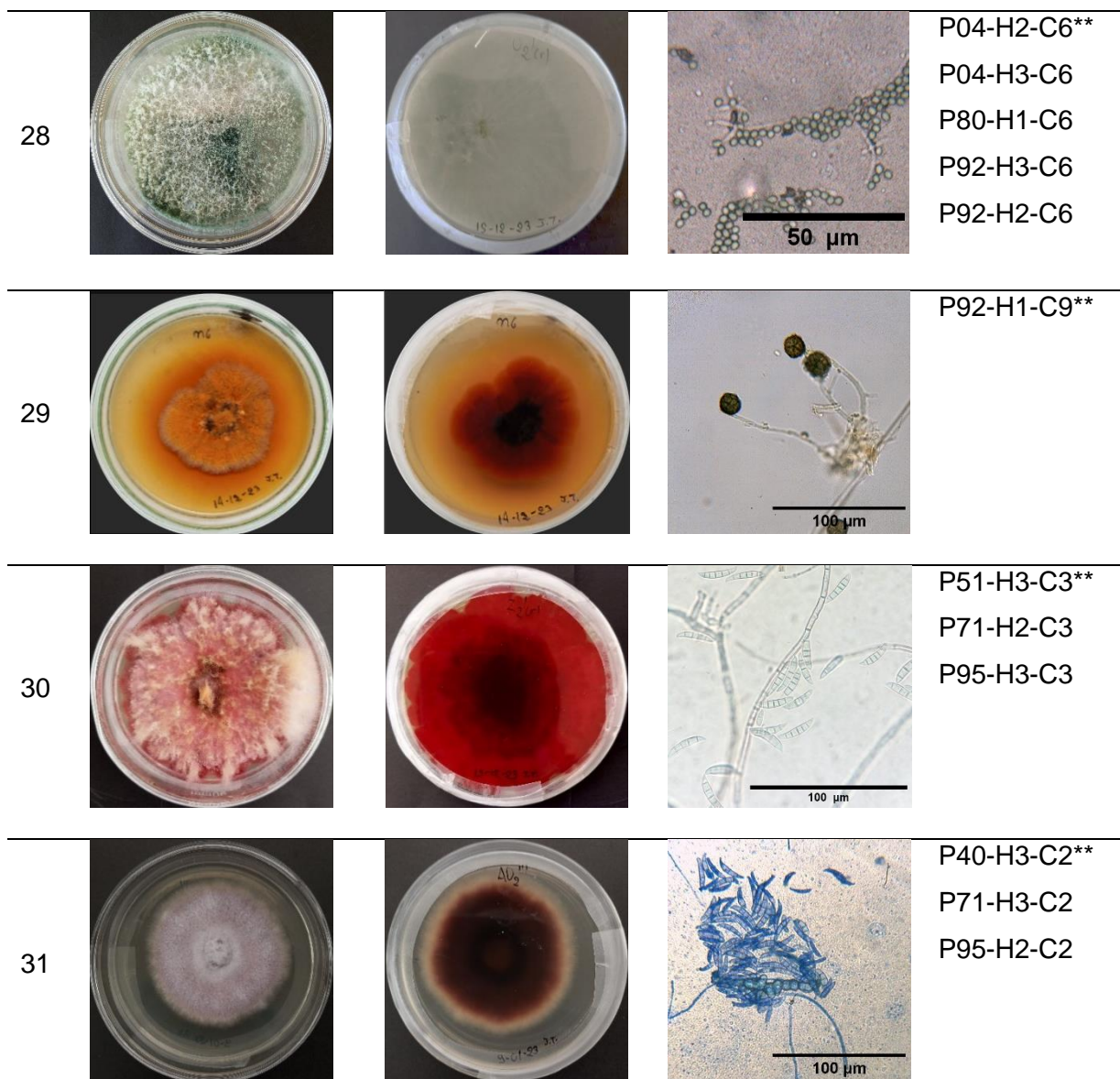












Nota. *, representa los aislados puros considerados como morfoespecies representativas para la caracterización molecular.

Cuantificación y estimación de pureza de ADN. Se eligieron 31 muestras para el proceso de extracción de ADN, al igual que el proceso la estimación de la pureza y concentración en base a la determinación de absorbancias por espectrofotometría, como se muestra en la tabla 7. Se registró una concentración promedio de ADN de 209.3 ± 103.4 µg/mL. Con relación a la pureza 260/280 se registró que el 64.52% de las muestras presentaron una pureza óptima $[\geq 1.8; < 2.1]$, el 12.90% pureza aceptable $[\geq 1.6; < 1.8]$, 16.13% contaminación con

compuestos aromáticos [<1.6] y el 6.45% contaminación con ARN [≥ 2.1]. Por otro lado, la relación de absorbancias 260/230, indicó que todas las muestras de ADN están altamente contaminadas con sales, fenoles y carbohidratos.

Tabla 7

Resultados de estimación de pureza y cuantificación de ADN por espectrofotometría

N°	Aislamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (260/280)	Pureza (260/230)
1	P51-H1-C4	339.0	1.30	0.95
2	P71-H1-C4	167.6	1.99 ⁺⁺	0.96
3	P67-H1-C2	351.0	1.47	0.93
4	P51-H2-C6	120.4	1.82 ⁺⁺	0.89
5	P17-H1-C9	273.8	2.06 ⁺⁺	1.24
6	P09-H1-C6	341.6	1.82 ⁺⁺	1.14
7	P75-H1-C0	297.4	2.21 ⁺⁺	1.31
8	P39-H1-C5	342.8	1.85 ⁺⁺	1.03
9	P22-H1-C2	75.0	1.58	0.55
10	P75-H2-C5	331.0	1.99 ⁺⁺	1.23
11	P96-H1-C5	163.0	1.87 ⁺⁺	0.83
12	P62-H1-C2	287.6	1.99 ⁺⁺	1.09
13	P85-H1-C2	163.6	1.77 ⁺	0.88
14	P47-H1-C6	140.2	1.84 ⁺⁺	0.93
15	P53-H1-C5	76.2	1.91 ⁺⁺	1.33
16	P40-H1-C3	95.0	1.55	0.60
17	P95-H1-C5	260.0	2.03 ⁺⁺	1.05
18	P40-H2-C3	118.8	1.87 ⁺⁺	0.76
19	P39-H2-C7	102.2	1.77 ⁺	0.74
20	P33-H1-C5	144.2	1.96 ⁺⁺	0.91
21	P04-H1-C2	47.6	1.36	0.43
22	P03-H1-C5	308.2	2.08 ⁺⁺	1.22
23	P03-H2-C7	236.8	2.17	1.26
24	P58-H1-C5	87.2	1.68 ⁺	0.75
25	P62-H3-C4	133.6	1.85 ⁺⁺	0.98

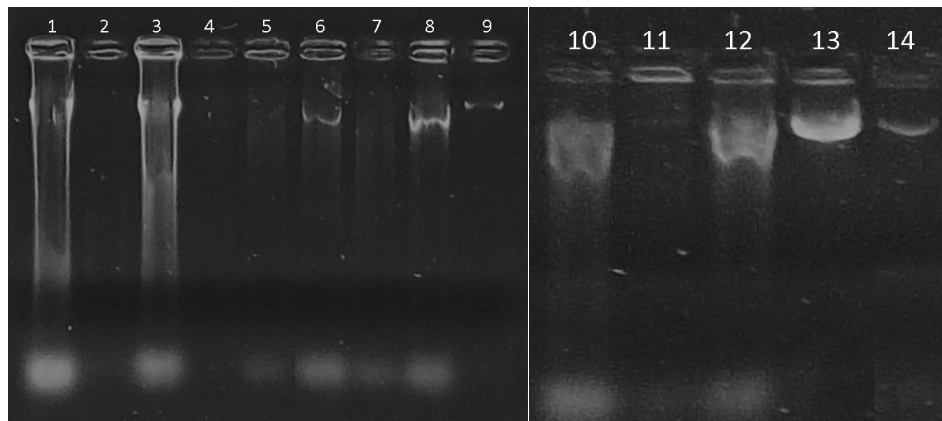
26	P74-H1-C8	83.4	1.63 ⁺	0.86
27	P62-H2-C6	156.8	1.85 ⁺⁺	0.90
28	P04-H2-C6	248.2	1.86 ⁺⁺	1.03
29	P92-H1-C9	234.8	2.05 ⁺⁺	1.20
30	P51-H3-C3	335.6	1.93 ⁺⁺	1.08
31	P40-H3-C2	89.6	2.01 ⁺⁺	0.78

