



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

Pérez Mejía Laura Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz

14 de marzo de 2024



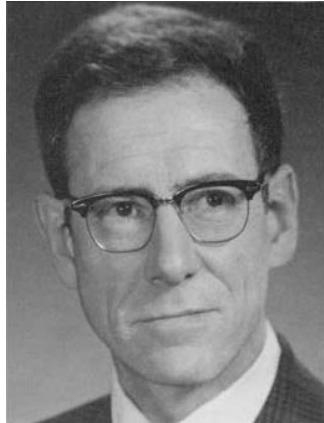


Introducción



Pier Antonio Micheli

Estudio de hongos a finales del siglo XVII



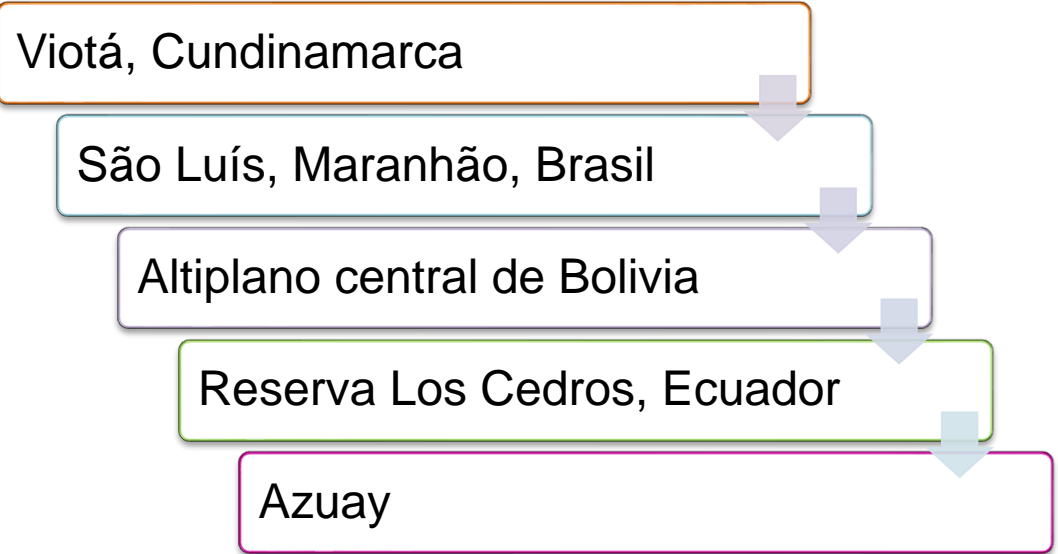
Robert Whittaker

Clasificación del nuevo reino Fungi



2,2 - 3,8 millones de especies

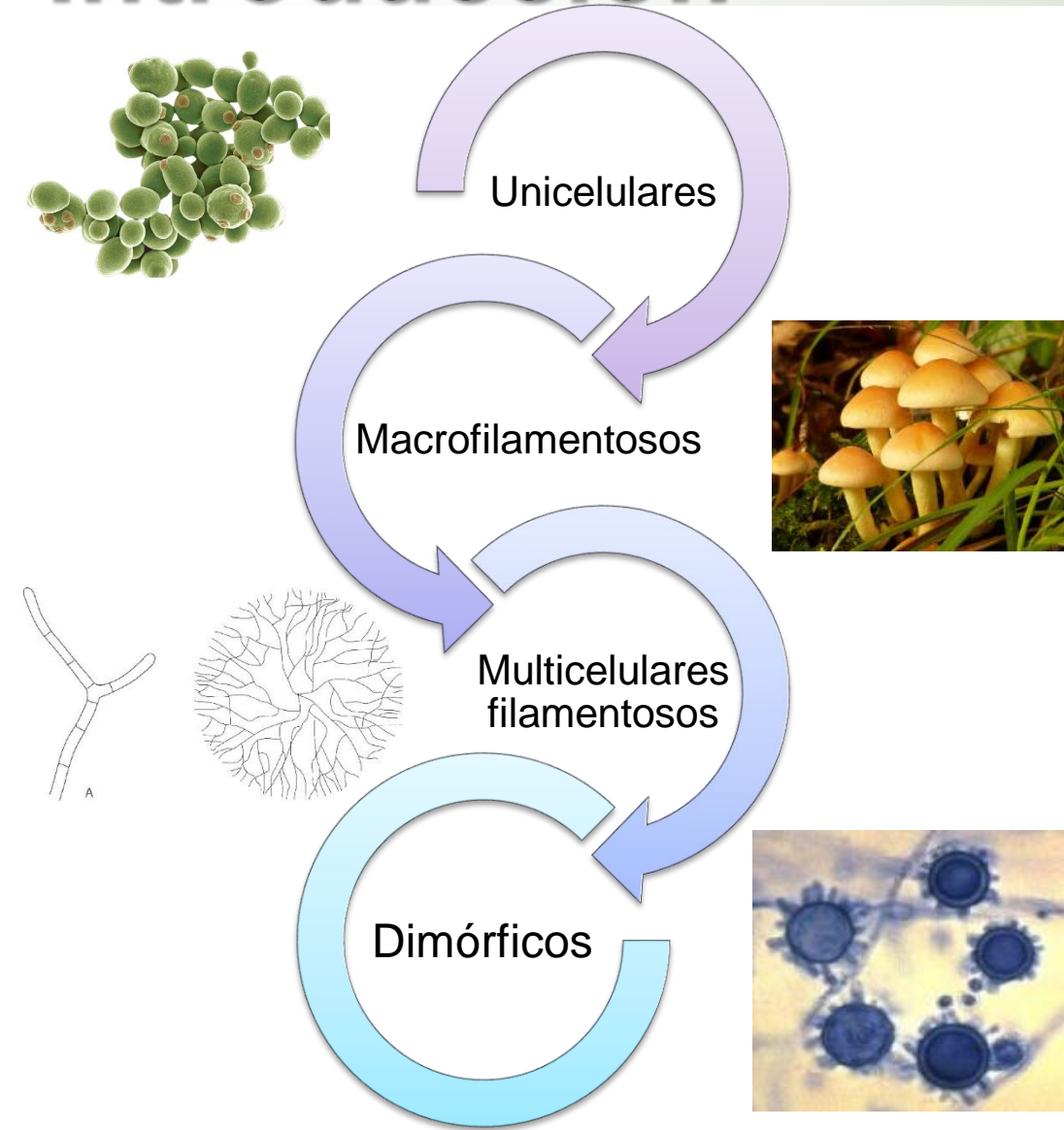
Se conocen alrededor de 150.000



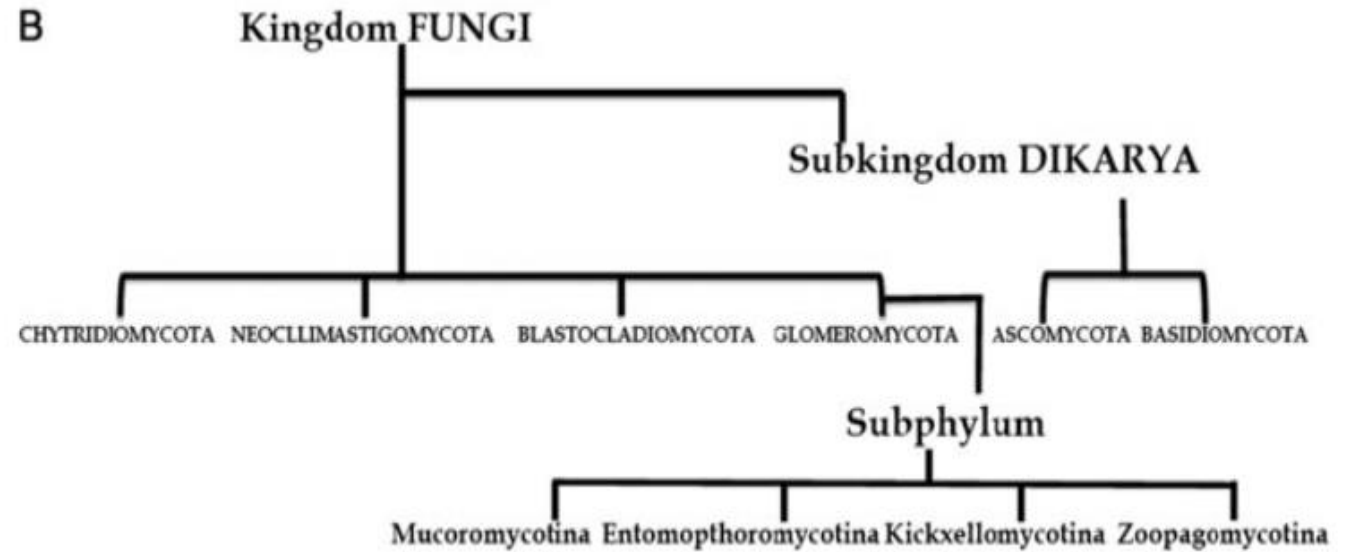
Aspergillus,
Penicillium,
Fusarium y
Trichoderma



