



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

Pérez Mejía Laura Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Biotecnóloga

Dr. Rueda Ortiz Darwin Arturo

26 de marzo de 2024

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



Plagiarism and AI Content Detection Report

Pérez Laura\_Trabajo de Integración C...

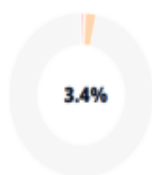
### Scan details

Scan time:  
March 6th, 2024 at 16:16 UTC

Total Pages:  
62

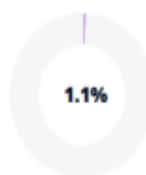
Total Words:  
15453

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Words
Identical	0.5% 70
Minor Changes	0.2% 28
Paraphrased	1.9% 290
Omitted Words	27.1% 4181

### AI Content Detection



Text coverage	Words
AI text	1.1% 156
Human text	98.9% 11116

[Learn more](#)

Firma:



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 Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración"**, fue realizado por la señorita **Pérez Mejía, Laura Valeria**, 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, 26 de marzo de 2024



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, **Pérez Mejía, Laura Valeria**, con cédula de ciudadanía N° 1724254048, 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 Horticultura y Fruticultura 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, 26 de marzo de 2024

.....  
**Pérez Mejía, Laura Valeria**

C.C.: 1724254048



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Pérez Mejía Laura Valeria**, con cédula de ciudadanía N° 1724254048, 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 Horticultura y Fruticultura 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, 26 de marzo de 2024

**Pérez Mejía, Laura Valeria**

C.C.: 1724254048

## Dedicatoria

*A mis padres, Germán y Mónica; a mis hermanas Carla y Daniela; a mis sobrinos Lian y Josué; a mi compañera fiel Princesa; al amor de mi vida Alexander; a mis amigos y amigas, por ser mis pilares, mi fortaleza y apoyo incondicional durante todo el proceso.*

**Laura Valeria Pérez Mejía**

## **Agradecimientos**

*A mis padres, Mónica y Germán por su apoyo, guía, dedicación y amor, gracias por enseñarme el valor del estudio y la vida.*

*A mis hermanas Daniela y Carla por brindarme su alegría y compañía, y por darme a los seres más preciados en mi vida Lian y Josué.*

*A mi compañera de vida Princesa por su fidelidad y amor incondicional.*

*Al amor de mi vida Alexander por el amor sincero, apoyo inquebrantable y ser mi luz en los días más difíciles.*

*A mis compañeros José y Romina por su apoyo y arduo trabajo durante todo el proceso de investigación.*

*A mis amigas y amigos del colegio y universidad por su amistad sincera y los recuerdos inmemorables juntos.*

*A la Ing. Ariana por su orientación, apoyo, paciencia y dedicación durante todo el desarrollo de mi proyecto de integración curricular*

*Al Dr. Darwin por su confianza, guía y ayuda durante todo el proceso de investigación.*

**Laura Valeria Pérez Mejía**

## Tabla de Contenido

<b>Dedicatoria</b> .....	<b>6</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>14</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>15</b>
<b>Capítulo I</b> .....	<b>16</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<i>General</i> .....	<i>19</i>
<i>Específicos</i> .....	<i>19</i>
<b>Capítulo II</b> .....	<b>19</b>
<b>Revisión de la literatura</b> .....	<b>19</b>
<i>Hongos en los suelos</i> .....	<i>19</i>
<i>Clasificación de los hongos</i> .....	<i>20</i>
<i>Reproducción de los hongos</i> .....	<i>22</i>
<i>Trampas microbianas</i> .....	<i>23</i>
<i>Identificación morfológica de hongos filamentosos</i> .....	<i>23</i>
<i>Extracción de ADN</i> .....	<i>24</i>
<i>PCR convencional</i> .....	<i>25</i>
<i>Región ITS</i> .....	<i>25</i>
<i>Secuenciación</i> .....	<i>26</i>



<i>Análisis bioinformático</i> .....	27
<i>Análisis filogenético</i> .....	28
<i>Conservación de hongos</i> .....	28
<i>Medición de la diversidad de especies</i> .....	28
<b>Capítulo III</b> .....	<b>29</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>29</b>
<i>Área de estudio</i> .....	29
<i>Trampas microbianas</i> .....	30
Preparación de trampas microbianas .....	30
Instalación de trampas microbianas .....	30
Recuperación de trampas microbianas .....	31
<i>Preparación de medios de cultivo</i> .....	31
Preparación de medio de cultivo papa agar dextrosa (PDA) .....	31
Preparación de medio de cultivo líquido peptona dextrosa .....	31
Preparación de medio de crioconservación .....	32
<i>Aislamiento y purificación de hongos filamentosos</i> .....	32
<i>Identificación de hongos</i> .....	33
Identificación macroscópica .....	33
Identificación microscópica .....	33
<i>Inoculación de hongos en medio líquido</i> .....	34
<i>Extracción de ADN</i> .....	34
<i>Cuantificación de ADN y estimación de pureza por espectrofotometría</i> .....	35
<i>Evaluación de integridad de ADN</i> .....	36
<i>Amplificación de región ITS mediante PCR convencional</i> .....	37
<i>Evaluación de presencia y longitud de producto amplificado</i> .....	38

	10
<i>Secuenciación</i> .....	39
<i>Análisis Bioinformático</i> .....	39
Análisis, limpieza y ensamblaje de secuencias. ....	39
Identificación de la especie en bases de datos.....	40
Árbol filogenético.....	41
<i>Evaluación de biodiversidad</i> .....	41
<i>Conservación de hongos y cepario</i> .....	43
<b>Capítulo IV</b> .....	<b>43</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>43</b>
<i>Identificación morfológica de especies de hongos filamentosos</i> .....	43
<i>Purificación de ADN</i> .....	51
<i>Integridad de ADN</i> .....	53
<i>Identificación molecular de hongos</i> .....	54
<i>Árbol filogenético</i> .....	56
<i>Evaluación de diversidad</i> .....	57
<i>Establecimiento del cepario de microorganismos</i> .....	59
<b>Capítulo V</b> .....	<b>60</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>60</b>
<i>Identificación morfológica de especies de hongos filamentosos</i> .....	60
<i>Concentración y pureza de ADN</i> .....	62
<i>Integridad del ADN</i> .....	63
<i>Identificación molecular de hongos</i> .....	63
<i>Árbol filogenético de máxima verosimilitud</i> .....	65
<i>Índices de diversidad</i> .....	66

<b>Capítulo VI.....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>85</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Códigos de coloraciones típicas de hongos</i> .....	33
<b>Tabla 2</b> <i>Criterios de pureza en muestras de ADN</i> .....	36
<b>Tabla 3</b> <i>Criterios de integridad de ADN en gel de agarosa</i> .....	37
<b>Tabla 4</b> <i>Primers utilizados para amplificación de región ITS</i> .....	37
<b>Tabla 5</b> <i>Ajuste de master mix para un volumen de reacción de 25 <math>\mu</math>L</i> .....	37
<b>Tabla 6</b> <i>Condiciones de amplificación de la región ITS</i> .....	38
<b>Tabla 7</b> <i>Hongos aislados por subparcelas</i> .....	44
<b>Tabla 8</b> <i>Agrupación de hongos aislados en base a su morfoespecie</i> .....	46
<b>Tabla 9</b> <i>Selección de cepa representativa por grupos de morfoespecie</i> .....	51
<b>Tabla 10</b> <i>Cuantificación y estimación de purezas de ADN de hongos por espectrofotometría</i> .....	52
<b>Tabla 11</b> <i>Productos de PCR mediante la amplificación de la región ITS</i> .....	55
<b>Tabla 12</b> <i>Microorganismos identificados mediante secuencia de la región ITS</i> .....	56
<b>Tabla 13</b> <i>Abundancia y clasificación de especies de hongos filamentosos</i> .....	58
<b>Tabla 14</b> <i>Análisis de índices de diversidad de hongos</i> .....	59
<b>Tabla 15</b> <i>Cepario de hongos filamentosos del sector de Horticultura y Fruticultura</i> .....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Espaciador transcrito interno (ITS)</i> .....	26
<b>Figura 2</b> <i>Principio de secuenciación Sanger</i> .....	27
<b>Figura 3</b> <i>Área de estudio del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I</i> .....	30
<b>Figura 4</b> <i>Electroferograma obtenido mediante secuenciación Sanger</i> .....	39
<b>Figura 5</b> <i>Análisis, limpieza y ensamblaje de secuencias</i> .....	40
<b>Figura 6</b> <i>Comparación en Nucleotide Blast</i> .....	41
<b>Figura 7</b> <i>Evaluación de integridad de ADN</i> .....	53
<b>Figura 8</b> <i>Amplificación de la región ITS</i> .....	54
<b>Figura 9</b> <i>Árbol filogenético de las secuencias ITS identificadas</i> .....	57

## Resumen

Los hongos son residentes destacados del suelo por su fácil adaptación a entornos desfavorables y su contribución al equilibrio de la naturaleza. Además, surgen como alternativas ecológicas de enfrentar actividades como riego, pastoreo excesivo, presencia de plagas u otros microorganismos patógenos. En la presente investigación, se efectuó la caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I. La obtención de cultivos puros de hongos se obtuvo mediante la captura de microorganismos con trampas de arroz y el posterior aislamiento y purificación de cepas en medio PDA. En seguida, se identificaron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas empleando claves dicotómicas. La identificación molecular se realizó mediante la extracción y purificación de ADN con CTAB y solventes orgánicos, la amplificación de la región ITS por PCR convencional y secuenciación Sanger. Se obtuvieron 43 cultivos puros de hongos agrupados en 23 morfoespecies, a partir de los cuales, se identificó 21 cepas a nivel de especie y 2 a nivel de género, de los cuales se distinguieron 6 géneros y 4 órdenes. Las especies con mayor abundancia fueron *Trichoderma asperellum* con 18 unidades de aislamiento y *Fusarium culmorum* con 3 individuos. El sector es una comunidad de alta diversidad ( $D_{Mg} = 5,85$ ,  $D' = 0,80$ ) manteniendo la estabilidad y ausencia de presiones ecológicas. No existió la presencia de especies dominantes, de forma que se presentó una homogeneidad entre las especies ( $D = 0,20$ ;  $J' = 0,70$ ;  $H' = 2,21$ ). El estimador no paramétrico (27 especies) y una proporción de singletons de 43,8% indicaron un grado de submuestreo. Se estableció el cepario de 23 hongos a través de la crioconservación de discos de agar con micelio en solución de glicerol 10% y peptona 0,1% y se almacenó en las instalaciones del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda "El Prado" - IASA I junto con las fichas técnicas morfo-moleculares de cada especie.

*Palabras clave:* Hongos filamentosos, identificación morfológica, molecular, cepario.

### Abstract

Fungi are notable residents of the soil due to their easy adaptation to unfavorable environments and their contribution to the balance of nature. In addition, they emerge as ecological alternatives to face activities such as irrigation, excessive grazing, presence of pests or other pathogenic microorganisms. In the present investigation, the morphological and molecular characterization of filamentous fungi associated with the soils of the Horticulture and Fruitgrowing sector of the Hacienda "El Prado" - IASA I was carried out. The obtaining of pure cultures of fungi was obtained by capturing microorganisms with rice traps and the subsequent isolation and purification of strains in PDA medium. Next, macroscopic and microscopic morphological characteristics were identified using dichotomous keys. Molecular identification was performed by DNA extraction and purification with CTAB and organic solvents, amplification of the ITS region by conventional PCR and Sanger sequencing. 43 pure cultures of fungi grouped into 23 morphospecies were obtained, from which 21 strains were identified at the species level and 2 at the genus level, of which 6 genera and 4 orders were distinguished. The most abundant species were *Trichoderma asperellum* with 18 isolation units and *Fusarium culmorum* with 3 individuals. The sector is a community of high diversity ( $DMg = 5.85$ ,  $D' = 0.80$ ) maintaining stability and absence of ecological pressures. There was no presence of dominant species, so that there was homogeneity between the species ( $D = 0.20$ ;  $J' = 0.70$ ;  $H' = 2.21$ ). The non-parametric estimator (27 species) and a proportion of singletons of 43.8% indicated a degree of undersampling. The strain of 23 fungi was established through cryopreservation of agar discs with mycelium in a 10% glycerol and 0.1% peptone solution and was stored in the facilities of the Agrobiotechnology Laboratory of the Hacienda "El Prado" - IASA I along with the morpho-molecular technical sheets of each species.

*Keywords:* Filamentous fungi, morphological, molecular identification, strain collection.

## Capítulo I

### Antecedentes

Los hongos han existido desde los inicios de la tierra, antes eran considerados parte del reino vegetal. Sin embargo no fue hasta finales del siglo XVII con el descubrimiento del microscopio que comenzó el estudio formal de los hongos por el botánico italiano Pier Antonio Micheli (García, 2023). A lo largo de los siglos se realizaron numerosas aportaciones que ayudaron a la caracterización y clasificación de los hongos, hasta que en 1969 Robert Whittaker los clasificó como un nuevo reino conocido como Fungi u Hongos (Cepero et al., 2012).

En 2017, Hawksworth & Lücking estimaron entre 2,2 y 3,8 millones de especies de hongos de los cuales se han descrito 150.000. Empero, con el uso de técnicas de secuenciación de alto rendimiento estos valores continuarán en aumento (Rúa-Giraldo, 2023). En base a últimos datos no oficiales generados de estudios independientes y dependientes de cultivos, se estimó que la riqueza asciende a 11,7 - 13,2 millones de especies (B. Wu et al., 2019). Las investigaciones de las cepas de hongos del suelo permiten contribuir al conocimiento acerca de la diversidad de hongos y el potencial que tienen en la tierra, así como el establecimiento de estrategias que impulsen el progreso de los terrenos (Durán & Zapata, 2020). En un estudio de aislamiento e identificación de hongos filamentosos encontrados en suelos de Viotá, Cundinamarca aislaron colonias fúngicas por diluciones en placas encontrando entre los géneros más comunes *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cunninghamella* y *Aspergillus* (Roa, 2020). En São Luís, Maranhão, Brasil se aisló los hongos filamentosos recolectados por el método de suspensión seriada, en su mayoría obtuvo *Aspergillus*, hongos que pueden servir como indicadores biológicos de contaminación y en la biorremediación del área de estudio (Rodrigues et al., 2020). En cuanto a Pacasa-Quisbert et al. (2017) encontraron en los suelos del altiplano central de Bolivia



mayor incidencia en el género *Penicillium* seguido por *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Trichoderma*.

En el Ecuador, en la Reserva Los Cedros ubicada en la vertiente occidental de los Andes ecuatorianos se identificó la presencia de al menos 727 especies de hongos únicas representada por 4 filos, 17 clases, 40 órdenes, 101 familias y 229 géneros (Vandegrift et al., 2023). También en la provincia del Azuay se determinó la biodiversidad fúngica aislando los hongos por siembra directa y dilución en placa, además con el análisis biomolecular se obtuvo entre los géneros más comunes *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Paucay, 2016).

Actualmente, las actividades agrícolas se han visto afectadas por factores como la presencia de plagas que originan en un aumento de productos químicos, para lo cual, se ha buscado una solución menos agresiva con los cultivos y el ambiente que son los hongos utilizados como agentes de biocontrol (Bihal et al., 2023). En investigaciones de hongos entomopatógenos autóctonos se encuentra *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, y *Beauveria sp.* en contra del vector del virus de la mancha anular de la papaya conocido como el pulgón *Aphis gossypii* (Mukherjee et al., 2020). En contra de la población de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) se destaca el uso de *Beauveria bassiana* (Imam, 2017), *Metarhizium anisopliae* (Latiff et al., 2013), *Isaria fumosoroseus* (Huang et al., 2010), *Ashersonia aleyrodis* (Prayogo & Bayu, 2020) y *Verticillium lecanii* (Abdel-Raheem & Al-Keridis, 2017).

### **Justificación**

Los hongos son residentes destacados del suelo por su fácil adaptación a entornos desfavorables y contribución en el equilibrio de la naturaleza (Frąc et al., 2018). Son especies con funciones benéficas como i) controladores biológicos en plagas como artrópodos o nemátodos, ii) reguladores de ecosistemas al formar la estructura del suelo, modificar hábitats y mitigar las repercusiones de procesos ecológicos, iii) descomponedores de materia orgánica al

transformar los nutrientes para la disponibilidad de las plantas, almacenar carbono más estable, y fijar nitrógeno y fósforo (Alarcón & Ramírez, 2022).

A nivel global, las industrias agrícolas enfrentan desafíos como la pérdida en la productividad de cultivos, principalmente por la presencia de plagas de insectos que causan reducción entre el 18% y 20% de los cultivos con costos que rondan los 470 mil millones de dólares (Bihal et al., 2023). En consecuencia, han aumentado el empleo de químicos como pesticidas e insecticidas. Además, otras actividades como riego, pastoreo excesivo y ganadería también son causantes de impactos negativos en el suelo (National Geographic, 2023). Por tal motivo, es fundamental adoptar enfoques menos perjudiciales para el medio ambiente, como el empleo de hongos benéficos. En este contexto, es esencial realizar un registro de la composición del microbioma fúngico para evaluar su influencia en el funcionamiento del suelo y alrededores, así como en el establecimiento de estrategias aptas para su biorrecuperación y biocontrol (Durán & Zapata, 2020). A sí mismo, determinar la riqueza y diversidad de microorganismos sirven como indicadores biológicos que proporciona información acerca de su capacidad de reacción frente a actividades humanas o naturales (Vallejo et al., 2010).

La ausencia de estudios previos moleculares sobre el microbioma fúngico en los suelos del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I, ubicada en la provincia Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia Sangolquí, destaca la necesidad de realizar esta investigación. Un proyecto que busca el establecimiento de una línea base de hongos filamentosos para fines de biorrecuperación y el diagnóstico del rol ecológico de la diversidad fúngica del sector de Horticultura y Fruticultura.