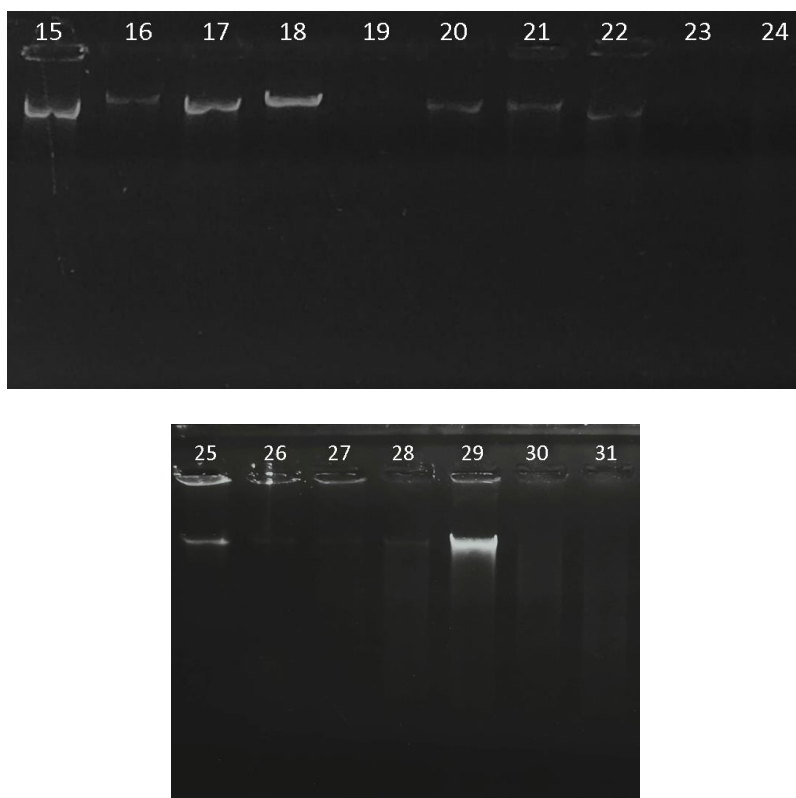
Nota. Junto a la relación de absorbancias 260/280 se indica las muestras que presentaron mejor calidad: ++, pureza óptima [≥ 1.8 ; < 2.1]; +, pureza aceptable [≥ 1.6 ; < 1.8].

Integridad de ADN por electroforesis. La evaluación de integridad por electroforesis en gel de 0.7% de agarosa se observa en la figura 5, registrando por las muestras de ADN genómico una integridad alta en el 41.94%, ADN integridad adecuada en el 19.35%, parcialmente degradado en el 12.90%, totalmente degradadas en el 6.45% y sin barrido ni bandas visibles en el 19.35%.

Figura 5

Evaluación de integridad de ADN genómico por electroforesis de material genético extraído de aislados de hongos filamentosos

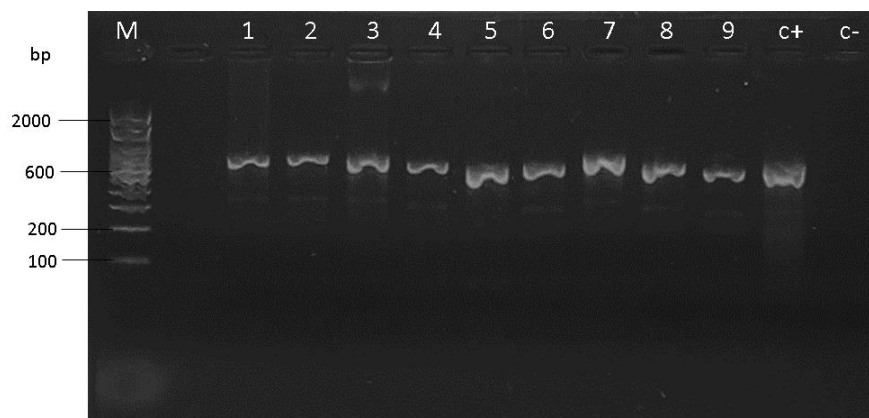


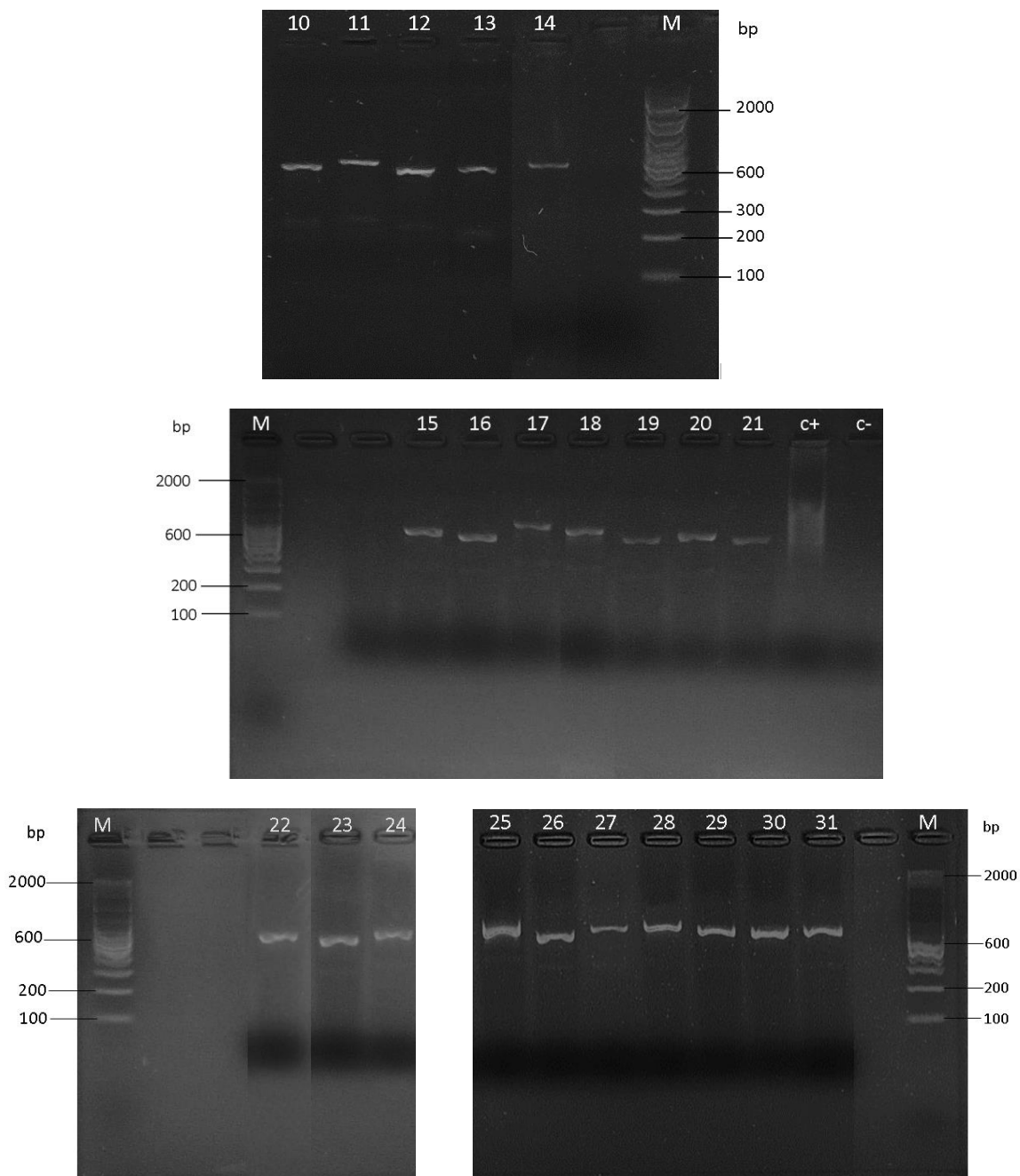


Amplificación de la región ITS. El fragmento de la región ITS de las 31 muestras de ADN se amplificó por PCR convencional usando los cebadores ITS1 (forward) e ITS4 (reverse). La electroforesis en gel de 2% de agarosa, reflejó tamaños de fragmentos entre 500 a 700 pb, como se muestra en la figura 6.

Figura 6

Amplificación de la región ITS a partir de ADN genómico de aislamientos de hongos filamentosos





Identificación molecular de hongos filamentosos. El procesamiento bioinformático y la posterior búsqueda en bases de datos biológicos de las lecturas producto del proceso de secuenciación de amplicones de la región ITS, resultó en la identificación a nivel de especie de las cepas como se muestra en la tabla 7, exceptuando *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., en donde los porcentajes de identidad impidieron discernir con certeza la especie del aislado.

Tabla 8

Hongos filamentosos identificados mediante búsqueda en BLAST del ensamblaje de lecturas del fragmento de la región ITS

#	Longitud (pb)	Organismo	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión
1	611	<i>Mucor circinelloides</i>	98.37	NR_126116.1
2	631	<i>Mucor circinelloides</i>	98.69	AY243943.1
3	600	<i>Mucor janssenii</i>	99.67	MH855051.1
4	549	<i>Clonostachys divergens</i>	99.25	NR_137532.1
5	521	<i>Fusarium equiseti</i>	100	MN722428.1
6	548	<i>Chaetomium cochliodes</i>	100	MH856972.1
7	639	<i>Minimedusa polyspora</i>	99.53	NR_145335.1
8	571	<i>Trichoderma hamatum</i>	100	MH113926.1
9	521	<i>Fusarium foetens</i>	99.22	NR_159865.1
10	557	<i>Clonostachys chloroleuca</i>	99.28	PP163405.1
11	586	<i>Trichoderma</i> sp.	99.66	OP497948.1
12	522	<i>Fusarium foetens</i>	99.22	NR_159865.1
13	614	<i>Mucor moelleri</i>	99.67	OW986506.1
14	586	<i>Trichoderma</i> sp.	100	MK871236.1
15	577	<i>Trichoderma</i> sp.	100	MN900599.1
16	523	<i>Fusarium</i> sp.	99.81	MH862657.1
17	608	<i>Mucor hiemalis</i>	99.35	LC413619.1
18	549	<i>Fusarium verticillioides</i>	99.81	MH729013.1
19	572	<i>Trichoderma hamatum</i>	99.83	MT348552.1
20	544	<i>Fusarium</i> sp.	99.43	MH862670.1
21	524	<i>Fusarium</i> sp.	98.66	NR_120263.1
22	577	<i>Trichoderma paraviridescens</i>	100	MN900599.1
23	542	<i>Clonostachys solani</i>	100	OM967396.1
24	528	<i>Xylaria</i> sp.	98.11	OP443871.1
25	644	<i>Mucor hiemalis</i>	99.51	LC413619.1
26	536	<i>Mucor griseocyanus</i>	98.84	MH854579.1
27	591	<i>Penicillium camemberti</i>	99.82	MT530220.1
28	571	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	MK841003.1