Introducción

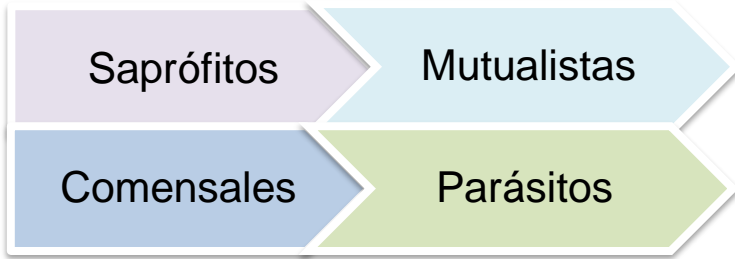


Clasificación de hongos

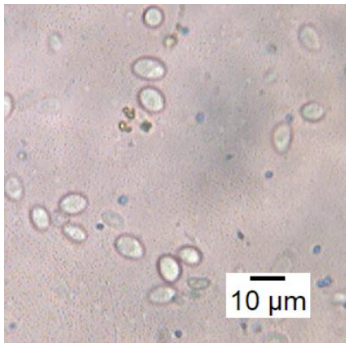
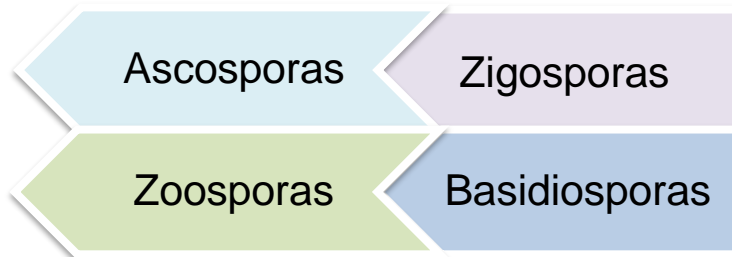


Introducción

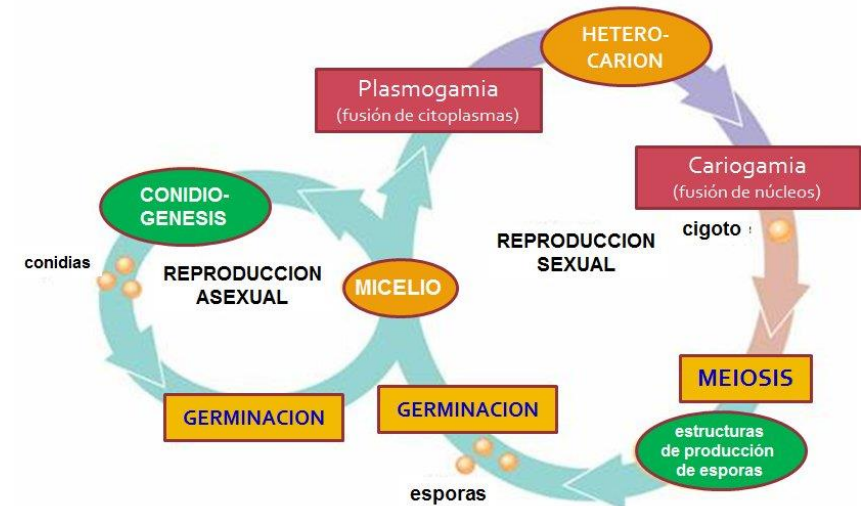
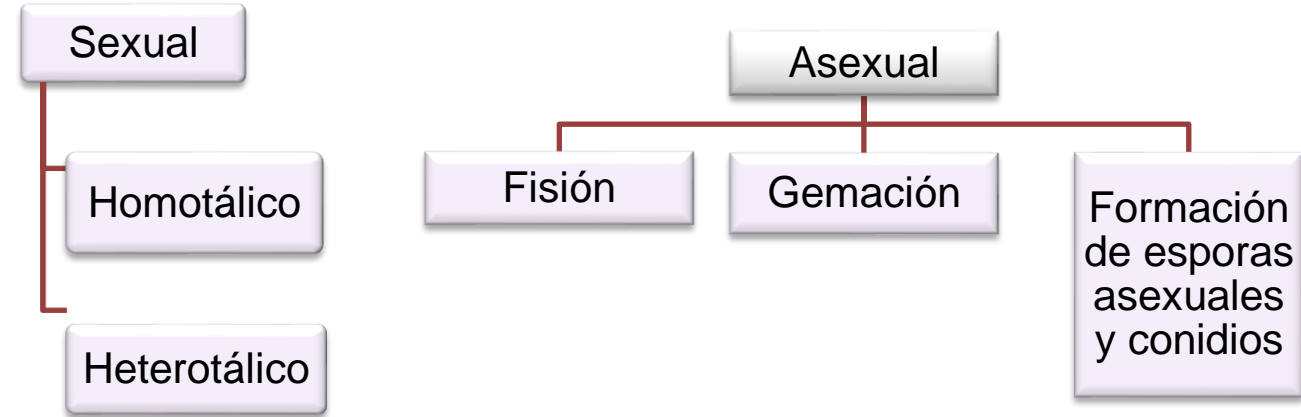
Modo de nutrición