### **Hipótesis**

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

## **Objetivos**

### ***General***

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

### ***Específicos***

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

## **Capítulo II**

### **Revisión de la literatura**

#### ***Hongos en los suelos***

El suelo es el recurso más importante de un ecosistema junto con la biodiversidad que habita en los mismos. La calidad del suelo implica la capacidad de sostener la productividad biológica, mejorar la calidad de aire y agua y respaldar la salud animal, humana y vegetal (Stivers, 2023). Por lo tanto, es importante dilucidar la biota presente en los suelos y su influencia. Entre ellos, se encuentran presentes los hongos. Los hongos son organismos eucariotas con gran variedad de distinciones morfológicas. En los suelos de horticultura, prima la diversidad de hongos beneficiosos, principalmente los hongos micorrícicos y endófitos. Sin embargo, también hay la presencia de hongos patógenos pertenecientes a ascomicetos y basidiomicetos (Fox & Boddy, 2013).

Los hongos son las especies más adaptables a entornos adversos. Su importancia radica en su capacidad de producir enzimas extracelulares que descomponen materia orgánica y otros componentes del suelo, absorben los contaminantes metálicos e interactúan con el resto de organismos. En los últimos años, ha destacado el uso de hongos en el mejoramiento de la calidad de suelo y mayor producción agrícola (Fraq et al., 2018).

Los hongos durante su ciclo de vida se dividen en unicelulares, macrofilamentosos y multicelulares filamentosos. Los hongos unicelulares son las levaduras microscópicas y los macrofilamentosos, aquellos hongos que producen cuerpos fructíferos visibles (Souza Filho, 2022). Los hongos filamentosos multicelulares presentan filamentos ramificados delgados y largos llamados hifas que tienen un crecimiento apical cuyo entrelazamiento forman el micelio, los filamentos de hifas están divididos por paredes transversales llamadas septos y además soportan esporas para su reproducción y diseminación (Asiegbu & Kovalchuk, 2021; Souza Filho, 2022). También existen los hongos dimórficos, es decir que cambian su fenotipo de levadura hasta la forma filamentosa (Cepero et al., 2012).

### ***Clasificación de los hongos***

Durante siglos, los biólogos clasificaron a los hongos como parte de las plantas; sin embargo, los hongos cuentan con quitina en sus paredes celulares, a diferencia de las plantas autótrofas y con celulosa (Chiquillo, 2015). La clasificación taxonómica de los hongos mejoró en el siglo XX con el avance de la microscopía y bioquímica, aunque se transformó con la llegada de técnicas moleculares. El reino de los hongos puede clasificarse según su filo entre los cuales se encuentran Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota y Neocallimastigomycota.

El filo Chytridiomycota producen zoosporas que necesitan agua para dispersarse, la mayoría vive en ambientes acuáticos. Los Ascomycotas representan el 65% de todas las especies de hongos y forman las ascosporas dentro del asco, una célula sexual que contiene

las esporas. En tanto que, Basidiomycota figura el 35% de las especies de hongos, producen cuerpos fructíferos y algunos de este grupo degradan la lignina (Kavanagh, 2017). Los Glomeromycotas son un grupo monofilético de hongos, se reproducen por blastosporas y forman simbiosis con plantas terrestres denominadas micorrizas. Por último, el filo Neocallimastigomycota son un grupo de hongos con flagelo, anaeróbicos obligados presentes en tracto digestivo de animales herbívoros (Naranjo & Gabaldón, 2019).

Los hongos también se pueden dividir en base a su papel o modo de nutrición en los ecosistemas (Samiksha, 2013). Los hongos saprófitos adquieren sus nutrientes en base a materia orgánica muerta y los hongos simbioses en donde hay interacción entre especies, pueden ser mutualistas, comensales y parásitos. Los hongos mutualistas resultan en un beneficio mutuo entre las dos especies, como líquenes y micorrizas. Los comensales son una relación en la que un organismo sale beneficiado mientras que el otro no se perjudica ni beneficia (Cepero et al., 2012). Por último, los hongos parásitos son aquellos en las que solamente un organismo se beneficia produciendo daños en el otro (Kavanagh, 2017). Dentro de esta última clase se encuentran los hongos entomopatógenos que cumplen con su rol en el control biológico de insectos y plagas (Pérez et al., 2020). Su función comienza con el contacto de las esporas y las cutículas de los insectos, germinan y proliferan al interior del hospedero produciendo toxinas que causan la muerte por deficiencia nutricional entre los 6-7 días. Entre ellos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecani* (Pacheco Hernández et al., 2019). Los hongos antagonistas como *Glomus* sp. o *Trichoderma* sp. que controlan enfermedades en las plantas de cultivo al suprimir hongos fitopatógenos y son usadas como bioestimulantes en cultivos hortícolas y entre los hongos patógenos se encuentran *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, entre otros (López-Bucio et al., 2015).

También, se pueden clasificar según la formación de esporas dependiendo del filo al que pertenecen, entre estos se encuentran las zigosporas, ascosporas, basidiosporas y zoosporas (Watanabe, 2010).

### ***Reproducción de los hongos***

La reproducción de hongos perfectos se da por las esporas mediante procesos sexuales y asexuales dependiendo de la especie, en tanto que, los hongos imperfectos o anamórficos se reproducen solamente de forma asexual o se desconoce su forma sexual (Naranjo & Gabaldón, 2019). La reproducción asexual en hongos se lleva a cabo mediante mecanismos de fisión y gemación, formación de esporas asexuales y conidios (Cepero et al., 2012). En la fisión, la célula madre se divide por mitosis formando una célula hija exactamente igual, mientras que en la gemación ocurre cuando el hongo desarrolla un brote o bulto que se multiplica por mitosis y se libera del progenitor formando un nuevo organismo, ambos ocurren en levaduras (Isaksson et al., 2021). Las esporas asexuales hay de dos tipos las esporangiosporas que son propágulos que se producen en los esporangios, en tanto que las zoosporas son esporas flageladas producidas en el zoosporangio, se encuentran principalmente en los filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota y Neocallimastigomycota (Cepero et al., 2012). La formación de conidios se da en el conidióforo o en una célula conidiogénica, aparecen en los filos Ascomycota y Basidiomycota o en ciertos hongos imperfectos o anamórficos (Cepero et al., 2012).

La reproducción sexual permite mayor variabilidad genética que la asexual. Este procedimiento puede ser homotálico, cuando es capaz de reproducirse sexualmente por si mismo o por el contrario, heterotálico si necesita dos individuos compatibles (Sun et al., 2019). En primer lugar, para dar inicio al ciclo sexual ocurre procesos de i) diferenciación sexual (femenino, masculino) o fenómenos de teleomorfosis (expulsión de feromonas de una hifa para estimular a otra provocando cambios fisiológicos) y cigotropismo (ambas hifas producen feromonas y crecen encorvadas una contra la otra). ii) A continuación, ocurre la plasmogamia

cuando sus paredes celulares se disuelven y fusionan sus citoplasmas. iii) A continuación, viene la etapa de cariogamia donde dos núcleos haploides compatibles se fusionan dando lugar a un núcleo diploide. iv) En la última etapa, se da la meiosis que son eventos de entrecruzamiento de cromosomas dando lugar a la esporogénesis en la que se formarán esporas sexuales haploides de dos tipos basidiosporas y ascosporas. Las ascosporas se producen en el filo Ascomycota dentro de los ascos y las basidiosporas en el filo Basidiomycota dentro de los basidios (Cepero et al., 2012; Leiva-Mora et al., 2014).

### ***Trampas microbianas***

Para evaluar la cantidad y diversidad de hongos presentes en el suelo, el primer paso es la captura de los microorganismos para lo cual se hace uso de trampas microbianas que permiten recolectar hongos (La Fertilidad de la Tierra, 2021). Para la captura de microorganismos se pueden construir trampas eficaces y de bajo costo dado que se pueden construir con materiales fáciles de obtener y sencillos en su empleo. Las trampas microbianas deben contener una alta cantidad de proteínas como cereales o leguminosas, que, además, se pueden enriquecer con jugos de pescado o carne (Yáñez, 2014). La proteína más comúnmente utilizada es el arroz blanco.

### ***Identificación morfológica de hongos filamentosos***

Para la identificación taxonómica de los hongos se describen las características macroscópicas de los cultivos al anverso como color de superficie y contorno, color de pigmento exudado, forma de la colonia y margen (irregular, liso), al reverso se observa el color de la parte interior, media y borde, la superficie interior y exterior de la colonia (Watanabe, 2010).

También, se emplean claves dicotómicas que son una herramienta fundamentada en definiciones de caracteres morfológicos a nivel macro y microscópicos (Cepero et al., 2012). A

partir de las cuales, se parten de dos posibles soluciones sobre si presentan un carácter u otro, descartando las opciones hasta llegar al organismo final. La literatura base de claves dicótomas son Barnett & Hunter (1987) y Watanabe (2010).

### **Extracción de ADN**

El proceso general para realizar una identificación molecular fúngica da inicio con la extracción del ADN. La extracción de ADN es un método de purificación que involucra la remoción de contaminantes como carbohidratos, proteínas, fenoles, entre otros desechos celulares mediante el empleo de métodos físicos y químicos con el fin de obtener buena cantidad y calidad de ADN (Gupta, 2019; Shen, 2019). Es necesario que el ADN esté puro para que diagnósticos posteriores como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de resultados confiables, sensibles y específicos (Kumar et al., 2010).

La extracción por el método orgánico se basa en el uso de fenol-cloroformo, el papel de las sustancias implicadas son el **Cloroformo** encargado de desnaturalizar proteínas y lípidos ayuda en la separación de fases orgánicas y acuosas, esta última contiene el ADN (Sharma et al., 2023). El **B mercaptoetanol** es un agente reductor que desnaturaliza proteínas rompiendo los puentes disulfuro y reduce la oxidación de los fenoles luego de la ruptura de la pared celular evitando su unión y precipitación con el ADN (Bermúdez et al., 2016; Mittmann et al., 2007). En tanto que el buffer de extracción de **bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)** es un detergente catiónico que libera los ácidos nucleicos formando complejos (F. M. Ausubel et al., 2001)

El ácido nucleico interactúa electrostáticamente (mediante puentes de hidrógeno) con el agua a través de las cargas negativas de los grupos fosfatos que conforman el nucleótido. Al añadir **Etanol**, se desplazan las moléculas del agua unidas al ADN ocasionando que la sal como **Acetato de sodio** con carga positiva se una a los iones fosfato del ADN, neutralice su carga y precipite el ADN (Marcos et al., 2019).



En la evaluación de calidad y rendimiento del ADN se utiliza la espectrofotometría, donde la muestra absorbe cantidades de luz en longitudes de onda específicas. El pico de absorción de ácidos nucleicos se registra en 260 nm (Gupta, 2019).

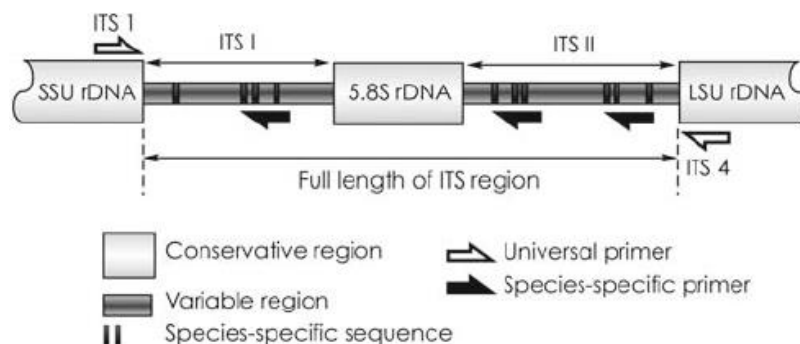
### ***PCR convencional***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una técnica de amplificación de una secuencia conocida de ADN generando copias necesarias para posteriores procesos de electroforesis y secuenciación (Dixon, 2010). La reacción en cadena de la polimerasa consta de tres etapas que son la desnaturalización, alineación y extensión. La PCR depende del emparejamiento de las bases de nucleótidos en la hélice de ADN bicatenario, para lo cual necesita una ADN polimerasa que sintetiza la cadena complementaria luego de que un cebador se coloca en un sitio específico para dar inicio a la síntesis (Valones et al., 2009).

### ***Región ITS***

Raja et al. (2017) indica que los hongos codifican tres subunidades de ARN ribosómico, la subunidad grande (nrLSU-26S o 28S), la subunidad pequeña (nrSSU-18S) y toda la región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S, ITS2). Para ubicar un organismo dentro de niveles taxonómicos superiores como familia, orden, clase, filo se amplifica la SSU, por el contrario, si solo se desea averiguar niveles taxonómicos como familia y género se amplifica la región LSU. Mientras que para identificar a nivel de especie se emplea la región ITS (Raja et al., 2017).

La caracterización molecular por la región ITS es la más utilizada en la identificación de la diversidad de especies fúngicas (Al-Harhi et al., 2023). Cada especie de hongos contiene una región ITS característica, las secuencias ITS entre dos especies de un mismo género son más similares que aquellas de diferentes géneros, motivo por el cual, esta región es considerada como el código de barras genéticos de hongos por excelencia (Maldonado et al., 2023).

**Figura 1***Espaciador transcrito interno (ITS)*

*Nota.* Región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) entre el ADNr de la subunidad pequeña (SSU-gen 5.8S rDNA) y el ADNr de la subunidad grande (LSU-28S rDNA). Los primer universales corresponden a ITS1 y ITS4. Adaptado de Horisawa et al. (2009)

**Secuenciación**

Las herramientas moleculares actuales como secuenciación de ADN han permitido investigar la diversidad de hongos sin necesidad de progresivos aislamientos en sustrato, presentando mayores ventajas sobre una identificación morfológica (Cepero et al., 2012).

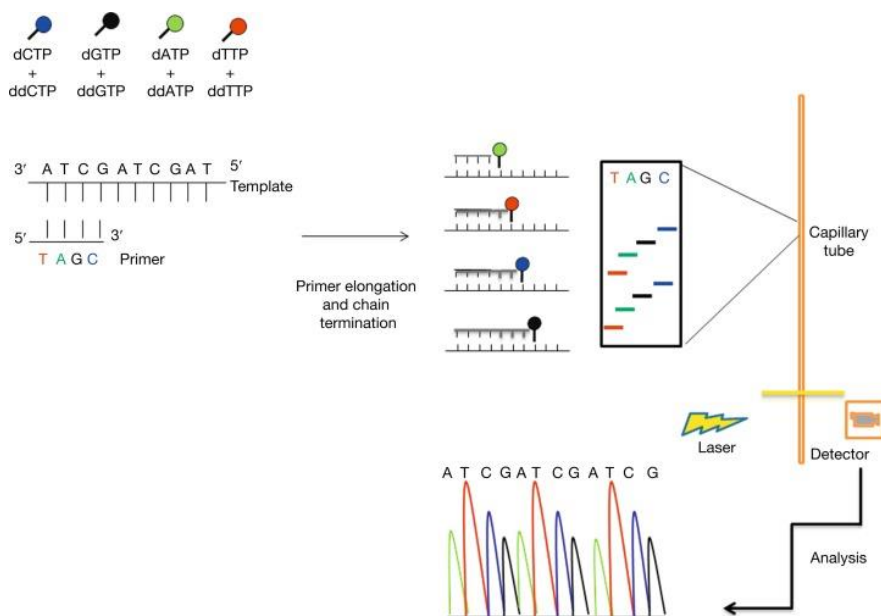
La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos adenina, guanina, citosina y timina dentro de un genoma (Amarakoon et al., 2017). Entre los métodos principales de secuenciación de ADN se encuentran el método Maxam-Gilbert, el método Sanger; y secuenciación de próxima generación (NGS) (Mitsui et al., 2015).

La secuenciación Sanger es un método de primera generación que emplea cebadores que se hibridan en sitios específicos del ADN monocatenario y se extienden mediante trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) que se detienen al juntarse con trifosfatos de didesoxinucleótidos (ddNTP) (Zhang et al., 2014). Cada ddNTP contiene un tinte fluorescente en base a su nucleótido, A con fluorescencia verde, T con fluorescencia roja, G con

fluorescencia negra y C con fluorescencia azul que son detectadas por un láser y traducidos en un pico hasta obtener un electroferograma (Gomes & Korf, 2018).

## Figura 2

### Principio de secuenciación Sanger



Nota. ddNTPs con marcadores fluorescentes se agregan a los amplicones mientras se sintetizan. La información final se obtiene en un electroferograma. Adaptado de Zhang et al. (2014).

### Análisis bioinformático

El barcoding o código de barras de ADN permite la identificación de especies basándose en pequeñas regiones del ADN ubicadas en sitios específicos que además se encuentren presentes en todas las especies (Bentos & Sosa, 2020). Para lo cual, se da inicio con el ensamblaje de secuencias que consiste en el alineamiento y combinación de fragmentos de ADN para reconstituir la secuencia original (Chen et al., 2017). De forma que se han desarrollado programas como el Staden que contiene dentro otros programas como trev para

editar cromatogramas, pregap para limpieza de secuencias y gap4 para el ensamblaje de las secuencias (COMAV Institute, 2010).

En este proceso, las secuencias desconocidas se comparan con otras secuencias registradas en bases de datos internacionales como GenBank y BLAST (herramienta de búsqueda de alineación lineal básica) permitiendo ubicarlas dentro de la filogenia (Watkinson et al., 2015).

### ***Análisis filogenético***

Es una herramienta que compara morfologías o información molecular de genes, individuos, especies y poblaciones estimando sus relaciones históricas evolutivas y representadas en un árbol filogenético o diagrama de ramificación (Hillis, 1997).

### ***Conservación de hongos***

Dentro de los métodos de conservación de hongos filamentosos se encuentra la congelación, para la supervivencia del material biológico se emplean agentes crioprotectores, como el glicerol, que son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan la membrana celular para reemplazar el agua intracelular, proteger de la formación de cristales de hielo y del colapso celular (Terreros et al., 2015). Este crioprotector se puede mezclar con otros compuestos como peptona para prolongar la viabilidad de los microorganismos (Tibaduiza et al., 2021).