29	522	<i>Epicoccum nigrum</i>	100	MT582797.1
30	531	<i>Fusarium culmorum</i>	100	MH681154.1
31	547	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	MN856310.1

Evaluación de la biodiversidad presente en el suelo

Se llegó a la identificación a nivel de especie para 20 grupos de hongos y 4 más a nivel de género. De esta manera, se obtuvo 51 individuos o unidades de aislamiento (N) distribuidos en 20 especies identificadas, 4 especies sin identificar, 9 géneros y 7 órdenes, como se describe en la tabla 9. Además, se clasificó las especies por con su rol ecológico de acuerdo con literatura disponible, de forma que se clasificaron en antagonistas (41.18%), fitopatógenos (35.29%), patógenos oportunistas de animales (3.92%) y saprófitos (19.61%). Las especies con mayor abundancia fueron *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma hamatum*, con 5 individuos cada una, seguidas por *Fusarium foetens* con 4 unidades de aislamiento. El género con más especies diferentes identificadas y a su vez mayor abundancia fue *Fusarium*, que se registró la presencia de *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. foetens*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* distribuidos en 13 unidades de aislamiento y una morfoespecie sin identificar *Fusarium* sp. con dos individuos que presentaron diferencias de características macroscópicas y microscópicas, en relación con las otras cinco especies identificadas. De forma análoga, se procedió para la clasificación de tres aislados del género *Trichoderma* sp., los cuales se agrupó en dos morfoespecies de acuerdo sus características morfológicas.

Tabla 9*Abundancia de especies de hongos filamentosos identificados*

#	Especie	N° individuos	Abundancia relativa (p_i)	Rol ecológico
1	<i>Chaetomium cochliodes</i>	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos y bacterias (Kang et al., 1999; Salo et al., 2020).
2	<i>Clonostachys chloroleuca</i>	2	0.0392	Fitopatógeno (Madrassi et al., 2023)
3	<i>Clonostachys divergens</i>	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos y saprófito (Phaund et al., 2023).
4	<i>Clonostachys solani</i>	3	0.0588	Antagonista contra hongos fitopatógenos y saprófito (Flores-Bazauri et al., 2015; Phaund et al., 2023).
5	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos y saprófito (Larena et al., 2005)
6	<i>Fusarium culmorum</i>	3	0.0588	Fitopatógeno (Wagacha & Muthomi, 2007)
7	<i>Fusarium equiseti</i>	3	0.0588	Fitopatógeno (Pérez-Corral et al., 2015)

8	<i>Fusarium foetens</i>	4	0.0784	Fitopatógeno (Schroers et al., 2004)
9	<i>Fusarium oxysporum</i>	3	0.0588	Fitopatógeno (Gordon, 2017)
10	<i>Fusarium verticillioides</i>	1	0.0196	Fitopatógeno (Picot et al., 2010)
11	<i>Fusarium sp.</i>	2	0.0392	Fitopatógeno (Torbati et al., 2021)
12	<i>Minimedusa polyspora</i>	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos (Beale & Pitt, 1995)
13	<i>Mucor circinelloides</i>	2	0.0392	Patógeno para mamíferos (López-Fernández et al., 2018)
14	<i>Mucor griseocyanus</i>	1	0.0196	Saprófito (Richardson & Rautemaa-Richardson, 2019)
15	<i>Mucor hiemalis</i>	2	0.0392	Saprófito (Kunimoto et al., 1977)
16	<i>Mucor janssenii</i>	2	0.0392	Saprófito (Wagner et al., 2020)
17	<i>Mucor moelleri</i>	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos (Nartey et al., 2022)
18	<i>Penicillium camemberti</i>	2	0.0392	Saprófito (Ropars et al., 2020)

19	<i>Trichoderma asperellum</i>	5	0.0980	Antagonista contra hongos fitopatógenos (Stracquadiano et al., 2020)
20	<i>Trichoderma hamatum</i>	5	0.0980	Antagonista contra hongos fitopatógenos, bacterias, nemátodos e insectos (Baazeem et al., 2021)
21	<i>Trichoderma paraviridescens</i>	2	0.0392	Saprófito (Goh et al., 2018)
22	<i>Trichoderma</i> sp. (T1)	1	0.0196	Antagonista contra hongos fitopatógenos (Samuels, 2006)
23	<i>Trichoderma</i> sp. (T2)	2	0.0392	Antagonista contra hongos fitopatógenos (Samuels, 2006)
24	<i>Xylaria</i> sp.	1	0.0196	Saprófito (Ferrari et al., 2021)

Nota. T1 y T2, corresponde a morfoespecies diferenciadas por sus características de crecimiento macroscópico en medio PDA.

Los índices de riqueza se presentan en la tabla 10 y cuyos valores fueron de $D_{mg} = 5.85$, $H' = 3.03$, $D = 0.055$, $D' = 0.945$ y $J' = 0.954$. Por su parte, las especies esperadas de acuerdo con el estimador no paramétrico Chao 1 fue de $S_{Chao1} = 28.96 \approx 29$ especies. El número de singletons y doubletons representó el 70.8% de las especies identificadas.

Tabla 10

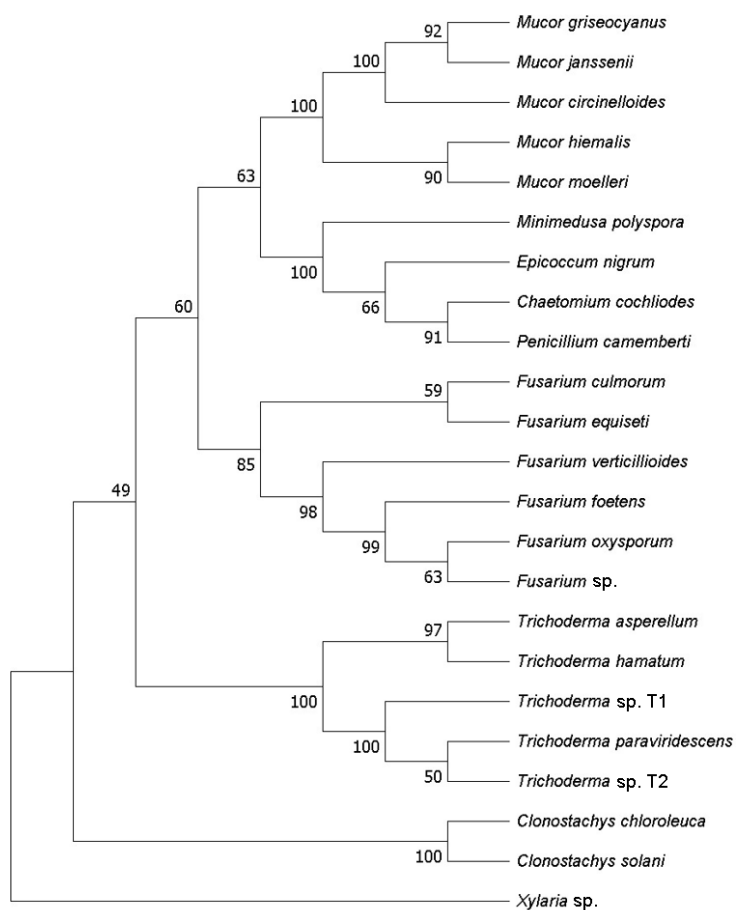
Resultados de la evaluación de biodiversidad de hongos filamentosos presente en el suelo

Parámetro	Valor
Riqueza (s)	24 especies
Riqueza esperada (s_{chao1})	28.96 \approx 29 especies
Abundancia (N)	51 individuos
Índice de Margalef (D_{mg})	5.85
Índice de Shannon-Wiener (H')	3.03
Índice de dominancia de Simpson (D)	0.055
Índice de diversidad de Simpson (D')	0.945
Índice de equidad de Pielou (J')	0.954

Elaboración del árbol filogenético. El alineamiento y análisis de secuencias de la región ITS propias de las 20 especies identificadas junto con las 4 especies no tipificadas, dio como resultado el árbol filogenético consenso como se indica en la figura 7, el cual resultó de la configuración de bootstrap a partir de 500 réplicas, el método de estimación de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo de Tamura-Nei para inferir la historia evolutiva.

Figura 7

Árbol filogenético de especies identificadas de hongos filamentosos del suelo del sector de Avicultura de la hacienda “El Prado” – IASA I.



Nota. El árbol consenso se obtuvo por el método de máxima verosimilitud, el modelo evolutivo de Tamura-Nei y configuración de bootstrap con 500 réplicas. El porcentaje de iteraciones en las que se presentó cada agrupamiento de taxones se muestra junto a las ramas.