Formación de esporas

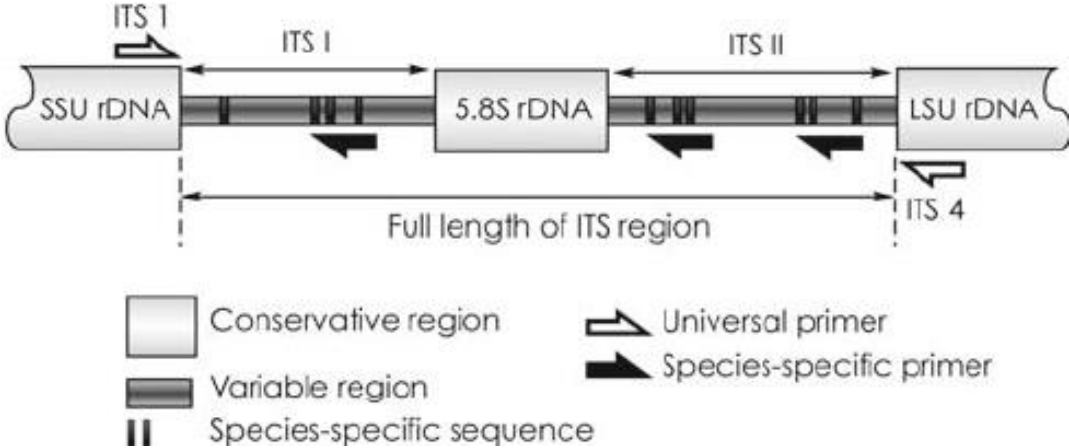


Reproducción



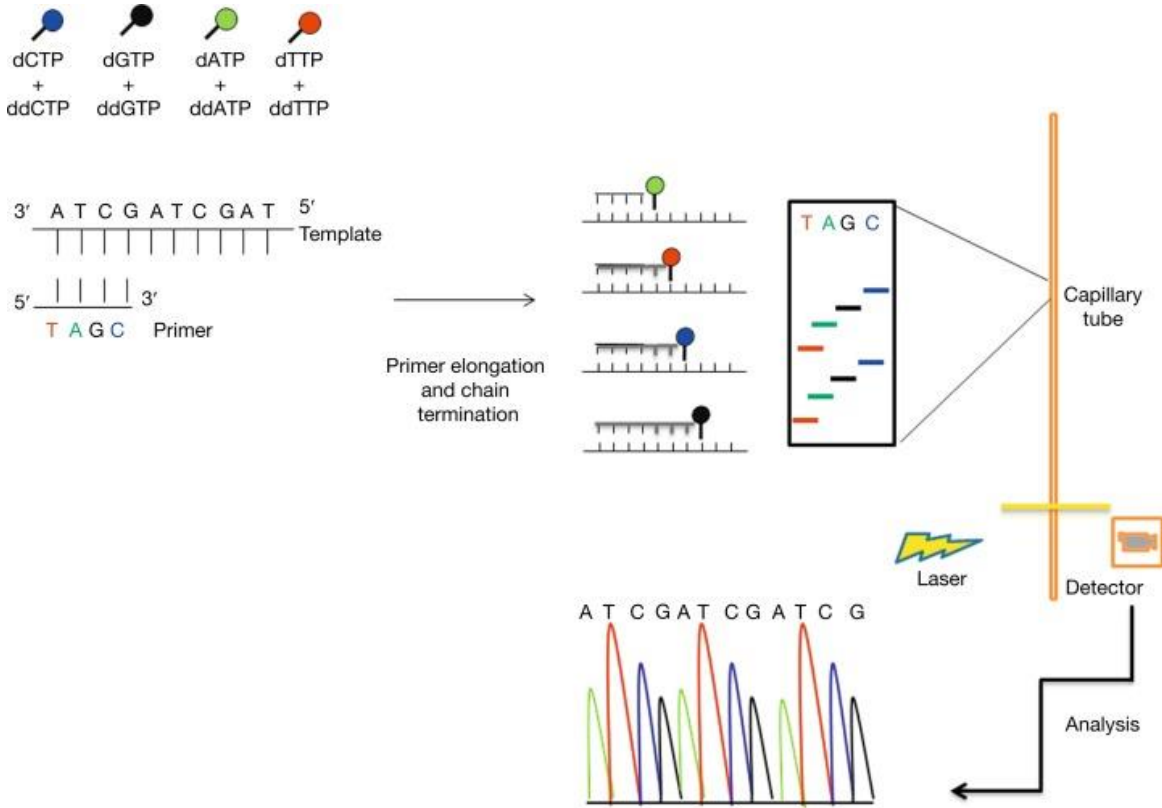
Introducción

Región ITS



Código de barras genéticos de hongos por excelencia

Secuenciación Sanger

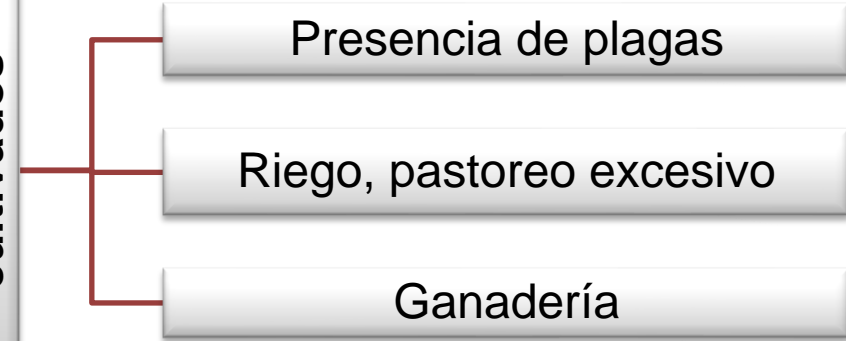


(Raja et al. 2017)

Justificación



Impactos en suelos cultivados



Hacienda "El Prado" - IASA I



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



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivos

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

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



Hipótesis

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



Materiales y métodos

Área: 86.951,81 m²



Figura 1
Área de estudio del sector de Horticultura y Fruticultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I



Preparación de trampas microbianas



Instalación de trampas microbianas



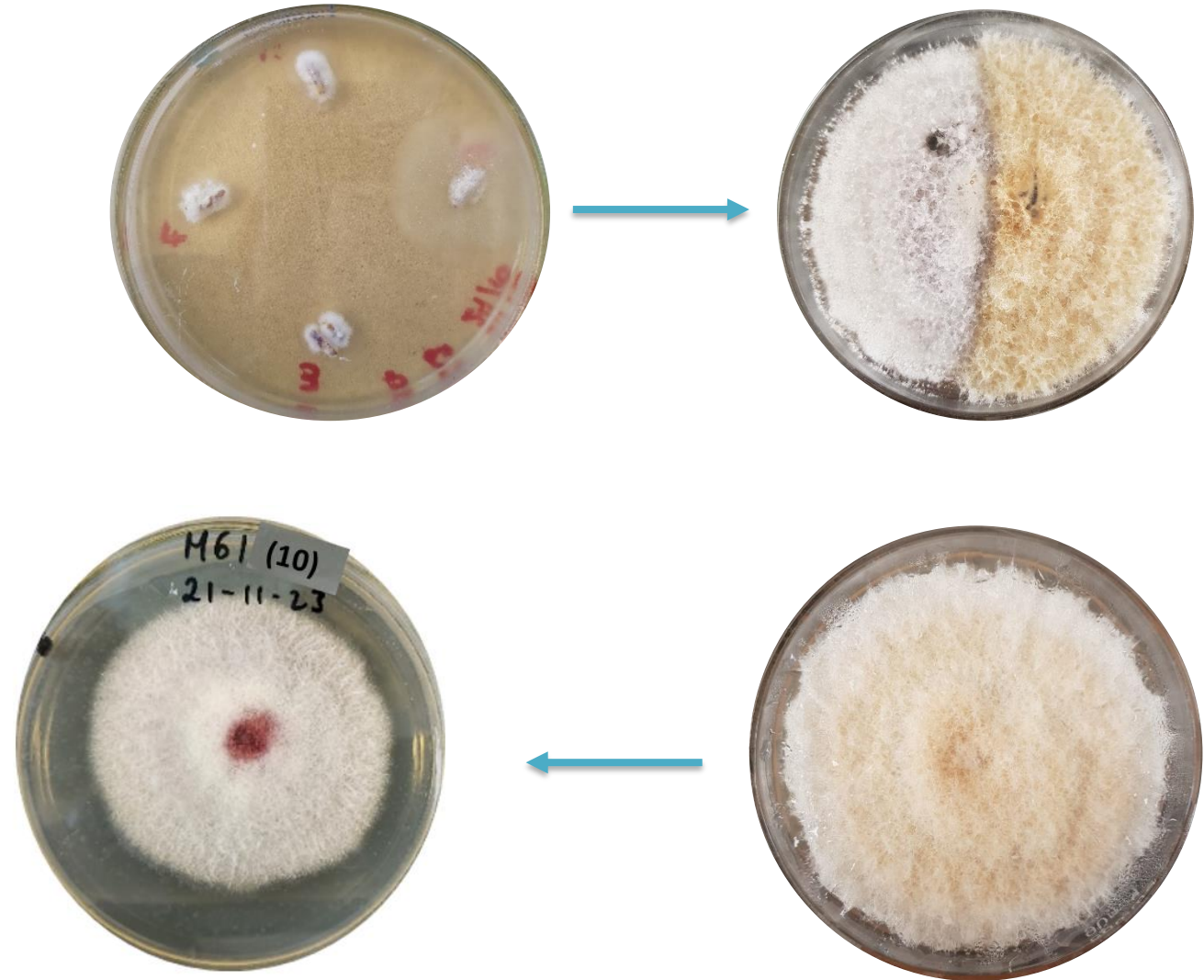
Materiales y métodos

Aislamientos y purificaciones de hongos

Tabla 1 .
Códigos de colores de hongos

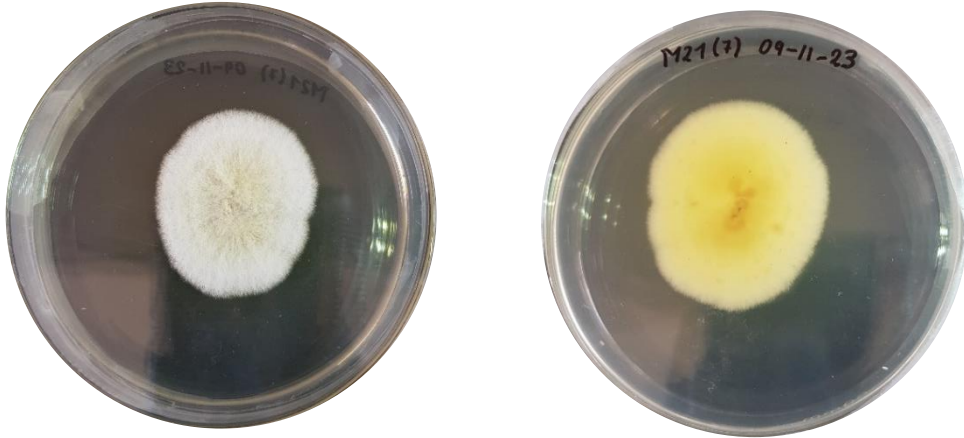
CÓDIGO	COLOR
1	Rojo
2	Morado
3	Lila
4	Gris
5	Blanco
6	Verde
7	Amarillo
8	Negro
9	Beige
10	Naranja
11	Café