### ***Medición de la diversidad de especies***

El Convenio de la Diversidad Biológica (2005) definió a la biodiversidad como la variabilidad de todos los organismos vivos y ecosistemas dentro de un área y de las interacciones ecológicas de las que forman parte (Carvalho et al., 2023). La diversidad se mide en base a la riqueza de especies y su abundancia relativa empleando indicadores.

**Abundancia:** Cantidad de individuos de una especie en un área determinada (Valdez et al., 2018).

**Abundancia relativa:** Hace referencia a la relación entre la cantidad de individuos de una especie y el número total de individuos de todas las especies presentes en un área (Ha et al., 2020).

**Riqueza:** Es definida como el número de especies dentro de un área determinada (Escalante & Morrone, 2002).

**Índice de Chao 1:** Emplea datos de distribución de especies entre muestras (Bautista et al., 2013). Analiza la presencia de especies raras (pocos individuos en la muestra) y relaciona la cantidad de especies con un solo individuo (singletons) y las especies con solo dos individuos (doubletons) (Escalante, 2003)

**Índice de Margalef ( $D_{Mg}$ ):** Mide la riqueza específica basada exclusivamente en el número de especies considerando que su riqueza no aumenta al aumentar el tamaño de muestreo (Moreno, 2001).

**Índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ):** Mide la probabilidad de que un individuo elegido al azar en un área pertenezca a una especie (Valdez et al., 2018).

**Índice de Simpson (D):** Mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en un área pertenezcan a la misma especie (Valdez et al., 2018).

### Capítulo III

#### Materiales y métodos

##### *Área de estudio*

El estudio se realizó en el área de Horticultura y Fruticultura que cuenta con un área de 86.951,81  $m^2$  ubicada entre las coordenadas 0°22'54"S 78°24'58"W, 0°22'52"S 78°24'47"W, 0°23'02"S 78°24'48"W y 0°23'04"S 78°24'55"W. El área de estudio se dividió en 100 parcelas

iguales utilizando la plataforma QGis, mismas que fueron seleccionados al azar para su posterior muestreo y se registró las coordenadas de la muestra con el uso de Google Earth.

### Figura 3

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



*Nota.* Los marcadores amarillos señalan el número de parcelas muestreadas y las coordenadas geográficas.

### **Trampas microbianas**

**Preparación de trampas microbianas.** El arroz se cocinó durante 5 minutos después de que el agua hirviera, procurando que quede en un estado semi-cocido. Posteriormente, se distribuyeron aproximadamente 50g de arroz cocinado en cada uno de los cincuenta vasos transparentes alcanzando una altura de 2 cm. Los vasos se cubrieron con dos capas de media nylon asegurándolos con una liga.

**Instalación de trampas microbianas.** Las trampas microbianas fueron transportadas hasta las diversas áreas seleccionadas al azar en el sector de Horticultura y Fruticultura

verificando que la zona tenga una buena cobertura vegetal y de preferencia bajo sombra. En primer lugar, se excavó un hoyo de 20 cm de profundidad, donde se enterraron los vasos boca abajo. Posteriormente, se cubrieron con una funda plástica, tierra y hojas secas, y por encima se colocó una cinta de identificación junto con un palillo. Las trampas se dejaron en reposo durante 15 días.

**Recuperación de trampas microbianas.** Después de los 15 días, las trampas fueron recuperadas y llevadas al laboratorio sin realizar movimientos bruscos. Además, se descartó aquellas con presencia de insectos, larvas, gusanos. Se almacenaron en oscuridad y en lugar fresco hasta llevar a cabo el posterior aislamiento de hongos.

### ***Preparación de medios de cultivo***

**Preparación de medio de cultivo papa agar dextrosa (PDA).** El volumen del medio de cultivo PDA preparado se determinó en base a la cantidad de trampas microbianas recuperadas. Para lo cual, se siguieron las instrucciones del fabricante, PDA de BD Difco, que indica se debe suspender 39 gramos del medio en 1 litro de agua purificada. El medio de cultivo se colocó en un frasco de tapa rosa (BOECO) de vidrio resistente al calor llenándolo únicamente dos tercios de su capacidad. Posteriormente, se llevó hasta su ebullición y autoclavó durante 15 minutos a 121°C, 14 PSI. Dentro de la cámara de flujo laminar, los frascos se enfriaron y se añadió antibiótico de Penicilina/Estreptomina 100X. A continuación, se dispensó un volumen de 20 a 25 mL de medio de cultivo en cada caja Petri, las cuales se expusieron a luz UV durante 15 minutos junto con fundas plásticas. Finalmente, las cajas Petri se almacenaron dentro de las fundas plásticas y se dejaron a temperatura ambiente por al menos 48 horas para descartar posibles contaminaciones.

**Preparación de medio de cultivo líquido peptona dextrosa.** Para la preparación del medio de cultivo líquido se pesó 20 gramos de dextrosa con 5 gramos de peptona disueltos en 1000 mL de agua destilada. La solución fue llevada hasta su punto de ebullición. A

continuación, en tubos de ensayo con tapa rosca se dispensó de 5 a 10 mL del medio y en el autoclave (ALL AMERICAN) se esterilizó por 15 minutos a 121°C y 14 PSI. Por último, luego de dejar enfriar los medios de cultivo, se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

**Preparación de medio de crioconservación.** Se siguió el protocolo de conservación de hongos filamentosos detallado por Tibaduiza et al. (2021). En este procedimiento, se calculó un volumen final en cada vial de 1,5 mL para el cual se preparó una solución de glicerol al 10% y peptona al 0.1% disueltos en agua destilada hasta alcanzar el volumen total requerido. La solución se calentó hasta su punto de ebullición y autoclavó por 15 minutos a 121°C y 14 PSI.

### ***Aislamiento y purificación de hongos filamentosos***

En una cámara previamente expuesta a luz UV junto con los materiales necesarios se aisló cada una de las trampas recuperadas. Con ayuda de una pinza y bisturí flameados con etanol 96%, se seleccionaron por cada trampa los granos que presentaban diversas coloraciones características de hongos, y se colocaron en una sola caja Petri con medio de cultivo. Los bordes de la caja Petri fueron flameados, sellados con Parafilm y rotulados con el número de subparcela, código de color (indicados en la Tabla 1.) y fecha. Posteriormente, se incubaron a 28°C durante 5 días en oscuridad para favorecer crecimiento de micelio seguido de 2 días en luz para estimular la esporulación.

A continuación, se identificó los hongos en función a sus colores y se procedió con la purificación de hongos. Para ello, se cortó un segmento de aproximadamente 5 x 5 mm del medio de cultivo con micelio del hongo, o se recogió una mínima cantidad de micelio con un asa microbiológica e inoculó en contacto con el medio de cultivo en una nueva caja Petri. Se incubó a 28°C durante 7 días en oscuridad. El procedimiento de purificación se repitió hasta obtener cultivos completamente puros. Las cepas se identificaron en base al número de subparcela y código de color.



**Tabla 1***Códigos de coloraciones típicas de hongos*

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

**Identificación de hongos**

**Identificación macroscópica.** Se describió las características claves de los hongos cultivados. Al anverso se distingue su color (centro, medio, anillo, borde), textura (algodonosa, polvosa), altura del micelio (alto, medio, bajo, irregular), tipo de crecimiento (denso, regular, tenue) y color de esporulación. Al reverso se evaluó el color (centro, medio, borde) y color de pigmento exudado.

**Identificación microscópica.** Se utilizó la técnica de la cinta pegante. En este proceso, se limpió un portaobjetos con etanol al 70% y colocó una gota de agua destilada o azul de metileno. Luego, se cortó un pedazo de cinta adhesiva de 1 a 2 cm, el cual se colocó sobre la muestra de hongo purificado con ayuda de pinzas. A continuación, se aplicó una ligera presión y se retiró la cinta del hongo colocándolo sobre el portaobjetos. Alternativamente, se utilizó otra técnica donde se tomó una pequeña cantidad de micelio la cual fue colocada sobre el portaobjetos y por encima un cubreobjetos. En un microscopio óptico con aumento de 400X se observó las estructuras microscópicas.

### ***Inoculación de hongos en medio líquido***

Primero, con un asa microbiológica se recogió micelio del hongo cultivado en medio sólido PDA e introdujo dentro del tubo de ensayo con medio líquido. Enseguida, se tapó sin cerrar completamente y cubrió con cinta Parafilm. Por último, se incubó inclinado a 28°C hasta su posterior extracción de ADN.

### ***Extracción de ADN***

Se empleó el protocolo propuesto para la identificación molecular de microorganismos propuesta por Flores (2021), modificado a partir del protocolo expuesto por Wilson (2001).

En primer lugar, se extrajo una cantidad de 20-50 mg de muestra fúngica tanto de aquellas cultivadas en medio sólido como en medio líquido. La muestra fue colocada en un microtubo de 2mL al que se agregó 500 µL del buffer de extracción (Tris HCl 100 mM (Invitrogen), EDTA 20 mM (JT. Baker), CTAB 2,5 %, NaCl 1.4 M (EMSURE), pH 8) junto con 2 µL de β-mercaptoetanol. Inmediatamente, se realizó una disrupción mecánica empleando un pistilo previamente flameado, se agregaron 4 perlas de vidrio y se sometió la muestra a una agitación vigorosa en vórtex a máxima velocidad durante al menos 5 minutos, hasta lograr la maceración del tejido. Posteriormente, la muestra se incubó a 60°C por 30 min y mezcló invirtiendo cada 10 minutos. Luego, se añadió 500 µL de cloroformo frío, se homogeneizó por 30s con un vórtex y dejó reposar por 2 minutos, seguido con una centrifugación a 14500g por 8min.

El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 mL, al cual se agregó el mismo volumen de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3M y 300 µL de etanol 70%. Las muestras se dejaron reposar a -20°C durante toda la noche favoreciendo la precipitación de ADN. Trascurrido el tiempo, se centrifugó a 14500g por 17min, se eliminó el sobrenadante y lavó tres veces con 200 µL de etanol al 70% sin perturbar el pellet, con el fin de eliminar posibles contaminantes. Finalmente, se dejó secar durante 30min al interior de una

cámara de flujo laminar y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de solución de NaOH 8 mM (Paso adaptado de Chiriboga (2023)) y 1  $\mu\text{L}$  de RNAsa (20mg/mL) permitiendo una incubación a 37°C por 30 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

### **Cuantificación de ADN y estimación de pureza por espectrofotometría**

Las muestras de ADN se homogeneizaron en vórtex y realizaron diluciones 1:4 de ADN con agua ultrapura (20 y 60  $\mu\text{L}$  respectivamente) en un microtubo de 0.6 mL. A continuación, se cargó 70  $\mu\text{L}$  de la dilución del ADN y del blanco en las celdas de microvolumen. Por último, se midió en el espectrofotómetro la absorbancia a las longitudes de onda: 260nm ( $A_{260}$ ), 280 nm ( $A_{280}$ ) y 230 nm ( $A_{230}$ ) mediante el test para medir múltiples longitudes de onda. Las concentraciones de ADN se calcularon asumiendo que una unidad de  $A_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ADN de doble cadena, y considerando el factor de dilución, según la ecuación siguiente:

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

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

$[ADN] (\mu\text{g}/\text{mL})$  = Concentración de la muestra de ADN

$A_{260}$  = Valor de absorbancia de la muestra de ADN a 260 nm

$FD_{ADN}$  = Factor de dilución de la muestra de ADN

$V_{TD}$  = Volumen total de la dilución

$V_{ADN}$  = Volumen de la muestra de ADN

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  = coeficiente estándar

Además, se determinó la pureza del ADN calculando las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ .

**Tabla 2***Criterios de pureza en muestras de ADN*

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

*Nota.* Ratios válidos para concentraciones de ADN  $> 50$  ug/uL aproximadamente. Adaptado de Banco Nacional de ADN Carlos III (2020)

***Evaluación de integridad de ADN***

Se pesó la agarosa para un volumen de 60mL (el volumen se ajusta en base a las necesidades de la cámara electroforética) obteniendo un grosor de 0.8 cm y una concentración final de 0.7% (p/v). En una probeta, se midieron 60mL de TBE 1X y mezclaron con la agarosa en un matraz de tres veces la capacidad de la solución. A continuación, se llevó la solución hasta su punto de ebullición, se mezcló y permitió enfriar hasta los 50°C, momento en el que se añadió el colorante de tinción de ácidos nucleicos (Diamond™ Nucleic Acid Dye) a una dilución 1:15000. La solución del gel se vertió en el soporte respectivo y dejó en reposo protegido de la luz directa durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocó el gel de agarosa dentro de la cámara electroforética con los pocillos cerca del polo negativo (color negro), asegurando que las muestras migren hacia el polo positivo (color rojo) y se añadió el buffer de electroforesis TBE 1x hasta cubrir completamente el gel de agarosa.

En una tira de Parafilm se mezclaron 5  $\mu$ L de ADN con 2  $\mu$ L de buffer de carga 5x y 2  $\mu$ L de agua ultrapura. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel y se inició a 90V durante 1 hora. Por último, se visualizó los fragmentos de ADN mediante luz UV en un transiluminador (ALPHA INNOTECH TM26).

**Tabla 3***Criterios de integridad de ADN en gel de agarosa*

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

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

### ***Amplificación de región ITS mediante PCR convencional***

Las muestras de ADN se amplificaron mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers ITS1 (forward) e ITS4 (reverse) con la finalidad de amplificar la región ITS (Tabla 4). La master mix fue preparada en base a las especificaciones del kit Platinum Taq DNA Polymerasa (invitrogen) con un volumen final de reacción de 25uL según se indica en la Tabla 5. El master mix se preparó incluyendo el número de muestras, un control positivo, un control negativo y una muestra adicional. Además, los componentes se agregaron desde el de mayor hasta el de menor volumen. La amplificación se realizó en un termociclador (TECHNE FTC41H2D) siguiendo las condiciones indicadas en la Tabla 6.

**Tabla 4***Primers utilizados para amplificación de región ITS*

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

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

**Tabla 5***Ajuste de master mix para un volumen de reacción de 25 µL*

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

*Nota.* dNTP's: Desoxinucleótido trifosfato.

**Tabla 6**

*Condiciones de amplificación de la región ITS*

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	-	-

***Evaluación de presencia y longitud de producto amplificado***

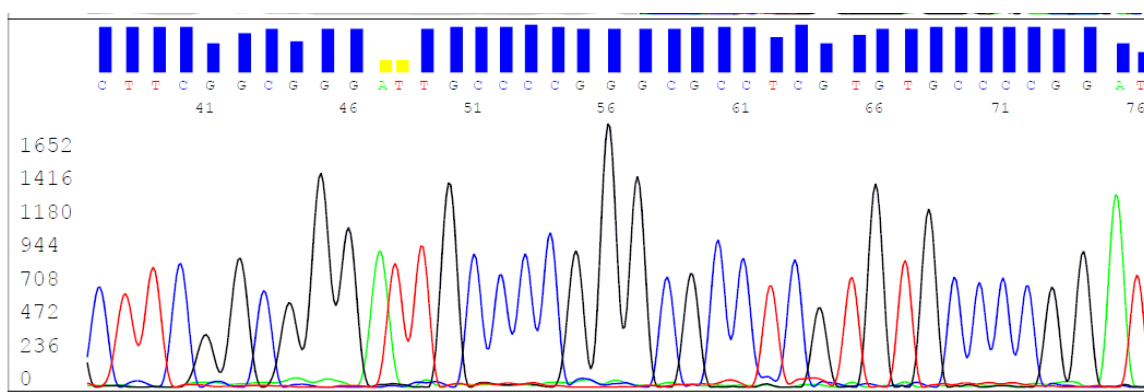
Se comprobó la amplificación de la región ITS mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X y tinción con colorante de ácidos nucleicos (Diamond™ Nucleic Acid Dye) a una dilución 1:15000. En los pocillos se agregó 5µL de muestra del amplicón junto con 3µL de agua ultrapura y 2µL de blue juice 0.03%. Para el marcador se cargó 2µL de *Trackit*<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), 2 µL de *Trackit*<sup>TM</sup> Cyan/Orange Loading Buffer (Invitrogen) y 6µL de agua ultrapura. La electroforesis se corrió a 90V por 1 hora. Trascurrido el tiempo, se observó en el transiluminador (ALPHA INNOTECH TM26).

## Secuenciación

Se remitió un volumen de 10µL de cada amplicón junto con 5µL de los primers forward y reverse distribuidos por alícuotas para cada muestra a una concentración 2µM. Estos envíos fueron dirigidos a los Laboratorios de Investigación UDLA para la purificación y secuenciación por método Sanger de las muestras de ADN.