Establecimiento del Cepario. Los 24 aislamientos identificados a nivel molecular fueron crioconservados para la conformación del cepario en el Laboratorio de Agrobiotecnología, además se incluyó la ficha de identificación morfo-molecular de acuerdo con el código asignado descrito en el anexo C.

Capítulo V

Discusión

El presente estudio empleo caracterización morfológica y molecular, con el objetivo de identificar hongos filamentosos del sector de avicultura suelo de la Hacienda “El Prado” – IASA I. El muestreo de microorganismos mediante el uso de trampas de arroz como sustrato facilitó la captura diferentes 51 aislamientos puros, de forma análoga a los resultados obtenidos en ensayos anteriores (Escobar Pardo, 2014; Yáñez Yáñez, 2014). Existen alternativas usadas para la caracterización de biodiversidad fúngica de las que predominan el método de diluciones seriadas, siembra directa y cultivo líquido (Alsohaili & Bani-Hasan, 2018), sin embargo, estas técnicas requieren más recursos y tiempo para identificar especies raras, puesto que en su mayoría las esporas más abundantes y aptas serán las que colonicen el medio de cultivo (Ortiz Paucay, 2016).

Por el contrario, el aislamiento con el uso de trampas es un enfoque de bajo costo, que se destaca por permitir la captura de una amplia gama de microorganismos, valoración anticipada de los tipos de crecimiento o morfoespecies y procesos de purificación de cepas eficientes. Sin embargo, esta metodología implicó limitaciones como la pérdida de trampas debido a factores que incluyen las características del terreno, la época del año, actividad humana, limitaciones en los dispositivos de ubicación empleados, contaminación bacteriana, entre otros. La contaminación bacteriana se presentó en las cajas con visible exceso de humedad, lo que se explica por la escasa aireación que facilita el crecimiento bacteriano (Qiu et al., 2022), a la vez que impide el desarrollo y colonización de hongos filamentosos por su naturaleza aerobia (Gomes et al., 2023).

A partir de la caracterización macroscópica fue posible el agrupamiento de los individuos en 31 morfoespecies, de las cuales la identificación molecular determinó 24 especies, mostrando que en ocasiones a pesar de presentar aislados con notables diferencias fenotípicas corresponden a la misma especie, lo que se presenta por el alto grado de

plasticidad fenotípica de algunas especies (Senanayake et al., 2020), aún en condiciones controladas de laboratorio.

La caracterización microscópica y la identificación con claves dicotómicas es una metodología clásica ampliamente utilizada debido a su replicabilidad para el objetivo de identificación de microorganismos (Wagner et al., 2020). Por este proceso se facilitó el reconocimiento de géneros como *Fusarium* spp, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. y *Mucor* spp., no obstante, el reconocimiento a nivel de especie al igual de géneros poco comunes se ve restringido por el poco o nulo desarrollo de estructuras reproductivas, ausencia de esporulación, un tiempo mayor para el procedimiento para la identificación a comparación de técnicas moleculares y la asociación errónea de especies diferentes en un mismo grupo debido a la poca experiencia en el campo del investigador (Gautam et al., 2022).

La formación de clamidosporas impidió en ocasiones la identificación con claves dicotómicas. El almacenamiento a 4°C los hongos condujo a provocar estrés térmico y con ello el desarrollo de estructuras con paredes celulares gruesas como adaptación a estas condiciones y la ausencia de formación de conidios (Sun et al., 2019). Es por lo que se deben mantener condiciones favorables para el desarrollo de conidios y esporulación, lo que a su vez se ve limitado por la diferencia del ritmo y dinámica de crecimiento de las diferentes especies. Además, la caracterización fenotípica de las especies a nivel macro y microscópico, se ve comprometida por los llamados caracteres morfológicos superpuestos entre diferentes especies, sin embargo, se ha establecido que el uso conjunto de caracteres fenotípicos, genotípicos, ecológicos y fisiológicos, conduce a identificaciones de microorganismos con mayor precisión (Manawasinghe et al., 2019; Senanayake et al., 2020).

Se mostró en varios aislados la presencia de exudados sobre el micelio o modificando la tonalidad el medio de cultivo, este fenómeno se produce por la liberación por gutación de metabolitos secundarios que producen naturalmente los hongos, en los que se incluye micotoxinas, agentes citotóxicos, antibióticos, fungicidas, insecticidas, antivirales, entre otros

(Keller, 2019). Dichos compuestos no son esenciales para la supervivencia del microorganismo, pero facilitan su adaptación a entornos específicos, con lo cual consiguen protección al daño por luz UV, crear rutas de señalización y realizar interacciones de simbiosis, competencia o patogenicidad (Macheleidt et al., 2016).

El protocolo de extracción convencional de ADN mediante buffer CTAB es de utilidad para obtener buena concentración de material genético. A pesar de existir pocas muestras contaminación con ARN y compuestos aromáticos, todas las muestras presentaron contaminación con sales y carbohidratos, lo que se argumenta por las características propias de la metodología. Los métodos convencionales se caracterizan por presentar menor calidad de ADN a comparación de los resultados que se obtienen con kits comerciales (Watanabe et al., 2010), sin embargo, el material genético resultante es apto para el proceso de amplificación por PCR (Ausubel et al., 2003), en el cual se pueden aplicar diluciones del ADN con agua ultrapura con el objetivo de llevar una menor cantidad de contaminantes a la preparación del master mix (Bürgmann et al., 2001). Es por lo que, a pesar a la contaminación por sales y carbohidratos registrada, se obtuvo la amplificación de los 31 aislamientos. El proceso de extracción requiere la estandarización del protocolo para géneros y especies específicas en el caso de requerir mayor calidad del material genético, puesto que las diferencias fisiológicas de las cepas pueden necesitar requerimientos en el procesamiento de las muestras.

El proceso de amplificación de ADN por PCR convencional requiere muestras de ADN íntegro de buena calidad (Lucena et al., 2016). La evaluación de la integridad de ADN registra por electroforesis en gel de agarosa para determinar si existe o no degradación del ADN (Zhang et al., 2011). Por el proceso de extracción con CTAB se obtuvo un 58.36% de muestras con una integridad de adecuada a alta y 16.66% presentó degradación parcial o total. La degradación de ADN fue influenciada por la forma y tiempo de almacenamiento, presencia de contaminantes o enzimas, entre otros (Sebastian & Oberdoerffer, 2017). El 25% de las muestras no se registró bandas visibles ni barrido, sin embargo todas las muestras incluyendo

aquellas donde se registra degradación del ADN mostraron amplificación de la región ITS, lo que indica la alta sensibilidad de la *Taq* ADN Polimerasa utilizada (de Oliveira et al., 2015), al igual que la concentración de ADN no fue suficiente para ser detectable en el gel de agarosa (Lucena et al., 2016). Además al tratarse una amplificación de un fragmento de alrededor de 600 bp, una muestra de ADN parcialmente degradado seguirá siendo de utilidad debido a la conservación del fragmento consecutivo (Pauvert et al., 2019).

La amplificación por PCR convencional dio como resultado bandas de alrededor de 600 bp. Además, se observó la presencia de bandas inespecíficas tenues de alrededor de 350 bp, lo que indica alta sensibilidad de la *Taq* ADN Polimerasa, por lo que se ajustó la temperatura de annealing (T_a) a 55°C (Romanelli et al., 2014), lo que contribuye a la especificidad de amplificación de fragmentos al evitar el acoplamiento de la polimerasa a sitios no deseados (Mattes, 2019). A pesar del ajuste de T_a , no se obtuvo la reducción total de las bandas tenues en la zona inferior del gel, sin embargo, los electroferogramas tras el proceso de secuenciación Sanger, mostraron ausencia de ruido y adecuados porcentajes de identidad para la identificación de microorganismos a nivel de especie.

La búsqueda de secuencias consenso en BLASTn permitió la identificación de 20 especies de hongos filamentosos, que fueron confirmadas por la observación microscópica. Tres de los agrupamientos de aislamientos pertenecientes a los géneros *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp., no fue posible la identificación, puesto que se presentan distancias genéticas mínimas entre especies, de manera que se requiere la amplificación complementaria de otras regiones de ADN como los genes de la β -tubulina y factor de elongación 1 α para su análisis y clasificación (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Watanabe et al., 2011).

La clasificación de los aislados de acuerdo con su rol ecológico mostró relaciones de función de acuerdo con el género. Para las especies del género *Clonostachys*, se ha observado anteriormente su acción como controlador biológico frente a enfermedades (Mouekouba et al., 2014), no obstante, *Clonostachys chloroleuca* también ha mostrado comportamiento como

patógeno al ser causante de la pudrición de la raíz de yuca (Madrassi et al., 2023). El comportamiento fitopatógeno de las especies de *Fusarium* se ha detallado ampliamente en la literatura, utilizando como huésped diversidad de plantas y en ocasiones a animales (Torbati et al., 2021), es por ello que las especies encontradas en el suelo de avicultura se clasificaron como fitopatógenos. Se ha visto que miembros del género *Mucor* se encuentran ocupando espacios ecológicos como descomponedores de la vegetación (Richardson & Rautemaa-Richardson, 2019), sin embargo, las especies pueden mostrar otros comportamientos ya sea de patógeno oportunista para *Mucor circinelloides* (López-Fernández et al., 2018) o antagonista antifúngico, en el caso de *Mucor moelleri* (Nartey et al., 2022). Las especies del género *Trichoderma* de forma general presentan apropiadas características como controladores biológicos y estimuladores de crecimiento (Samuels, 2006), exceptuando *Trichoderma paraviridescens* que se destaca por su función como organismo saprófito (Baazeem et al., 2021; Goh et al., 2018).