Obtención de
cultivos puros



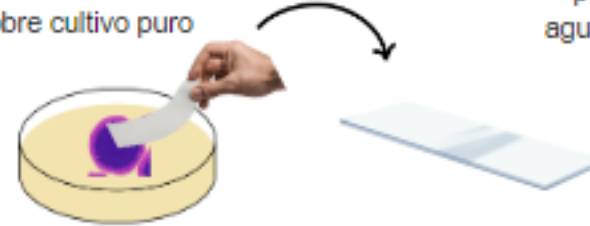
Materiales y métodos

Identificación morfológica macroscópica



Identificación morfológica microscópica

Se presionó cinta adhesiva de 2 cm sobre cultivo puro



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

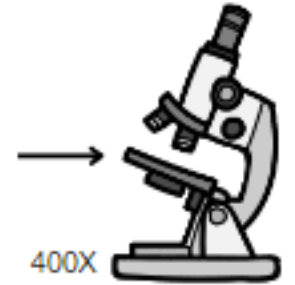
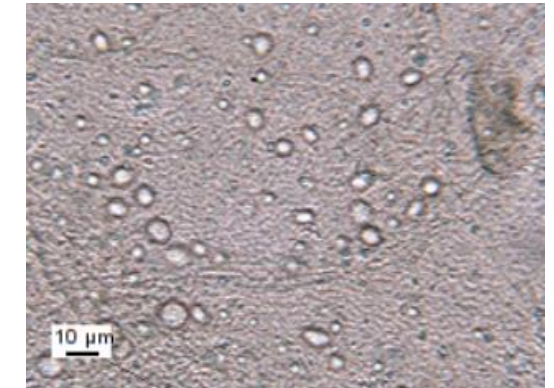


Tabla 2 .
Características macroscópicas

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



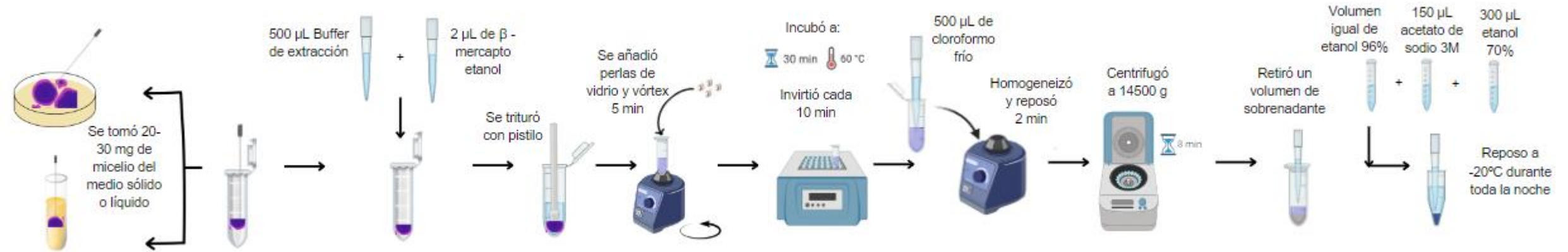
Clasificación de aislamientos por morfoespecies

Materiales y métodos

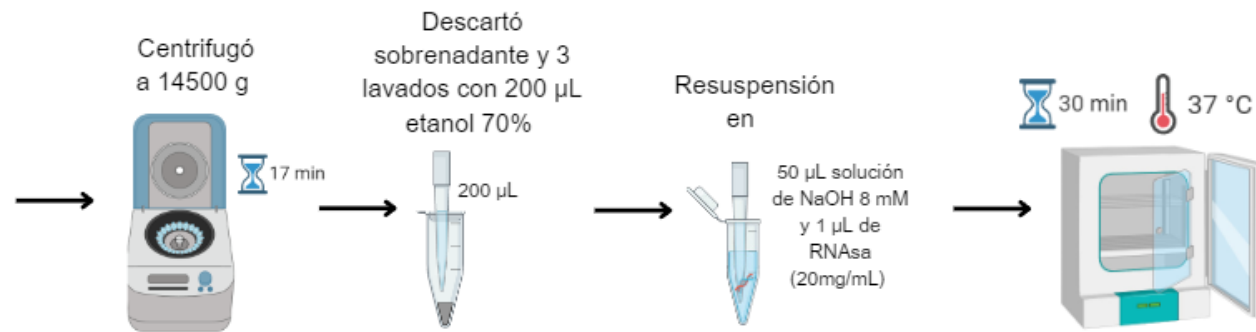
Extracción de ADN

Método orgánico

I Parte

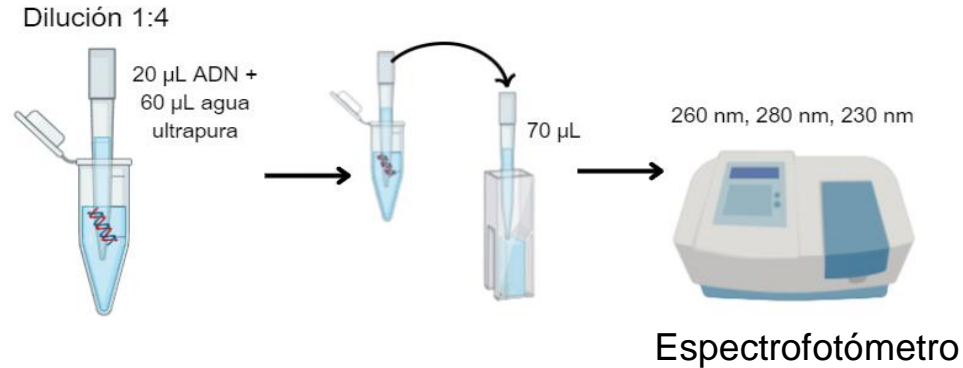


II Parte



Materiales y métodos

Cuantificación de ADN y estimación de pureza



Cálculo de concentración:

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

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

Tabla 3

Crterios de pureza en muestras de ADN

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

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



Materiales y métodos

Evaluación de integridad de ADN

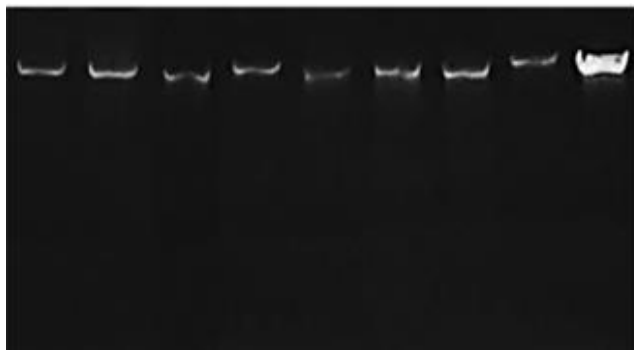
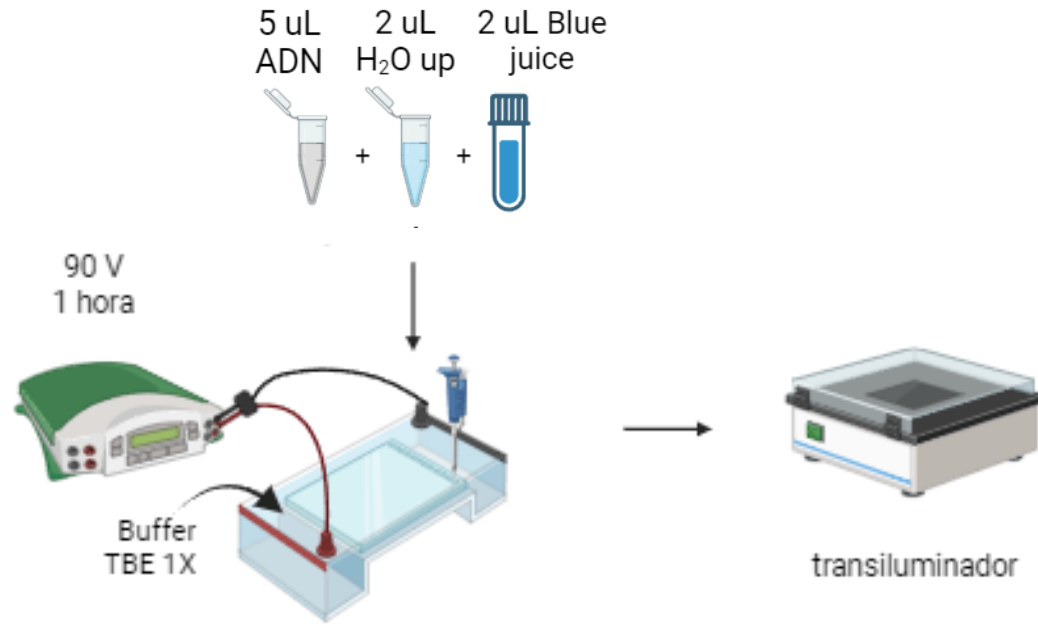