### Figura 4

*Electroferograma obtenido mediante secuenciación Sanger*



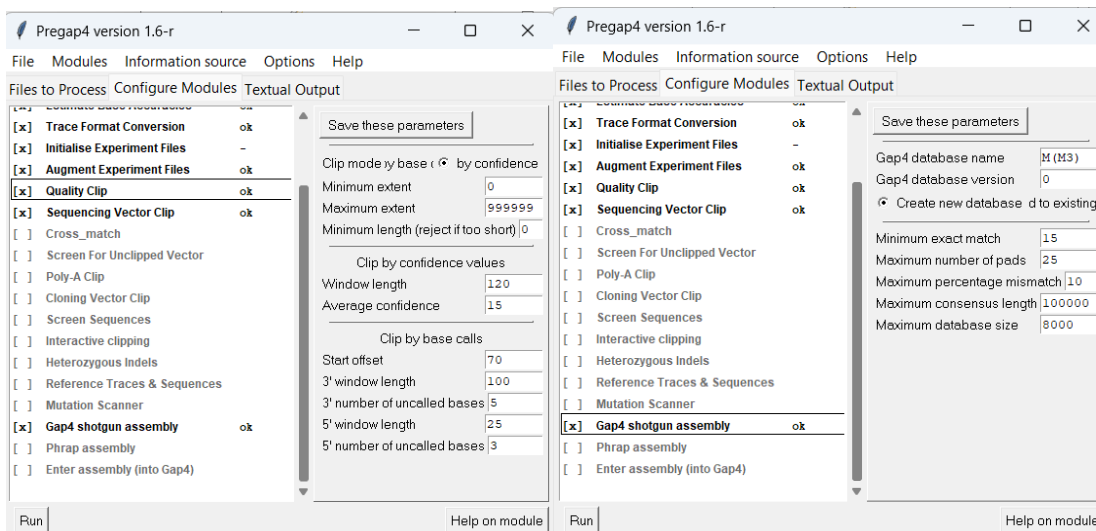
## Análisis Bioinformático

**Análisis, limpieza y ensamblaje de secuencias.** Una vez se recibió los resultados de la secuenciación Sanger, se procedió con el preanálisis automático de datos mediante la configuración de módulos como evaluación de calidad, detección de vectores y conversión de formatos. Se mantuvo la configuración de la calidad del clip establecida con una longitud de ventana a 50, una confianza media de 15 y en el montaje de escopeta un desajuste porcentual máximo de 10. Los datos obtenidos se ingresaron en el programa Gap4 en donde se efectuó el ensamblaje, análisis y limpieza de las secuencias tanto forward como reverse de cada muestra identificando en el cromatograma inconsistencias representadas por “ \* ”, “ - “ u otra letra no correspondiente obteniendo como resultado una secuencia consenso final en fomato FASTA.

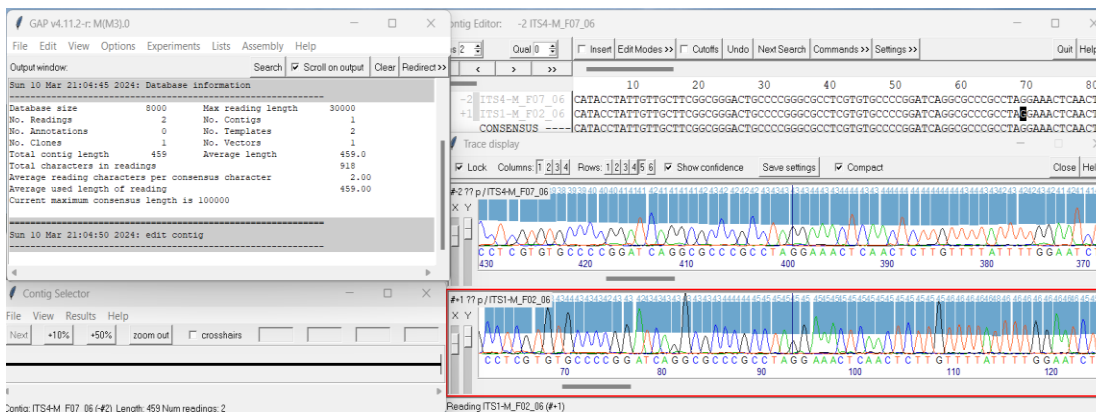
## Figura 5

### Análisis, limpieza y ensamblaje de secuencias

#### A



#### B



Nota. (A): Configuración de módulos en Pregap4, (B): Limpieza de secuencias en Gap4

**Identificación de la especie en bases de datos.** Las secuencias consenso se compararon en las bases de datos del NCBI mediante la herramienta Nucleotide Blast, en la cual se identificó similitudes entre secuencias y determinó la especie de hongo a la que pertenece. Además, generó datos relevantes como porcentaje identidad, valor E y el número de accesión.



Figura 6

## Comparación en Nucleotide Blast

BLAST® » blastn suite » results for RID-YWVBE6US016

Home Recent Results Saved Strategies Help

< Edit Search Save Search Search Summary v How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title **Fusarium culmorum**

RID **YWVBE6US016** Search expires on 03-12 10:33 am Download All v

Program BLASTN Citation v

Database nt See details v

Query ID lc|Query\_3232989

Description Fusarium culmorum

Molecule type dna

Query Length 525

Other reports Distance tree of results MSA viewer ?

**Filter Results**

Organism only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity E value Query Coverage

to to to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download v Select columns v Show 100 v ?

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium culmorum isolate F150 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer...	Fusarium culmor...	961	961	99%	0.0	100.00%	539	MH681154.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium culmorum isolate F52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer...	Fusarium culmor...	961	961	99%	0.0	100.00%	545	MH681149.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium graminearum strain PGTU10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1...	Fusarium gramin...	961	961	99%	0.0	100.00%	523	MF497389.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium culmorum isolate NT_Fc2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spa...	Fusarium culmor...	961	961	99%	0.0	100.00%	535	OQ875827.1

**Árbol filogenético.** Se construyó el cladograma utilizando el programa MegaX, en donde se realizó el alineamiento múltiple de secuencias mediante Muscle, se empleó el método de máxima verosimilitud, el modelo de Tamura Nei y un valor de Bootstrap de 1000 réplicas.

## Evaluación de biodiversidad

Una vez se identificó los hongos en base a su género y especie se determinó la diversidad biológica mediante los siguientes índices y fórmulas.

Abundancia relativa ( $p_i$ ):

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

$n_i$  : número de individuos de una especie

$N$ : número total de individuos de la muestra

Índice de Margalef ( $D_{Mg}$ ):

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

$S$ : número total de especies presentes

$N$ : número total de individuos de la muestra

$D_{Mg} = 0$  solo existe una especie en la muestra

$D_{Mg} < 2$  = región de baja biodiversidad

$D_{Mg} > 5$  = región de alta biodiversidad.

Índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ):

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

Valor tiende 0: comunidad de poca diversidad

Valor tiende a  $\ln(S)$ : comunidad de máxima equitatividad

Índice de dominancia de Simpson ( $D$ ):

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

Valor tiende a cero: ausencia de dominancia de especie, estabilidad del sitio

Valor tiende a 1: presencia de dominancia de especie

Índice de diversidad Simpson ( $D'$ ):

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

Valor tiende a cero: no hay diversidad

Valor tiende a 1: hay diversidad

Índice de equidad de Pielou ( $J'$ ):

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

Valor tiende a cero: especie con abundancia dominante

Valor tiende a uno: especies con abundancia similar

Índice no paramétrico Chao1 ( $S_{Chao1}$ ) para un número de individuos pequeño:

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

$S_{Chao1}$  = Número total de especies que se desea conocer

$S_{obs}$  = Número total de especies observadas en la muestra

$F$  = Número de Singletons

$G$  = Número de doubletons

### ***Conservación de hongos y cepario***

Con un sacabocados o un tubo de vidrio de 5mm de diámetro aproximadamente y previamente flameado se extrajeron entre 5 a 7 discos de agar con crecimiento micelial o esporulación y se colocaron en viales de 2 mL esterilizados. Posteriormente, se añadió 1,5 mL de la solución con glicerol al 10% y peptona al 0,1% hasta cubrir completamente los discos. Se refrigeraron por 20 minutos y se almacenaron a -80°C en el ultracongelador (SANYO).

Las cepas conservadas se almacenaron en el ultracongelador (SANYO) del Laboratorio de Agrobiotecnología ubicado en la Hacienda "El Prado" - IASA I junto con las fichas morfológicas respectivas de cada cepa.

## **Capítulo IV**

### **Resultados**

#### ***Identificación morfológica de especies de hongos filamentosos***

En la tabla 7, se presentan los hongos aislados finales por cada subparcela muestreada junto con sus coordenadas geográficas respectivas. Además, las fotografías de los cultivos primarios se encuentran en Apéndice A, mientras que los hongos aislados puros con su

fotografía y descripción morfológica se indican en Apéndice B. En las subparcelas donde no se pudo realizar los aislamientos de cepas se resaltó su motivo.

De las 50 subparcelas muestreadas, se recuperó el 50% del total de trampas microbianas. El 50% restante, se perdió debido a varios factores como la pérdida de la cinta de identificación, imprecisiones en las coordenadas geográficas, contaminación por gusanos y larvas y un exceso de humedad. Como resultado final, se obtuvieron 43 cepas aisladas del 50% de subparcelas.

**Tabla 7**

*Hongos aislados por subparcelas*

<b>ID Subparcela</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>N° hongos aislados</b>	<b>Código asignado u observación</b>
1	0°22'53"S 78°24'55"W	1	P1 - H1 - C11
3	0°22'53"S 78°24'52"W	-	Trampa no recuperada
7	0°22'53"S 78°24'47"W	-	Contaminación por gusanos en trampa
9	0°22'54"S 78°24'56"W	1	P9 - H2 - C3
10	0°22'54"S 78°24'55"W	-	Humedad excesiva en trampa
11	0°22'54"S 78°24'54"W	2	P11 - H3 - C3 P11 - H4 - C7
13	0°22'54"S 78°24'52"W	-	Trampa no recuperada
15	0°22'54"S 78°24'50"W	-	Humedad excesiva en trampa
17	0°22'54"S 78°24'49"W	2	P17 - H5 - C5 P17 - H6 - C8
19	0°22'54"S 78°24'47"W	-	Contaminación por gusanos en trampa
21	0°22'55"S 78°24'56"W	2	P21 - H7 - C7 P21 - H8 - C10
22	0°22'55"S 78°24'55"W	-	Contaminación por larvas en trampa
23	0°22'55"S 78°24'54"W	1	P23 - H9 - C11
25	0°22'55"S 78°24'52"W	1	P25 - H10 - C7
27	0°22'55"S 78°24'50"W	-	Trampa no recuperada
29	0°22'55"S 78°24'48"W	-	Humedad excesiva en trampa
31	0°22'56"S 78°24'56"W	-	Contaminación por gusanos en aislado
33	0°22'56"S 78°24'55"W	-	Trampa no recuperada
35	0°22'56"S 78°24'53"W	-	Humedad excesiva en trampa
37	0°22'56"S 78°24'51"W	-	Humedad excesiva en trampa

39	0°22'55"S 78°24'49"W	1	P39 - H11 – C5
41	0°22'55"S 78°24'47"W	-	Trampa no recuperada
43	0°22'57"S 78°24'55"W	-	Trampa no recuperada
45	0°22'57"S 78°24'53"W	-	Contaminación por larvas en trampa
49	0°22'57"S 78°24'49"W	-	Trampa no recuperada
51	0°22'56"S 78°24'47"W	-	Contaminación por larvas y gusanos en trampa
53	0°22'58"S 78°24'54"W	2	P53 - H12 - C10 P53 - H13 - C10
57	0°22'58"S 78°24'50"W	-	Humedad excesiva en trampa
59	0°22'57"S 78°24'48"W	1	P59 – H14 – C1
61	0°22'59"S 78°24'54"W	3	P61 - H15 - C3 P61 - H16 - C10 P61 - H17 - C10
63	0°22'59"S 78°24'53"W	-	Humedad excesiva en trampa
65	0°22'59"S 78°24'51"W	-	Contaminación por gusanos en aislado
67	0°22'59"S 78°24'49"W	1	P67 - H18 - C2
69	0°23'00"S 78°24'54"W	-	Contaminación por larvas en trampa
72	0°23'00"S 78°24'52"W	4	P72 - H19 - C3 P72 - H20 - C7 P72 - H21 - C8 P72 - H22 - C9
73	0°22'59"S 78°24'51"W	-	Trampa no recuperada
75	0°23'00"S 78°24'49"W	1	P75 - H23 - C7
76	0°23'00"S 78°24'48"W	1	P76 - H24 - C5
77	0°23'01"S 78°24'54"W	1	P77 - H25 - C5
81	0°23'00"S 78°24'51"W	1	P81 - H26 - C7
85	0°23'02"S 78°24'55"W	2	P85 - H27 - C5 P85 - H28 - C7
87	0°23'01"S 78°24'52"W	2	P87 - H29 - C3 P87 - H30 - C10
89	0°23'01"S 78°24'51"W	2	P89 - H31 - C3 P89 - H32 - C10
91	0°23'01"S 78°24'49"W	3	P91 - H33 - C2 P91 - H34 - C5 P91 - H35 - C11
92	0°23'02"S 78°24'48"W	1	P92 - H36 - C9
93	0°23'02"S 78°24'55"W	3	P93 - H37 - C2 P93 - H38 - C8 P93 - H39 - C10
95	0°23'03"S 78°24'53"W	2	P95 – H40 - C7 P95 - H41 - C10


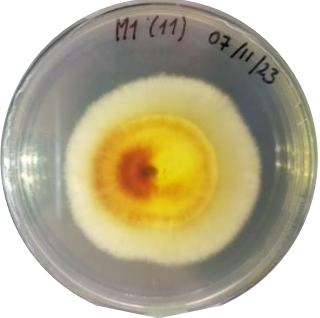




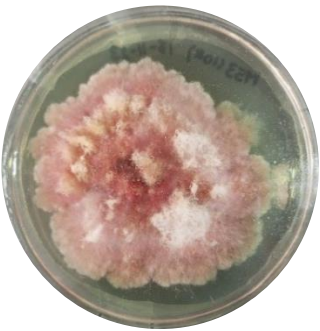


97	0°23'02"S 78°24'51"W	-	Trampa no recuperada
98	0°23'03"S 78°24'48"W	-	Trampa no recuperada
99	0°23'03"S 78°24'55"W	2	P99 - H42 - C7 P99 - H43 - C3

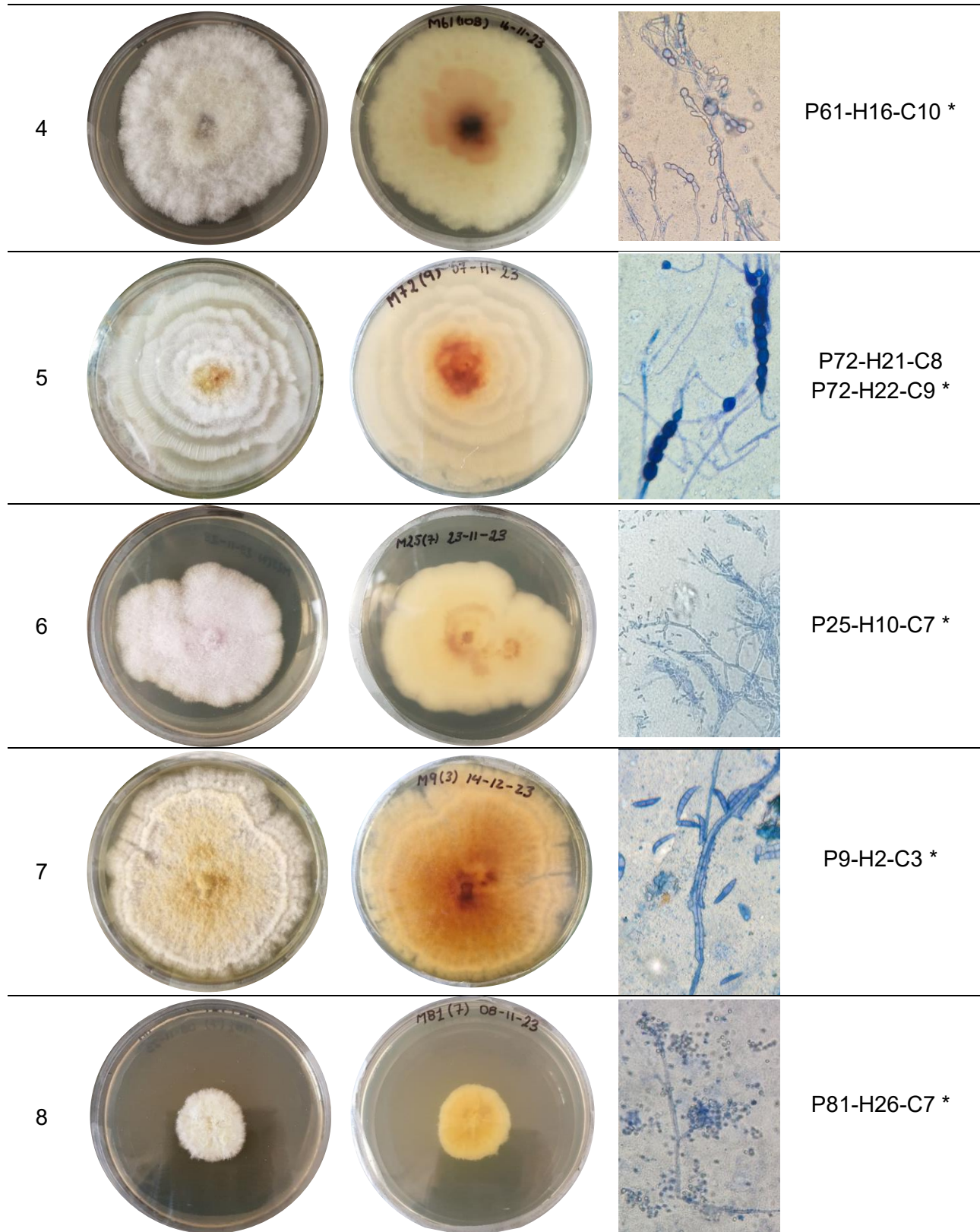
*Nota.* P: ID Subparcela, H: hongo aislado, C: código de color (Ver tabla 1).


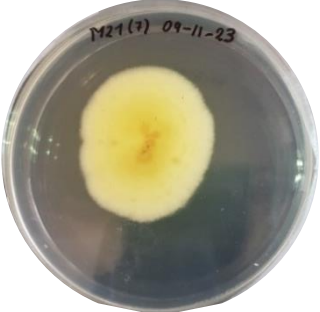





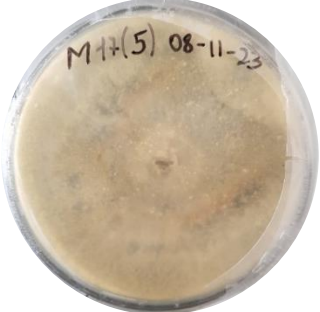
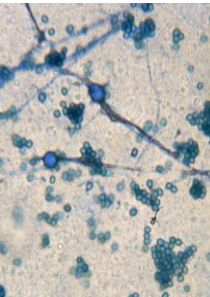






En la tabla 8, se presenta la agrupación de hongos en base a la morfoespecie de los cultivos puros de hongos aislados obteniendo un total de 23 morfoespecies.