Por lo descrito anteriormente, la clasificación de hongos presentes en el sector puede ser de utilidad como punto de partida para inferir la calidad del suelo en base a las predominancia de organismos antagonistas frente a patógenos, sin embargo, se debe considerar que la dinámica ecológica de hongos se modifica y existen adaptaciones de las cepas específicas que pueden llevar a determinadas especies a abarcar diferentes nichos dentro de su ecosistema (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

Se utilizaron los índices de diversidad y abundancia para la evaluación de la biodiversidad de hongos filamentosos del suelo. El índice de Margalef ($D_{mg} = 5.85$) muestra la riqueza de especies en proporción al logaritmo natural de individuos muestreados, generalmente una relación más alta implica mayor riqueza de especies (Death, 2008). Por otro lado, el índice de Shannon-Wiener ($H' = 3.03$), revela información sobre la heterogeneidad de la comunidad, entendiéndose valores mayores a 2 como la similitud de abundancia entre las especies (Morris et al., 2014). Tanto el índice de dominancia ($D = 0.055$) como diversidad

(0.945) de Simpson, presentan el nivel de importancia de las especies dominantes. Finalmente, el índice de equidad de Pielou ($J' = 0.954$), representa la similitud de abundancias entre especies (Gotelli & Chao, 2013). Estos datos señalan que el sector de avicultura se considera como de alta riqueza y diversidad de especies hongos filamentosos cultivables, en donde las especies aparecen con frecuencias similares, sin presenciar la predominancia marcada de pocas especies con respecto al resto.

El resultado de las especies esperadas por estimador no paramétrico Chao 1 fue de 29 especies de hongos filamentosos, lo cual indica el límite inferior de la riqueza de hongos filamentosos cultivables del sector de avicultura (Kim et al., 2017). No obstante, el número de singletons y doubletons representó el 70.8% de las especies identificadas, lo que indica que la comunidad estaba submuestreada e implica que múltiples especies raras no fueron registradas (Chiu et al., 2014).

El árbol filogenético generado con el método de Máxima Verosimilitud presentó un esquema de estimación de la relación evolutiva entre las especies identificadas, la pertinencia de los agrupamientos registrados se sustenta en la cercanía entre especies del mismo género, así como de la proximidad evolutiva de los géneros *Clonostachys*, *Trichoderma* y *Fusarium* que pertenecen al orden Hypocreales (Rossman & Seifert, 2011). Sin embargo, al tratarse de secuencias que consideran una región del ADN, existen organismos no emparentados agrupados erróneamente, por esta razón se precisa un enfoque de análisis de filogenia basado en varios genes, para la obtención de topologías que se aproximen de mejor manera a la historia evolutiva real de estos organismos (Zhang et al., 2017).

Capítulo VI

Conclusiones

Con el estudio de la caracterización morfo-molecular de hongos filamentosos del suelo del sector de avicultura de La Hacienda “El Prado” – IASA I, se obtuvieron 51 aislamientos puros agrupados en 24 morfoespecies, de las cuales 20 se identificaron a nivel de especie y 4 a nivel de género, distribuidos en 9 géneros (*Mucor*, *Minimedusa*, *Epicoccum*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Clonastachys* y *Xylaria*) y 7 órdenes.

Los índices de riqueza y abundancia utilizados para la evaluación de la biodiversidad del suelo mostraron que el sector de avicultura presenta una alta biodiversidad ($D_{mg} = 5.85$, $H' = 3.03$), y homogeneidad de abundancia entre especies de hongos filamentosos ($D = 0.055$, $D' = 0.945$ y $J' = 0.954$). Sin embargo, el estimador no paramétrico de riqueza Chao 1 (29 especies) y la proporción de singletons y doubletons (70.8%), indican que la técnica de recolección tiene limitaciones para la captura de especies menos frecuentes.

A partir de los aislados identificados morfo-molecularmente (fichas técnicas) se estableció un criocionario en viales conteniendo discos de agar colonizados en solución protectante, los cuales fueron ingresados en el Laboratorio de Agrobiotecnología.

La presente investigación permitió el establecimiento de una línea base del sector de estudio, de acuerdo con el rol ecológico de los hongos filamentosos registrados, los cuales se clasificaron en antagonistas (41.18%), fitopatógenos (35.29%), patógenos oportunistas de animales (3.92%) y saprófitos (19.61%).

Recomendaciones

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

Considerando que la secuenciación de la región ITS en ciertos casos delimita la identificación de ciertos hongos por falta de resolución o la presencia de copias ITS no homologas en su genoma, se sugiere emplear amplificación de los genes de β -tubulina y factor de elongación 1 α , con el objetivo discriminar las distancias genéticas en especies altamente emparentadas.

Para identificar especies fúngicas no cultivables en condiciones *in vitro* o de difícil recolección, es recomendable la aplicación de técnicas con mayor sensibilidad como las de secuenciación de siguiente generación (NGS), permitiendo conocer a mayor profundidad las interacciones del microbioma del suelo y promover el uso de hongos filamentosos en bioinsumos o producción de metabolitos secundarios.

Bibliografía

- [BancoADN] (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. Universidad de Salamanca. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- [GADMR] (2021). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial (Actualización PDyOT)*. <https://www.ruminahui-aseo.gob.ec/wp-content/uploads/PDYOT-2020-2025.pdf>
- [INAMHI] (2017). *Clima. Anuarios Hidrológicos*. Retrieved 18 de diciembre de 2023 from <https://inamhi.website/anuarios-hidrologicos/>
- A.Ali, W., Al- Jaff, B., & Alsaeedi, S. (2018). Cultivation and Detection of Unculturable Fungi in Soil Using Soil Infusion Agar(SIA). *J. of al-anbar university for pure science*, 12. <https://www.iasj.net/iasj/download/aa5c43b7f7b277e1>
- Ahrendt, S. R., Mondo, S. J., Haridas, S., & Grigoriev, I. V. (2023). MycoCosm, the JGI's Fungal Genome Portal for Comparative Genomic and Multiomics Data Analyses. *Methods Mol Biol*, 2605, 271-291. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2871-3_14
- Al-Bedak, O., Sayed, R., & Hassan, S. (2019). A new low-cost method for long-term preservation of filamentous fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101417>
- Albert, C. H., Yoccoz, N. G., Edwards, T. C., Graham, C. H., Zimmermann, N. E., & Thuiller, W. (2010). Sampling in ecology and evolution — bridging the gap between theory and practice. *Ecography*, 33(6), 1028-1037. <http://www.jstor.org/stable/25790084>
- Alsohaili, S. A., & Bani-Hasan, B. M. (2018). Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the Northern Eastern desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3). <https://cutt.ly/CwS7oeqA>
- Amancha, D. X. (2023). *Determinación de la biodiversidad fúngica asociada al compost, de muestras recolectadas en tres etapas diferentes, en la comunidad Gaushi* [Trabajo de Integración Curricular, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <https://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/19601>

- Amza, J. (2018). Seed borne fungi; food spoilage, negative impact and their management: A review. *Seed*, 81, 70-79. <https://core.ac.uk/download/pdf/234684834.pdf>
- Andermann, T., Antonelli, A., Barrett, R. L., & Silvestro, D. (2022). Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning. *Front Plant Sci*, 13, 839407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.839407>
- Arce Carriel, M. (2009). Normal climática y distribución de la precipitación de la hacienda El Prado-IASA. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 8(4-5). <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/1422>
- Arenas Guzmán, R. (2014). Taxonomía y Clasificación. In d. L. F. Javier (Ed.), *Micología médica ilustrada* (5 ed.). McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., & Smith, J. (2003). Preparation of Genomic DNA from Plant Tissue In K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://hoclai.files.wordpress.com/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf>
- Ávila Minga, J. D., & Quito Arias, D. N. (2019). *Identificación de la biodiversidad fúngica a través del análisis metagenómico del suelo en el área de la concesión minera Loma Larga Azuay-Ecuador* [Trabajo de Titulación de Ingeniería, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16942>
- Avilés Guzmán, M. C., & Granja Valle, G. F. (2014). *Identificación morfológica y molecular de hongos microscópicos obtenidos en cultivos comerciales enfermos, en la región interandina centro-norte del Ecuador en el período 2011-2012* [Disertación de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8763>
- Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of

- Trichoderma hamatum FB10 and Its Secondary Metabolites. *Journal of Fungi*, 7(5), 331.
<https://www.mdpi.com/2309-608X/7/5/331>
- Bagyaraj, D., & Ashwin, R. (2017). Soil biodiversity: role in sustainable horticulture. *Biodivers Hortic Crops*, 5, 1-18. <https://cutt.ly/qwS2MTSI>
- Barahona, M. F. (2013). *Plan de Manejo Ambiental del área académica y agrícola de la Carrera de Ciencias Agropecuarias - IASA I* [Tesis de maestría, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/6339>
- Barnett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4 ed.). APS Press. The American Phytopathological Society.
- Beale, R. E., & Pitt, D. (1995, 1995/03/01/). The antifungal properties of *Minimedusa polyspora*. *Mycological Research*, 99(3), 337-342. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80910-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80910-6)
- Bellemare, A., John, T., & Marquetteau, S. (2018). Fungal Genomic DNA Extraction Methods for Rapid Genotyping and Genome Sequencing. In R. P. de Vries, A. Tsang, & I. V. Grigoriev (Eds.), *Fungal Genomics: Methods and Protocols* (pp. 11-20). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5_2
- Boddy, L. (2016). Chapter 11 - Fungi, Ecosystems, and Global Change. In S. C. Watkinson, L. Boddy, & N. P. Money (Eds.), *The Fungi* (Third ed., pp. 361-400). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00011-6>
- Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23(24), 4992-4999. <https://doi.org/10.1093/nar/23.24.4992>
- Britt, K., McGee, J., & Campbell, J. (2019). An Introduction to Google Earth Pro. *Geospatial Extension Program; Virginia Tech; Department of Forest Resources and Environmental Conservation: Blacksburg, VA, USA.*

- Bürgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F., & Zeyer, J. (2001). A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 45(1), 7-20.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00213-5)
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods Mol Biol*, 2065, 5-22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Carreño Bulgarin, G. P., & Quijije Franco, G. A. (2021). *Diversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina* [Tesis de Biología, Escuela Superior Politécnica del Litoral].
<https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/53099>
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265-270. <http://www.jstor.org/stable/4615964>
- Chiriboga, B. A. (2023). *Caracterización molecular y proteómica de hongos rizoféricos en tres especies arbóreas plantadas en zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada (Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía ecuatoriana* [Trabajo de integración curricular de Ingeniería, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. Sangolquí, Ecuador.
<https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/37483>
- Chiu, C.-H., Wang, Y.-T., Walther, B. A., & Chao, A. (2014). An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good–turing frequency formula. *Biometrics*, 70(3), 671-682. <https://doi.org/10.1111/biom.12200>
- Costa, P. M. O., Souza-Motta, C. M., & Malosso, E. (2012). Diversity of filamentous fungi in different systems of land use. *Agroforestry systems*, 85(1), 195-203.
<https://doi.org/10.1007/s10457-011-9446-8>
- Cubillos, C. Á., Ramírez, M. G., & Toledo, R. L. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de

- Campoalegre (Huila). *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 1(1), 15-20.
<https://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/145>
- de Oliveira, F. L. A., de Azevedo, M. J. N., Barbosa, A. N., de Souza Rodrigues, R., dos Santos Reis, R., & Rocha, D. A. P. (2015). Use of different Taq DNA polymerases for detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical samples. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6(4), 6-6.
- Death, R. (2008). Margalef's Index. In S. E. Jørgensen & B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 2209-2210). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00117-8>
- Delgado, E. F., Valdez, A. T., Covarrubias, S. A., Tosi, S., & Nicola, L. (2021). Soil Fungal Diversity of the Aguarongo Andean Forest (Ecuador). *Biology*, 10(12), 1289.
<https://www.mdpi.com/2079-7737/10/12/1289>
- Díaz-Urbano, M., Goicoechea, N., Velasco, P., & Poveda, J. (2023). Development of agricultural bio-inoculants based on mycorrhizal fungi and endophytic filamentous fungi: Co-inoculants for improve plant-physiological responses in sustainable agriculture. *Biological Control*, 182, 105223. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105223>
- Doula, M. K., & Sarris, A. (2016). Chapter 4 - Soil Environment. In S. G. Pouloupoulos & V. J. Inglezakis (Eds.), *Environment and Development* (pp. 213-286). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62733-9.00004-6>
- Enriquez Brito, J. L., & Viera Briones, J. L. (2010). *Caracterización preliminar de aislamiento de microorganismos, mediante la técnica de EM, a nivel de comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente diferentes* [Tesina, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/31467>
- Escobar Pardo, Ó. F. (2014). Extracción e identificación de microorganismos asociados al cultivo del ají (*Capsicum annum*) en La Mesa (Cundinamarca). *Revista Sennova*:

- Revista del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación*, 1(1), 156-174.
<https://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/90>
- Espinoza, T. (2003). ¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao.
Elementos Ciencia y cultura, 52, 53-56. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29405209.pdf>
- Felsenstein, J. (1983). Parsimony in Systematics: Biological and Statistical Issues. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14(1), 313-333.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.14.110183.001525>
- Feranchuk, S., Belkova, N., Potapova, U., Kuzmin, D., & Belikov, S. (2018). Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. *Research in microbiology*, 169(4), 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.004>
- Ferrari, R., Gautier, V., & Silar, P. (2021). Chapter Three - Lignin degradation by ascomycetes. In M. Morel-Rouhier & R. Sormani (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 99, pp. 77-113). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.006>
- Flores-Bazauri, W., Chico-Ruíz, J., & Cerna-Rebaza, L. (2015). Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. Antagonistic in vitro activity of *Clonostachys rosea* on *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*.
- Flores, F. (2021). Extracción de ADN Genómico de bacterias, hongos o plantas. In *Protocolo para la identificación molecular de microorganismos*. IDgen. Identificación Molecular.
- Fraç, M., Hannula, S. E., Bełka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in microbiology*, 9, 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- García, M. A., García, S. C., Gordillo, J. M., & Martínez, R. F. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28.
<https://www.redalyc.org/pdf/4578/457845138002.pdf>

- Gardi, C., & Jeffery, S. (2009). *Soil biodiversity*. European Commission. Institute for Environment and Sustainability (Joint Research Centre). Citeseer.
<https://doi.org/10.2788/7831>
- Gautam, A. K., Verma, R. K., Avasthi, S., Sushma, Bohra, Y., Devadatha, B., Niranjana, M., & Suwannarach, N. (2022). Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. *Journal of Fungi*, 8(3), 226. <https://doi.org/10.3390/jof8030226>
- GBIF-Secretariat. (2023). *GBIF Backbone Taxonomy*. Retrieved 24 de noviembre de 2023 from <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Goh, J., Nam, B., Lee, J. S., Mun, H. Y., Oh, Y., Lee, H. B., Chung, N., & Choi, Y.-J. (2018, 09/01). First report of six trichoderma species isolated from freshwater environment in Korea. *Korean Journal of Mycology*, 46, 213-225. <https://doi.org/10.4489/KJM.20180027>
- Gomes, D. G., Coelho, E., Silva, R., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2023). 8 - Bioreactors and engineering of filamentous fungi cultivation. In M. J. Taherzadeh, J. A. Ferreira, & A. Pandey (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 219-250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00018-1>
- González-Rivadeneira, T., Villagómez-Resendiz, R., & Barili, A. (2018). The Current Status of Ethnobiology in Ecuador. *Ethnobiology Letters*, 9(2), 206-213.
<https://www.jstor.org/stable/26607689>
- Gordon, T. R. (2017). Fusarium oxysporum and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Gotelli, N., & Chao, A. (2013). Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data. In (Vol. 5, pp. 195-211).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00424-X>
- Graser, A., Mearns, B., Mandel, A., Ferrero, V. O., & Bruy, A. (2017). *QGIS: Becoming a GIS power user. Learning Path. Master data management, visualization, and spatial analysis techniques in QGIS and become a GIS power user*. Packt Publishing Ltd.

- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, 12(3), 454-500. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.3.454>
- Hartigan, J. A. (1973). Minimum Mutation Fits to a Given Tree. *Biometrics*, 29(1), 53-65. <https://doi.org/10.2307/2529676>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ..., & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hofer, U. (2018). The majority is uncultured. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 716-717. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0097-x>
- Jacome Garrido, N. S. (2023). *Identificación de especies del género Colletotrichum en distintos hospederos, mediante indicadores morfométricos, metabólicos y moleculares* [Trabajo de integración curricular de Ingeniería, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"].
- James, T. Y., Stajich, J. E., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 291-313. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022020-051835>
- Kang, J. G., Kim, K. K., & Kang, K. Y. (1999). Antagonism and structural identification of antifungal compound from *Chaetomium cochliodes* against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 42(3), 146-150.
- Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020, 2020/07/01). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428-444. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>

- Kasi, P. D., Tenriawaru, E. P., Cambaba, S., & Triana, B. (2021, 2021/04/01). The abundance and diversity of Basidiomycetes fungi in sago bark waste. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 739(1), 012063. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/739/1/012063>
- Keller, N. P. (2019, Mar). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol*, 17(3), 167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106(7), 757-767.
- Kumar, M., & Mugunthan, M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Med J Armed Forces India*, 74(4), 333-336. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2017.07.009>
- Kunimoto, R. K., Ito, P. J., & Ko, W. (1977). *Mucor* rot of guava fruits caused by *Mucor hiemalis*. *Tropical Agriculture*, 54(2), 185-187.
- Læssøe, T., & Petersen, J. (2011). Collectors of fungi in Ecuador - a preliminary annotated list. *MycoKey Ecuador*. <https://www.mycokey.com/Ecuador/HistoryStart.html>
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J. F., Lichou, J., de Eribe, X. O., & Usall, J. (2005). Biological control of postharvest

- brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, 32(2), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>
- López-Fernández, L., Sanchis, M., Navarro-Rodríguez, P., Nicolás, F. E., Silva-Franco, F., Guarro, J., Garre, V., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., & Capilla, J. (2018). Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*, 9(1), 707-720. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1435249>
- Lucena, G., Sánchez-López, A., Barberán-Aceituno, C., Carrillo, J., Lopez-Guerrero, J., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking*, 14, 1-7. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Luna Ludeña, M. P. (2012). *Análisis y Aplicación de técnicas geoestadísticas para la clasificación agrológica de los suelos de la Hacienda el Preado IASA - ESPE* [Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional]. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/7882/3/CD-4618.pdf>
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2007, 2007/02/01/). Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 26(2), 145-161. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.04.014>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 371-392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Madrassi, L. M., González, R. D., Mónaco, C. I., Zapata, P. D., & Alvarenga, A. E. (2023). *Clonostachys chloroleuca*: A novel pathogen causing cassava root rot disease in Misiones Province, Argentina. *New Disease Reports*, 48(2), e12229. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12229>