Tabla 4

Criterios de integridad de ADN en gel de agarosa

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

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



Materiales y métodos

Amplificación de región ITS mediante PCR convencional

kit Platinum Taq DNA Polymerasa

Tabla 5

Primers utilizados para amplificación de región ITS

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

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

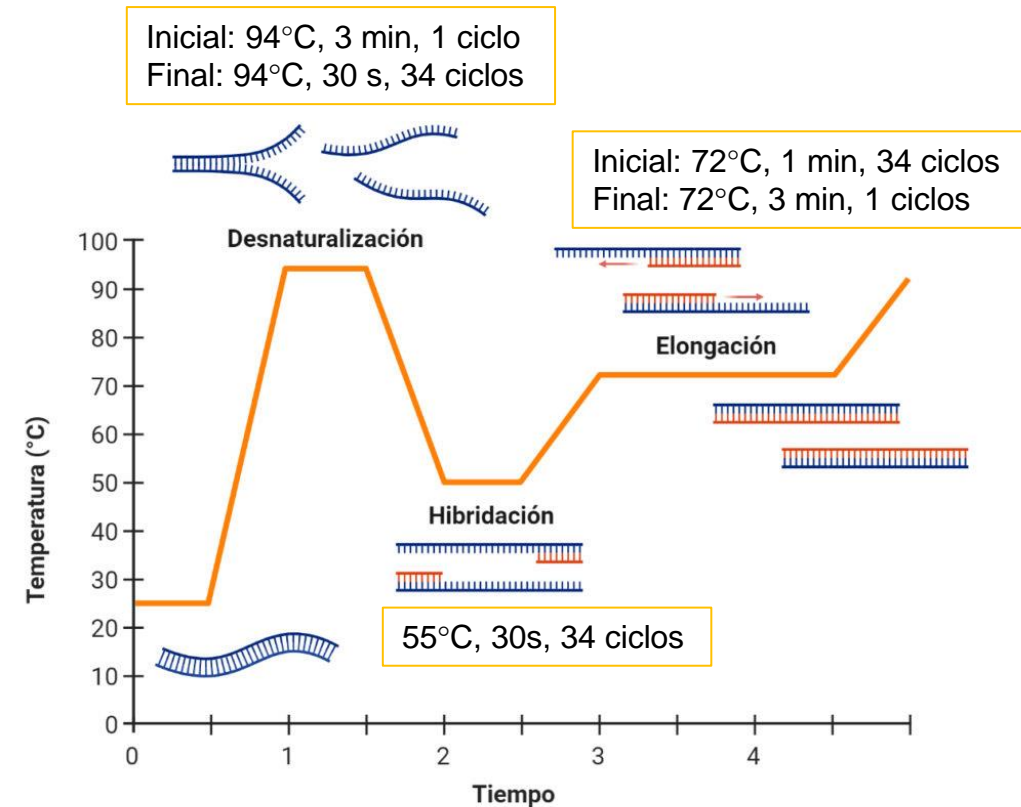
Tabla 6

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

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

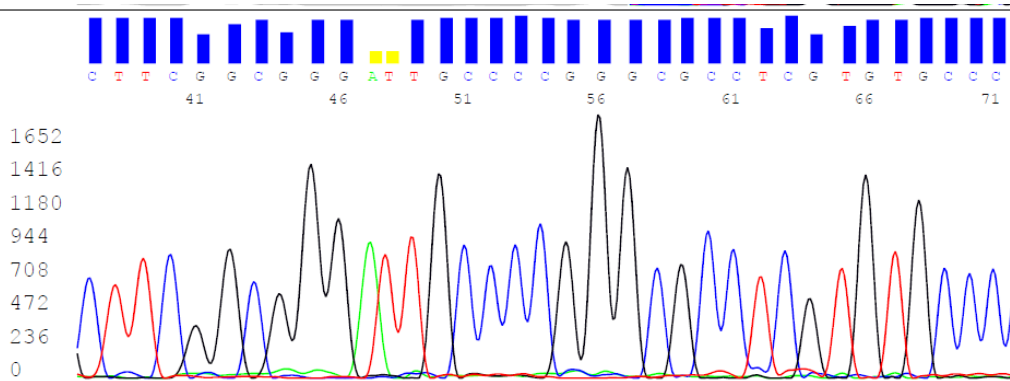
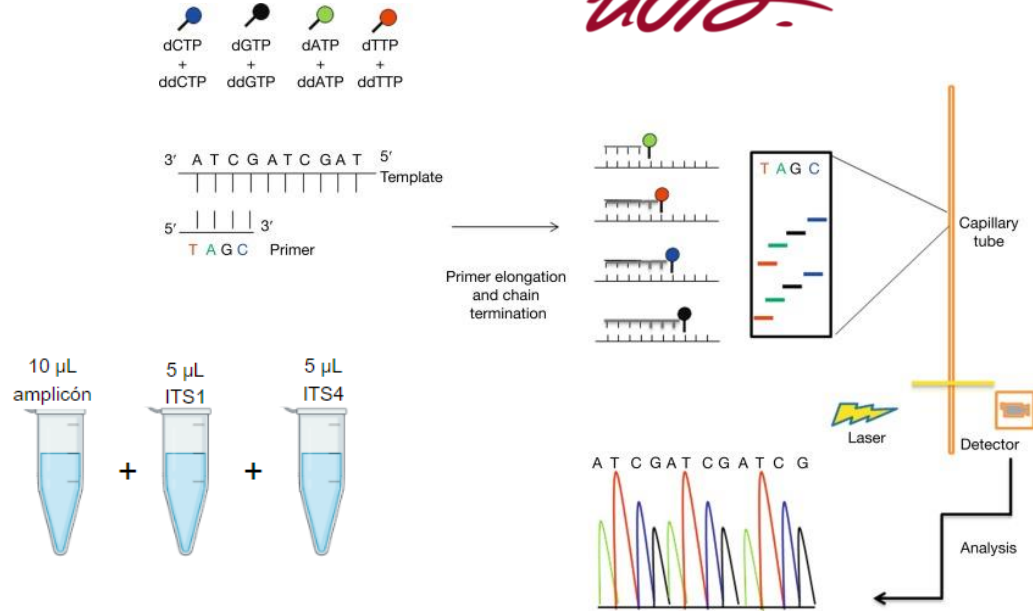
Figura.

Condiciones de amplificación de la región ITS



Materiales y métodos

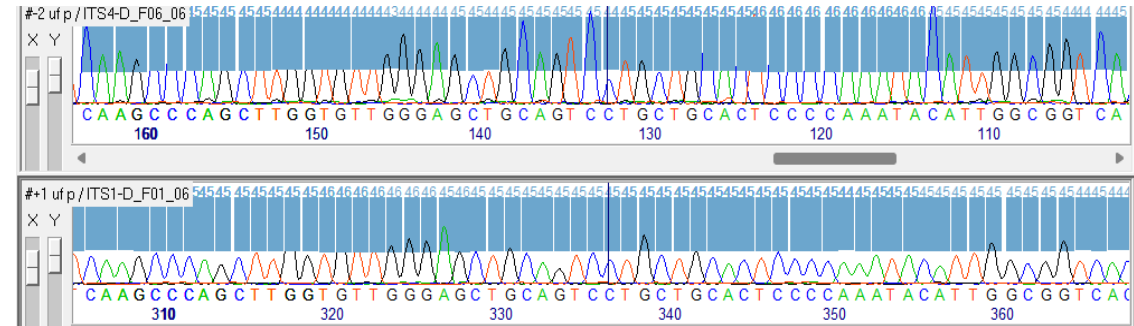
Secuenciación Sanger



Análisis bioinformático



Staden Package



Mega X

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



Materiales y métodos

Evaluación de biodiversidad

Cultivo o aislado puro considerado una entidad individual

Abundancia relativa (p_i):

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

Índice de diversidad de Shannon (H'):

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

Índice de diversidad Simpson (D'):

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

Índice no paramétrico Chao1 (S_{Chao1}):

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

Índice de Margalef (D_{Mg}):

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

Índice de dominancia de Simpson (D):

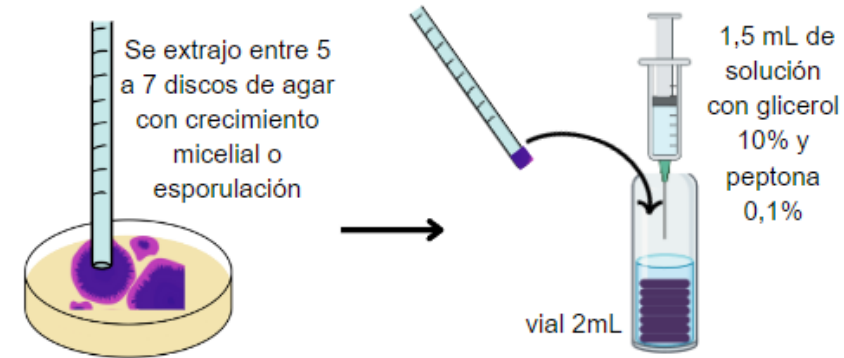
$$D = \sum \left(\frac{n_i}{N} \right)^2 = \sum (p_i)^2$$

Índice de equidad de Pielou (J'):

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

Determinación del rol ecológico en base a literatura

Cepario



Almacenamiento en ultracongelador a -80°C



Resultados y discusión

Tabla 7

Hongos aislados por subparcelas

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

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

50% restante perdido:

- contaminación por gusanos y larvas
- exceso de humedad.