**Tabla 8**

*Agrupación de hongos aislados en base a su morfoespecie*


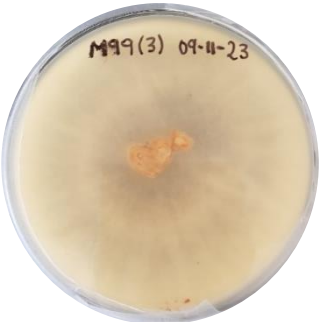
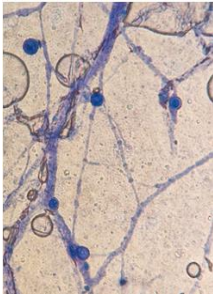




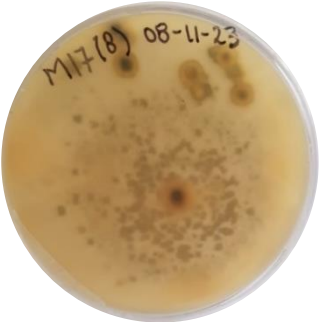

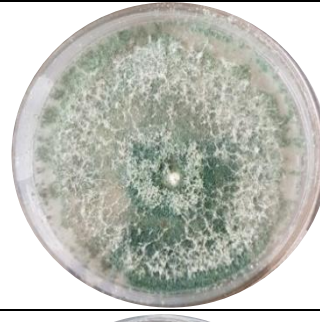
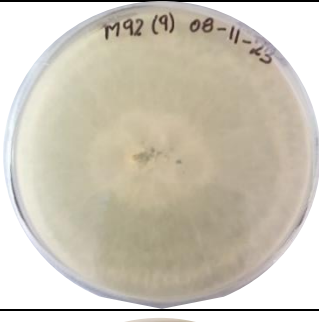

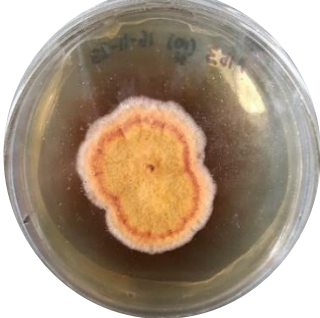
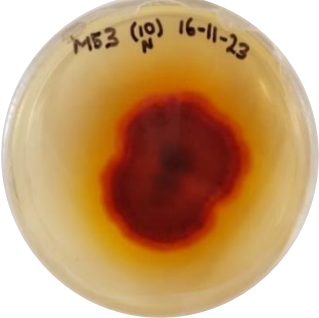

Orden	Crecimiento en PDA (anverso)	Crecimiento en PDA (reverso)	Caracterización microscópica (400X)	Hongos aislados
1				P1-H1-C11 *
2				P23-H9-C11* P61-H15-C3
3				P53-H13-C10 * P72-H19-C3 P72-H20-C7



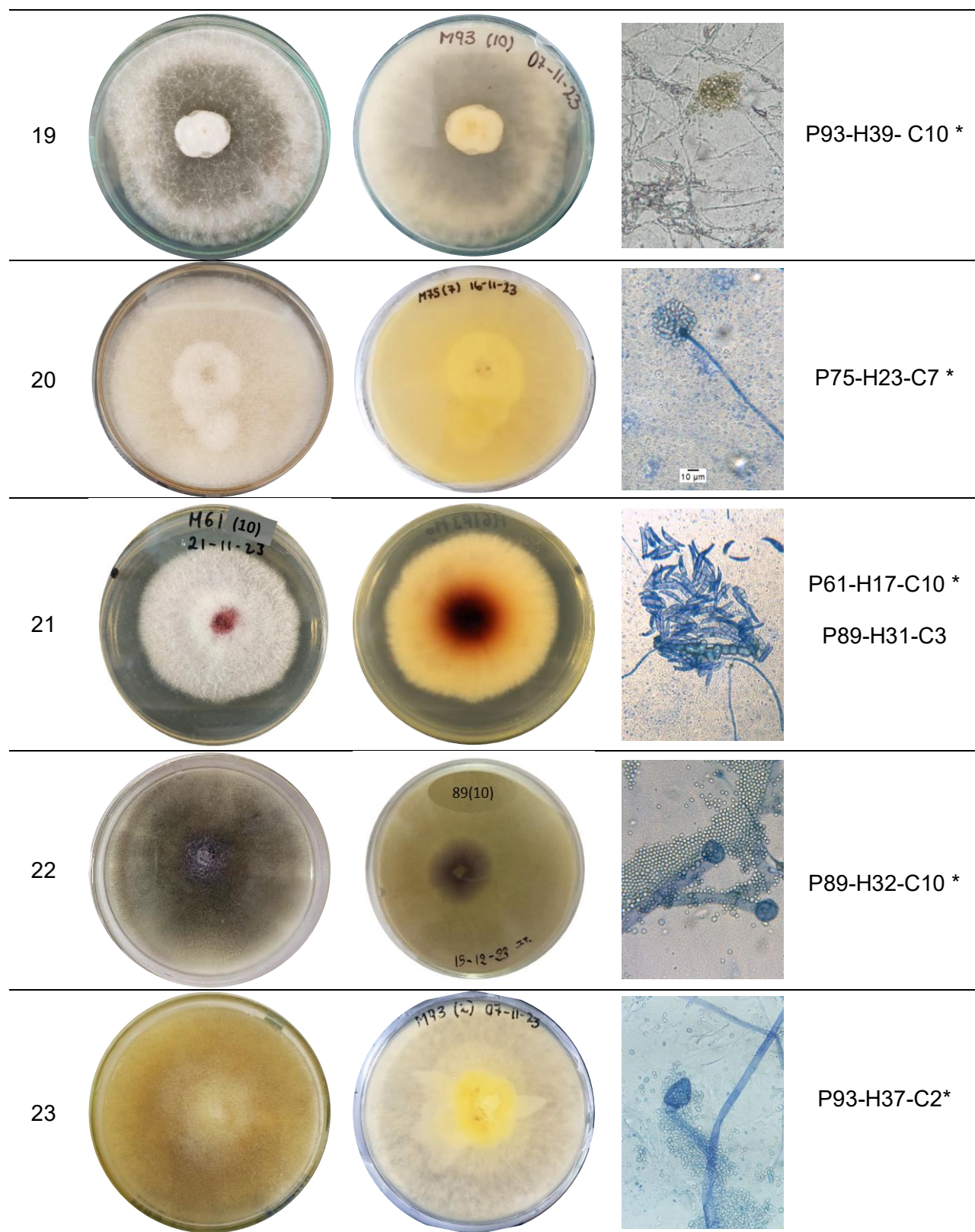
9				P21-H7-C7 *
10				P85-H27-C5 *
11				P17-H5-C5 *
12				P11-H3-C3 P11-H4-C7 * P21-H8-C10 P91-H33-C2 P91-H34-C5 P99-H42-C7
13				P59-H14-C1 P67-H18-C2 P77-H25-C5 P85-H28-C7 P87-H29-C3 P87-H30-C10 P91-H35-C11 * P95-H41-C10



---

14				P93-H38-C8 P99-H43-C3*
15				P39-H11-C5 * P95-H40-C7
16				P17-H6-C8 *
17				P76-H24-C5 P92-H36-C9 *
18				P53-H12-C10 *

---



*Nota.* Los asteriscos (\*) señalan los hongos representativos de cada agrupación seleccionados para identificación molecular.

En la Tabla 9, se indica el hongo representativo escogido por cada grupo de morfoespecie. En total se seleccionó, 23 hongos puros para su posterior identificación molecular.

**Tabla 9**

*Selección de cepa representativa por grupos de morfoespecie*

<b>Orden</b>	<b>Hongo representativo</b>
1	P1-H1-C11
2	P23-H9-C11
3	P53-H13-C10
4	P61-H16-C10
5	P72-H22-C9
6	P25-H10-C7
7	P9-H2-C3
8	P81-H26-C7
9	P21-H7-C7
10	P85-H27-C5
11	P17-H5-C5
12	P11-H4-C7
13	P91-H35- C11
14	P99-H43-C3
15	P39-H11-C5
16	P17-H6-C8
17	P92-H36-C9
18	P53-H12-C10
19	P93-H39- C10
20	P75-H23-C7
21	P61-H17-C10
22	P89-H32-C10
23	P93-H37-C2

*Nota.* P: ID Subparcela, H: hongo aislado, C: código de color (Ver tabla 1).

### ***Purificación de ADN***

Con la purificación de ADN por el método orgánico de las cepas seleccionadas representativas, se obtuvo una concentración promedio de  $231,9 \pm 86,52$ . En cuanto a la

evaluación de purezas 260/280 se evidenció que el 47,83% de hongos presentaron valores de pureza óptima, el 30,43% con pureza aceptable y el 21,74% se encontró contaminado por compuestos aromáticos. Respecto a la evaluación de pureza 260/230 el 100% de muestras de hongos se encontraron altamente contaminados por compuestos orgánicos como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos (Ver Tabla 10).

**Tabla 10**

*Cuantificación y estimación de purezas de ADN de hongos por espectrofotometría*

Orden	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )	Pureza ( $A_{260}/A_{230}$ )
1	293,2	2,0 <sup>++</sup>	1,3
2	335,6	1,4	0,9
3	273,0	1,9 <sup>++</sup>	1,1
4	186,0	1,7 <sup>+</sup>	0,9
5	329,8	1,5	0,9
6	95,0	1,6 <sup>+</sup>	0,6
7	143,0	1,7 <sup>+</sup>	0,6
8	135,8	1,9 <sup>++</sup>	0,8
9	257,2	2,0 <sup>++</sup>	1,1
10	120,2	1,7 <sup>+</sup>	0,8
11	178,4	1,8 <sup>++</sup>	0,8
12	326,8	1,7 <sup>+</sup>	1,0
13	318,4	1,5	0,9
14	146,2	1,7 <sup>+</sup>	0,8
15	321,0	1,9 <sup>++</sup>	1,1
16	156,4	1,8 <sup>++</sup>	0,8
17	248,2	1,9 <sup>++</sup>	1,0
18	234,8	2,1 <sup>++</sup>	1,2
19	198,4	1,7 <sup>+</sup>	0,8
20	336,0	1,4	0,9
21	89,6	2,0 <sup>++</sup>	0,8
22	351,0	1,5	0,9
23	260,0	2,0 <sup>++</sup>	1,1

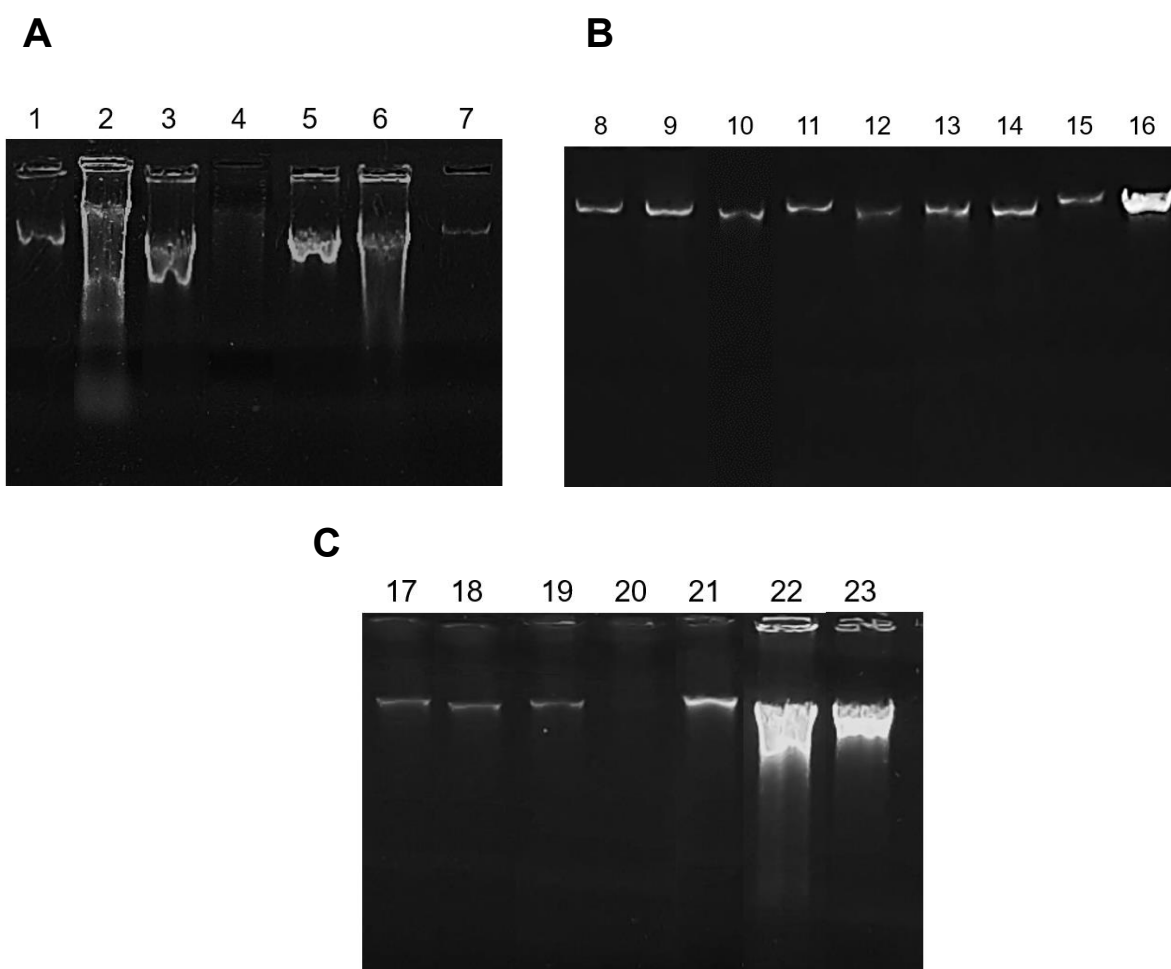
Nota. ( $\mu\text{g/mL}$ ): microgramos/mililitro. Respecto a la pureza  $A_{260}/A_{280}$ , se señalan las muestras de ADN con: pureza óptima, <sup>++</sup>, [1,8 – 2,1] y pureza aceptable, <sup>+</sup>, [1,6 – 1,7].

### Integridad de ADN

La evaluación de integridad de ADN a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,7% señaló que el 65,22% presentaron una integridad alta, el 13,04% una integridad adecuada, el 13,04% una degradación parcial y el 8.70% presentó una ausencia total de banda y smear (Ver figura 7).

### Figura 7

Evaluación de integridad de ADN



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

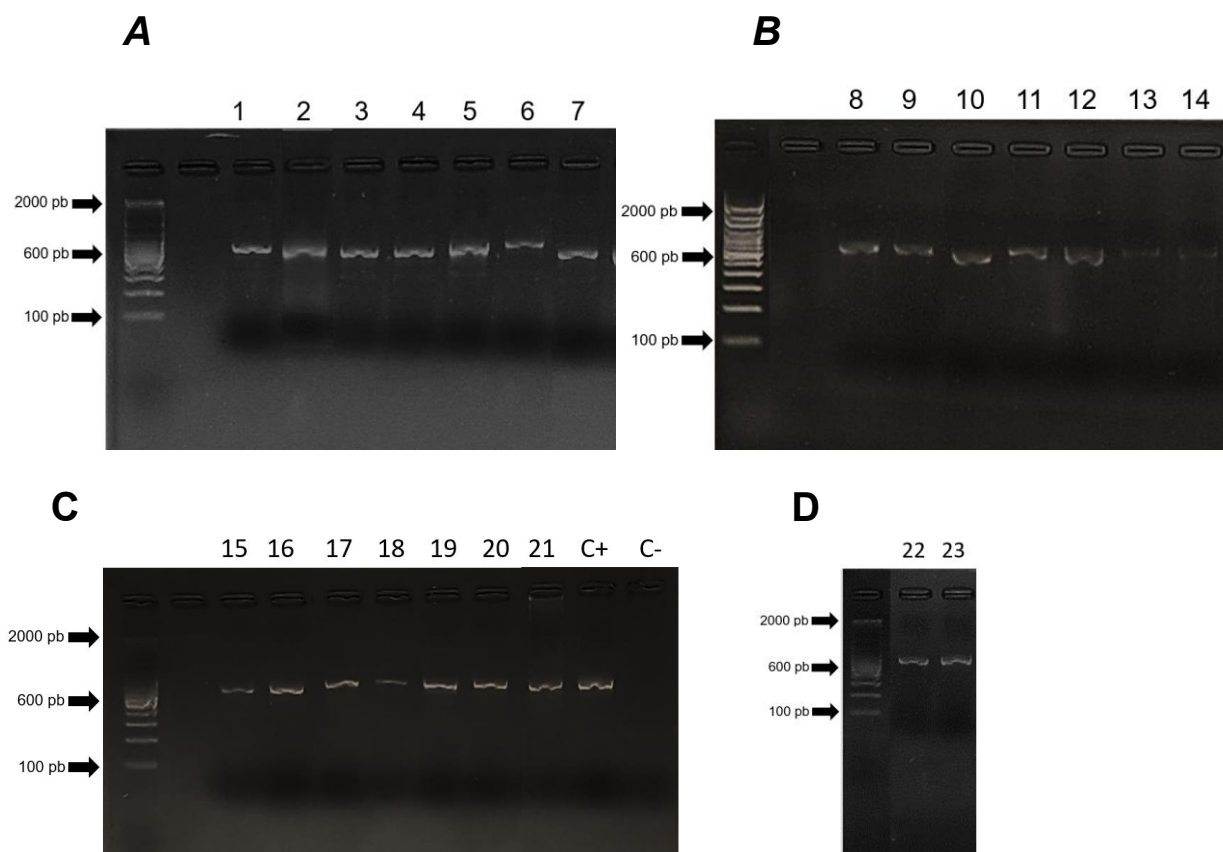
*griseocyanus*; Carril 20: *Mucor irregularis*; Carril 21: *Fusarium oxysporum*; Carril 22: *Mucor janssenii*; Carril 23: *Mucor hiemalis*

### Identificación molecular de hongos

En la amplificación de la región ITS de las 23 muestras de ADN, se obtuvieron productos de PCR entre 523 pb y 610 pb, de las cuales, el 60,87% presentó bandas definidas y el 39,14% presentó bandas inespecíficas (Ver figura 8, tabla 11).