- Magan, N., Gouma, S., Fragoeiro, S., Shuaib, M. E., & Bastos, A. C. (2022). Chapter 10 - Bacterial and fungal bioremediation strategies. In S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation (Second Edition)* (pp. 193-212). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00028-X>
- Magnoli, K., Carranza, C., Aluffi, M., Magnoli, C., & Barberis, C. (2023). Fungal biodegradation of chlorinated herbicides: an overview with an emphasis on 2,4-D in Argentina. *Biodegradation*, 34(3), 199-214. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10022-9>
- Magurran, A. (2004). Chapter 1. Introduction: measurement of (biological) diversity. In *Measuring Biological Diversity* (pp. 1-17). Blackwell Science Ltd.
- Manawasinghe, I. S., Dissanayake, A. J., Li, X., Liu, M., Wanasinghe, D. N., Xu, J., Zhao, W., Zhang, W., Zhou, Y., Hyde, K. D., Brooks, S., & Yan, J. (2019). High Genetic Diversity and Species Complexity of Diaporthe Associated With Grapevine Dieback in China [Original Research]. *Frontiers in microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01936>
- Mattes, W. (2019). The basics of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols in molecular toxicology* (pp. 1-40). CRC Press.
- McGowan, J., & Fitzpatrick, D. A. (2020). Chapter Five - Recent advances in oomycete genomics. In D. Kumar (Ed.), *Advances in Genetics* (Vol. 105, pp. 175-228). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.03.001>
- Medina, M., D'Armas, H., Jaramillo-Jaramillo, C., & San Martín, D. (2019). Análisis del contenido fúngico de algunas especies vegetales cultivadas en Ecuador. *FACSALUD-UNEMI*, 3(4), 3-12. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol3iss4.2019pp3-12p>
- Montoya-Castrillón, M., Serna-Vasco, K. J., Pinilla, L., Quiceno-Rico, J. M., Cardona-Bermúdez, L. M., & Osorio-Echavarría, J. (2021). Isolation and characterization of filamentous fungi from wood and soil samples of “La Lorena”, Sonsón, Antioquia (Colombia), natural

- reserve. *Dyna*, 88(219), 171-180.
<https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=49671317022>
- Moore, J. E., & Millar, B. C. (2020, Oct). A simple preservation method for the storage of *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium apiospermum* filamentous fungi isolated from the sputum of patients with cystic fibrosis (CF). *J Microbiol Methods*, 177, 106052.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106052>
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., & Rillig, M. C. (2014, Sep). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol*, 4(18), 3514-3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Mouekouba, L. D. O., Zhang, L., Guan, X., Chen, X., Chen, H., Zhang, J., Zhang, J., Li, J., Yang, Y., & Wang, A. (2014). Analysis of *Clonostachys rosea*-Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *PLOS ONE*, 9(7), e102690.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102690>
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S.-C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi*, 37-47. <https://cutt.ly/lwDoXedm>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews*, 94(4), 1443-1476.
<https://doi.org/10.1111/brv.12510>
- Nartey, L. K., Pu, Q., Zhu, W., Zhang, S., Li, J., Yao, Y., & Hu, X. (2022, 2022/02/01/). Antagonistic and plant growth promotion effects of *Mucor moelleri*, a potential biocontrol agent. *Microbiological Research*, 255, 126922.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126922>
- Nevalainen, H., Kautto, L., & Te'o, J. (2014). Methods for Isolation and Cultivation of Filamentous Fungi. In I. T. Paulsen & A. J. Holmes (Eds.), *Environmental Microbiology:*

- Methods and Protocols* (pp. 3-16). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-712-9_1
- Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Veldre, V., Nylinder, S., De Wit, P., Brosche, S., Alfredsson, J., Ryberg, M., & Kristiansson, E. (2010). An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Molecular ecology resources*, *10*, 1076-1081. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02850.x>
- Ortiz Paucay, L. P. (2016). *Biodiversidad fúngica en el suelo del bosque protector Aguarongo, provincia del Azuay-Ecuador* [Trabajo de Titulación de Ingeniería, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12814>
- Ortiz Villacís, J. A. (2021). *Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos presentes en el suelo de las diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua* [Trabajo de Titulación de Ingeniería, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/33664>
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K iphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, *8*, 2-25. <https://cutt.ly/DwIYMCTS>
- Pachacama Méndez, R. F. (2010). *Caracterización de los remanentes de bosque de la hacienda El Prado* [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/12626/1/T-ESPE-IASA%20I-004242.pdf>
- Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., Lesur, I., Vallance, J., & Vacher, C. (2019). Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecology*, *41*, 23-33.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las

- plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Pérez-Corral, D., González, N., Gallegos M, G., Ruiz-Cisneros, M., Berlanga, D., & Rios, C. (2015). Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6, 1629-1638.
- Phaund, W., Somaly, U., Das, K., Lee, S.-Y., & Jung, H.-Y. (2023). *Clonostachys divergens* and *Chrysosporium merdarium*: Two New Records from Soil in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 51, 91-100. <https://doi.org/10.4489/KJM.20230010>
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., & Richard-Forget, F. (2010). Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical reviews in microbiology*, 36(3), 221-231. <https://doi.org/10.3109/10408411003720209>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31, 583-590. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008&nrm=iso
- Pokharel, S., Khanal, B. C., Basnet, A., Pandey, G., & Basnet, S. (2023). DNA extraction and PCR optimization for DNA barcode analysis of commercially-grown coffee varieties in Nepal. *Kathmandu University Journal of Science Engineering and Technology*, 17. <https://journals.ku.edu.np/kuset/article/view/124>
- Pozo Cueva, D. A. (2010). *Estudio de las áreas potenciales para la reforestación de la Hacienda el Prado IASA I - Sangolquí* [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. <https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/2589?locale-attribute=en>
- Qiu, Y., Zhou, Y., Chang, Y., Liang, X., Zhang, H., Lin, X., Qing, K., Zhou, X., & Luo, Z. (2022, Nov 20). The Effects of Ventilation, Humidity, and Temperature on Bacterial Growth and

- Bacterial Genera Distribution. *Int J Environ Res Public Health*, 19(22).
<https://doi.org/10.3390/ijerph192215345>
- Quinsasamín, J. (2019). *Diversidad de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera de la Amazonía ecuatoriana* [Trabajo de Titulación de Ingeniería, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"].
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21015/1/T-IASA%20I-005491.pdf>
- Quito Betancourt, S. I. (2008). *Diseño de un sistema de costos para el área de producción lechera de la Hacienda el Prado (IASA I)* [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1467>
- Ramírez González, A. (2005). *Ecología aplicada: Diseño y Análisis Estadístico*. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Remache, A. R. (2020). *Diversidad de hongos endorizosféricos de tres especies arbóreas plantadas sobre suelos perturbados inoculados con tierra de bosque natural. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias*. [Trabajo de Titulación de Ingeniería, Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE"]. Sangolquí, Ecuador.
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/24805?show=full>
- Richardson, M. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2019). Biotic Environments Supporting the Persistence of Clinically Relevant Mucormycetes. *J Fungi (Basel)*, 6(1).
<https://doi.org/10.3390/jof6010004>
- Rohadi, H., Ilyas, M., & Ekowati, N. (2020). Preservation Technique of Filamentous Fungi Based on Inactive Metabolism at Indonesian Culture Collection (InaCC). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 593(1), 012001.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/593/1/012001>
- Rojas Triviño, A. (2011). Práctica 9. Observación y reconocimiento de hongos. In *Conceptos y Práctica de Microbiología General* (pp. 102-113). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8391>

- Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera, M. L., & Wickes, B. L. (2014). A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses*, 57(10), 612-622. <https://doi.org/10.1111/myc.12208>
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Curr Biol*, 30(22), 4441-4453.e4444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>
- Rossman, A., & Seifert, K. (2011). Phylogenetic revision of taxonomic concepts in the Hypocreales and other Ascomycota--a tribute to Gary J. Samuels. *Studies in Mycology*, 68.
- Rueda Moreno, R. J., & Caiza Sánchez, G. E. (2017). *Estudio de la optimización de la calidad del abono bocashi mediante la adición de potenciales microorganismos eficaces* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/4212>
- Rugeles Barandica, L. A., Cañar Serna, D. Y., Tibaduiza Castañeda, L. P., Jiménez Sabogal, H. R., González Almario, C., Estrada Bonilla, G. A., Bonilla Buitrago, R. R., Criollo Campos, P. J., Pérez Moncada, U. A., & Uribe Gutiérrez, L. A. (2021). Conservación y manejo de la diversidad microbiana en los bancos de germoplasma para la alimentación y la agricultura en Colombia. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7404845>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salo, J. M., Kedves, O., Mikkola, R., Kredics, L., Andersson, M. A., Kurnitski, J., & Salonen, H. (2020). Detection of *Chaetomium globosum*, *Ch. cochliodes* and *Ch. rectangulare* during the Diversity Tracking of Mycotoxin-Producing *Chaetomium*-like Isolates Obtained in Buildings in Finland. *Toxins*, 12(7), 443. <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/7/443>