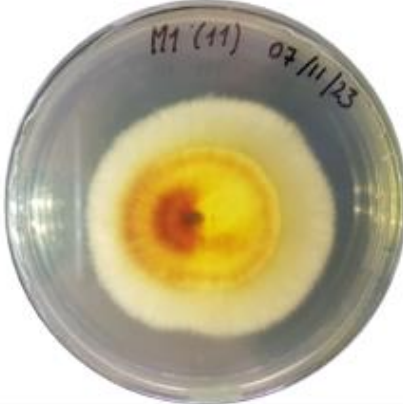
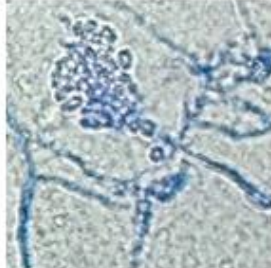


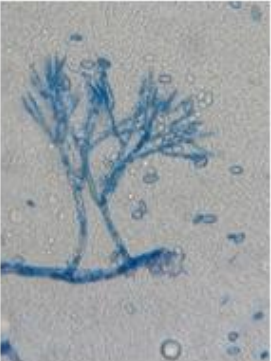
Se obtuvieron 43 cepas aisladas del 50% de subparcelas recuperadas.

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



Resultados y discusión

Tabla 2
Agrupación de hongos por morfoespecie

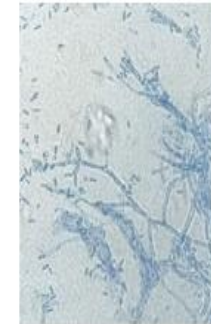
Orden	Crecimiento en PDA (anverso)	Crecimiento en PDA (reverso)	Caracterización microscópica (400X)	Hongos aislados
1				P1-H1-C11 *
2				P23-H9-C11* P61-H15-C3

3



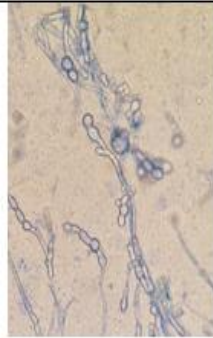
P53-H13-C10 *
P72-H19-C3
P72-H20-C7

6



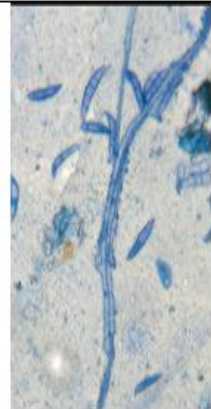
P25-H10-C7*

4



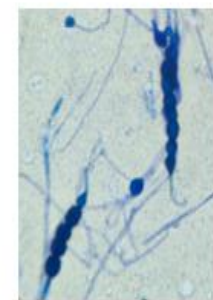
P61-H16-C10 *

7



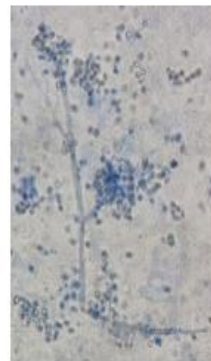
P9-H2-C3 *

5



P72-H21-C8
P72-H22-C9*

8



P81-H26-C7*



9



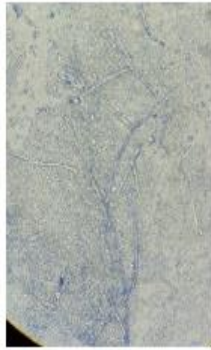
P21-H7-C7 *

12



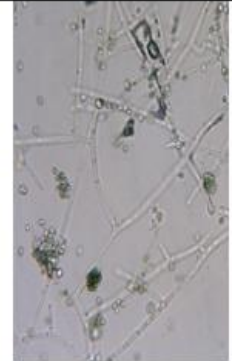
P11-H3-C3
P11-H4-C7 *
P21-H8-C10
P91-H33-C2
P91-H34-C5
P99-H42-C7

10



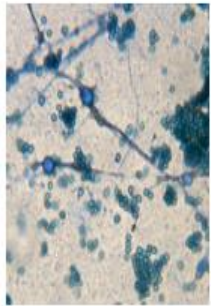
P85-H27-C5 *

13



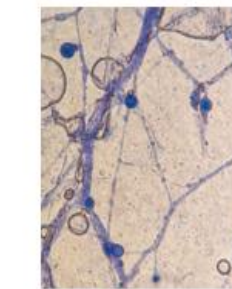
P59-H14-C1
P67-H18-C2
P77-H25-C5
P85-H28-C7
P87-H29-C3
P87-H30-C10
P91-H35- C11 *
P95-H41-C10

11



P17-H5-C5 *

14



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

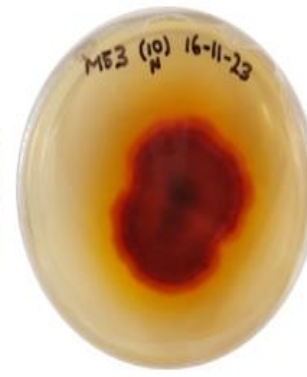


15



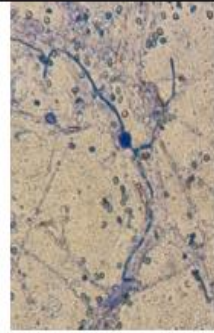
P39-H11-C5*
P95-H40-C7

18



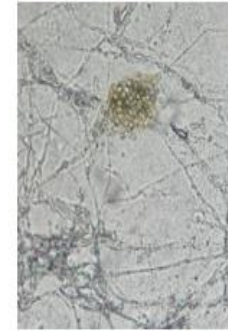
P53-H12-C10 *

16



P17-H6-C8 *

19



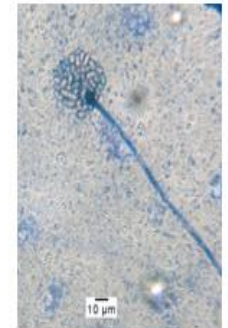
P93-H39- C10 *

17



P76-H24-C5
P92-H36-C9*

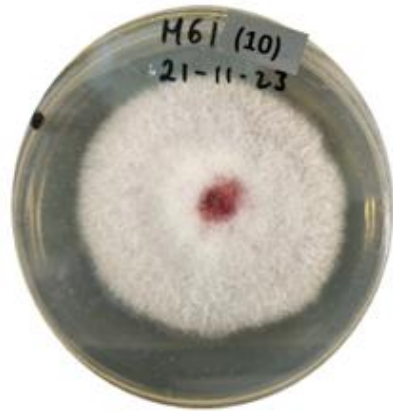
20



P75-H23-C7 *



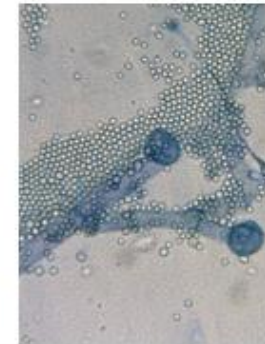
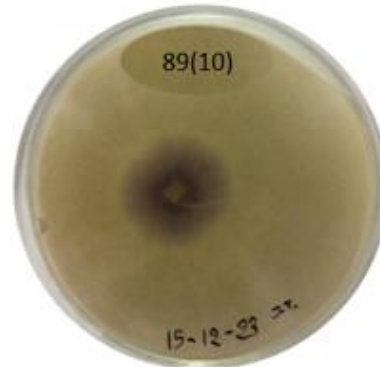
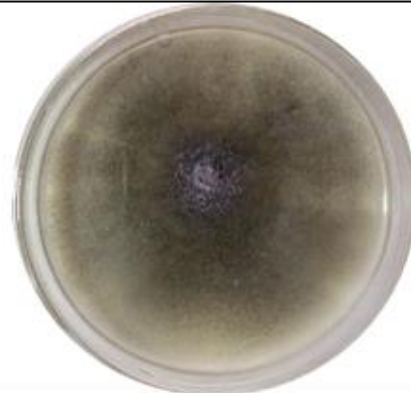
21



P61-H17-C10

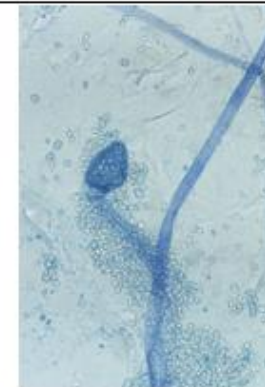
P89-H31-C3

22



P89-H32-C10

23



P93-H37-C2*



Resultados y discusión

Tabla 4

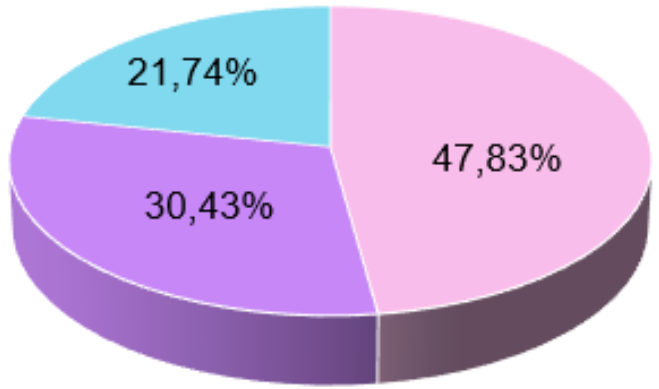
Agrupación de hongos por morfoespecie

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

23 hongos representativos seleccionados para identificación molecular

Concentración promedio de 231,9 ± 86,52.