### Figura 8

Amplificación de la región ITS



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

*griseocyanus*; Carril 20: *Mucor irregularis*; Carril 21: *Fusarium oxysporum*; Carril 22: *Mucor janssenii*; Carril 23: *Mucor hiemalis*

**Tabla 11**

*Productos de PCR mediante la amplificación de la región ITS*

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

*Nota.* pb = pares de bases

En la tabla 12, se presentan las especies de hongos identificados mediante el procesamiento bioinformático, la búsqueda y comparación en bases de datos biológicas las secuencias de la región ITS. Se identificaron 21 hongos a nivel de especie y 2 a nivel de género.

Tabla 12

*Microorganismos identificados mediante secuencia de la región ITS*

Muestra	Longitud (pb)	Organismo	% Identidad	N° Accesoión
1	539	<i>Clonostachys rosea</i>	100%	<a href="#">MK752439.1</a>
2	609	<i>Mucor moelleri</i>	99,67%	<a href="#">OP346778.1</a>
3	525	<i>Fusarium culmorum</i>	100%	<a href="#">MH681154.1</a>
4	532	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	<a href="#">OR911525.1</a>
5	610	<i>Linnemannia elongata</i>	99,84%	<a href="#">MT365987.1</a>
6	523	<i>Fusarium sp.</i>	99,81%	<a href="#">MH862657.1</a>
7	536	<i>Fusarium equiseti</i>	99,62%	<a href="#">MN722428.1</a>
8	543	<i>Clonostachys rosea</i>	99,81%	<a href="#">MT945204.1</a>
9	541	<i>Clonostachys rosea</i>	99,81%	<a href="#">MT945204.1</a>
10	543	<i>Clonostachys solani</i>	99,82%	<a href="#">MH855181.1</a>
11	577	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100%	<a href="#">MN856356.1</a>
12	576	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	<a href="#">MT133310.1</a>
13	594	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,83%	<a href="#">MK841027.1</a>
14	589	<i>Trichoderma sp.</i>	100%	<a href="#">MK871236.1</a>
15	577	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	<a href="#">MH892840.1</a>
16	573	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99,83%	<a href="#">MT111912.1</a>
17	571	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	<a href="#">MK841003.1</a>
18	522	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	<a href="#">MT582797.1</a>
19	605	<i>Mucor griseocyanus</i>	99,67%	<a href="#">MH857592.1</a>
20	601	<i>Mucor irregularis</i>	96,38%	<a href="#">ON209714.1</a>
21	525	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	<a href="#">MN856310.1</a>
22	600	<i>Mucor janssenii</i>	99,67%	<a href="#">MH855051.1</a>
23	608	<i>Mucor hiemalis</i>	99,35%	<a href="#">LC413619.1</a>

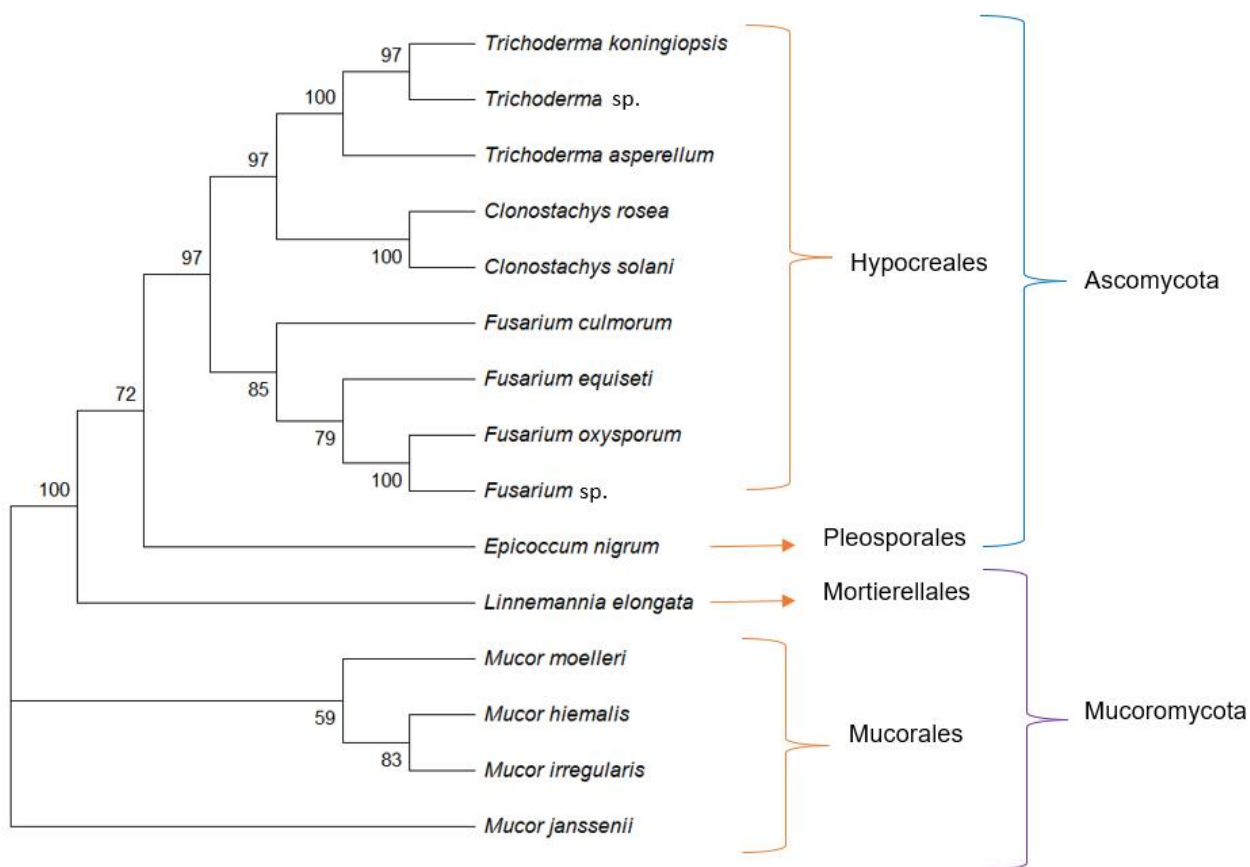
### Árbol filogenético

Empleando el método de máxima verosimilitud y modelo de Tamura Nei se obtuvo el árbol filogenético de 15 secuencias de nucleótidos con valores de Bootstrap mayores a 50. Se observó la agrupación de los géneros de hongos del orden Hypocreales (*Trichoderma*, *Clonostachys*, *Fusarium*), Pleosporales (*Epicoccum*), Mortierellales (*Linnemannia*) y Mucorales (*Mucor*) pertenecientes a la división Ascomycota y Mucoromycota correspondientemente.



Figura 9

Árbol filogenético de las secuencias ITS identificadas



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

### **Evaluación de diversidad**

Con la identificación molecular de cepas, se obtuvo 43 individuos (N) distribuidos en 23 especies, 6 géneros y 4 órdenes. Entre las especies con mayor abundancia de hongos destacó *Trichoderma asperellum* con 18 individuos seguido por *Fusarium culmorum* y *Clonostachys rosea* con 3 individuos. Además, se colocó el rol ecológico de los hongos en base a bibliografía obteniendo 65,12% antagonistas, 18,60% fitopatógenos, 11,63% saprófitos y 4,65% patógenos oportunistas. (Ver Tabla 13).

Tabla 13

Abundancia y clasificación de especies de hongos filamentosos

Especie	N° Individuo	Abundancia relativa (pi)	Categoría
<i>Clonostachys rosea</i>	3	0,0698	Antagonista (Gams et al., 2004).
<i>Clonostachys solani</i>	1	0,0233	Saprófito (Piombo et al., 2023)
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0,0233	Antagonista (Li et al., 2022).
<i>Fusarium culmorum</i>	3	0,0698	Fitopatógono (Kant et al., 2017)
<i>Fusarium equiseti</i>	2	0,0465	Fitopatógono (Herrera-Parra et al., 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	0,0465	Fitopatógono (Bertero et al., 2018).
<i>Fusarium</i> sp.	1	0,0233	Fitopatógono (Bertero et al., 2018).
<i>Linnemannia elongata</i>	2	0,0465	Saprófito (Vandepol et al., 2022)
<i>Mucor griseocyanus</i>	1	0,0233	Patógono oportunista (Cruz et al., 2017).
<i>Mucor hiemalis</i>	1	0,0233	Saprófito (Cadavid-Mora et al., 2023)
<i>Mucor irregularis</i>	1	0,0233	(Cruz et al., 2017) Patógono oportunista (Cruz et al., 2017).
<i>Mucor janssenii</i>	1	0,0233	Saprófito (Cadavid-Mora et al., 2023)
<i>Mucor moelleri</i>	2	0,0465	Antagonista (Nartey et al., 2022).
<i>Trichoderma asperellum</i>	18	0,4186	Antagonista (López-Legarda et al., 2012)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	2	0,0465	Antagonista (López-Legarda et al., 2012)
<i>Trichoderma</i> sp.	2	0,0465	Antagonista (López-Legarda et al., 2012)

Se evaluó una abundancia de 43 individuos de hongos distribuidos en 23 especies que resultaron en una riqueza específica de  $D_{Mg} = 5,85$  para el índice de Margalef, en el índice de Shannon-Wiener se obtuvo valores de  $H' = 2,21$ , en el índice de dominancia de Simpson  $D = 0,20$ , en el índice de diversidad de Simpson  $D' = 0,80$  y para el índice de equidad de Pielou  $J' = 0,70$ . Además, el estimador no paramétrico presentó un valor de especies esperadas mayor a 27 y una proporción de singletons de 43,8% indicando un grado de submuestreo. (Ver Tabla 14).

**Tabla 14**

*Análisis de índices de diversidad de hongos*

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

### ***Establecimiento del cepario de microorganismos***

El cepario establecido cuenta con las 23 cepas de hongos agrupados por morfoespecie, identificados molecularmente y crioconservados en discos de agar con micelio en solución de glicerol 10% y peptona 0,1%. Se almacenó en las instalaciones del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda “El Prado” - IASA I junto con la información morfológica y molecular en fichas de cada especie (Ver Apéndice B).

Tabla 15

*Cepario de hongos filamentosos del sector de Horticultura y Fruticultura*

Orden	N° de hongo	Especie
1	P1-H1-C11	<i>Clonostachys rosea</i>
2	P23-H9-C11	<i>Mucor moelleri</i>
3	P53-H13-C10	<i>Fusarium culmorum</i>
4	P61-H16-C10	<i>Fusarium equiseti</i>
5	P72-H22-C9	<i>Linnemannia elongata</i>
6	P25-H10-C7	<i>Fusarium sp.</i>
7	P9-H2-C3	<i>Fusarium equiseti</i>
8	P81-H26-C7	<i>Clonostachys rosea</i>
9	P21-H7-C7	<i>Clonostachys rosea</i>
10	P85-H27-C5	<i>Clonostachys solani</i>
11	P17-H5-C5	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
12	P11-H4-C7	<i>Trichoderma asperellum</i>
13	P91-H35- C11	<i>Trichoderma asperellum</i>
14	P99-H43-C3	<i>Trichoderma sp.</i>
15	P39-H11-C5	<i>Trichoderma asperellum</i>
16	P17-H6-C8	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
17	P92-H36-C9	<i>Trichoderma asperellum</i>
18	P53-H12-C10	<i>Epicoccum nigrum</i>
19	P93-H39- C10	<i>Mucor griseocyanus</i>
20	P75-H23-C7	<i>Mucor irregularis</i>
21	P61-H17-C10	<i>Fusarium oxysporum</i>
22	P89-H32-C10	<i>Mucor janssenii</i>
23	P93-H37-C2	<i>Mucor hiemalis</i>

## Capítulo V

### Discusión

#### **Identificación morfológica de especies de hongos filamentosos**

El suelo y su biodiversidad constituyen el recurso más vital de un ecosistema. Por ende, es crucial dilucidar el microbioma presente en el mismo, comenzando con la captura de los microorganismos. El muestreo directo del suelo es un método para el análisis microbiológico altamente sensible, sin embargo, el análisis individual de submuestras tomadas al azar en todo el campo tiene un costo económico muy elevado (Castelán et al., 2023). Por lo cual, en este caso, se optó por un método más económico y accesible que son las trampas de arroz. Se

evidenció que, de las 50 subparcelas muestreadas, se recuperó el 50% las trampas microbianas. Dado que la colección de hongos se realizó en temporada de lluvia y un tiempo de colección de 15 días, el 50% restante, se perdió debido a varios factores como la pérdida de la cinta de identificación, imprecisiones en las coordenadas geográficas, contaminación por gusanos y larvas y un exceso de humedad (Ver Tabla 1). El Dr. Cho Han Hue señala que se debe evitar la captura de microorganismos durante las temporadas de lluvias puesto que podría provocar el lavado de nutrientes y la pérdida de microbiota importante (Reddy, 2012). Además, la colección de microbios en climas fríos ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ) toma de 4 a 5 días mientras que en condiciones más cálidas ( $>20^{\circ}\text{C}$ ) se lo efectúa de 3 a 4 días (Park & DuPont, 2010).

La humedad por las excesivas cantidades de lluvias se pueden reducir al cocinar el arroz con una cantidad mínima de agua o colocando líneas de defensa como un contenedor con agujeros sobre la trampa que a su vez lo protege de la pérdida de su ubicación (Keliikuli et al., 2019).

Como resultado final, se obtuvieron 43 cepas aisladas del 50% de subparcelas que al agruparse por morfoespecie dio como resultado una selección de 23 hongos representativos. La delimitación por morfoespecie permite identificar unidades taxonómicas reconocibles como resultado del análisis y comparación de características morfológicas (Fuentes, 2015). Los caracteres observables base para la división de hongos se basó en las características macro y microscópicas. No obstante, este proceso presenta limitaciones ya que no considera la variación natural, como el no definir límites claros entre la diferencias de especies y la variación geográfica (Dujardin et al., 2009). Las diferencias morfológicas no siempre son divergencias biológicas, pueden existir especies morfológicamente iguales pero de diferentes especies, o especies genéticamente iguales pero morfológicamente distintas (Bargues et al., 2010). Además, es un método subjetivo que en muchos casos depende de la experiencia del investigador.

### **Concentración y pureza de ADN**

Los hongos contienen una pared celular muy fuerte y resistente a kits tradicionales enfocados en levaduras y bacterias. El método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987) sigue siendo uno de los más ampliamente usados, a pesar de las modificaciones sometidas. En la presente investigación, se obtuvo una concentración alta promedio de  $231,9 \pm 86,52$ . Este método de extracción con cloroformo presenta ventajas como confiabilidad y la obtención alta en cantidades de ADN (Chauhan, 2018).

En cuanto a la evaluación de puridades  $A_{260}/A_{280}$  se evidenció que el 47,83% de hongos presentaron valores de pureza óptima, el 30,43% de pureza aceptable y el 21,74% se encontró contaminado por compuestos aromáticos. Respecto a la evaluación de pureza  $A_{260}/A_{230}$  el 100% de muestras de hongos presentaron contaminación por compuestos orgánicos. En acuerdo con otras investigaciones en hongos filamentosos, el uso de CTAB y solventes orgánicos presentaron en  $A_{260}/A_{280}$  valores dentro del rango; mientras que, para  $A_{260}/A_{230}$  todos los extractos presentaron contaminación del reactivo (Conlon et al., 2022; van Burik et al., 1998).

El uso de disolventes orgánicos o sales pueden generar trazas en las muestras de ADN que interfieren en su calidad y rendimiento (FUJIFILM Wako Chemicals, 2014). Además, tomar restos de la interfaz o lavados mal efectuados y la transferencia de la muestra entre varios tubos incrementa el riesgo de contaminación y error (Butler, 2012; Conlon et al., 2022). De forma que se procuró no tomar todo el sobrenadante en la fase acuosa y se aumentó la cantidad de lavados a tres. Huanca-Mamani et al. (2014) empleó en la purificación con isopropanol, para precipitar el ADN donde obtuvo rendimientos entre 400 y 900 ng/uL y calidades en el  $A_{260}/A_{230}$  alrededor de 1,7.

### **Integridad del ADN**

La evaluación de integridad de ADN a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,7% señaló que el 65,22% presentaron una integridad alta, el 13,04% una integridad adecuada, el 13,04% una degradación parcial y el 8.70% presentó ausencia total de ADN. El 8,7% de muestras de ADN que no fueron visibles no afectaron el análisis posterior de PCR, amplificando con éxito el producto. Esto debido a que la PCR es un método sensible, preciso y con alta especificidad (Ulucan et al., 2023) . No obstante, este fenómeno puede optimizarse con una reducción en la concentración de agarosa, que incrementaría la separación de las moléculas hasta 750 pb; sin embargo, el gel sería más frágil y difícil de manipular (Fierro, 2014). O a su vez se podría utilizar un gel de poliacrilamida puesto que tiene mayor resolución respecto al gel de agarosa (Green & Sambrook, 2020).

### **Identificación molecular de hongos**

En la amplificación de la región ITS de las 23 muestras de ADN, se obtuvieron productos de PCR entre 523 pb y 610 pb. De las cuales, el 60,87% presentó bandas definidas y el 39,14% presentó bandas no específicas de aproximadamente 400 pb. La presencia de bandas inespecíficas tenues se atribuyó a una concentración subóptima de  $MgCl_2$  , ya que una mínima cantidad se depositó accidentalmente en el buffer de PCR. Las concentraciones altas de cloruro de magnesio provocan uniones no específicas de los cebadores generando la aparición de bandas de ADN no deseadas (Pelt-Verkuil et al., 2008).

La región ITS es considerada como el código de barras genético de hongos por excelencia (Maldonado et al., 2023). Luego del análisis y comparación de secuencias se identificaron 16 especies distribuidos en 6 géneros y 4 órdenes. Entre ellos, *Clonostachys rosea*, *Clonostachys solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Linnemannia elongata*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma asperellum*, *Epicoccum nigrum*, *Mucor moelleri*, *Mucor griseocyanus*, *Mucor irregularis*, *Mucor janssenii* y *Mucor hiemalis*. No se

identificó a nivel de especie 2 cepas identificadas como *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. Los ITS en ciertos casos delimitan la identificación de ciertos hongos por falta de resolución o la presencia de copias ITS no homólogas en el genoma. Como es el caso para ciertas especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Penicillium*. El problema no se presenta directamente al taxón sino en linajes que pudieron evolucionar dinámicamente (Lücking et al., 2020; Raja et al., 2017).

Según Hurdeal et al. (2021), el género *Mucor* se encuentran en los suelos o sustratos orgánicos como estiércol, son agentes patógenos de infecciones humanas como mucormicosis, son saprófitos y endófitos de plantas en descomposición. Entre sus especies se encuentra *Mucor irregularis*, un oportunista emergente, fitopatógeno de maíz y papaya (Cruz et al., 2017). Además, produce lacasa degradando hidrocarburos de cadena larga y BTEX (Asemoloye et al., 2020). *Mucor moelleri* es, además, un agente de biocontrol mediante la producción de compuestos microbianos volátiles, en la supresión de enfermedades y crecimiento de la planta (Nartey et al., 2022). *Mucor griseocyanus* produce la enzima lipasa constitutiva (Coca & Dustet, 2006), mientras que *Mucor hiemalis* produce pectinasas, proteasas (Cadavid-Mora et al., 2023) que son empleadas en procesos industriales.

El género *Trichoderma* con sus especies *asperellum* y *koningiopsis* tiene amplias aplicaciones en el control biológico de enfermedades en las plantas por su capacidad antagónica frente a microorganismos como *Fusarium*, *Colletotrichum*, etc., y en su crecimiento al regular vías metabólicas, potenciar la fertilidad del suelo, producir enzimas, antibióticos y actuar en la biorremediación de suelo y agua (López-Legarda et al., 2012; Zheng et al., 2021)

Las especies del género *Fusarium* son patógenos que han afectado innumerables cultivos al infectar tejidos y órganos de las plantas generando pérdidas (Fonseca-Guerra et al., 2022). Además, producen micotoxinas presentes en alimentos y son causantes de enfermedades e infecciones en seres humanos y animales. *F. oxysporum* es la especie principal patógena tanto para plantas como animales (Bertero et al., 2018). *F. culmorum* ataca



las plantas provocando la pudrición de raíces y tallos, además de producir toxinas tóxicas (Kant et al., 2017), al igual que *F. equiseti*, quien también se considera invasor secundario de los cultivos agrícolas luego de la contaminación de suelos y que, además, causa el entrecortamiento de nodos (Herrera-Parra et al., 2017; Thrane, 2014).

El género *Clonostachys* son saprótrofos y micoparásitos destructivos. Contienen aproximadamente 229 metabolitos secundarios que les confieren propiedades citotóxicas, antimicrobianas, antiparasitarias, insecticidas, entre otros (Han et al., 2020). La especie *Clonostachys rosea* ataca a otros hongos penetrando y destruyendo sus hifas (Gams et al., 2004).

La especie *Linnemannia elongata* son saprófitos presentes en la materia orgánica y suelo. En plantas de *Arabidopsis* mejora su crecimiento y masa de semillas, e interviene en rutas biosintéticas modificando la expresión de genes (Vandepol et al., 2022). Su patogenicidad aún no está identificada; sin embargo, se demostró ocasionan decaimiento en partes aéreas de plantas de aguacate (Hernández Pérez et al., 2018). La especie *Epicoccum nigrum* es un hongo saprófito y endofítico, empleado como antagonista por actuar en el control biológico de patógenos vegetales mediante sus metabolitos secundarios (Li et al., 2022).

### **Árbol filogenético de máxima verosimilitud**

El método de máxima verosimilitud identifica arboles filogenéticos con la más alta puntuación de probabilidad, se fundamenta en un modelo estocástico que describe la evolución de aminoácidos o nucleótidos (Raja et al., 2017). Se construyó el árbol filogenético de 15 secuencias de nucleótidos mediante máxima verosimilitud y modelo de Tamura Nei obteniendo valores de Bootstrap mayores a 50. Bootstrap evalúa la confiabilidad de la filogenia obtenida mediante las secuencias, valores menores al 50% son indicadores de replicaciones mal efectuadas (Ojha et al., 2022). Además, se observó la agrupación de los géneros de hongos del

orden Hypocreales (*Trichoderma*, *Clonostachys*, *Fusarium*), Pleosporales (*Epicoccum*), Mortierellales (*Linnemannia*) y Mucorales (*Mucor*).

### **Índices de diversidad**

La medición de la diversidad biológica sirve como un indicador del estado de los sistemas ecológicos (Moreno, 2001). El estudio de la diversidad de macroorganismos puede ser aplicada para las comunidades micológicas; sin embargo, debido al desarrollo no lineal en hongos, conceptos complejos de especie e individuo o técnicas de muestreo han dificultado su medición (Unterseher et al., 2008). En este estudio, cada cultivo puro obtenido y clasificado por morfoespecie se consideró como una entidad individual. Un cultivo puro es un conjunto de células que proceden de una misma célula (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021), y que además comparten características únicas, homogéneas y comparables. Magurran (2005) señala que la diversidad se basa en supuestos como i) todos los individuos son iguales y i) la abundancia de especies debe ser calculada en base a unidades comparables y apropiadas.

Con la identificación molecular de cepas, se obtuvo 43 individuos (N) distribuidos en 23 especies, 6 géneros y 4 órdenes. Entre las especies con mayor abundancia de hongos destacó *Trichoderma asperellum* con 18 individuos seguido por *Fusarium culmorum* y *Clonostachys rosea* con 3 individuos

El sector de Horticultura y Fruticultura es una comunidad de alta diversidad ( $D_{Mg} = 5,85$ ,  $D' = 0,80$ ) manteniendo la estabilidad en el mismo y la ausencia de presiones ecológicas. No existió la presencia de especies dominantes ( $D = 0,20$ ), de forma que se presentó una homogeneidad entre las especies ( $J' = 0,70$ ;  $H' = 2,21$ ). El estimador no paramétrico Chao1 presentó un valor de especies esperadas equivalente a 27 y una proporción de singletons de 43,8% indicando un grado de submuestreo. Serramo et al. (2012) señala que un número mayor a 8% en especies raras o únicas presentan grado de submuestreo, es decir, un muestreo

insuficiente. Según Pineda (2019), el submuestreo es un sesgo en la evaluación de la riqueza real de las especies representando un conflicto en el método de captura de especies raras.

## Capítulo VI

### Conclusiones

- En el sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda “El Prado” – IASA I, se identificaron 43 aislamientos puros agrupados en 23 morfoespecies de los cuales mediante la amplificación de la región ITS se distinguieron 6 géneros (*Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Linnemannia*, *Clonostachys*) y 4 órdenes.
- El sector de Horticultura y Fruticultura es una comunidad de alta diversidad ( $D_{Mg} = 5,85$ ,  $D' = 0,80$ ) manteniendo la estabilidad y ausencia de presiones ecológicas. Además, no existió la presencia de especies dominantes ( $D = 0,20$ ), de forma que se presentó una homogeneidad entre las especies ( $J' = 0,970$ ;  $H' = 2,21$ ). El estimador no paramétrico Chao 1 (>27 especies) con una proporción de singletons de 43,8% lo que indicó un grado de submuestreo.
- El cepario se estableció a partir de los hongos aislados e identificados morfológica y molecularmente descritos en fichas técnicas mediante la crioconservación de discos de agar con micelio en solución protectante, siendo almacenados en las instalaciones del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda “El Prado” - IASA I.
- La presente investigación permitió el establecimiento de una línea base del sector de estudio de acuerdo al rol ecológico de los hongos filamentosos registrados, clasificados en 65,12% antagonistas, 18,60% fitopatógenos, 11,63% saprófitos y 4,65% patógenos oportunistas.

## Recomendaciones

- Se recomienda el uso de la línea base establecida en la presente investigación, con el fin de diseñar estrategias de biorrestauración y control biológico.
- Se recomienda emplear la amplificación de marcadores de códigos de barras secundarios  $\beta$ -Tubulina y factor de elongación 1 $\alpha$  en casos donde la amplificación de la región ITS delimita la identificación de ciertos hongos por falta de resolución o presencia de copias ITS no homólogas en su genoma, con el fin de discriminar las distancias genéticas en especies estrechamente relacionadas.
- Se recomienda la aplicación de técnicas más sensibles como secuenciación de siguiente generación (NGS), para identificar especies fúngicas no cultivables en condiciones *in vitro* o de difícil recolección, con el fin de dilucidar profundamente las interacciones del microbioma del suelo promoviendo la aplicación de hongos filamentosos en bioinsumos o producción de metabolitos secundarios.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- Abdel-Raheem, M. A., & Al-Keridis, L. A. (2017). Virulence of three entomopathogenic fungi against whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato crop. *Journal of Entomology*, 14(4), 155-159.
- Alarcón, E., & Ramírez, F. (2022, octubre 19). *Los hongos en los ecosistemas*. Crónica y el Portal Comunicación Veracruzana. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1835-los-hongos-en-los-ecosistemas>
- Al-Harhi, H. F., Elgorgan, A. M., Ahmed, B., Bahkali, A. H., ElSheshtawi, M., Purusottapatnam Shaik, J., Msaad Al-Falih, A., & Syed, A. (2023). Identification, molecular characterization, and plant growth promoting activities of endophytic fungi of *Jasminum*

- sambac, *Camellia sinensis*, and *Ocimum basilicum*. *Journal of King Saud University - Science*, 35(3), 102558. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102558>
- Amarakoon, I. I., Hamilton, C.-L., Mitchell, S. A., Tennant, P. F., & Roye, M. E. (2017). Chapter 28—Biotechnology. En S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy* (pp. 549-563). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00028-7>
- Asemoloye, M. D., Tosi, S., Daccò, C., Wang, X., Xu, S., Marchisio, M. A., Gao, W., Jonathan, S. G., & Pecoraro, L. (2020). Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites. *Microorganisms*, 8(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121912>
- Asiegbu, F. O., & Kovalchuk, A. (2021). Chapter 1—An introduction to forest biome and associated microorganisms. En F. O. Asiegbu & A. Kovalchuk (Eds.), *Forest Microbiology* (pp. 3-16). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822542-4.00009-7>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., & Struhl, K. (Eds.). (2001). *Current protocols in molecular biology*. (Greene Publishing&Wiley-Interscience). Wiley.
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *Programa de control de claidad de muestras de ADN y ARN*. 2. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Bargues, M. D., Schofield, C. J., & Dujardin, J.-P. (2010). 6—Classification and Phylogeny of the Triatominae. En *American Trypanosomiasis* (pp. 117-147). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00006-X>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1987). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4.<sup>a</sup> ed.). Macmillan.
- Bautista, C. E., Monks, S., & Pulido, G. (2013). Los parásitos y el estudio de su biodiversidad: Un enfoque sobre los estimadores de la riqueza de especies. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas.*, 4, 6.

- Bentos, F. R., & Sosa, F. C. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *INNOTEC*, 20, 117-138.
- Bermúdez, M. de J., Guzmán, S., Orozco, M., Velázquez, J. J., Buenrostro-Nava, M. T., & Michel, C. Y. (2016). Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(4), 897-910.
- Bertero, A., Moretti, A., Spicer, L. J., & Caloni, F. (2018). Fusarium Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. *Toxins*, 10(6), Art. 6.  
<https://doi.org/10.3390/toxins10060244>
- Bihal, R., Al-Khayri, J. M., Banu, A. N., Kudesia, N., Ahmed, F. K., Sarkar, R., Arora, A., & Abd-El salam, K. A. (2023). Entomopathogenic Fungi: An Eco-Friendly Synthesis of Sustainable Nanoparticles and Their Nanopesticide Properties. *Microorganisms*, 11(6), 1617. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061617>
- Butler, J. M. (2012). Chapter 2—DNA Extraction Methods. En J. M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 29-47). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00002-6>
- Cadavid-Mora, Y., Márquez-Cardozo, C. J., Cadena-Chamorro, E., Londoño-Hernandez, L., & Yepes-Betancur, D. (2023). Chapter 2—Enzymes production from fruit and vegetable waste and their industrial applications. En *Value-Addition in Agri-food Industry Waste Through Enzyme Technology* (pp. 17-36). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89928-4.00014-6>
- Carvalho, M., Mathis, J., Hamzah, B. A., Forbes, V. L., Carlarne, C. P., & Manfredi, J. L. (2023). Chapter 21—Ocean law, policies, and regulation. En L. E. Fleming, L. B. Alcantara Creencia, W. H. Gerwick, H. C. Goh, M. O. Gribble, B. Maycock, & H. Solo-Gabriele (Eds.), *Oceans and Human Health (Second Edition)* (pp. 643-685). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95227-9.00023-3>

- Castelán, M. E., Hack, C. M., Porta, M., Sotelo, C. E., Arzuaga, S. A., Llano, K. R. Á., Banegas, N., Carnicer, S., Collavino, M. M., Leiva, S. M. C., Correa, A., Cossoli, M. R., Delfino, M. R., Ferrerira, M., González, D., Grasso, D. H., Iglesias, M. C., Mansilla, N., Martin, C., ... Viruel, E. (2023). *Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo* (1.<sup>a</sup> ed.). Universidad Nacional del Nordeste EUDENE.  
[https://eudene.unne.edu.ar/images/PDFs\\_Descarga/Metodologias\\_microbiologicas\\_de\\_indicadores\\_ambientales\\_de\\_suelo.pdf](https://eudene.unne.edu.ar/images/PDFs_Descarga/Metodologias_microbiologicas_de_indicadores_ambientales_de_suelo.pdf)
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de hongos* (1.<sup>a</sup> ed.). Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.
- Chauhan, D. T. (2018, noviembre 4). *Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparation of Chemicals and Protocol*. Genetic Education. <https://geneticeducation.co.in/phenol-chloroform-dna-extraction-basics-preparation-of-chemicals-and-protocol/>
- Chen, Q., Lan, C., Zhao, L., Wang, J., Chen, B., & Chen, Y.-P. P. (2017). Recent advances in sequence assembly: Principles and applications. *Briefings in Functional Genomics*, 16(6), 361-378. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elx006>
- Chiquillo, H. (2015). *Generalidades destacables de los hongos para su caracterización en morfología, reproducción e importancia*.  
[https://www.academia.edu/77198741/Generalidades\\_destacables\\_de\\_los\\_hongos\\_para\\_su\\_caracterizaci%C3%B3n\\_en\\_morfolog%C3%ADa\\_reproducci%C3%B3n\\_e\\_importancia](https://www.academia.edu/77198741/Generalidades_destacables_de_los_hongos_para_su_caracterizaci%C3%B3n_en_morfolog%C3%ADa_reproducci%C3%B3n_e_importancia)
- Chiriboga, B. (2023). *Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos 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*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Coca, J., & Dustet, J. C. (2006). Expression and characterization of lipase produced by mucor griseocyanus. *Biotecnología Aplicada*, 23, 224-228.

COMAV Institute. (2010). *Ensamblaje y mapeo de secuencias tipo Sanger*.

[https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro\\_bioinf/ensamblaje.html](https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/ensamblaje.html)

Conlon, B. H., Schmidt, S., Poulsen, M., & Shik, J. Z. (2022). Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR Protocols*, 3(1), 101126.

<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101126>

Cruz, I., Márquez, I., García, R. S., Carrillo, J. A., León, J., Allende-Molar, R., Cruz-Lachica, I., Márquez-Zequera, I., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A., León-Félix, J., & Allende-Molar, R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 397-417. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>

Dirección de Bromatología de Neuquen. (2021). *Procedimientos de microbiología molecular*.

<https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>

Dixon, P. (2010). Chapter One—Structure and function of the genome. En P. Bennett & C.

Williamson (Eds.), *Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (Fourth Edition)* (pp. 1-11). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10281-3.00005-1>

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (Eds.). (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19, 11-15.

Dujardin, J. P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., & Catalá, S. (2009). Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica*, 110(2-3), 101-111.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.026>

Durán, M., & Zapata, H. (2020). *Evaluación de la biodiversidad fúngica en suelos de la reserva natural Banco Totumo—Bijibana (municipio de Repelón) y el humedal El Limón (corregimiento de Las Compuertas, municipio de Manatí) en el departamento del Atlántico*. [Universidad de la Costa-CUC].

<https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/6346/EVALUACI%C3%93N%20D>



E%20LA%20BIODIVERSIDAD%20FUNGICA%20EN%20SUELOS%20DE%20LA%20RESERVA%20NATURAL%20BANCO%20TOTUMO%20-%20BIJIBANA%20%28MUNICIPIO%20DE%20REPELON%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Escalante, T. (2003). ¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao.

*Elementos : Ciencia y cultura.*

[https://www.researchgate.net/publication/26419434\\_Cuántas\\_especies\\_hay\\_Los\\_estimadores\\_no\\_parametricos\\_de\\_Chao](https://www.researchgate.net/publication/26419434_Cuántas_especies_hay_Los_estimadores_no_parametricos_de_Chao)

Escalante, T., & Morrone, J. J. (2002). Métodos para medir la biodiversidad. *Acta zoológica mexicana*, 85, 195-196.

Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En *Herramientas Moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1.ª ed., p. 274). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

*Aspectos teóricos y prácticos* (1.ª ed., p. 274). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

[https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

Flores, F. (2021). *Protocolo para la identificación molecular de microorganismos.*

Fonseca-Guerra, I. R., Chiquillo-Pompeyo, J. C., Benavides Rozo, M. E., & Díaz Ovalle, J. F.

(2022). *Fusarium spp. Associated with Chenopodium quinoa crops in Colombia.*

*Scientific Reports*, 12(1), 20841. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24908-w>

Fox, R., & Boddy, L. (2013). Fungi why they are important in horticulture. *The Horticulturist*, 22(2), 18.

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>

Fuentes, A. (2015). Identificación de especímenes y delimitación de morfoespecies. En

Jorgensen & M. Cayola (Eds.), *Manual de Trabajo, Proyecto Inventario Botánico de la*

*Región del Madidi* (pp. 181-191).

[https://www.researchgate.net/publication/310802757\\_Identificacion\\_de\\_especimenes\\_y\\_delimitacion\\_de\\_morfoespecies](https://www.researchgate.net/publication/310802757_Identificacion_de_especimenes_y_delimitacion_de_morfoespecies)

FUJIFILM Wako Chemicals. (2014, enero 30). *10 Métodos de Extracción de ADN*.

<https://www.wakolatinamerica.com/blog-reactivos/noticias-wako/post/10-metodos-de-extraccion-de-adn/>

Gams, W., Diederich, P., & Pöldmaa, K. (2004). 17—FUNGICOLOROUS FUNGI. En G. M.

Mueller, G. F. Bills, & M. S. Foster (Eds.), *Biodiversity of Fungi* (pp. 343-392). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50020-9>

García, A. S. (2023). Historia de la micología. *Revista de la Universidad de México*, 6.

Gomes, A., & Korf, B. (2018). Chapter 5—Genetic Testing Techniques. En N. H. Robin & M. B.

Farmer (Eds.), *Pediatric Cancer Genetics* (pp. 47-64). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor*

*Protocols*, 2020(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>

Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2),

116-117. [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18)

Ha, M., Morrow, M., & Algiers, K. (2020, julio 31). 5.2.4: *Biodiversity in Ecosystems*. Biology

LibreTexts.

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/Botany\\_\(Ha\\_Morrow\\_and\\_Algers\)/05%3A\\_Ecology\\_and\\_Conservation/5.02%3A\\_Communities\\_and\\_Ecosystems/5.2.04%3A\\_Biodiversity\\_in\\_Ecosystems](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/Botany_(Ha_Morrow_and_Algers)/05%3A_Ecology_and_Conservation/5.02%3A_Communities_and_Ecosystems/5.2.04%3A_Biodiversity_in_Ecosystems)

Han, P., Zhang, X., Xu, D., Zhang, B., Lai, D., & Zhou, L. (2020). Metabolites from *Clonostachys* Fungi and Their Biological Activities. *Journal of Fungi*, 6(4), 229.

<https://doi.org/10.3390/jof6040229>

- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>
- Hernández Pérez, A., Cerna Chávez, E., Delgado Ortiz, J. C., Beltrán Beache, M., Hernández Bautista, O., Tapia Vargas, L. M., Ochoa Fuentes, Y. M., Hernández Pérez, A., Cerna Chávez, E., Delgado Ortiz, J. C., Beltrán Beache, M., Hernández Bautista, O., Tapia Vargas, L. M., & Ochoa Fuentes, Y. M. (2018). Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo del aguacate en Michoacán, México. *Scientia fungorum*, 48, 95-98. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.48.1232>
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Martínez-Bolaños, M., Hernández-Arenas, M., López-Guillén, G., Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Martínez-Bolaños, M., Hernández-Arenas, M., & López-Guillén, G. (2017). Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1), 150-161. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1608-1>
- Hillis, D. M. (1997). Phylogenetic analysis. *Current Biology*, 7(3), R129-R131.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(97\)70070-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(97)70070-8)
- Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2009). Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*, 55, 133-138. <https://doi.org/10.1007/s10086-008-1011-3>
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra Martínez, R., & Sepúlveda-Chavera, G. (2014). Un método rápido y eficiente para la extracción de ADN total de hongos filamentosos del suelo. *Idesia (Arica)*, 32(2), 75-78. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Huang, Z., Ali, S., Ren, S.-X., & Wu, J.-H. (2010). Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. *Insect Science*, 17(2), 140-148.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.01299.x>

- Hurdeal, V. G., Gentekaki, E., Hyde, K. D., Nguyen, T. T. T., & Lee, H. B. (2021). Novel *Mucor* species (Mucoromycetes, Mucoraceae) from northern Thailand. *MycKeys*, 84, 57-78. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.84.71530>
- Imam, I. I. (2017). ROLE OF CERTAIN *BEAUVERIA BASSIANA* ISOLATE AS BIOLOGICAL CONTROL AGENT AGAINST WHITEFLY, *BEMISIA TABACI* (GENN.) AND ITS EFFECT ON THE PREDATOR *CHRYSOPELA CARNEA* (STEPHENS). *Egyptian Journal of Desert Research*, 67(2), 351-359. <https://doi.org/10.21608/ejdr.2017.78730>
- Isaksson, H., Conlin, P. L., Kerr, B., Ratcliff, W. C., & Libby, E. (2021). The Consequences of Budding versus Binary Fission on Adaptation and Aging in Primitive Multicellularity. *Genes*, 12(5), 661. <https://doi.org/10.3390/genes12050661>
- Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., & Pauls, K. P. (2017). Resistencia a las enfermedades ☆. En M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 789-805). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09244-X>
- Kavanagh, K. (2017). *Fungi: Biology and Applications* (3.<sup>a</sup> ed.). John Wiley & Sons.
- Keliikuli, A., Smith, K., Li, Y., & Lee, C. N. (2019). *Natural Farming: The Development of Indigenous Microorganisms Using Korean Natural Farming Methods*.
- Kumar, S., Singh, N., & Prasad, R. (2010). Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1830-1844. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.015>
- La Fertilidad de la Tierra. (2021, septiembre 6). *Elaboración y usos de las trampas de arroz*. <https://www.lafertilidaddelatierra.com/trampas-de-arroz/>
- Latiff, N., Sajap, A., Ghani, I., & Salam, M. (2013). Infectivity of Five *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetales) Strains on Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Infesting Brinjal, *Solanum melongena* (Solanaceae). *Academic Journal of Entomology*, 6, 127-132. <https://doi.org/10.5829/idosi.aje.2013.6.3.7686>

- Leiva-Mora, M., Portal, O., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C., Rojas, L., Roque, B., & Carrera, K. (2014). Caracterización molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en base a grupos de apareamiento sexual. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 70-74.
- Li, T., Im, J., & Lee, J. (2022). Genetic Diversity of *Epicoccum nigrum* and its Effects on *Fusarium graminearum*. *Mycobiology*, 50(6), 457-466.  
<https://doi.org/10.1080/12298093.2022.2148394>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109-123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- López-Legarda, X., Sanmartin, P., Pemberty, M., Granada, D., & Rueda, A. (2012). Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *tumbaga*, 2, 29-49.
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R., Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., ... Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus*, 11(1), 14.  
<https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Magurran, A. (2005). *Measuring biological diversity*. Blackwell Science Ltd.
- Maldonado, L., Sánchez, A., & Villaruel, J. (2023). Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN. *CIENCIA ergo-sum*, 31(1), 11.
- Marcos, Gallego, R. E., & Ochoa de Alda, J. G. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: Desarrollo de una estrategia interdisciplinar a partir de sus fundamentos científicos. *Educación química*, 30(1), 58-69.  
<https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.65732>

- Mitsui, J., Ishiura, H., & Tsuji, S. (2015). Chapter 6—DNA Sequencing and Other Methods of Exonic and Genomic Analyses. En R. N. Rosenberg & J. M. Pascual (Eds.), *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)* (pp. 77-85). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00006-1>
- Mittmann, F., Dienstbach, S., & Wagner, G. (2007). Large scale extraction of high quality moss DNA. *Russian Journal of Plant Physiology - RUSS J PLANT PHYSIOL-ENGL TR*, *54*, 564-568. <https://doi.org/10.1134/S1021443707040206>
- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1).
- Mukherjee, A., Debnath, P., & Ghosh, S. (2020). Biological control of papaya aphid (*Aphis gossypii* Glover) using entomopathogenic fungi. *Vegetos*, *33*, 1-10.
- Naranjo, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *94*(6), 2101-2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nartey, L. K., Pu, Q., Zhu, W., Zhang, S., Li, J., Yao, Y., & Hu, X. (2022). Efectos antagonistas y promotores del crecimiento vegetal de *Mucor moelleri*, un potencial agente de biocontrol. *Microbiological Research*, *255*, 126922. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126922>
- National Geographic. (2023, octubre 19). *Environmental Impacts of Agricultural Modifications*. <https://education.nationalgeographic.org/resource/environmental-impacts-agricultural-modifications>
- Ojha, K. K., Mishra, S., & Singh, V. K. (2022). Chapter 5 - Computational molecular phylogeny: Concepts and applications. En D. B. Singh & R. K. Pathak (Eds.), *Bioinformatics* (pp. 67-89). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00025-0>
- 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 Kiphakiphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25.
- Pacheco Hernández, M. de L., Reséndiz Martínez, J. F., Arriola Padilla, V. J., Pacheco Hernández, M. de L., Reséndiz Martínez, J. F., & Arriola Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: Una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 4-32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Park, H., & DuPont, M. W. (2010). *How to Cultivate Indigenous Microorganisms*. 7.
- Paucay, P. (2016). *Biodiversidad fúngica en el suelo del Bosque Protector Aguarongo, provincia del Azuay—Ecuador* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12814/1/UPS-CT006692.pdf>
- Pelt-Verkuil, E. van, Belkum, A. van, & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science & Business Media. [https://books.google.com.ec/books?id=-AMuhy2Nwb0C&pg=PA97&dq=chloride+magnesium+in+pcr+non+specific+products&hl=es&newbks=1&newbks\\_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwj5ojH59mEAXPFDABHZhKBCsQ6AF6BAgJEA#v=onepage&q=chloride%20magnesium%20in%20pcr%20non%20specific%20products&f=true](https://books.google.com.ec/books?id=-AMuhy2Nwb0C&pg=PA97&dq=chloride+magnesium+in+pcr+non+specific+products&hl=es&newbks=1&newbks_redir=0&sa=X&ved=2ahUKEwj5ojH59mEAXPFDABHZhKBCsQ6AF6BAgJEA#v=onepage&q=chloride%20magnesium%20in%20pcr%20non%20specific%20products&f=true)
- Pérez, J., Burrola, C., & Zepeda, C. (2020). Hongos parásitos de insectos ¿Héroes o Villanos? *Ciencia UANL*, 99. <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=9668>
- Pineda, R. (2019). Estimadores de la riqueza de especies. *La Biodiversidad En Un Mundo Cambiante: Fundamentos Teóricos y Metodológicos*. [https://www.academia.edu/41966738/Estimadores\\_de\\_la\\_riqueza\\_de\\_especies](https://www.academia.edu/41966738/Estimadores_de_la_riqueza_de_especies)
- Piombo, E., Guaschino, M., Jensen, D. F., Karlsson, M., & Dubey, M. (2023). Insights into the ecological generalist lifestyle of *Clonostachys* fungi through analysis of their predicted

- secretomes. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1112673.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1112673>
- Prayogo, Y., & Bayu, M. S. Y. I. (2020). Biological control of Bemisia tabaci gennadius by using entomopathogenic fungi Aschersonia aleyrodis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 456(1), 012041. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/456/1/012041>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017, febrero 15). *Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community* (world) [Review-article]. ACS Publications; American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Reddy, R. (2012). *Cho's Global Natural Farming* (S. Gopal, Ed.; SARRA). SA.
- Roa, V. (2020). Isolation, Identification, and Preserval of Filamentous Fungi Found at Soils of Viotá, Cundinamarca. *Indian Journal of Science and Technology*, 13, 983-1001.  
<https://doi.org/10.17485/ijst/2020/v13i08/146345>
- Rodrigues, I. V. P., Borges, K. R. A., Custódio Neto da Silva, M. A., Soares Brandão Nascimento, M. do D., dos Santos, J., Santana Azevedo, A., & Bezerra, G. F. de B. (2020). Diversity of Soil Filamentous Fungi Influenced by Marine Environment in São Luís, Maranhão, Brazil. *The Scientific World Journal*, 2020, 3727453.  
<https://doi.org/10.1155/2020/3727453>
- Rúa-Giraldo, Á. L. (2023). Taxonomía de los hongos: Un rompecabezas al que le faltan muchas piezas. *Biomédica*, 43(Suppl 1), 288-311. <https://doi.org/10.7705/biomedica.7052>
- Samiksha, S. (2013, agosto 29). 4 Important Classes in which the Nutrition of Fungi may be Classified. *Your Article Library*. <https://www.yourarticlelibrary.com/fungi/4-important-classes-in-which-the-nutrition-of-fungi-may-be-classified/7486>
- Serramo, L., Fracasso, M., Oliveira, D., Ramlo, A., & Riul, P. (2012). The relationship between percentage of singletons and sampling effort: A new approach to reduce the bias of



richness estimates. *Ecological Indicators*.

[https://www.academia.edu/89490210/The\\_relationship\\_between\\_percentage\\_of\\_singleton\\_and\\_sampling\\_effort\\_A\\_new\\_approach\\_to\\_reduce\\_the\\_bias\\_of\\_richness\\_estimates](https://www.academia.edu/89490210/The_relationship_between_percentage_of_singleton_and_sampling_effort_A_new_approach_to_reduce_the_bias_of_richness_estimates)

Sharma, R., Sharad, S., Minhas, G., Sharma, D. R., Bhatia, K., & Sharma, N. K. (2023).

Chapter 12—DNA, RNA isolation, primer designing, sequence submission, and

phylogenetic analysis. En A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, & T. C. Bhalla (Eds.), *Basic*

*Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 197-206). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00012-X>

Shen, C.-H. (2019). *Diagnostic Molecular Biology* (2.<sup>a</sup> ed.). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91788-9.00001-6>

Souza Filho, P. F. (2022). Chapter Five—Fungal protein. En J. Wu (Ed.), *Advances in Food and*

*Nutrition Research* (Vol. 101, pp. 153-179). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.003>

Stivers, L. (2023, enero 24). *Introduction to Soils: Soil Quality*.

<https://extension.psu.edu/introduction-to-soils-soil-quality>

Sun, S., Lin, X., Coelho, M. A., & Heitman, J. (2019). Evolution of yeast mating systems: All

roads lead to selfing. *Current biology : CB*, 29(15), R743-R746.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.073>

Terreros, M., Huanca, W., Arriaga, I., & Ampuero, A. (2015). Efecto de tres crioprotectores en la

criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de*

*Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 420-426.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>

Thrane, U. (2014). Fusarium. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food*

*Microbiology (Second Edition)* (pp. 76-81). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>

- Tibaduiza, L., Ovalle, J., & Botero, L. (Eds.). (2021). *Conservación y manejo de la diversidad microbiana en los bancos de germoplasma para la alimentación y la agricultura en Colombia* (1.<sup>a</sup> ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/36935>
- Ulucan, A., Ekinci, G., Tüfekci, E., Günes, V., Çitil, M., KELEŞ, İ., OZTURK, A. S., OZTURK, A., EPIKMEN, E. T., OKULMUS, C., & ŞİMŞEK, S. G. (2023). *Veterinary: Modern Analysis, Finding and Researches*. Livre de Lyon.
- 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, C. G., Guzmán, M. A., Valdés, A., Forougbakhch, R., Alvarado, M. A., Rocha E., A., Valdez M., C. G., Guzmán L., M. A., Valdés G., A., Forougbakhch P., R., Alvarado V., M. A., & Rocha E., 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>
- Vallejo, V., Roldan, F., & Dick, R. (2010). Soil Enzymatic Activities and Microbial Biomass in an Integrated Agroforestry Chronosequence Compared to Monoculture and a Native Forest of Colombia. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 577-587. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0466-8>
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1-11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- van Burik, J.-A. H., Schreckhise, R. W., White, T. C., Bowden, R. A., & Myerson, D. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*, 36(5), 299-303. <https://doi.org/10.1080/02681219880000471>

- 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>
- Vandepol, N., Liber, J., Yocca, A., Matlock, J., Edger, P., & Bonito, G. (2022). *Linnemannia elongata* (Mortierellaceae) stimulates *Arabidopsis thaliana* aerial growth and responses to auxin, ethylene, and reactive oxygen species. *PLOS ONE*, 17(4), e0261908.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261908>
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (3.<sup>a</sup> ed.). CRC Press.
- Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. (2015). *The Fungi* (3.<sup>a</sup> ed.). Academic Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En *Pcr Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Vol. 31, pp. 315-322).
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. En F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, & K. Struhl (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. 56, p. 2.4.1-2.4.5). John Wiley & Sons.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, 10(3), 127-140. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>
- Yáñez, Á. (2014). *Aprovechamiento de los E.M (Microorganismos eficientes) para mejorar la calidad del abono orgánico tipo compost* [Universidad Técnica de Ambato].  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6797/1/tesis-006%20Maestr%c3%ada%20en%20Agroecolog%c3%ada%20y%20Ambiente%20-%20CD%20220.pdf>

- Zhang, P., Seth, A., & Fernandes, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies. En L. M. McManus & R. N. Mitchell (Eds.), *Pathobiology of Human Disease* (pp. 4074-4088). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8>
- Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K.-Q., & Yu, Z. (2021). New Species of *Trichoderma* Isolated as Endophytes and Saprobes from Southwest China. *Journal of Fungi*, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>

## Apéndices