- Samuels, G. J. (2006). Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*®, 96(2), 195-206. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0195>
- Sandoval, N. S. E., Ocaña, J. C. M., & Castillo, B. D. P. (2020). Caracterización Molecular de la Diversidad Fúngica de los Bosques Lluçud y Palictahua: Potencialidades en Control Biológico. *KnE Engineering*, 5(2). <https://doi.org/10.18502/keg.v5i2.6249>
- Sankha, B. (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. In B. Yusuf (Ed.), *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences* (pp. Ch. 2). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Schneider, S., Hartmann, M., Enkerli, J., & Widmer, F. (2010). Fungal community structure in soils of conventional and organic farming systems. *Fungal Ecology*, 3(3), 215-224.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., ..., & Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoch, C. L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciuffetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., ..., & Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224-239. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
- Schroers, H. J., Baayen, R. P., Meffert, J. P., de Gruyter, J., Hooftman, M., & O'Donnell, K. (2004, Mar-Apr). *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids

- (*Begonia x hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Mycologia*, 96(2), 393-406.
- Sebastian, R., & Oberdoerffer, P. (2017). Transcription-associated events affecting genomic integrity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 20160288.
- Senanayake, I., Rathnayaka, A., Marasinghe, D., Calabon, M., Gentekaki, E., Lee, H., Hurdeal, V., Pem, D., Dissanayake, L., & Wijesinghe, S. (2020). Morphological approaches in studying fungi: Collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*, 11(1), 2678-2754.
- Serna-Domínguez, M. G., Andrade-Michel, G. Y., Arredondo-Bernal, H. C., & Gallou, A. (2018). Two efficient methods for isolation of high-quality genomic DNA from entomopathogenic fungi. *J Microbiol Methods*, 148, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.012>
- Sharma, N., Sharma, N., Sharma, S., Sharma, P., & Devi, B. (2023). Chapter 3 - Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. In A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, & T. C. Bhalla (Eds.), *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 47-84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>
- Siddique, A. B., Albrechtsen, B. R., Ilbi, H., & Siddique, A. B. (2022). Optimization of Protocol for Construction of Fungal ITS Amplicon Library for High-Throughput Illumina Sequencing to Study the Mycobiome of Aspen Leaves. *Applied Sciences*, 12(3), 1136. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/3/1136>
- Singara Charya, M. A. (2015). Fungi: An Overview. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. V. Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement* (pp. 197-215). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_7

- Singh, S. K., & Baghela, A. (2017). Cryopreservation of Microorganisms. In A. Varma & A. K. Sharma (Eds.), *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes* (pp. 321-333). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_21
- Soria Guerra, A. M. (2015). *Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de haba (vicia faba l.) sector La Urbina, cantón Pillaro, Tungurahua 2015* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Coopaxi]. <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2540>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016, 2016/09/01). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Speers, A., & Forbes, J. (2015). 1 - Yeast: An overview. In A. E. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology* (pp. 3-9). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00001-0>
- Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *Journal of Fungi*, 6(4), 263. <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/4/263>
- Sun, Z.-B., Zhang, J., Sun, M.-H., & Li, S.-D. (2019). Identification of genes related to chlamydospore formation in *Clonostachys rosea* 67-1. *MicrobiologyOpen*, 8(1), e00624. <https://doi.org/10.1002/mbo3.624>
- Sutton, B. C. (2014). FUNGI | Classification of the Deuteromycetes. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 30-34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00140-3>
- Sydow, H. (1939). Ecuadorian fungi. (First series.). *Ann. mycol.*, 37(4-5), 275-478. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19421100365>

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tomalo Guanoluisa, M. A. (2015). *Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de fresa (fragaria vesca) en el sector de Salache Barbapamba, cantón Salcedo, Cotopaxi 2015* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi].
<https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2509>
- Torbati, M., Arzanlou, M., & da Silva Santos, A. C. (2021). Fungicolous Fusarium Species: Ecology, Diversity, Isolation, and Identification. *Current Microbiology*, 78(8), 2850-2859.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02584-9>
- Tournas, V. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical reviews in microbiology*, 31(1), 33-44.
<https://doi.org/10.1080/10408410590886024>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W232-W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Unterseher, M., Schnittler, M., Dormann, C., & Sickert, A. (2008). Application of species richness estimators for the assessment of fungal diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 205-213. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01128.x>
- Valdez, A., & Covarrubias, S. (2021). Fungal diversity in high Andean ecuadorian forest soil. *Authorea Preprints*. <https://doi.org/10.22541/au.161546623.36028736/v1>
- Valdez, C. G., Guzmán, M. A., Valdés, A., Forougbakhch, R., Alvarado, M. A., & Rocha, A. (2018). Estructura y diversidad de la vegetación en un matorral espinoso prístino de Tamaulipas, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1674-1682.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32135>

- Valencia, C. A., Pervaiz, M. A., Husami, A., Qian, Y., & Zhang, K. (2013). Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks. In C. A. Valencia, M. A. Pervaiz, A. Husami, Y. Qian, & K. Zhang (Eds.), *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics* (pp. 3-11). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9032-6_1
- Valle, F., Moreno, V., Silvestro, L., Castellari, C., Diaz Delfino, A., Andreoli, Y., & Picone, L. (2019). Diversidad Fúngica en Suelos con diferentes usos en la región Pampeana Argentina. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35, 163-172. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000301>
- Vandegrift, R., Newman, D. S., Dentinger, B. T. M., Batallas-Molina, R., Dueñas, N., Flores, J., Goyes, P., Jenkinson, T. S., McAlpine, J., Navas, D., Policha, T., Thomas, D. C., & Roy, B. A. (2023). Richer than Gold: the fungal biodiversity of Reserva Los Cedros, a threatened Andean cloud forest. *Botanical Studies*, 64(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40529-023-00390-z>
- Vega Acosta, J. P. (2016). *Evaluación de microorganismos nativos en el proceso de degradación de materia orgánica en compostaje del Relleno Sanitario en el GAD del Cantón de la Joya de los Sachas* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/4949>
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. In J. M. Keith (Ed.), *Bioinformatics: Volume I: Data, Sequence Analysis, and Evolution* (pp. 3-33). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1
- Volk, T. J. (2013). Fungi. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 624-640). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00062-9>
- Wade, W. (2002). Unculturable bacteria--the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*, 95(2), 81-83. <https://doi.org/10.1177/014107680209500207>

- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007). *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877-885. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>
- Wagner, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartze, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2020). A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia*, 44, 67-97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi and, Y., & Hara-Kudo, Y. (2010). Rapid and Effective DNA Extraction Method with Bead Grinding for a Large Amount of Fungal DNA. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1077-1084. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.6.1077>
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K.-i., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., & Hara-Kudo, Y. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 322. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-322>
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species* (3 ed.). CRC press.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). Chapter 1 - Introduction. In *Introduction to fungi* (3 ed., pp. 1-39). Cambridge University Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Vol. 31, pp. 315-322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Xu, X., Wang, H., Guo, D., Man, X., Jun, L., Li, J., Luo, C., Zhang, M., Zhen, L., & Liu, X. (2021). Curcumin modulates gut microbiota and improves renal function in rats with uric acid

- nephropathy. *Renal Failure*, 43, 1063-1075.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2021.1944875>
- Yáñez Yáñez, Á. W. (2014). *Aprovechamiento de los EM (microorganismos eficientes) para mejorar la calidad del abono orgánico tipo compost* [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/6797>
- Yang, Y., Shen, Z., Bissett, A., & Viscarra Rossel, R. A. (2022). Estimating soil fungal abundance and diversity at a macroecological scale with deep learning spectrotransfer functions. *SOIL*, 8(1), 223-235. <https://doi.org/10.5194/soil-8-223-2022>
- Yu, L., & Gong, P. (2012). Google Earth as a virtual globe tool for Earth science applications at the global scale: progress and perspectives. *International Journal of Remote Sensing*, 33(12), 3966-3986.
- Zent, E. L., & Zent, S. (2012). A primer on ethnobiological methods for ethnomycological research: studying folk biological classification systems. In *Mushrooms in Forests and Woodlands: Resource Management, Values and Local Livelihoods* (pp. 39-60). Routledge.
- Zhang, J.-H., Wang, F., & Wang, T.-Y. (2011). A simple and effective SuperBuffer for DNA agarose electrophoresis. *Gene*, 487(1), 72-74.
- Zhang, N., Luo, J., & Bhattacharya, D. (2017). Chapter Eight - Advances in Fungal Phylogenomics and Their Impact on Fungal Systematics. In J. P. Townsend & Z. Wang (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 100, pp. 309-328). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.004>
- Zhang, W., & Sun, Z. (2008). Random local neighbor joining: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47(1), 117-128.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.01.019>
- Zhang, Y., Koehler, A. V., Wang, T., & Gasser, R. B. (2021). Chapter One - Enterocytozoon bieneusi of animals—With an ‘Australian twist’. In D. Rollinson & J. R. Stothard (Eds.),

Advances in Parasitology (Vol. 111, pp. 1-73). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.10.001>

Zhang, Y. J., Zhang, S., Liu, X. Z., Wen, H. A., & Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 114-118. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x>

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Zhou, L. W., & May, T. W. (2023). Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era. *Mycology*, 14(1), 52-59. <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2103194>