A260 / A280



- Pureza óptima
- Pureza aceptable
- Comp. Aromáticos

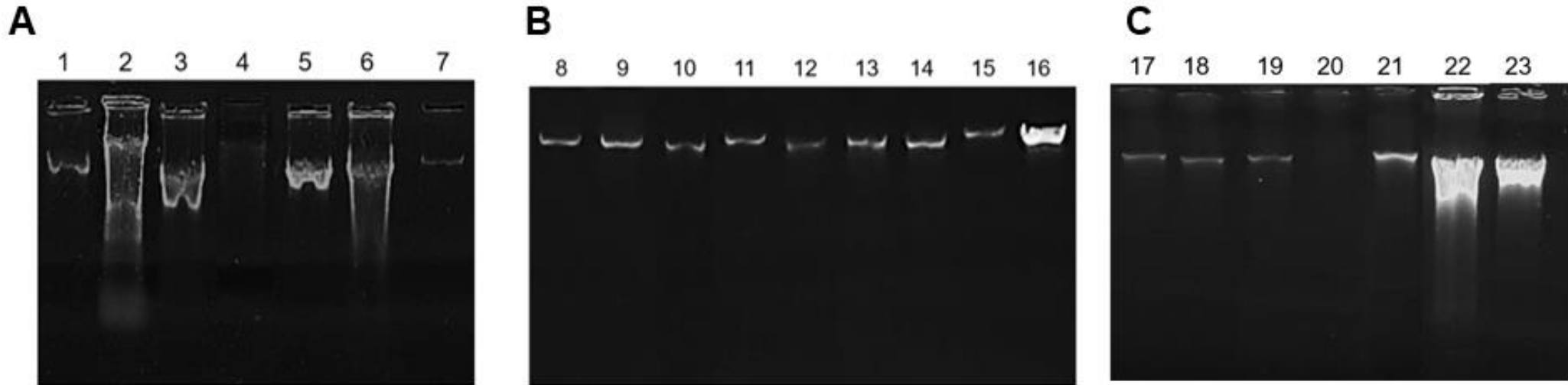
A260 / A230

100% altamente contaminado por compuestos orgánicos como sales y carbohidratos

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

Figura 1

Evaluación de integridad de ADN

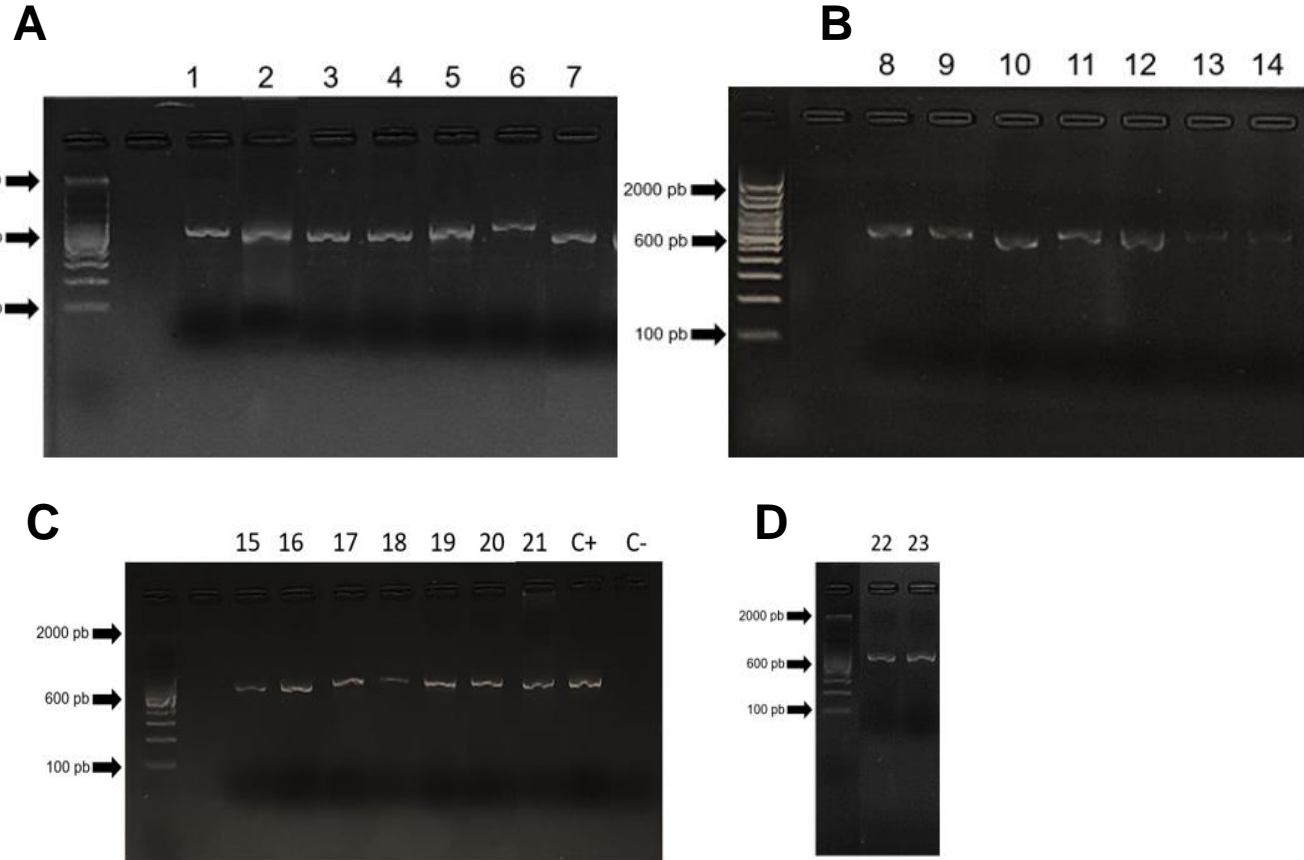


Nota. Carril 1,8,9: *Clonostachys rosea*; Carril 2: *Mucor moelleri*; Carril 3: *Fusarium culmorum*; Carril 4,7: *Fusarium equiseti*; Carril 5: *Linnemannia elongata*; Carril 6: *Fusarium sp.*; Carril 10: *Clonostachys solani*; Carril 11,16: *Trichoderma koningiopsis*; Carril 12,13,15,17: *Trichoderma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

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

Resultados y discusión

Figura 2
Amplificación de la región ITS



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

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

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

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

Resultados y discusión

Tabla 6

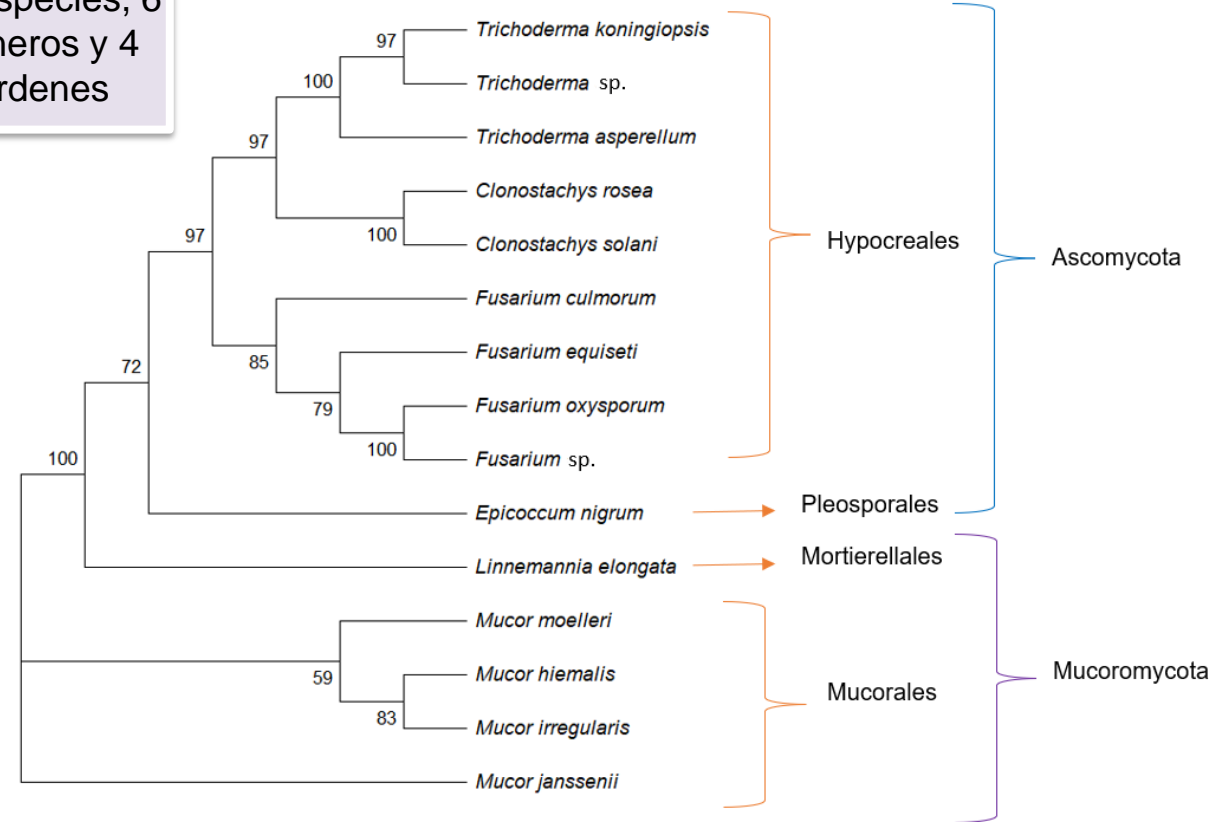
Microorganismos identificados mediante secuencia de la región ITS

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

16 especies, 6 géneros y 4 órdenes

Figura 3

Árbol filogenético de las secuencias ITS identificadas



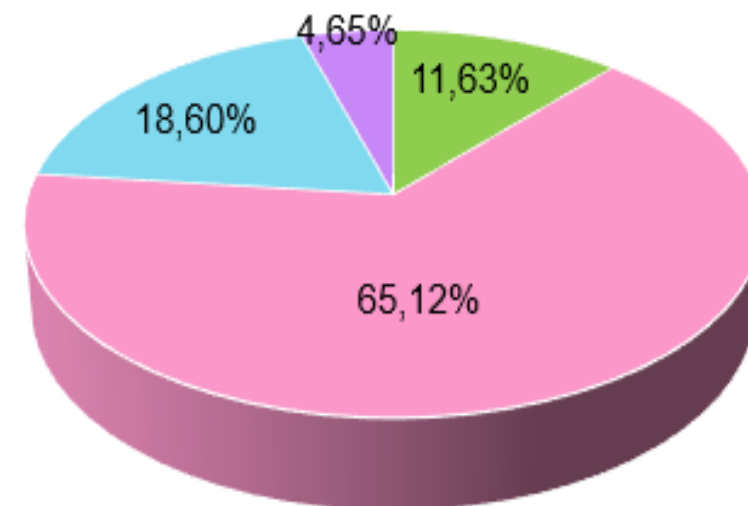
Nota. Historia evolutiva analizada por el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura Nei con Bootstrap de 1000 réplicas.

Resultados y discusión

Tabla 7

Abundancia y clasificación de especies de hongos filamentosos

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



- saprófitos
- antagonistas
- fitopatógenos
- patógenos oportunistas



Resultados y discusión

Evaluación de diversidad

Tabla 8

Índices de diversidad de hongos filamentosos

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

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

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

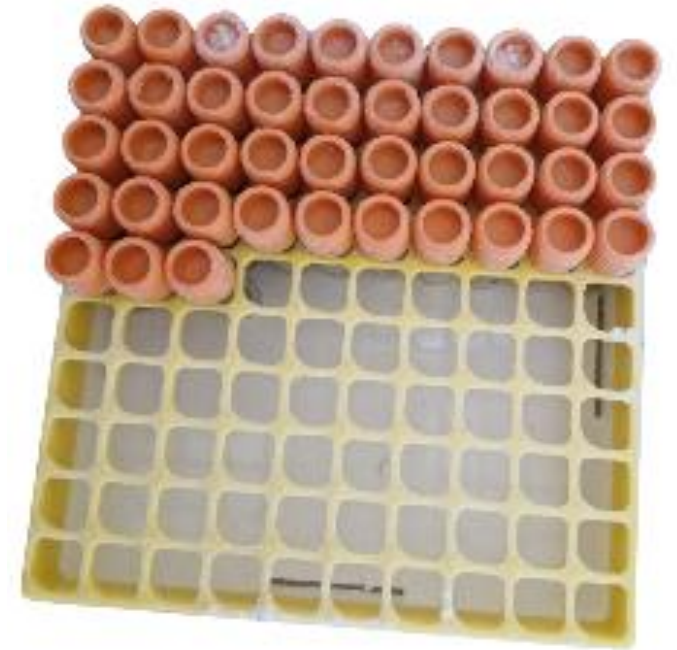
Resultados y discusión

Cepario




Crioconservación de 23 especies de hongos filamentosos





Discos de agar colonizados



CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

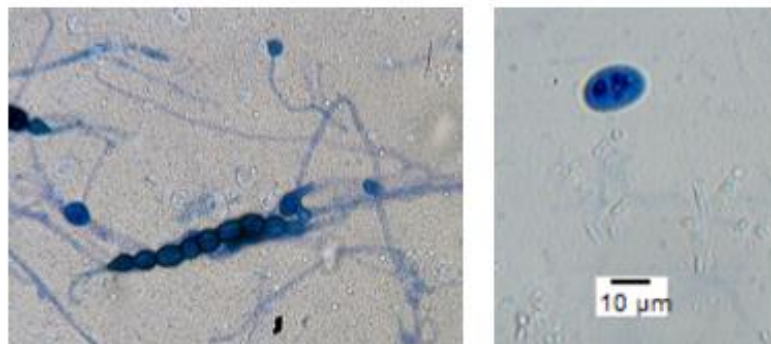
Fecha: 05 de marzo 2024		Especie: <i>Linnemannia elongata</i>	
Orden	5	Código	P72-H22-C9
Tiempo	7 días		
Anverso		Color anverso	Centro: amarillo
			Medio: blanco
			Anillo: -
			Borde: blanco
Textura	Algodonosa	X	
	Polvosa		
Aspecto	Irregular	X	
	Radiado		
Reverso		Altura del micelio	Alto
			Medio
	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

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

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

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

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



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

Clave para Zygomycota

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

Clave para especie de *Linnemannia*

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

Conclusiones

1



43 aislamientos

23 morfoespecies

16 especies

6 géneros

Mucor, Fusarium, Trichoderma, Epicoccum, Linnemannia, Clonostachys

2



Alta biodiversidad (DMg = 5,85, D' = 0,80)

Homogeneidad (D = 0,20, J' = 0,970, H' = 2,21)

Chao 1 (> 27 especies) se evidenció un grado de submuestreo (F/S = 43,8%)

3



ESPE		COLECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS	
IASA I - LABORATORIO AGROBIOTECNOLÓGICO			
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS			
Fecha: 05 de marzo 2024	Examen: Clonostachys rosea	Orden: 1	Código: P23-H9-C11
Orden: 1	Color: anarillo tenue	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Aspecto: esférico	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Altera del medio: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Tipo de crecimiento: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Color de esporulación: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Exhibido: si	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Color: anarillo	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa

ESPE		COLECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS	
IASA I - LABORATORIO AGROBIOTECNOLÓGICO			
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS			
Fecha: 05 de marzo 2024	Examen: Mucor sp.	Orden: 2	Código: P23-H9-C11
Orden: 2	Color: anarillo tenue	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Aspecto: esférico	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Altera del medio: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Tipo de crecimiento: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Color de esporulación: no	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Exhibido: si	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa
Color: anarillo	Color: anarillo	Forma: esférica	Textura: algodonosa

Almacenamiento en las instalaciones del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda "El Prado" - IASA I.

4

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.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Recomendaciones



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

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



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





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

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

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

A mis padres, familia, pareja y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA