



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

Trabajo Experimental:

**“SISTEMATIZACIÓN DEL CEPARIO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE LA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA”**

AUTOR:

Bryan Alejandro Ochoa Cabrera

TUTOR:

Manuel Ernesto Delgado Fernández, Ph.D

CUENCA

2017

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Bryan Alejandro Ochoa Cabrera, con documento de identificación N° 0106554025, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: “SISTEMATIZACIÓN DEL CEPARIO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA. SEDE CUENCA”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Ambiental, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Bryan Alejandro Ochoa Cabrera

Cédula: 0106554025

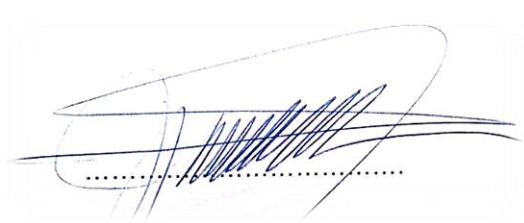
Cuenca, junio del 2017

CERTIFICACIÓN

Yo declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Sistematización del cepario de hongos filamentosos de la Universidad Politécnica Salesiana. Sede Cuenca”, realizado por Bryan Alejandro Ochoa Cabrera, obteniendo el trabajo experimental que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, junio del 2017

Firma:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a dense scribble, written over a horizontal dotted line.

Manuel Ernesto Delgado Fernández, PhD

0102073780

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Bryan Alejandro Ochoa Cabrera, con número de cédula 0106554025, autor del trabajo de titulación: “SISTEMATIZACIÓN DEL CEPARIO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA. SEDE CUENCA”, certifico que el total contenido del trabajo experimental es de mí exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, junio del 2017



Bryan Alejandro Ochoa Cabrera

0106554025

DEDICATORIA

Este es el resultado de un esfuerzo incalculable, cariño fraterno y apoyo incondicional de mi familia; este logro va dedicado a mis padres y hermanos, quienes han sido el apoyo fundamental para permitirme alcanzar esta y todas las metas de mi vida.

A mis amigos y familiares, a las personas que de una u otra forma han significado un aprendizaje en este oficio de vivir; y a todos quienes de algún modo han apoyado mi forjamiento humano, convencido de que con humildad y esfuerzo, las mejores cosas en la vida llegan. Pero sobre todas las cosas a Dios y a su gloria eterna.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana y a todos los docentes, quienes fieles al principio de Don Bosco nos han sabido brindar sus conocimientos para formarnos como excelentes profesionales, pero sobre todo nos han compartido sus valores y enseñanzas para ser mejores seres humanos y personas íntegras.

De manera especial y con mucha gratitud al Dr. Ernesto Delgado, quien con su forma de ser, paciencia y don de gente, sumado a su gran preparación académica y profesionalismo, supo guiarme en este proyecto y culminarlo de manera exitosa.

A las personas que forman parte de la carrera y los laboratorios de Ciencias de la Vida, por la ayuda incondicional en cada proceso realizado dentro del mismo.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad establecer la sistematización de un grupo de cepas de hongos filamentosos dentro de un cepario debidamente organizado, bajo criterios de preservación, codificación y levantamiento de información. Los hongos en mención se aislaron de muestras de suelo provenientes de 3 pisos altitudinales del “Bosque protector Aguarongo” mediante muestreo estratificado. Para este propósito se elaboraron fichas técnicas en las que consta un sistema de información que detalla las características macroscópicas, microscópicas, morfológicas y condiciones de conservación. Se sistematizaron un total de 181 cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., distribuidas en cuanto a número y porcentaje de la siguiente manera: 86 cepas que pertenecen al género *Aspergillus* sp. (48%), 76 cepas al género *Penicillium* sp. (42%); 8 cepas al género *Trichoderma* sp. (4%) y 7 cepas al género *Fusarium* sp. que nos representa un 4%; algunos hongos presentaron estructuras no reproductivas (2%) por lo que no fue posible llevar a cabo su identificación. Como análisis complementario y sin ser un objetivo planteado dentro de este trabajo se realizó una réplica del muestreo de suelo para extracción de ADN con el propósito de llevar a cabo un estudio metagenómico del ABVPA a futuro, cuyos resultados servirán para profundizar la información que se dispone del cepario.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR..... | i |
| CERTIFICADO | ii |
| DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO..... | v |
| RESUMEN..... | vi |
| ÍNDICE GENERAL..... | 1 |
| LISTADO DE TABLAS | 3 |
| ÍNDICE DE IMÁGENES | 5 |
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES..... | 7 |
| ÍNDICE DE ANEXOS | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 10 |
| 2.1 Objetivo General..... | 10 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 10 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 11 |
| 3.1 Generalidades de los hongos | 11 |
| 3.1.1 Reproducción | 11 |
| 3.2 Hongos filamentosos | 11 |
| 3.2.1 Desarrollo de los hongos filamentosos | 12 |
| 3.3 Géneros representativos..... | 14 |
| 3.3.1 <i>Aspergillus</i> sp..... | 14 |
| 3.3.2 <i>Penicillium</i> sp..... | 17 |
| 3.3.3 <i>Trichoderma</i> sp. | 20 |
| 3.3.4 <i>Fusarium</i> sp. | 23 |
| 3.5 Preservación de microorganismos..... | 26 |
| 3.5.1. Conservación a largo plazo..... | 26 |
| 3.5.2 Conservación a corto plazo..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.5.3 Métodos alternativos | 29 |
| 3.6 Estructuración de un cepario..... | 30 |
| 3.7 Identificación taxonómica de hongos mediante biología molecular | 31 |
| 3.7.1 Cuantificación de ADN..... | 31 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Revisión del estado y conservación de los aislados fúngicos..... | 33 |
| 4.2 Sistematización del cepario | 34 |
| 4.3 Muestreo de la zona..... | 34 |
| 4.5 Extracción de ADN | 36 |
| 5. RESULTADOS | 38 |
| 5.1 Revisión del estado de las cepas..... | 38 |
| 5.2 Análisis y cuantificación de las cepas aisladas..... | 39 |
| 5.4 Sistematización de la información..... | 48 |
| 5.5 Caracterización de la zona de muestreo | 55 |
| 5.4 Cuantificación de ADN | 61 |
| 5.5 Proyección futura..... | 63 |
| CONCLUSIONES | 64 |
| RECOMENDACIONES | 65 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 66 |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS | 70 |
| ANEXOS:..... | 72 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación actual del género <i>Aspergillus</i> sp. _____ | 17 |
| Tabla 2. Taxonomía del género <i>Penicillium</i> sp. _____ | 20 |
| Tabla 3. Taxonomía del Género <i>Penicillium</i> sp., según Alexopoulos, 1996. _____ | 23 |
| Tabla 4. Taxonomía. _____ | 25 |
| Tabla 5. Identificación inicial del estado de las cepas aisladas, bajo una codificación de acuerdo a las muestras extraídas en cada sustrato del suelo del ABVPA. _____ | 39 |
| Tabla 6. Disposición de Cepas aisladas según su género _____ | 40 |
| Tabla 7. Organización de las cepas conservadas en el Cepario Institucional de la UPS Cuenca - 2017 _____ | 42 |
| Tabla 8. Organización de las cepas conservadas en el Cepario Institucional de la UPS Cuenca - 2017 _____ | 43 |
| Tabla 9. Disposición final de las cepas en gradillas codificadas y estructuradas dentro del cepario _____ | 44 |
| Tabla 10. Ficha técnica de información sistematizada de características del desarrollo y conservación del <i>Aspergillus</i> sp. _____ | 49 |
| Tabla 11. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del <i>Penicillium</i> sp. _____ | 50 |
| Tabla 12. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del <i>Trichoderma</i> sp. _____ | 51 |
| Tabla 13. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del <i>Fusarium</i> sp. _____ | 52 |
| Tabla 14. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del <i>Penicillium</i> sp. _____ | 53 |
| Tabla 15. Ficha técnica de identificación de características del desarrollo y conservación del hongo <i>Aspergillus</i> sp. _____ | 54 |
| Tabla 16. Codificación de las cepas de acuerdo al género que pertenecen _____ | 55 |
| Tabla 17. Muestreo tomado como referencia para establecer una variación de temperatura en el Bosque Protector Aguarongo _____ | 56 |
| Tabla 18. Estadísticas de variación de la temperatura en la zona de muestreo ABVPA _____ | 57 |

| | |
|---|----|
| Tabla 19. Datos referenciales de variación de humedad del Bosque Protector Aguarongo | 58 |
| Tabla 20. Estadísticas de Humedad del ABVPA | 58 |
| Tabla 21. Datos del nivel altitudinal (m.s.n.m.) al que fueron obtenidas las muestras de suelo en el Bosque Protector Aguarongo | 59 |
| Tabla 22. Estadísticas de la variación del nivel altitudinal del AVBPA, zona donde se llevó a cabo el muestreo | 60 |
| Tabla 23. Detalle de los resultados obtenidos de la extracción de ADN de las muestras analizadas en pureza y estructura a través del software del kit PowerSoild. | 61 |
| Tabla 24. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN | 62 |
| Tabla 25. Determinación de pureza de ADN contenido en las muestras analizadas, en base a valores indicativos preestablecidos | 62 |

ÍNDICE DE IMÁGENES

- Imagen 1. Representación microscópica de la estructura de un hongo filamentoso, fase micelial (azul) y talo filamentoso vegetativo (verde) Fuente: Greslebin A, 2011. _____ 13
- Imagen 2. Identificación microscópica de *Aspergillus* sp., en donde se puede observar el desarrollo de una vesícula con conidios de forma globosa, la disposición de sus fiálides y la longitud de su conidióforo, en una ampliación de 40x. Fuente: El Autor _____ 15
- Imagen 3. Cultivo del *Aspergillus* sp., en PDA dentro de una caja petri en donde se evidencia en crecimiento de la colonia con tonalidades amarillas y verde pardas hacia el centro, con un mínimo grado de esporulación. Fuente: El Autor. _____ 16
- Imagen 4. Estructura microscópica del *Penicillium* sp., en donde se observa la disposición triverticiliada de las cadenas de sus conidios, ramificación de su conidióforo, hifa septada, etc. Con una ampliación 40x Fuente: El Autor _____ 18
- Imagen 5. Desarrollo de una colonia de un *Penicillium* sp., en agar PDA donde se observa su forma de crecimiento con los extremos sin fructuación, de color verde con tonalidades amarillas y una estructura aterciopelada. Fuente: El Autor _____ 19
- Imagen 6. Estructura microscópica de un *Trichoderma* sp., en donde se observa el desarrollo de su fiálide, conidios y conidióforos con una ampliación de 40x. Fuente: El Autor _____ 21
- Imagen 7. Colonia *Trichoderma* sp., se muestra un crecimiento concéntrico irregular con tonalidades blanco-verdosas y anillos concéntricos Fuente: El Autor _____ 22
- Imagen 8. Identificación microscópica de la estructura de las clamnidosporas y macroconidias del *Fusarium* sp., con ampliación 40x Fuente: El autor _____ 24
- Imagen 9. Características macroscópicas de un *Fusarium* sp., en donde se evidencia el crecimiento de la colonia con una coloración blanca y pigmentaciones púrpuras, ampliación 40x. Fuente: El Autor _____ 25
- Imagen 10. NanoDrop 2000 utilizado actualmente en análisis de cuantificación de ADN Fuente: Fuente: ISOGEN, Life Science _____ 33
- Imagen 11. Desarrollo de una cepa de *Penicillium* sp., trasplantada dentro de un cultivo de PDA en caja petri de 9cm, con un periodo de crecimiento de 7 días. Fuente: El Autor _____ 33

Imagen 12. Disposición de las Cepas dentro del tubo a pico de clarín con aceite mineral para su preservación dentro de las gradillas que forman el cepario. Fuente: El Autor _____ 34

Imagen 13. Determinación de la humedad de suelo del BVPA a través del higrómetro, variable importante a considerar dentro de la preservación ex situ de las muestras recolectadas. Fuente: El Autor _____ 35

Imagen 14. Procedimiento de mezcla y vorteadó de las muestras de suelo con las soluciones para la extracción de ADN Fuente: El Autor _____ 37

Imagen 15. Materiales utilizados en la extracción de ADN, junto a la centrífuga utilizada en el procedimiento Fuente: El Autor _____ 37

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Desarrollo y disposición de estructuras de los hongos filamentosos Fuente: Carrillo L, 2007 _____ | 12 |
| Ilustración 2. Especies frecuentes estudiadas de <i>Aspergillus</i> sp., en donde sobresalen: 1) <i>A. Ochraceus</i> , 2) <i>A. Parasiticus</i> y 3) <i>A. Niger</i> _____ | 14 |
| Ilustración 3. Resumen del procedimiento de extracción de ADN a través del Kit PowerSoild Fuente: PowerSolid DNA Insolation Kit, Manual _____ | 36 |
| Ilustración 4. Procedimiento para la cuantificación con NanoDrop Fuente: Se, 1993 _____ | 38 |
| Ilustración 5. Cuantificación de cepas aisladas según su género. Fuente: El Autor. _____ | 40 |
| Ilustración 6. Representación de las cepas conservadas en el cepario de acuerdo a sus porcentajes. Fuente: El Autor _____ | 40 |
| Ilustración 7. Representación del ABVPA en donde se evidencian los puntos de muestreo y las características de cobertura del suelo del ABVPA Fuente: IGM, El Autor _____ | 55 |
| Ilustración 8. Variación de temperatura en el área de muestreo del Bosque Protector Aguarongo Fuente: El Autor _____ | 57 |
| Ilustración 9. Contenido y variación de Humedad del Suelo del ABVPA en base a las zonas de muestreo Fuente: El Autor _____ | 58 |
| Ilustración 10. Niveles altitudinales de las zonas de muestreo del ABVPA Fuente: El Autor ____ | 60 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR. Fuente: El Autor, Nano Drop 2000..... | 72 |
| Anexo 2. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR. Fuente: El Autor, Nano Drop..... | 72 |
| Anexo 3. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR. Fuente: El Autor, Nano Drop 2000..... | 73 |
| Anexo 4. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR. Fuente: El Autor, Nano Drop 2000..... | 73 |
| Anexo 5. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR. Fuente: El Autor, Nano Drop 2000..... | 74 |
| Anexo 6. Mapa de ubicación de los puntos del segundo muestreo y las características de cobertura del suelo del ABVPA Fuente: El Autor | 75 |

1. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento y análisis de la actividad de los microorganismos dentro de los procesos de transformación han ido generando avances considerables en varios campos, especialmente en el área ambiental en donde la biorremediación se presenta como una alternativa para la depuración de matrices contaminadas y la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos en elementos fáciles de degradar (Sánchez & Rodríguez, 2010). Los hongos son saprófitos por excelencia, pudiendo según algunos autores degradar una gran variedad de sustancias (Nabors, 2011); las variables que intervienen en el proceso son: humedad relativa, precipitación, capacidad de campo, escorrentía, etc. (Randy, H; Adams, 1999).

Para el estudio de la fisiología y actividad biológica de las cepas, es necesario su conservación mediante cultivos puros *in vitro*, los procedimientos son muy variados, y los más utilizados son: conservación de esporas en tierra, arena o sílica gel, cepas liofilizadas, congelación, agua destilada y la preservación en aceite mineral (Bueno & Gallardo, 1998). La determinación del método de conservación se fundamenta en las características de los microorganismos, los requerimientos nutricionales y de cultivo, el propósito, la cantidad de cepas y las condiciones del lugar de preservación. El uso y formación de ceparios cada día adquieren mayor protagonismo, constituyéndose como un mecanismo para la preservación *ex situ* de la diversidad microbiana (Fernández, Martínez, Perurena, Illnait, & Valdés, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Sistematizar el cepario de hongos filamentosos de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.

2.2 Objetivos Específicos

- Recopilar y documentar información, en diferentes fuentes a cerca de los géneros y especies de hongos filamentosos que forman el cepario.
- Elaborar una ficha técnica, con una caracterización física de cada cepa.
- Describir las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas de hongos filamentosos que forman el cepario.
- Establecer el medio adecuado para la conservación de las cepas.
- Desarrollar una herramienta útil que se utilizará en los diferentes proyectos de investigación en el área de la Biotecnología.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de los hongos

Son microorganismos eucariotes con células mitocondriales de núcleo bien definido y con hifas carentes de clorofila, por excelencia son grandes descomponedores y biocontroladores debido a su alta capacidad de degradación (Fernández-Larrea, 2006; Gato Cárdenas, 2010). Se encuentran agrupados de acuerdo a sus características morfológicas o moleculares (Leonor Carrillo, 2003), formando asociaciones de organismos talófitos, eucariotas y heterótrofos que los definen como un grupo heterogéneo y polifilético (Sobrado, Cabral, & Romero, 2013).

3.1.1 Reproducción

Los hongos que cuentan con mecanismos de reproducción sexual se conocen como perfectos, los que se reproducen asexualmente se conocen como imperfectos, pudiendo presentar además una reproducción parasexual por gemación, bipartición y esporulación (Morales Gallego, 2009) crecen a temperaturas que van desde 10 hasta 20°C con un pH variable de 4,5 a 8.

3.2 Hongos filamentosos

Son microorganismos constituidos por un talo o micelio formado por múltiples filamentos denominados hifas, con esporas encargadas de la reproducción (sexual o asexual) y una pared celular formada por quitina (Arias & Piñeros, 2008). Algunas especies presentan hifas con tabiques transversales o septos a excepción del grupo *Zygomycota* que muestra hifas cenocíticas o no septadas (Tobergte & Curtis, 2013). Tienen la capacidad de adaptarse a condiciones adversas, desarrollándose en sustratos con altas concentraciones de azúcar, con un pH que varía

entre 2 y 9 (ácido) en un tiempo aproximado de 5 a 7 días (Moreno, 2000) aprovechan la glucosa, el almidón y la celulosa como fuente de carbono en las plantas (Arias & Piñeros, 2008) a los hongos filamentosos se los identifica como mohos y cuando son células aisladas levaduras.

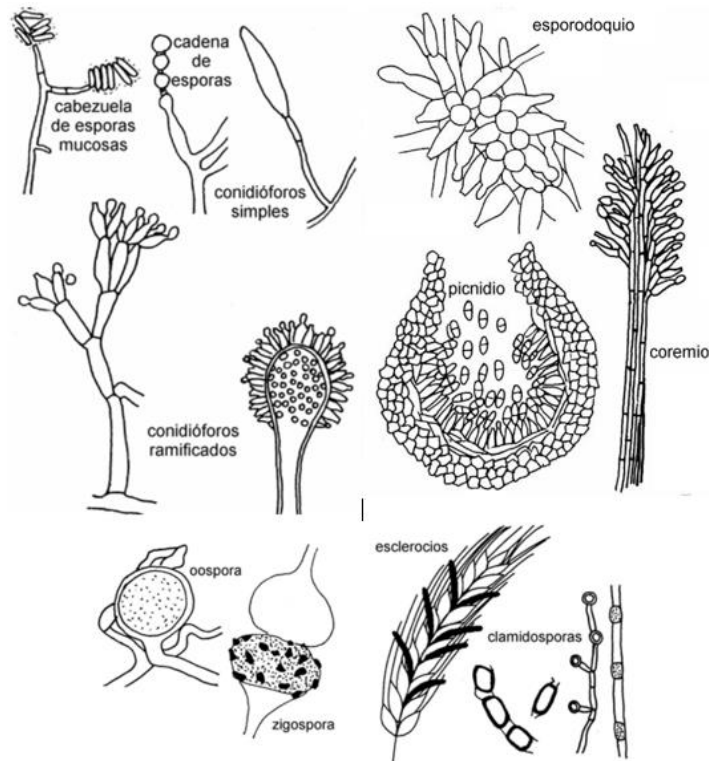


Ilustración 1. Desarrollo y disposición de estructuras de los hongos filamentosos
Fuente: Carrillo L, 2007

3.2.1 Desarrollo de los hongos filamentosos

La curva de crecimiento de los hongos filamentosos se divide en tres fases:

1. Fase de no crecimiento evidente: se divide en una fase anterior a la germinación de esporas y una fase en la que el crecimiento se presenta pero no se evidencia.

2. Fase de rápido crecimiento: se desarrolla el micelio en las extremidades de las hifas y se generan las cepas que mediante la utilización de carbohidratos y nitrógeno.
3. Fase sin crecimiento: el peso del micelio disminuye debido a la acumulación de metabolitos tóxicos, ácidos orgánicos y amoniaco, provocado el agotamiento de fuentes de carbono. (Arias & Piñeros, 2008)

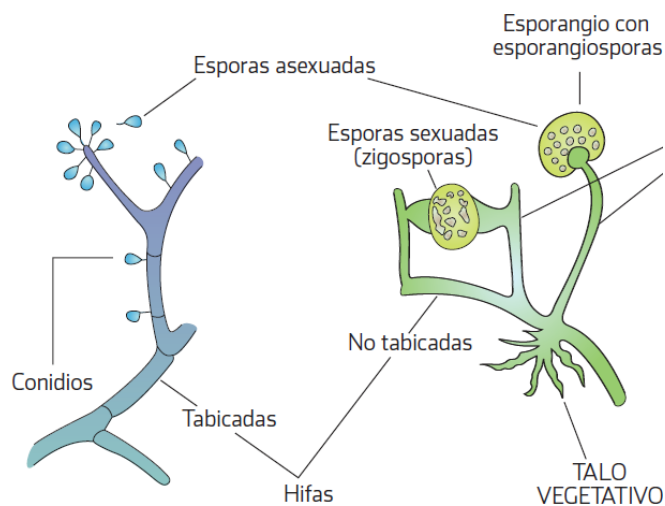


Imagen 1. Representación microscópica de la estructura de un hongo filamentoso, fase micelial (azul) y talo filamentoso vegetativo (verde)
Fuente: Greslebin A, 2011.

3.2.2 Requerimientos nutricionales

El principal compuesto que actúa como fuente de energía es la glucosa, pero también requieren nitrógeno, azufre y vitaminas, en casos puntuales de microorganismos selectos, además de la presencia de los macronutrientes: potasio, fósforo y azufre, micronutrientes: hierro, cobre, magnesio, zinc y molibdeno (Campoverde, 2012).

3.3 Géneros representativos

3.3.1 *Aspergillus* sp.

El biólogo italiano Pier Antonio Micheli en 1772, comparó la estructura de su cabeza en forma conidial con un la de un “*Aspergillum*” (instrumento religioso que se usa para dispensar agua bendita) término que posteriormente fue validado por Link (Gonzalez Salgado, 2010). Producen micotoxinas y metabolitos secundarios que se encargan de la degradación de materia orgánica, y se utilizan como mecanismos de defensa frente a otros microorganismos. Su desarrollo lo cumplen principalmente en el suelo y vegetales en descomposición a temperaturas que varían entre los 12°C y 57°C la esporulación se produce a una temperatura de hasta 70°C (Instituto de Seguridad e Higiene Nacional, 2012) permaneciendo en el ambiente durante largos periodos de tiempo, por lo que se vuelven perjudiciales, ya que provocan infecciones en los seres humanos, este género igualmente se presenta como fitopatógeno de algunas especies vegetales (Abarca, 2000). En la naturaleza se encuentran ampliamente distribuidos en sustratos que muestran un alto nivel de humedad o materia orgánica en descomposición (Pontón & Cabañes, 2000).

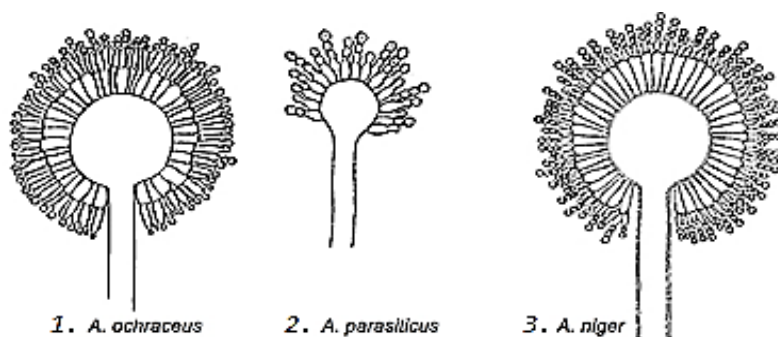


Ilustración 2. Especies frecuentes estudiadas de *Aspergillus* sp., en donde sobresalen: 1) *A. Ochraceus*, 2) *A. Parasiticus* y 3) *A. Niger*

3.3.1.1 Morfología

3.3.1.1.1 Características microscópicas

Sus hifas son hialinas y tabicadas, con una longitud moderada de sus conidióforos y una célula pie característica en su base, además de una vesícula que contiene la métula y una hilera de fiálides que tienden a mantenerse en manojos paralelos originados desde su centro para finalizar con cadenas de conidios con varios colores que se pueden mostrar en cuatro formas diferentes, globosa, radiada, columnar o claviforme (Carrillo, 2001) (Diba, Rezaie, & Mahmoudi, 2007)

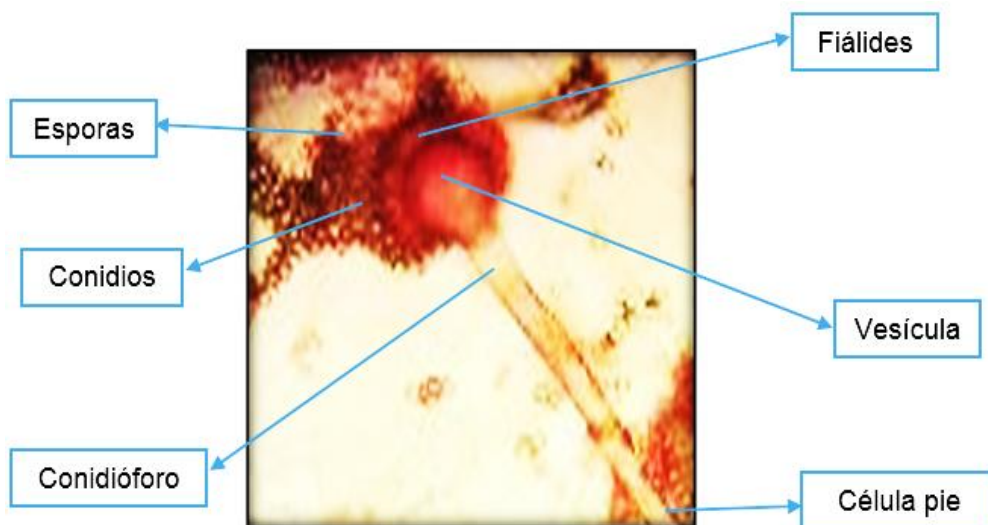


Imagen 2. Identificación microscópica de *Aspergillus* sp., en donde se puede observar el desarrollo de una vesícula con conidios de forma globosa, la disposición de sus fiálides y la longitud de su conidióforo, en una ampliación de 40x.

Fuente: El Autor

3.3.1.1.2 Características macroscópicas

Una característica importante en el reconocimiento de este género es el color de su colonia que se presenta en distintos tonos que van desde verde, pardo, amarillo, blanco, gris, hasta negro según el desarrollo de su especie (Carrillo, 2001). Se consideran parámetros morfológicos como el diámetro de la colonia, el color del reverso de la caja, producción de exudados y pigmentos solubles con presencia de esclerocios (Rodrigues, Kozakiewicz, Soares, Paterson, & Lima, 2007). La forma de la colonia está ligada al crecimiento de la vesícula y sus conidios, desde la etapa de formación hasta un estado de madurez (Arias & Piñeros, 2008); inicialmente se muestra una estructura algodonosa de color verde-parda con esporulación alta en el centro, posteriormente presenta un color amarillo con márgenes blancos y textura lanosa (Eltem, Askun, Sarigul, Oskale, & Efendiler, 2004).

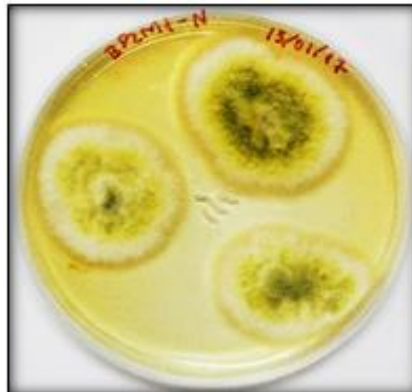


Imagen 3. Cultivo del *Aspergillus* sp., en PDA dentro de una caja petri en donde se evidencia en crecimiento de la colonia con tonalidades amarillas y verde pardas hacia el centro, con un mínimo grado de esporulación. Fuente: El Autor.

3.3.1.2 Taxonomía

Raper y Fennell en 1965, describen en su monografía “The genus *Aspergillus*” la clasificación de 132 especies divididas en 18 grupos, sin embargo luego de ciertas modificaciones tipificadas en las normas del ICBN (Código Internacional de Nomenclatura Botánica), Kozakiewicz en 1989 reclasificó el género en 6 subgéneros divididos en una o más secciones, proponiendo un cambio en la nomenclatura de las estructuras morfológicas del género (Abarca, 2000). Pitt *et al.*, 2000 reconocen 182 especies más 36 añadidas en los últimos años.

Tabla 1. Clasificación actual del género *Aspergillus* sp.

| Subgénero | Sección | Sinónimo ^a | Especie tipo | Teleomorfo | |
|--------------------|---------------------|----------------------------|---------------------------|---|-------------------|
| <i>Aspergillus</i> | <i>Aspergillus</i> | Grupo <i>A. glaucus</i> | <i>A. glaucus</i> | <i>Eurotium</i> | |
| | <i>Restricti</i> | Grupo <i>A. restrictus</i> | <i>A. restrictus</i> | -- | |
| <i>Fumigati</i> | <i>Fumigati</i> | Grupo <i>A. fumigatus</i> | <i>A. fumigatus</i> | <i>Neosartorya</i> | |
| | <i>Cervini</i> | Grupo <i>A. cervinus</i> | <i>A. cervinus</i> | -- | |
| <i>Ornati</i> | | Grupo <i>A. ornatus</i> | <i>A. ornatulus</i> | <i>Warcupiella, Sclerocleista, Hemisartorya</i> | |
| <i>Clavati</i> | <i>Clavati</i> | Grupo <i>A. clavatus</i> | <i>A. clavatus</i> | -- | |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Nidulantes</i> | Grupo <i>A. nidulans</i> | <i>A. nidulans</i> | <i>Emericella</i> | |
| | <i>Versicolores</i> | Grupo <i>A. versicolor</i> | <i>A. versicolor</i> | -- | |
| | <i>Usti</i> | Grupo <i>A. ustus</i> | <i>A. ustus</i> | -- | |
| | <i>Terrei</i> | Grupo <i>A. terreus</i> | <i>A. terreus</i> | -- | |
| | <i>Flavipedes</i> | Grupo <i>A. flavipes</i> | <i>A. flavipes</i> | <i>Fennellia</i> | |
| | <i>Circumdati</i> | <i>Wentii</i> | Grupo <i>A. wentii</i> | <i>A. wentii</i> | -- |
| | | <i>Flavi</i> | Grupo <i>A. flavus</i> | <i>A. flavus</i> | -- |
| | | <i>Nigri</i> | Grupo <i>A. niger</i> | <i>A. niger</i> | -- |
| | | <i>Circumdati</i> | Grupo <i>A. ochraceus</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>Petromyces</i> |
| | | <i>Candidi</i> | Grupo <i>A. candidus</i> | <i>A. candidus</i> | -- |
| | <i>Cremeri</i> | Grupo <i>A. cremerus</i> | <i>A. cremerus</i> | <i>Chaetosartorya</i> | |
| | <i>Sparsi</i> | Grupo <i>A. sparsus</i> | <i>A. sparsus</i> | -- | |

Fuente: Abarca, 2000

3.3.2 *Penicillium* sp.

Los hongos de este género están ampliamente distribuidos en la naturaleza, hallándose principalmente en el suelo, en vegetación caída o suspendidos en el aire (FBA, 1809). Este género es reconocido regularmente de acuerdo a su morfología microscópica que se asemeja a la

de un pincel con ramificaciones en sus terminaciones, siendo esta una característica a considerar para dividirlos en grupos o subgéneros (Fleming, 1929).

3.3.2.1 Morfología

3.3.2.1.1 Características microscópicas

Su estructura presenta un conidióforo simple o ramificado, con conidios que se forman en cadenas basipétalas que pueden llegar a ser: verticilados, diverticilados, triverticilados o tetraverticilados (Camero-Rodríguez & Linares-Gómez, 2013) que se unen al micelio mediante el estipe en donde se localizan las fiálides que parten desde un mismo punto originario (Ortiz Paucay, 2016). Sus filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros, formados de septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. La estructura completa presenta fiálides, métulas y la estipe.

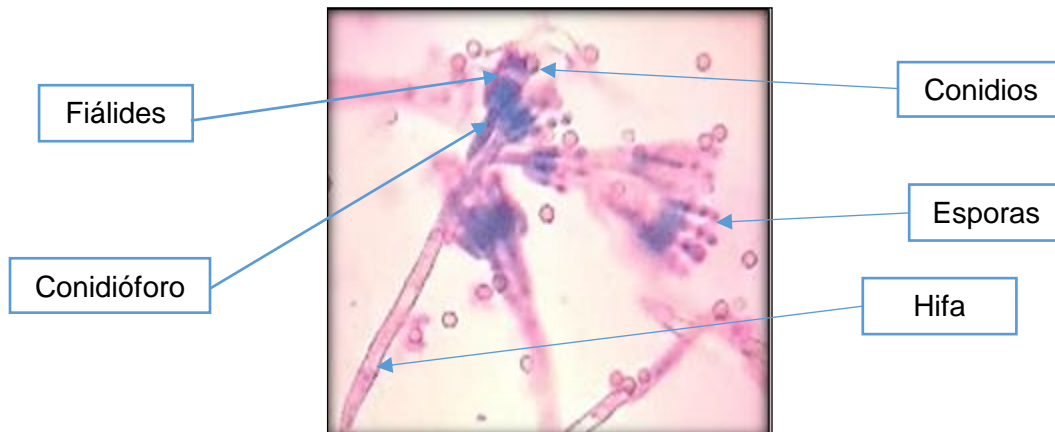


Imagen 4. Estructura microscópica del *Penicillium* sp., en donde se observa la disposición triverticiliada de las cadenas de sus conidios, ramificación de su conidióforo, hifa septada, etc. Con una ampliación 40x
Fuente: El Autor

3.3.2.1.2 Caracterización macroscópica

Inicialmente la colonia se presenta con una estructura blanca esponjosa que aumenta de tamaño rápidamente y luego de unos días esporula tomando una coloración verde oscura. Algunas colonias presentan durante su desarrollo un color amarillo brillante y en ocasiones una pigmentación rojiza (Fleming, 1929). Al reverso de la caja en terreno PDA se presenta diferentes tonalidades de color conforme avanza su crecimiento, mostrando así una tonalidad amarillenta o anaranjada al inicio, para tomar en ciertas ocasiones un color pardo rojizo durante la etapa final de su maduración (Gómez, 1930).

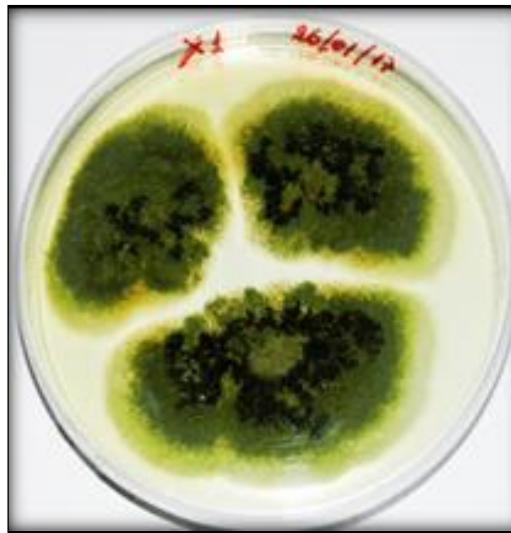


Imagen 5. Desarrollo de una colonia de un *Penicillium* sp., en agar PDA donde se observa su forma de crecimiento con los extremos sin fructuación, de color verde con tonalidades amarillas y una estructura aterciopelada. Fuente: El Autor

3.3.2.2 Taxonomía

Cada año se propone una reclasificación del género, ya sea por la aparición de nombres nuevos o por la reactivación de antiguas denominaciones mediante la neotipificación, sin embargo Link en 1809 hizo la primera clasificación taxonómica antecediendo las normalizaciones de Pitt (1980) y Frisvard (1981) (Tabla 2).

Tabla 2. Taxonomía del género *Penicillium* sp.

| | |
|---------|----------------------|
| Reino | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Clase | <i>Euascomycetes</i> |
| Orden | <i>Eutoriales</i> |
| Familia | <i>Trichomaceae</i> |
| Género | <i>Penicillium</i> |

Fuente: (FBA, 1809).

3.3.3 *Trichoderma* sp.

Son hongos saprofitos comunes del suelo y la madera, presentan un crecimiento muy rápido y gran capacidad de adaptación encontrándose de forma natural en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (B. I. Martínez, I, & Ii, 2013). Poseen gran importancia a nivel agrícola debido a sus características de descomponedores, pudiendo ser aplicables en procesos de control biológico con alto potencial de eficacia, así como convertirse en buenos indicadores de la calidad del compost (Castle et al., 1998). Su desarrollo puede darse dentro de un amplio rango de temperaturas, suelos ácidos y sustratos de baja humedad (Harman G. 1998;Vallejo, 2014).

3.3.3.1 Morfología

En la Comisión Internacional para la Taxonomía de Hongos (ICTF) se destaca la clasificación morfológica planteada por Rifai (1969) y Bissett (1991) para identificar las características de *Trichoderma* sp., reconocido como hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo y aerobio (Vallejo, 2014).

3.3.3.1.1 Características Microscópicas

Presenta hifas hialinas septadas con conidióforos en su mayoría ramificados, que generalmente forman un ángulo de 90° y cuentan con una disposición piramidal (Saha, Nasreen, & Sheikh, 2012) conidios de forma elipsoidal, menores a 5µm de largo y ancho, que tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas que se forman de hifas entrelazadas y dan origen a las fiálides permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de este (Bojorquez Morales, 2010).

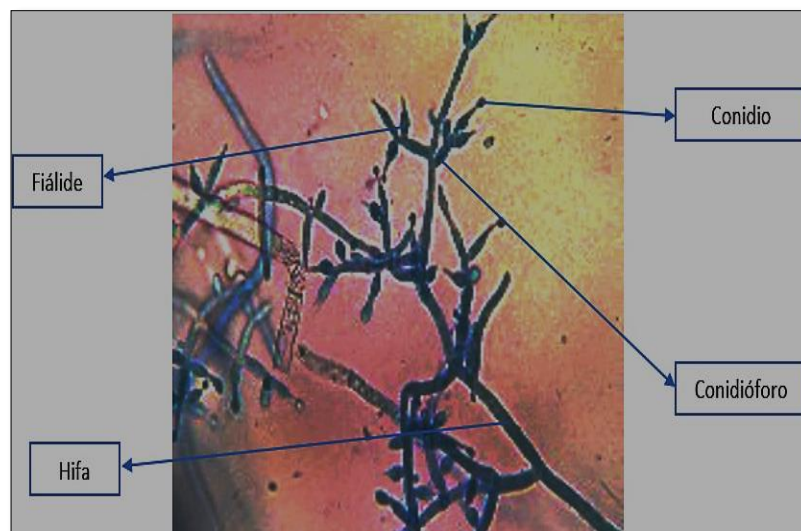


Imagen 6. Estructura microscópica de un *Trichoderma* sp., en donde se observa el desarrollo de su fiálide, conidios y conidióforos con una ampliación de 40x.
Fuente: El Autor

3.3.3.1.2 Características macroscópicas

Para la observación de las colonias y su tasa de crecimiento se toma un margen activo de 4 días en cultivo en PDA (Saha *et al.*, 2012), pudiendo observarse un desarrollo micelial rápido con una colonia delgada en sus inicios y abundante producción de esporas para luego presentar penachos de coloración blanco - verdoso o amarillo – verdoso, formando anillos concéntricos (Arango *et. al*, 1998; Barnett *et. al*, 1972; Chavez García, 2006).

Es importante mantener el nivel de pH regulado (6) para el crecimiento de las colonias y su esporulación con la intención de obtener mayor longevidad en el cultivo (Bojorquez Morales, 2010).



Imagen 7. Colonia *Trichoderma* sp., se muestra un crecimiento concéntrico irregular con tonalidades blanco-verdosas y anillos concéntricos
Fuente: El Autor

3.3.3.2 Taxonomía

Según la “Comisión Internacional para la Taxonomía de Hongos” (ISTH), hasta el año 2015 se presentó una lista de 256 especies de *Trichoderma* sp. (Alexopoulos, 1996).

Tabla 3. Taxonomía del Género *Penicillium* sp., según Alexopoulos, 1996.

Taxonomía

| | |
|-------------|--|
| División | <i>Eumycota</i> |
| Subdivisión | <i>Deuteromycotina</i> |
| Clase | <i>Hypomicetes</i> |
| Orden | <i>Hyphales</i> |
| Familia | <i>Monilaceae</i> |
| Género | <i>Trichoderma</i> |
| Especies | <i>Harzianum, Hamatum, viride, entre otras</i> |

Fuente: (Tovar Castaño, 2008)

3.3.4 *Fusarium* sp.

Las especies de este género se desarrollan en un amplio rango de ecosistemas debido a su diversidad morfológica, fisiológica y capacidad de adaptabilidad a condiciones extremas (E. Martínez, Martínez, Guillén, Peña, & Hernández, 2015). Una particularidad de este género es su desarrollo a temperaturas de hasta 37 °C por lo que no tienen problema en adaptarse a situaciones medioambientales del lugar en donde se encuentran (Cecilia Tapia y José Amaro, 2014).

3.3.4.1 Morfología

Debido a sus características saprófitas se desarrollan comúnmente en el suelo, en donde se presentan como agentes fitopatógenos para las plantas y son responsables directos de enfermedades como el “Damping-off” que provoca el marchitamiento vascular en las plantas, pudrición de la raíz, corona, tallo, fruto o semillas, convirtiéndose en uno de los principales focos de interés en el ámbito agrícola (Medrano y Ortuño, 2007).

3.3.4.1.1 Características microscópicas

Microconidios abundantes y ovals mezclados con una menor cantidad de macroconidios en forma de media luna, pudiéndose apreciar clamidosporas grandes y redondeadas solitarias o en

parejas. La célula basal es claramente identificable con el extremo puntiagudo, el conidióforo presenta fiálides cortas que se afilan hacia la punta con collarettes poco definidos (Sempere, García, & Santamaría, 2004; GEFOR, 2012).

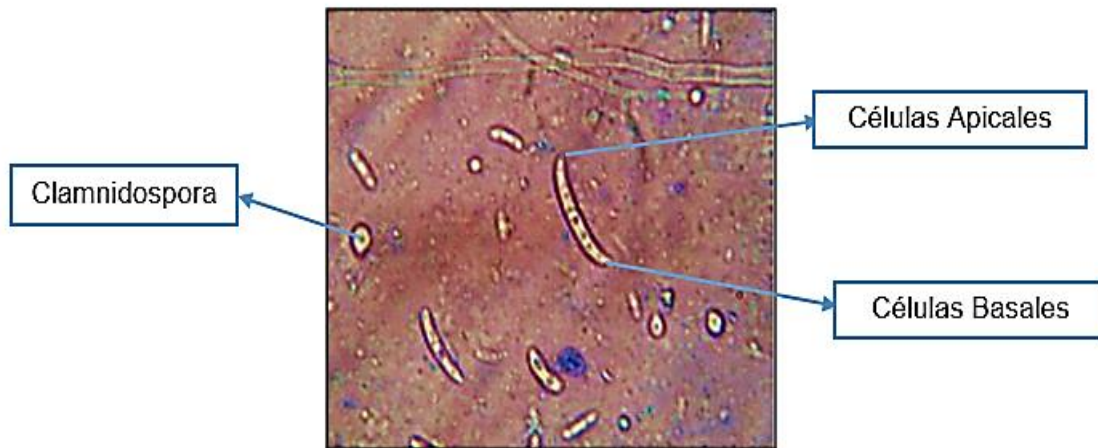


Imagen 8. Identificación microscópica de la estructura de las clamnidosporas y macroconidias del *Fusarium* sp., con ampliación 40x
Fuente: El autor

3.3.4.1.2 Características macroscópicas

Estudios realizados por Booth (1971), Gerlach & Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983), determinaron que las colonias desarrolladas en Agar papa dextrosa (PDA) muestran características importantes para la determinación e identificación de las especies de *Fusarium* sp. en base al desarrollo, coloración y estructura de la superficie (Hafizi, Salleh, & Latiffah, 2013). Las colonias presentan micelio aéreo y una rapidez de crecimiento en dependencia directa de la especie que se desarrolla (Torrenegra & Rueda, 2001), presenta una superficie algodonosa, algo

esporulada, de forma redondeada, color blanco, crema, rojo o púrpura con pigmentaciones combinadas (Soesanto & Rahayuniati, 2011).



Imagen 9. Características macroscópicas de un *Fusarium* sp., en donde se evidencia el crecimiento de la colonia con una coloración blanca y pigmentaciones púrpuras, ampliación 40x.

Fuente: El Autor

3.3.4.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de este género ha sufrido varios cambios desde las primeras descripciones hechas por Link en 1803; debido a la aparición de nuevas tecnologías utilizadas actualmente, sin embargo en la mayoría de estudios se mantiene vigente la taxonomía clásica basada en el reconocimiento de su estructura morfológica (Tapia & Amaro, 2014)

Tabla 4. Taxonomía.

| | |
|----------|--|
| División | <i>Ascomycota</i> |
| Clase | <i>Euascomycetes</i> |
| Orden | <i>Hypocreales</i> |
| Familia | <i>Hypocreaceae</i> |
| Género | <i>Fusarium</i> |
| Especies | <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>.verticilloides</i> , <i>F. dimerum</i> , etc. |

Fuente. Nelson, 1994

3.5 Preservación de microorganismos

Para el estudio desde el punto de vista biotecnológico ambiental, es necesario preservar los microorganismos mediante técnicas de conservación y almacenamiento con el propósito de garantizar su idoneidad y correcta reproducción en ambientes *ex situ* (Gutiérrez, Bustamante, & Buitrago, 2009) se consideran factores como: pureza del cultivo a preservar y que al menos el 70- a 80% de las células tratadas sobrevivan y permanezcan genéticamente estables (García & Uruburu, 2000).

3.5.1. Conservación a largo plazo

3.5.1.1 Liofilización

Es un procedimiento de deshidratación celular que se lleva a cabo por medio de sublimación y congelamiento de una suspensión conidial, a través de tres componentes: un mecanismo de congelamiento, una fuente de vacío y una trampa para el vapor de agua; este proceso se lleva a cabo mediante la aplicación de un pre-congelamiento inicial y un proceso de centrifugación posterior, con lo cual se estipula un periodo largo de viabilidad en la conservación de organismos microbianos (Smith & Onions, 1994; Alarcon, 2006). Es uno de los métodos más utilizados en la estructuración de colecciones de microorganismos a nivel global, ya que permite controlar el metabolismo de las especies a través de la deshidratación celular disminuyendo así su contenido de humedad residual y generando un material compacto que posteriormente se puede disolver con facilidad (Pinzón, Bustamante, & Buitrago, 2011). Las temperaturas a las cuales se realiza el proceso limitan el desarrollo incontrolado de las células, garantizando así su alta estabilidad

genética para una correcta conservación y transporte, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C – 20°C) (García & Uruburu, 2000).

3.5.1.2 Criocongelación

Su principio radica en que toda célula, tejido o microorganismo sometido a bajas temperaturas disminuye sus funciones vitales, permaneciendo en estado de latencia por periodos prolongados y suprimiendo sus actividades metabólicas (Pasarellt *et. al*, 1992; Rico *et al* 2004; Pinzón Gutiérrez *et al.*, 2009).

Los microorganismos se conservan en suspensión dentro de un líquido con aceite crioprotector y se almacenan a temperaturas inferiores a 0°C. para la criocongelación completa se consideran: la edad de las células (que convenientemente deben ser maduras), velocidad de congelación y descongelación, temperatura de mantenimiento y empleo de agentes crioprotectores para proteger el daño celular del proceso (García & Uruburu, 2000). Los aceites crioprotectores son compuestos químicos de gran afinidad con el agua, siendo los más utilizados el glicerol y el dimetilsulfóxido idóneos para conservar *Ascomycetes* mitospóricos, *Zygomycetes* y levaduras (Carmichel, 1962; Gato Cárdenas, 2010). Su función es proteger el daño de las células microbianas cuando estas se expongan a bajas temperaturas de congelación (Arias & Piñeros, 2008).

3.5.2 Conservación a corto plazo

Consiste en trasplantar los microorganismos en periodos cortos de tiempo en un medio de cultivo adecuado, con la limitante de incrementar el riesgo de contaminación o de permitir el crecimiento del microorganismo, que puede cambiar espontáneamente sus características (Parra *et al.*, 2006; Eduardo, Rey, Rubio, Andrei, & Zambrano, 2016). Durante la aplicación de estos procesos, es necesario desarrollar metodologías a la par, con la intención de contar con un soporte de réplicas para evitar el riesgo de perder las muestras (Alarcon, 2006).

3.5.2.1 Transferencia Periódica

Este método se basa en resembrar la cepa en otro terreno cada cierto tiempo, debido a que su crecimiento se ve limitado por el agotamiento de nutrientes del cultivo en donde se conservaba, provocando el envejecimiento y muerte celular a mediano plazo (García & Uruburu, 2000). Es un método válido para periodos de tiempo corto, con la desventaja de que los microorganismos deben ser trasplantados con frecuencia, lo que aumenta el riesgo de contaminación de los cultivos. Además se debe considerar que al crecer a una temperatura ambiente se puede alterar su estructura genética, afectando su desarrollo y modificando sus características (Alarcon, 2006).

3.5.2.2 Suspensión en agua destilada

Método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por periodos prolongados, a la vez que evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros (Bueno & Gallardo, 1998). Consiste en suspender en agua estéril células del cultivo como

conidias, esporas, esclerocios, etc. Los resultados obtenidos muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años (Alarcon, 2006) incluidos *Ascomycetos* en formas mitospóricas, que pueden sobrevivir hasta 10 años cuando se almacenan a 20°C. Este método ha sido utilizado regularmente en la conservación de especies del género *Trichoderma* sp., principalmente en *T. harzianum*, y *T. koningii* (Bueno y Gallardo, 1998; Gato Cárdenas, 2010).

3.5.2.3 Conservación en aceite mineral

El método consiste en recubrir con aceite mineral un cultivo puro, con el propósito de disminuir la deshidratación del medio y la actividad metabólica del cultivo, debido a la reducción de la tensión de oxígeno y presencia de ácaros, convirtiéndose en un método aplicable en hongos de formas no esporuladas o miceliales, con un período de preservación de 12 a 30 meses, aunque algunas especies de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. han permanecido viables hasta 40 años (Alarcon, 2006). Es un método recomendado para conservar hongos en donde la congelación puede resultar adversa para ellos, evitando en lo posible la desecación del medio de cultivo en el que se desarrollan y que puede ser aplicado en ambientes con temperaturas oscilatorias entre 15 a 22°C. Es fácil de realizar y presenta costos relativamente bajos. (Gato Cárdenas, 2010).

3.5.3 Métodos alternativos

Son procesos que no se emplean habitualmente y que se llevan a cabo cuando las características de las cepas microbianas no resisten la preservación mediante los métodos de corto o largo plazo y por ausencia de los equipos necesarios para su aplicación.

3.5.3.1. Desección en papel filtro

Se lleva a cabo mediante el uso de un papel filtro con una solución densa de células que se deja secar al aire en tubos bajo condiciones de esterilidad y ausencia de agua, sin embargo es posible también el uso de la denominada desecación líquida con un liofilizador, evitando el congelamiento de las células mediante la regulación de temperaturas (García & Uruburu, 2000). Este método se encarga de reducir drásticamente el metabolismo de los microorganismos manteniendo el producto seco y debidamente sellado, con el fin de evitar el contacto con el aire considerando que son higroscópicos (Alarcon, 2006).

3.5.3.2 Conservación en suelo

Se puede definir como un método de preservación complementario, debido a que en sustratos como suelo, arena o sílica gel, se agregan células microbianas desecadas para conservarlas por un largo periodo de tiempo en base a esta metodología. Estos sustratos deben estar debidamente esterilizados y secos para evitar la absorción de humedad e inducir la esporulación de bacilos aerobios y anaerobios, pudiendo ser preservados finalmente en atmósfera seca o refrigeración (Hernández & Loaiza, 2014).

3.6 Estructuración de un cepario

Los ceparios son fuentes de preservación de microorganismos e información de las características de crecimiento, mecanismos de siembra, desarrollo, tiempo de vida y demás análisis que se recopilan en una sistematización que puede servir para cualquier aplicación (Olaya & Rachez, 2014).

3.7 Identificación taxonómica de hongos mediante biología molecular

3.7.1 Cuantificación de ADN

El estudio del total de ADN contenido en una muestra ambiental, nos permite analizar la biodiversidad del genoma y sus productos dentro de una comunidad microbiana, a través de su extracción, clonación y respectiva secuenciación (Uribe Vélez, 2009). La utilización de protocolos viables de extracción de ácidos nucleicos y la determinación del tipo de sus tejidos son puntos críticos en estudios de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Lopera-Barrero et al., 2008). Actualmente se han desarrollado sistemas comerciales con equipos para pruebas moleculares que empezaron a formar parte complementaria y/o alternativa de las pruebas fenotípicas, determinando una mayor especificidad y sensibilidad de los ensayos (Garzón Grajales, 2013).

3.7.1.2 Electroforesis en gel de agarosa

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico, presentando una gran sensibilidad y aplicabilidad a cualquier célula eucariótica, que permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales, además del monitoreo ambiental (su impacto sobre el ADN en diferentes ecosistemas con variable grado de contaminación) y análisis de sensibilidad a radiaciones (González & Llópiz Janer, 1999).

Es una de las metodologías más utilizadas para analizar y caracterizar la calidad de las moléculas extraídas de diversas procedencias, que utiliza un polisacárido altamente purificado derivado del agar, para separar este tipo de macromoléculas y grandes complejos proteicos (Valobra & Martinelli, 2014).

3.7.1.2 Cuantificación por espectrofotometría

Nos permite determinar la cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA/RNA), previo a la realización de ensayos de secuenciación de estos, así como de plásmidos, cósmidos y los productos resultantes de PCR (Gemma Rodríguez, 2000).

Durante los últimos años, los avances biotecnológicos han empleado espectrofotómetros que facilitan y perfeccionen esta cuantificación destacando uso del Nano Drop, equipo que permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda con gran exactitud y reproducibilidad basando su funcionamiento en el empleo de un sistema de retención de muestra que aprovecha la tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y un pedestal superior, que definen paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración y pureza de la muestra de ADN (Nanodrop, 2009).



Imagen 10. NanoDrop 2000 utilizado actualmente en análisis de cuantificación de ADN
Fuente: Fuente: ISOGEN, Life Science

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Revisión del estado y conservación de los aislados fúngicos

Se verificó el estado del conjunto de cepas codificadas de acuerdo al sitio de muestreo en concordancia a sus 3 pisos altitudinales, en base a este procedimiento, se hizo el trasplante en cajas Petri de 9 cm y en tubos de ensayo a pico de clarín con medio PDA. La temperatura del lugar en donde se ubica el cepario fluctúa entre 15 a 20°C.

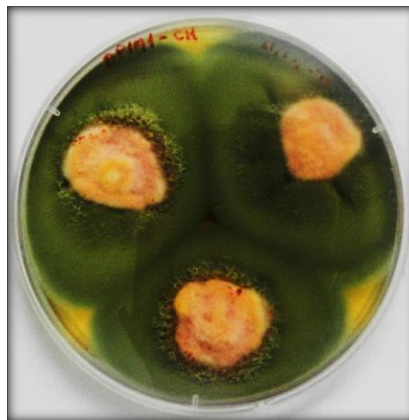


Imagen 11. Desarrollo de una cepa de *Penicillium* sp., trasplantada dentro de un cultivo de PDA en caja petri de 9 cm, con un periodo de crecimiento de 7 días.
Fuente: El Autor

4.2 Sistematización del cepario

La organización y conservación de las cepas se realizó de acuerdo a la identificación de las muestras aisladas en el laboratorio, tomando en cuenta su género, tiempo de crecimiento, características de desarrollo, condiciones de almacenamiento y metodología utilizada para conservar cada cepa. Esta información se recopiló en fichas técnicas que incluyen un registro fotográfico de su crecimiento macroscópico y detalles de morfología microscópica, además de una codificación inicial y su clasificación de acuerdo al género al que pertenecen.

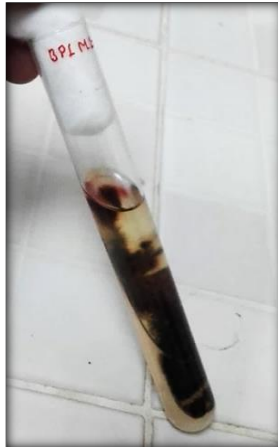


Imagen 12. Disposición de las Cepas dentro del tubo a pico de clarín con aceite mineral para su preservación dentro de las gradillas que forman el cepario.
Fuente: El Autor

4.3 Muestreo de la zona

Los muestreos se llevaron a cabo en el Área del Bosque Protector Aguarongo, ubicado entre las coordenadas geográficas: 78°48'54" y 78°52'22" de longitud occidental y de 2°52'37" y 2°59'43" de latitud sur (UTM: 744000 – 9682000 y 737000 – 9668000), considerando variables ambientales como altura, temperatura, humedad, tipo de suelo y cobertura vegetal, a través de una estratificación del suelo en base a tres pisos altitudinales, con la intención de recolectar

muestras significativas en varias zonas del área, para posteriormente determinar sus características.

El primer muestreo se realizó en los meses de mayo y junio del año 2016, en alturas comprendidas entre los 2900 y 3000 m.s.n.m. tomando muestras a una profundidad de 30 cm del suelo, almacenándolas en fundas ziplock, codificándolas y transportándolas al laboratorio en un cooler con hielo, para conservarlas a una temperatura de 4°C (Sayler *et al.*, 1998; Ortiz Paucay, 2016).

En el segundo muestreo identificó la ubicación geográfica de los puntos de recolección de muestras mediante el uso de un GPS – GARMÍN Oregon 650 para establecer las variables ambientales antes mencionadas, en un rango de altura de 3000 a 3200 m.s.n.m. con el propósito de cubrir el área de estudio y determinar la diversidad fúngica presente en la zona.



Imagen 13. Determinación de la humedad de suelo del BVPA a través del higrómetro, variable importante a considerar dentro de la preservación ex situ de las muestras recolectadas.

Fuente: El Autor

4.5 Extracción de ADN

Método establecido por Kennedy *et al.*, 2014; con un KIT de extracción PowerSoil DNA insolation (MO BIO Laboratories Inc.) (Ilustración 3) (Imagen 14 y 15).

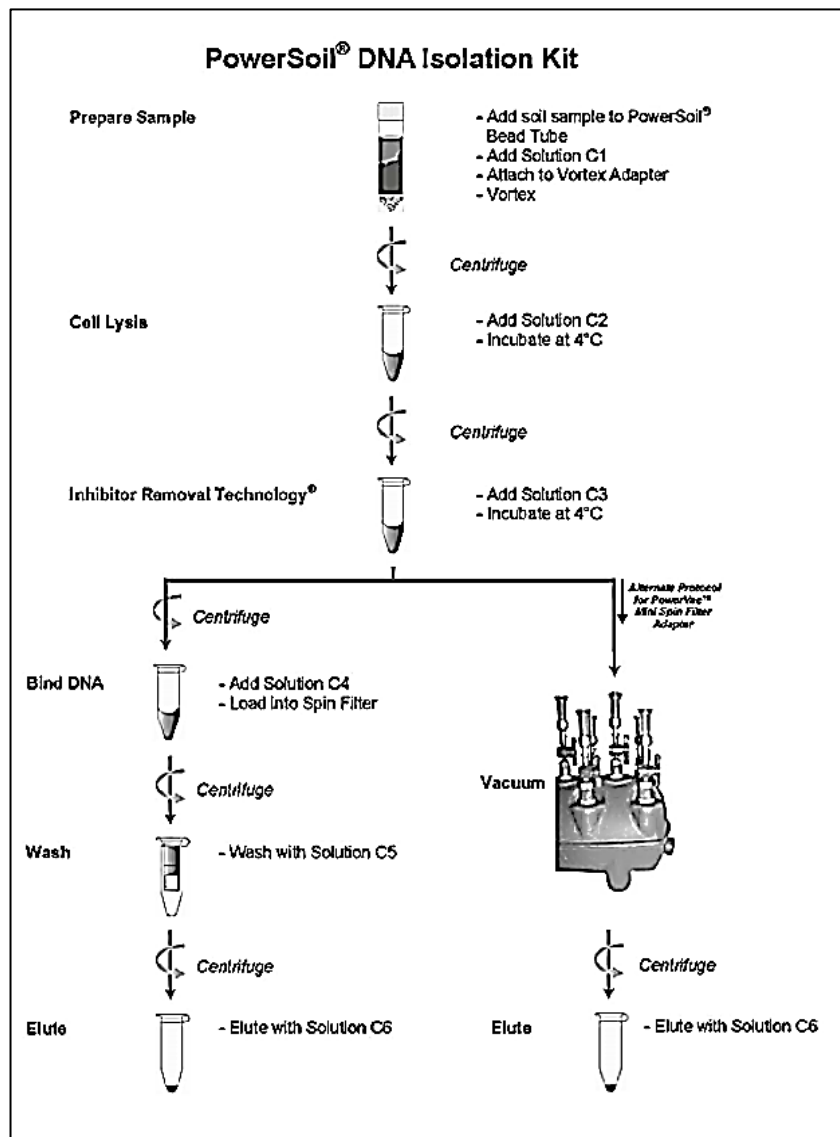


Ilustración 3. Resumen del procedimiento de extracción de ADN a través del Kit PowerSoil
Fuente: PowerSoil DNA Isolation Kit, Manual



Imagen 14. Procedimiento de mezcla y vorteadado de las muestras de suelo con las soluciones para la extracción de ADN
Fuente: El Autor



Imagen 15. Materiales utilizados en la extracción de ADN, junto a la centrífuga utilizada en el procedimiento
Fuente: El Autor

4.7 Cuantificación a través electroforesis con gel de agarosa

Se procedió acorde a la metodología planteada por Suchodolski *et al.*, 2009, empleando un análisis confiable a través de un NanoDrop 2000, que es un espectrofotómetro utilizado para cuantificar precisamente ácidos nucleicos y proteínas con muestras de 0.5 μ l (Se, 1993).

El procedimiento de lectura es:



Con el brazo levantando se pipetea un microlitro (μL) de la muestra directamente sobre el pedestal



Se cierra el brazo y se forma una columna con la muestra.



El pedestal se ajusta automáticamente a la mejor altura de lectura que es entre 0.05 mm y 1 mm.



Cuando la lectura se completa, la superficie se limpia solamente con un papel especial y así queda listo para la siguiente medida.

Ilustración 4. Procedimiento para la cuantificación con NanoDrop
Fuente: Se, 1993

5. RESULTADOS

5.1 Revisión del estado de las cepas

Se revisó el material biológico para identificar los cultivos deteriorados o envejecidos para su posterior trasplante y réplica correspondiente. Los resultados se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Identificación inicial del estado de las cepas aisladas, bajo una codificación de acuerdo a las muestras extraídas en cada sustrato del suelo del ABVPA.

| Código de Gradilla | Código de cepas a trasplantar | Código de Gradilla | Código de cepas a trasplantar |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| BP2 (M1 - M2) | N, XA, RA3, BP2 M2: O7, Q, A, | BP3 (M1 - M2) | M1 -J, M1-C M1-H1M2-S, M2-O3C |
| BP1M1 | Trasplantar todas las muestras | CP3 M2 | B, N7, 2, T1, N6, NH |
| AP1 (M1-M2) | J1, X1 M2, A, A7 | CP1M2 | X1, W, T2 |
| AP3 (M1 - M2) | I6, E, F, H | CP2 (M1 - M2) | T |
| BP1M2 | B, H, G1, F, G, K1, G1B | CP2 M1 | S |
| AP2 (M1 - M2) | AP2M2-B | CP3M1 | 7B, 7A, B |

Fuente: El Autor

5.2 Análisis y cuantificación de las cepas aisladas

Una vez trasplantadas y aisladas las cepas, corroboramos el género al que pertenecen y cuantificamos el total de muestras conservadas en el cepario, teniendo:

Tabla 6. Disposición de Cepas aisladas según su género

| Género | TOTAL | Porcentaje % |
|------------------------------|------------|--------------|
| <i>Aspergillus sp.</i> | 86 | 47.51 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 76 | 41.99 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 8 | 4.42 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 7 | 3.87 |
| Estructuras no reproductivas | 4 | 2.21 |
| TOTAL | 181 | 100 |

Fuente: El Autor

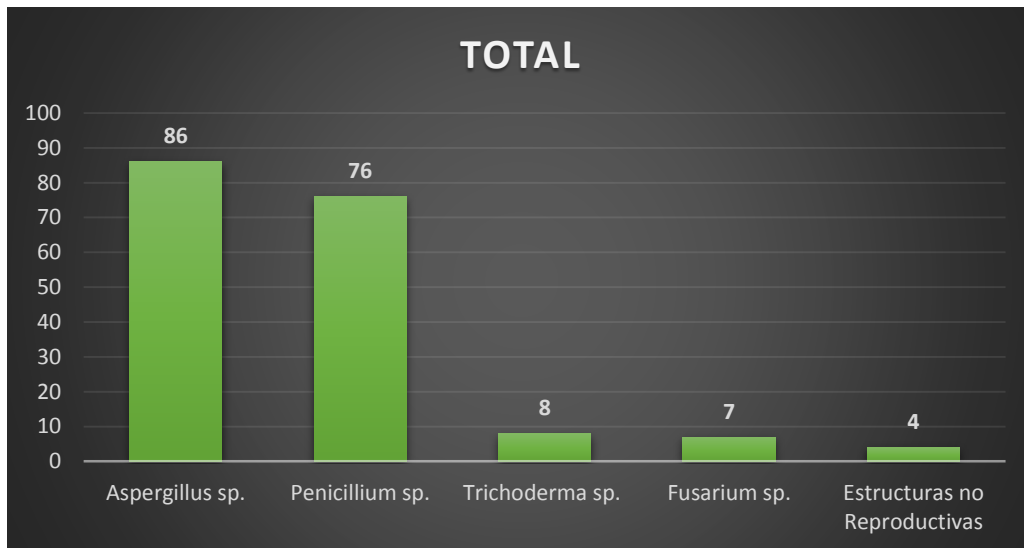


Ilustración 5. Cuantificación de cepas aisladas según su género.

Fuente: El Autor.

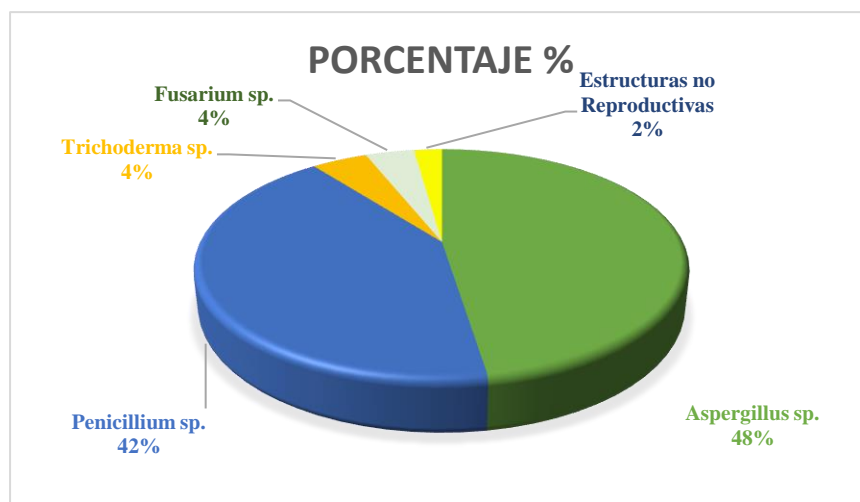


Ilustración 6. Representación de las cepas conservadas en el cepario de acuerdo a sus porcentajes.

Fuente: El Autor

Los resultados obtenidos nos permiten cuantificar la frecuencia de las cepas aisladas de las muestras de suelo, que en porcentajes se presentan mayoritariamente como: *Aspergillus* sp. (48%). y *Penicillium* sp. (42%), las cepas que se presentan en menor porcentaje son: *Trichoderma* sp. (4%), *Fusarium* sp. (4%) y estructuras no reproductivas (2%). De estos géneros los cuatro identificados inicialmente, muestran características relacionadas a la degradación de materia orgánica y un crecimiento en zonas húmedas, con un gran poder de adaptabilidad en condiciones extremas para su desarrollo, convirtiendo así al cepario en una fuente útil para aplicaciones en estudios relacionados al tema biotecnológico y ambiental.

5.3 Conservación de las cepas

Las 181 cepas se conservaron de manera organizada (por duplicado) en tubos de ensayo con terreno PDA a pico de clarín, dispuestos en gradillas codificadas en base al tipo de muestreo, la temperatura del área oscila entre 15 a 20°C (temperatura ambiente) con una HR del 20% las fechas de los trasplantes (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Organización de las cepas conservadas en el Cepario Institucional de la UPS Cuenca - 2017

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Código Gradilla | BP1M2 | BP1M1 | BP1M1 | BP2M1 | AP1M1 | BP1M2 | AP3M1 |
| Codificación de Tubos por Gradilla | X1 | M | CH1 | RA2 | CEF1 | F | D |
| | A7 | K | Q | RA1 | X1 | C | K |
| | Y | X | LL | E | ZOF81 | P | J |
| | CJ1 | Y | R | N | O5 | K | E |
| | G1B | | META 7 | XA1 | BU1 | K1 | A |
| | H | | R3 | XA | | G1B | AR |
| | G | | BU1X | RA3 | | B | I6 |
| | 7 | | P2 | Ñ | | H | |
| | CH | | T | CD | | D | |
| | Y1 | | T1 | | | M | |
| | J1 | | CH | BP2M2 | AP1M2 | G1 | AP3M2 |
| | I | | Z | O7 | M2B | | B |
| | D1 | | E5 | Q | A | | C |
| | X | | | A | F82 | | J |
| | P2 | | | 4 | X2 | | F |
| | BUX | | | B | A6 | | H |
| | P | | | W | A9 | | I4 |
| | D7 | | | B2 | A8 | | |
| | I7 | | | | X5 | | |
| | J | | | | A7 | | |
| | | | | | | | |
| Fecha de Trasplante | 16/12/2016 | 04/01/2017 | 13/01/2017 | 26/01/2017 | 03/03/2017 | 07/03/2017 | 10/03/2017 |
| Fecha: 1ra Siembra | 15/09/2016 | 15/09/2016 | 15/09/2016 | 01/07/2016 | 08/07/2016 | 15/09/2016 | 18/07/2016 |

Fuente: El Autor

Tabla 8. Organización de las cepas conservadas en el Cepario Institucional de la UPS Cuenca - 2017

| | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Código Gradilla | AP2M1 | BP3M1 | CP3M2 | CP1M2 | CP1M1 | CP3M1 | CP2M1 |
| Codificación de Tubos por Gradilla | A | K1 | L | X | B | N | D3 |
| | C1 | H | R | J | C | Q | T |
| | X | A | B | T | N | 7B | D2 |
| | T | H1 | T | 3A | Y | Y1 | Z |
| | E1 | C | N7 | X2 | J | Y2 | O2B |
| | Y | J | 2 | X1 | D | A | O1 |
| | F1 | | T1 | W | D1 | 10 | DY |
| | F2 | | N6 | T3 | M7 | RS2 | O2A |
| | | BP3M2 | NH | R | W | T7 | Q |
| | | R | 3 | T2 | T | 7A | R |
| | AP2M2 | O3B | R2 | Q | CP2M2 | T6 | S |
| | C2 | BM | | 3B | N2 | RS1 | D1 |
| | Q | O3A | | Z | J | Q2 | |
| | T | O3C | | | J3 | B | |
| | T2 | S | | | B2 | | |
| | X | T | | | S2 | | |
| | B | | | | OP1 | | |
| | | | | | 2 | | |
| | | | | | J2 | | |
| | | | | | S1 | | |
| | | | | M2 | | | |
| Fecha de Trasplante | 14/03/2017 | 16/03/2017 | 20/03/2017 | 22/03/2017 | 26/03/2017 | 29/03/2017 | 03/04/2017 |
| Fecha 1ra Siembra | 06/09/2016 | 01/07/2016 | 18/07/2016 | 09/08/2016 | 09/08/2016 | 18/07/2016 | 02/08/2016 |

Fuente: El Autor

La preservación de las cepas de acuerdo a las condiciones del lugar, se estima en un período de tiempo que va desde 5 hasta los 30 meses.

Tabla 9. Disposición final de las cepas en gradillas codificadas y estructuradas dentro del cepario

| Gradillas | Códigos de muestras | Fecha 1ra Siembra | Fecha Trasplante |
|---|---|-------------------|-------------------|
|  | <p><u>BP1M2</u> X1, A7, Y, CJ1, G1B, H, G, 7, CH, Y1, J1, I, D1, X, P2, BUX, P, D7, I7, J.</p> | <p>15/09/2016</p> | <p>16/12/2016</p> |
|  | <p><u>BP1M1</u> M, K, X, Y</p> | <p>15/09/2016</p> | <p>04/01/2017</p> |
|  | <p><u>BP1M1</u> CH1, Q, LL, R, META 7, R3, BU1X, P2, T, T1, CH, Z, E5</p> | <p>15/09/2016</p> | <p>13/01/2017</p> |

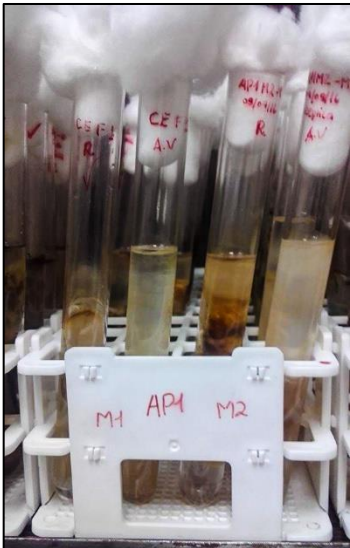


BP2M1
RA2, RA1, E, N, XA1,
XA, RE3, Ñ, CD

BP2M2
O7, Q, A, 4, B, W, B2

01/07/2016

26/01/2017



AP1M1
CEF1, X1, ZOF81, O5,
BU1

AP1M2
M2B, A, F82, X2, A6,
A9, A8, X5, A7

08/07/2016

03/03/2017



BP1M2
F, C, P, K, K1, G1B, B,
H, D, M, G1

15/09/2016

07/03/2017



AP3M1
D, K, J, E, A, AR, I6

AP3M2
B, C, J, F, H, I4

18/07/2016

10/03/2017



AP2M1
A, C1, X, T, E1, Y, F1,
F2

AP2M2
C2, Q, T, T2, X, B

06/09/2016

14/03/2017



BP3M1
K1, H, A, H1, C, J

BP3M2
R, O3B, BM, O3A,
O3C, S, T

01/07/2016

16/03/2017



CP3M2
L, R, B, T, N7, 2, T1,
N6, NH, 3, R2

18/07/2016

20/03/2017



CP1M2
X, J, T, 3A, X2, X1, W,
T3, R, T2, Q, 3B, Z

09/08/2016

22/03/2017



CP1M1
B, C, N, Y, J, D, D1,
M7, W, T

CP2M2
N2, J, J3, B2, S2, OP1,
2, J2, S1, M2

09/08/2016

26/03/2017


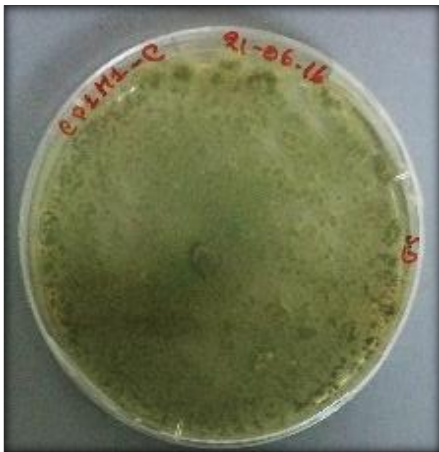
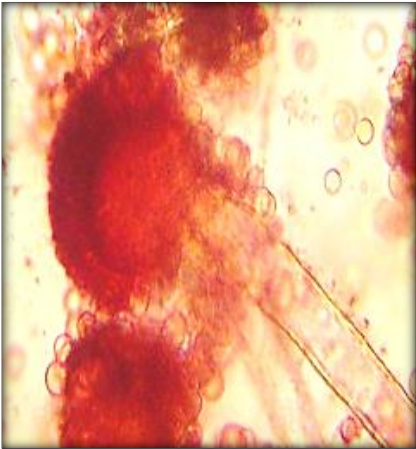
| | | | |
|---|--|----------------------------------|----------------------------------|
|  | <p align="center"><u>CP3M1</u> N, Q, 7B, Y1, Y2, A, 10, RS2, T7, 7A, T6, RS1, Q2, B</p> | <p align="center">18/07/2016</p> | <p align="center">29/03/2017</p> |
|  | <p align="center"><u>CP2M1</u> D3, T, D2, Z, O2B, O1, DY, O2A, Q, R, S, D1</p> | <p align="center">01/08/2016</p> | <p align="center">03/04/2017</p> |
|  | <p align="center">Organización y conservación final del cepario</p> | | |

Fuente: El Autor

5.4 Sistematización de la información




Se diseñaron fichas catalográficas ilustrativas de cada género de acuerdo a los requerimientos establecidos (tablas: 10 hasta la 15)

Tabla 10. Ficha técnica de información sistematizada de características del desarrollo y conservación del *Aspergillus* sp.

|  COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|---|--|--|----------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández PhD & Bryan Ochoa Cabrera | | | |
| Código: | CP1M1 – C | Serie: A53 | |
| Microorganismo: Hongo Filamentoso | Género: <i>Aspergillus</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre 2016 |
| Nivel de Bio Seguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| Características Morfológicas | | | |
| MACROSCÓPICAS | |  | |
| <p>El color es su principal característica con distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris, negro, con cuatro formas básicas de su cabeza:</p> <p>Radiada, globosa, columnar y claviforme; se toma en cuenta el diámetro del crecimiento de las colonias dentro del cultivo, presencia de esclerosis, pigmentos y desde luego la textura y coloración de éstas.</p> | | | |
| MICROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Su estructura presenta hifas hialinas y tabicadas, con una longitud moderada de los conidióforos y una célula pie (no se evidencia) característica en su base.</p> <p>Las vesículas con forma de cúpula y una hilera de fiálides desde las cuales salen largas cadenas de conidias globulosas de dos a tres micras de diámetro.</p> <p>(Ampliación del microscopio 40x)</p> | | | |




Fuente: El Autor

Tabla 11. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del *Penicillium* sp.

|  COLECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|---|--|--|--------------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández, PhD & Bryan Ochoa | | | |
| Código: | CP1M1 – B | Serie: P33 | |
| Microorganismo: Hongo filamentoso | Género: <i>Penicillium</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre del 2016 |
| Nivel de Bioseguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabouraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS | | | |
| MACROSCÓPICAS | | | |
| <p>Presenta colonias de crecimiento rápido, áreas conidiales de color verde y un exudado amarillo brillante, al reverso de la caja de color crema (PDA), con esporulación abundante.</p> | |  | |
| MICROSCÓPICAS | | | |
| <p>Las especies de este género son inconfundibles por la forma de pincel que ofrecen sus aparatos conidiales, por eso su nombre pincilo (del latín que significa «pincel»). Se evidencian sus fiálides que parten desde un mismo origen, con disposición asimétrica. Presenta además conidios en forma globosa y un conidióforo ramificado.</p> <p>(Ampliación del microscopio 40x)</p> | |  | |




Fuente: El Autor

Tabla 12. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del *Trichoderma* sp.

|  UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA ECUADOR COLECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|--|--|--|--------------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández, PhD & Bryan Ochoa | | | |
| Código: | CP2M1 – 02A | Serie: T5 | |
| Microorganismo: Hongo filamentoso | Género: <i>Trichoderma</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre del 2016 |
| Nivel de Bioseguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabouraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS | | | |
| MACROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Se reconocen las colonias por su crecimiento rápido y su coloración amarillo – verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos que se forman de acuerdo su desarrollo.</p> | | | |
| MICROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Hifas hialinas septadas que se disponen con un ángulo similar a 90° de forma piramidal, conidióforos ramificados, fiálides y conidios de forma globosa.</p> | | | |

Fuente: El Autor

Tabla 13. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del *Fusarium* sp.

|  COLECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|--|--|--|--------------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández, PhD & Bryan Ochoa | | | |
| Código: | CP2M1 – Q | Serie: F5 | |
| Microorganismo: Hongo filamentoso | Género: <i>Fusarium</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre del 2016 |
| Nivel de Bioseguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabouraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS | | | |
| MACROSCÓPICAS | | | |
| <p>Presentan un tipo de micelio aéreo abundante, con un color que depende de la especie, en ciertos casos de color blanco - púrpura.</p> <p>El medio de cultivo agar papa glucosado (APG) es el más utilizado en la observación de estas características.</p> | |  | |
| MICROSCÓPICAS | | | |
| <p>Se forman clamidosporas de forma oval o globosa, intercalares o terminales con paredes lisas o rugosas, de forma individual, en cadenas o en racimos; además se caracterizan por secretar hidrófila en cultivos de 2 o 3 semanas por la germinación de los macroconidios para producir microconidios aberrantes en fiálides pequeñas.</p> | |  | |




Fuente: El Autor.

Tabla 14. Ficha técnica de información sistematizada de las características del desarrollo y conservación del *Penicillium* sp.

|  COLECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|--|--|--|--------------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández, PhD & Bryan Ochoa | | | |
| Código: | BP1M1 – CH1 | Serie: P21 | |
| Microorganismo: Hongo filamentoso | Género: <i>Penicillium</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre del 2016 |
| Nivel de Bioseguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabouraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS | | | |
| MACROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Colonias de crecimiento rápido, áreas conidiales de color anaranjado (usualmente se presentan de color verde) con un exudado amarillo brillante con una estructura esponjosa y poco aterciopelada. Al reverso de la caja se presenta de color crema y con esporulación abundante.</p> | | | |
| MICROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Las especies de este género son inconfundibles por la forma de pincel que ofrecen sus aparatos conidianos, por eso su nombre pinicilo (del latín que significa «pincel»). Se evidencian sus fiálides que parten desde un mismo origen, con disposición asimétrica. Presenta además conidios en forma globosa y un conidióforo ramificado, en este caso no muy diferenciable</p> <p>(Ampliación del microscopio 40x)</p> | | | |

Fuente: El Autor

Tabla 15. Ficha técnica de identificación de características del desarrollo y conservación del hongo *Aspergillus* sp.

|  COLECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA – CUENCA | | | |
|--|--|--|--------------------------------|
| Responsables: Ernesto Delgado Fernández, PhD & Bryan Ochoa | | | |
| Código: | CP2M2 –J3 | Serie: A65 | |
| Microorganismo: Hongo filamentoso | Género: <i>Aspergillus</i> sp. | | |
| Fuente: | Aislado: UPS – CUE | Origen: Suelo | Ambiente: ABVPA |
| Almacenamiento: | Tubos 16 x150 | Historial UPS | Cepario desde Octubre del 2016 |
| Nivel de Bioseguridad: | BSL 2 | Conservación: | Terreno PDA, Sabouraud |
| Condiciones de crecimiento: | Aerobio Estricto. Temperatura Ambiente 10° - 20° C durante 10 días | | |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS | | | |
| MACROSCÓPICAS | |  | |
| <p>El color es su principal característica con distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris, negro.</p> <p>Se toma en cuenta el diámetro del crecimiento de las colonias dentro del cultivo, presencia de esclerosis, pigmentos y desde luego la textura y coloración de éstas.</p> | | | |
| MICROSCÓPICAS | |  | |
| <p>Su estructura presenta hifas septadas hialinas y tabicadas, con una longitud moderada de los conidióforos y una célula pie característica en su base.</p> <p>Las vesículas con forma de cúpula y una hilera de fiálides desde las cuales salen largas cadenas de conidias globulosas de dos a tres micras de diámetro. (Ampliación del microscopio 40x)</p> | | | |

Fuente: El Autor

Además de la codificación inicial de las cepas aisladas, agregamos un término de identificación de acuerdo al género al que pertenecían, teniendo (Tabla 16):

Tabla 16. Codificación de las cepas de acuerdo al género que pertenecen

| Género | Códigos |
|------------------------|---------|
| <i>Aspergillus sp.</i> | A86 |
| <i>Penicillium sp.</i> | P59 |
| <i>Rizopus sp.</i> | R1 |
| <i>Fusarium sp.</i> | F6 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | T6 |

Fuente. El Autor

A: *Aspergillus sp.* P: *Penicillium sp.* R: *Rizopus sp.* F: *Fusarium sp.* T: *Trichoderma sp.*

La numeración equivale a la cantidad de cepas pertenecientes a cada género, sin incluir las especies no reproductivas.

5.5 Caracterización de la zona de muestreo

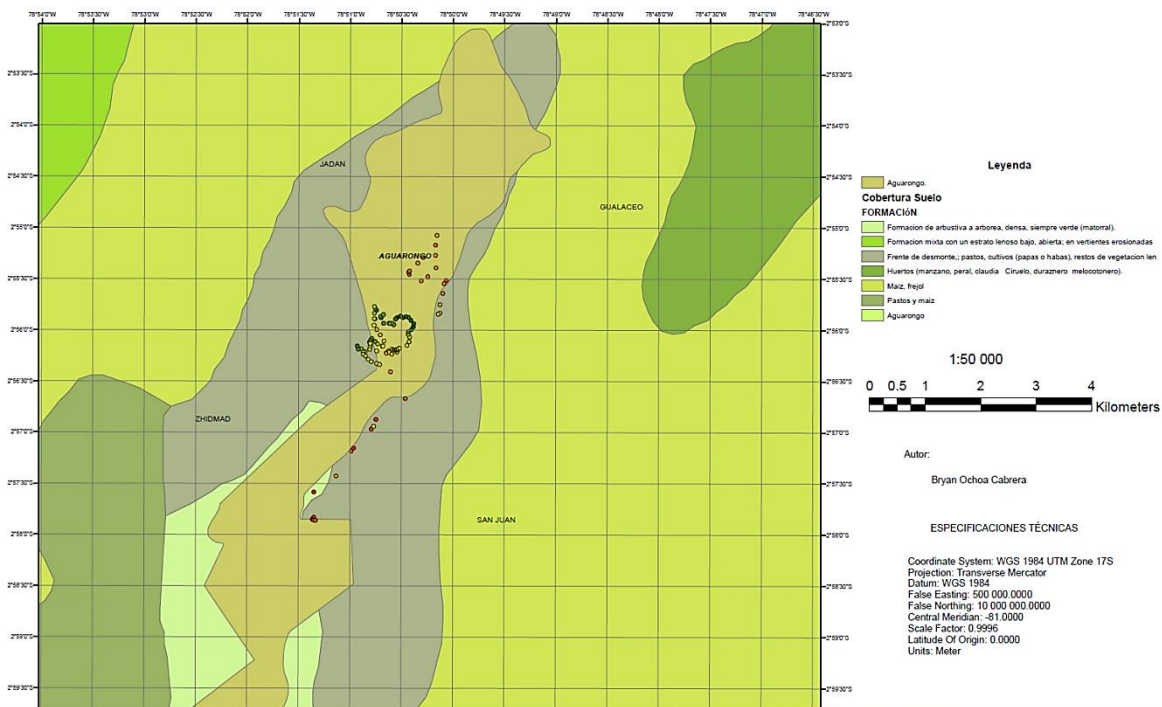


Ilustración 7. Representación del ABVPA en donde se evidencian los puntos de muestreo y las características de cobertura del suelo del ABVPA

Fuente: IGM, El Autor

En el gráfico se ilustra la ubicación geográfica de los puntos de recolección de muestras mediante una variación de colores, representando así en tonalidad verde los muestreos que se realizaron a menor altura, en amarillo los que se llevaron a cabo a una altura media y en rojo el muestreo de los puntos más altos en la estratificación (ver Anexo 6).

En base a la cartografía obtenida en el portal electrónico del Instituto Geográfico Militar (IGM), se pudo definir que el ABVPA presenta una cobertura de suelo en la que predominan los pastos y chaparros, vegetación leñosa, arbórea y arbustiva propia del matorral, además de cultivos cercanos (a pesar de ser un área protegida) debido a la presencia de asentamientos poblacionales. Prado en 2015, divide esta vegetación por porcentajes, presentando: 52% de vegetación baja (chaparro), 24 % de pastos y plantas nativas, 15.8 % de vegetación leñosa y cultivos un 6% (Ortiz Paucay, 2016).

Tomando en cuenta las variables ambientales del muestreo, se determinaron los valores de temperatura de la zona, tomando como referencia 35 muestras, teniendo:

Tabla 17. Muestreo tomado como referencia para establecer una variación de temperatura en el Bosque Protector Aguarongo

| # Muestra | T °C | # Muestra | T °C | # Muestra | T °C | # Muestra | T °C | # Muestra | T °C |
|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| 1 | 24.7 | 8 | 23.7 | 15 | 20.2 | 22 | 21.4 | 29 | 28.4 |
| 2 | 25.5 | 9 | 20.8 | 16 | 21.7 | 23 | 19.9 | 30 | 15 |
| 3 | 18.5 | 10 | 23.5 | 17 | 21.3 | 24 | 17.8 | 31 | 16.2 |
| 4 | 21.6 | 11 | 19.6 | 18 | 20.8 | 25 | 21 | 32 | 16 |
| 5 | 23.9 | 12 | 18.7 | 19 | 15.2 | 26 | 20.4 | 33 | 17 |
| 6 | 19.3 | 13 | 28.4 | 20 | 18.6 | 27 | 20.6 | 34 | 15.4 |
| 7 | 17.5 | 14 | 22.2 | 21 | 26.9 | 28 | 24.2 | 35 | 17.6 |

Fuente: El Autor

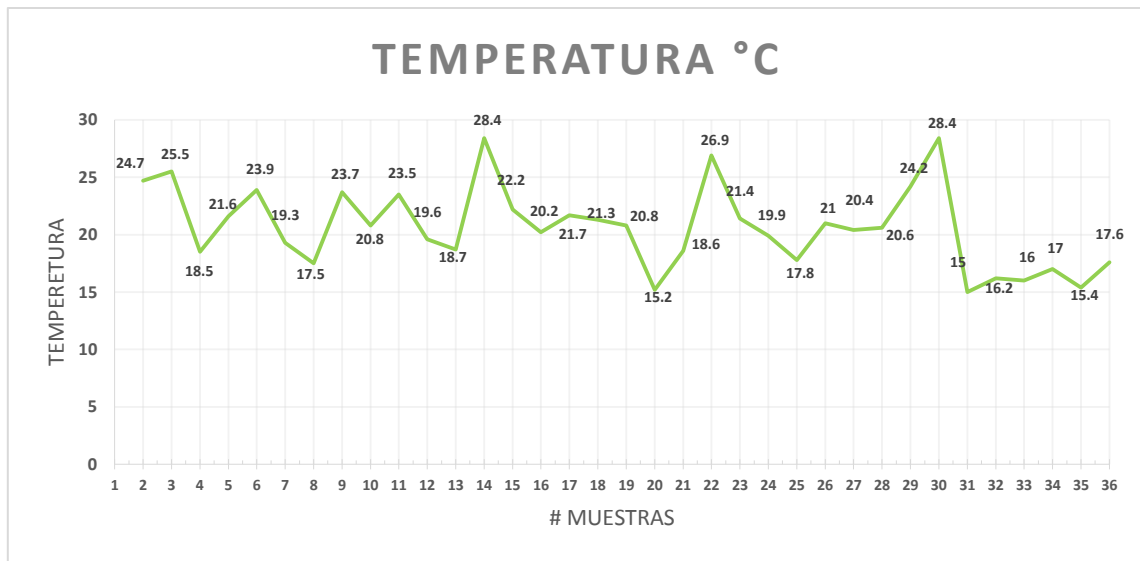


Ilustración 8. Variación de temperatura en el área de muestreo del Bosque Protector Aguarongo
Fuente: El Autor

Tabla 18. Estadísticas de variación de la temperatura en la zona de muestreo ABVPA

| Estadísticas | | |
|---------------------|------------|-------|
| Temperatura °C | | |
| N° de Muestras | Válidas | 35 |
| | No Válidas | 0 |
| Media | | 20,71 |
| Mediana | | 21,00 |
| Moda | | 21 |
| Desviación estándar | | 3,59 |
| Varianza | | 12,86 |

Fuente: El Autor

El análisis estadístico nos presenta valores con los que podemos definir que en la zona predomina un clima templado, con temperaturas relativamente estables que varían entre 3 y 4°C, permitiendo el desarrollo de una extensa variedad fúngica con condiciones de adaptabilidad en diferentes temperaturas, convirtiéndolas en microorganismos factibles para poder analizarlos en condiciones *ex situ* y conservarlas dentro de ambientes preestablecidas.

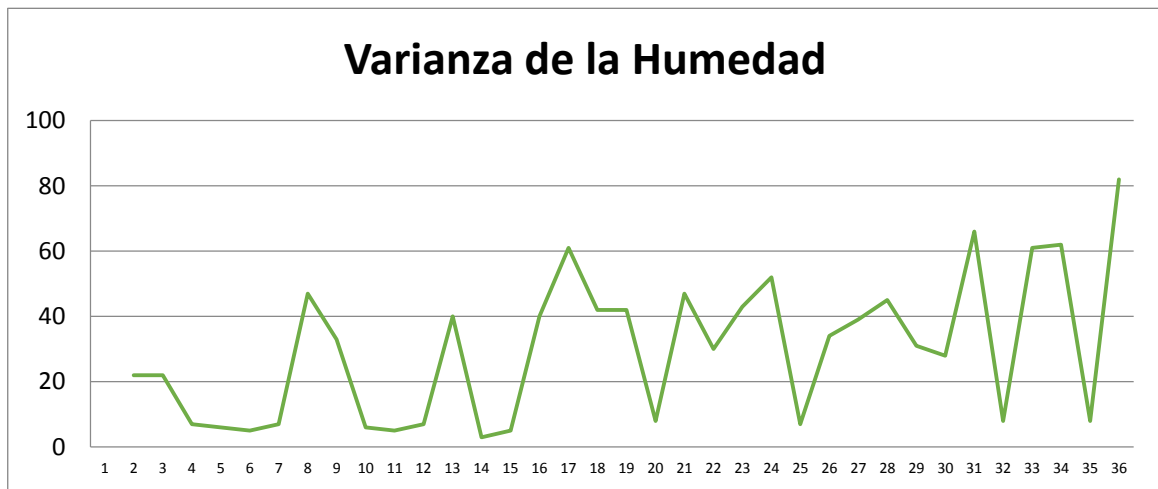
En relación a los niveles de humedad presente en la zona de muestreo, los datos referenciales evidencian una variación notable en diferentes puntos, teniendo:

Tabla 19. Datos referenciales de variación de humedad del Bosque Protector Aguarongo

| # | Humedad | # | Humedad | # | Humedad | # | Humedad | # | Humedad |
|---|---------|----|---------|----|---------|----|---------|----|---------|
| 1 | 22 | 8 | 33 | 15 | 40 | 22 | 43 | 29 | 28 |
| 2 | 22 | 9 | 6 | 16 | 61 | 23 | 52 | 30 | 66 |
| 3 | 7 | 10 | 5 | 17 | 42 | 24 | 7 | 31 | 8 |
| 4 | 6 | 11 | 7 | 18 | 42 | 25 | 34 | 32 | 61 |
| 5 | 5 | 12 | 40 | 19 | 8 | 26 | 39 | 33 | 62 |
| 6 | 7 | 13 | 3 | 20 | 47 | 27 | 45 | 34 | 8 |
| 7 | 47 | 14 | 5 | 21 | 30 | 28 | 31 | 35 | 82 |

Fuente: El Autor

Ilustración 9. Contenido y variación de Humedad del Suelo del ABVPA en base a las zonas de muestreo



Fuente: El Autor

Tabla 20. Estadísticas de Humedad del ABVPA

| Estadísticas | | |
|---------------------|------------|---------|
| Humedad | | |
| N° Muestras | Válidas | 35 |
| | No Válidas | 0 |
| Media | | 30,03 |
| Mediana | | 31,00 |
| Moda | | 7 |
| Desviación Estándar | | 21,998 |
| Varianza | | 483,911 |

Fuente: El Autor

El suelo del Área del Bosque Protector Aguarongo presenta un amplio rango de variación de humedad con valores que van desde el 7% hasta el 82%, permitiéndonos determinar una diversidad de microorganismos con características de degradación, teniendo en cuenta que en su mayoría crecen en condiciones de humedad alta que aprovechan para su desarrollo (higroscópicos), aunque también se encontraron hongos con un crecimiento pleno en sustratos de muy poca humedad, demostrando su alto grado de adaptabilidad a condiciones extremas o de variación de parámetros ambientales eternos.

En relación a los niveles altitudinales de la zona en donde se obtuvieron las muestras de suelo, tenemos:

Tabla 21. Datos del nivel altitudinal (m.s.n.m.) al que fueron obtenidas las muestras de suelo en el Bosque Protector Aguarongo

| N° | Alt. | N° | Alt. | N° | Alt. | N° | Alt. | N° | Alt. |
|-----------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|-----|-------------|
| 1 | 3193 | 21 | 3196 | 41 | 3136 | 61 | 3115 | 81 | 3140 |
| 2 | 3205 | 22 | 3193 | 42 | 3130 | 62 | 3101 | 82 | 3142 |
| 3 | 3219 | 23 | 3200 | 43 | 3117 | 63 | 3107 | 83 | 3144 |
| 4 | 3215 | 24 | 3198 | 44 | 3151 | 64 | 3112 | 84 | 3150 |
| 5 | 3220 | 25 | 3205 | 45 | 3156 | 65 | 3118 | 85 | 3161 |
| 6 | 3211 | 26 | 3209 | 46 | 3159 | 66 | 3113 | 86 | 3172 |
| 7 | 3182 | 27 | 3203 | 47 | 3164 | 67 | 3104 | 87 | 3173 |
| 8 | 3221 | 28 | 3187 | 48 | 3170 | 68 | 3107 | 88 | 3164 |
| 9 | 3215 | 29 | 3180 | 49 | 3169 | 69 | 3112 | 89 | 3162 |
| 10 | 3219 | 30 | 3170 | 50 | 3163 | 70 | 3116 | 90 | 3169 |
| 11 | 3218 | 31 | 3152 | 51 | 3164 | 71 | 3134 | 91 | 3175 |
| 12 | 3210 | 32 | 3130 | 52 | 3161 | 72 | 3137 | 92 | 3173 |
| 13 | 3214 | 33 | 3135 | 53 | 3172 | 73 | 3136 | 93 | 3176 |
| 14 | 3199 | 34 | 3131 | 54 | 3179 | 74 | 3132 | 94 | 3146 |
| 15 | 3194 | 35 | 3140 | 55 | 3180 | 75 | 3126 | 95 | 3163 |
| 16 | 3179 | 36 | 3144 | 56 | 3157 | 76 | 3133 | 96 | 3173 |
| 17 | 3172 | 37 | 3151 | 57 | 3151 | 77 | 3124 | 97 | 3161 |
| 18 | 3173 | 38 | 3153 | 58 | 3152 | 78 | 3133 | 98 | 3171 |
| 19 | 3185 | 39 | 3150 | 59 | 3139 | 79 | 3124 | 99 | 3172 |
| 20 | 3202 | 40 | 3150 | 60 | 3120 | 80 | 3125 | 100 | 3171 |

Fuente: El Autor

Tabla 22. Estadísticas de la variación del nivel altitudinal del AVBPA, zona donde se llevó a cabo el muestreo

| Estadísticas | | |
|---------------------|------------|----------|
| Altura | | |
| N° de Muestras | Válidas | 99 |
| | No Válidas | 0 |
| Media | | 3161,71 |
| Mediana | | 3162,00 |
| Desviación Estándar | | 32,010 |
| Varianza | | 1024,658 |
| Mínima | | 3101 |
| Máxima | | 3221 |

Fuente. El Autor

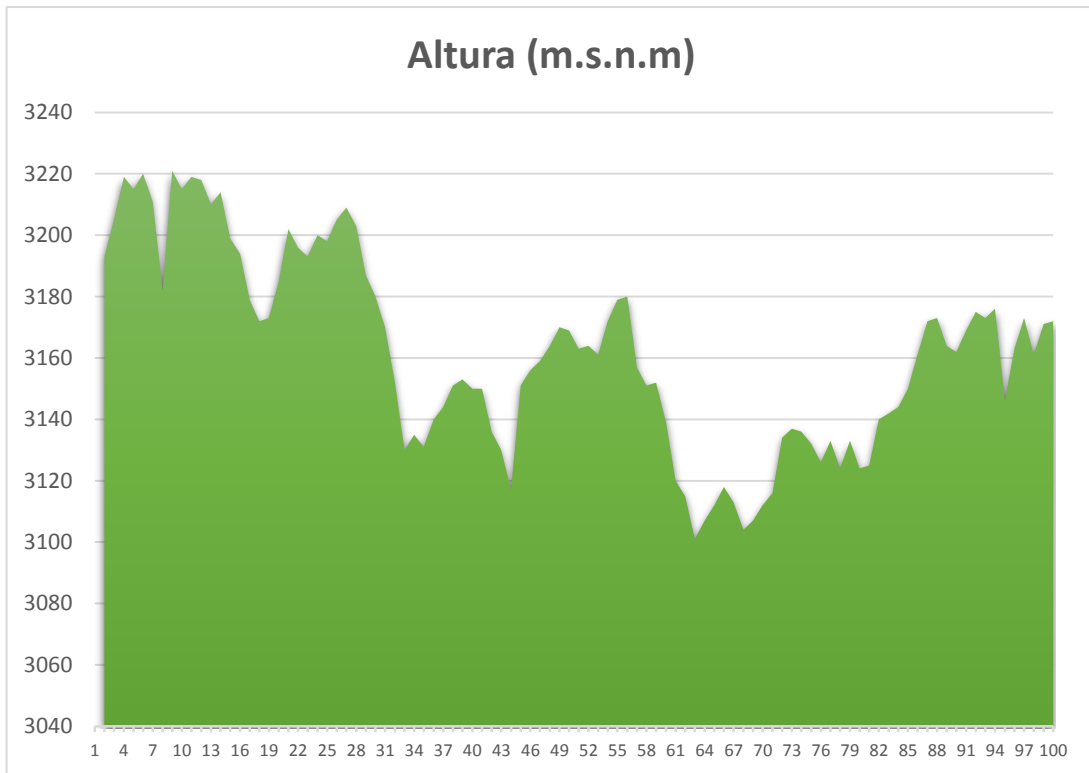


Ilustración 10. Niveles altitudinales de las zonas de muestreo del AVBPA

Fuente: El Autor

La superficie de la zona del ABVPA presenta varios niveles altitudinales, por lo que el muestreo estratificado resultó idóneo para cumplir con el propósito de obtención de muestras a diferentes alturas, cubriendo en lo posible la mayor extensión del área y determinando que esta variable no representa un cambio significativo en las características estructurales de los microorganismos recolectados.

5.4 Cuantificación de ADN

El análisis se toma como precedente para un estudio metagenómico a futuro, en el cual se tiene:

Tabla 23. Detalle de los resultados obtenidos de la extracción de ADN de las muestras analizadas en pureza y estructura a través del software del kit PowerSoild como precedente de un posterior análisis biomolecular de las muestras obtenidas.

| # | Fecha y Hora | Concentración de ADN | Unidad | A260 | A280 | 260/280 |
|----|--------------------|----------------------|--------|-------|--------|---------|
| 1 | 11/04/2017 9:30:16 | 0.6 | ng/μl | 0.012 | 0.006 | 1.96 |
| 2 | 11/04/2017 9:31:25 | 1.6 | ng/μl | 0.033 | 0.017 | 1.92 |
| 3 | 11/04/2017 9:32:29 | 11.5 | ng/μl | 0.229 | 0.104 | 2.2 |
| 4 | 11/04/2017 9:33:04 | 1.8 | ng/μl | 0.035 | 0.021 | 1.72 |
| 5 | 11/04/2017 9:33:36 | 10.9 | ng/μl | 0.217 | 0.113 | 1.93 |
| 6 | 11/04/2017 9:35:57 | 16.9 | ng/μl | 0.338 | 0.12 | 2.82 |
| 7 | 11/04/2017 9:36:42 | 0.7 | ng/μl | 0.013 | 0.013 | 1.01 |
| 8 | 11/04/2017 9:37:16 | 19 | ng/μl | 0.38 | 0.155 | 2.45 |
| 9 | 11/04/2017 9:37:59 | 0.3 | ng/μl | 0.006 | -0.002 | -2.46 |
| 10 | 11/04/2017 9:38:30 | 33.7 | ng/μl | 0.673 | 0.279 | 2.41 |
| 11 | 11/04/2017 9:39:11 | 0.5 | ng/μl | 0.011 | 0.011 | 0.97 |
| 12 | 11/04/2017 9:39:45 | 0.3 | ng/μl | 0.007 | 0 | 1.57 |
| 13 | 11/04/2017 9:40:25 | 0.5 | ng/μl | 0.01 | 0.007 | 1.55 |
| 14 | 11/04/2017 9:41:01 | 2.5 | ng/μl | 0.049 | 0.03 | 1.64 |
| 15 | 11/04/2017 9:41:40 | 0.6 | ng/μl | 0.012 | 0.007 | 1.73 |
| 16 | 11/04/2017 9:42:10 | 1.4 | ng/μl | 0.027 | 0.016 | 1.75 |
| 17 | 11/04/2017 9:42:47 | 2.8 | ng/μl | 0.057 | 0.032 | 1.75 |
| 18 | 11/04/2017 9:43:35 | 0.4 | ng/μl | 0.008 | 0.004 | 2.03 |
| 19 | 11/04/2017 9:44:34 | 1.5 | ng/μl | 0.031 | 0.012 | 2.5 |
| 20 | 11/04/2017 9:45:09 | 1 | ng/μl | 0.021 | 0.012 | 1.71 |

Fuente: El Autor

Se llevó a cabo la extracción de ADN de 20 muestras, como referencia de las cien obtenidas previamente en el suelo del ABVPA, de las cuales se determinó su nivel de pureza que garantizará un correcto análisis biomolecular a futuro (Banco Nacional de ADN, 2010) (ver tabla 24 y tabla 25):

Tabla 24. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN

| Radio | Valor | Pureza |
|----------------|--------------|------------------------------------|
| | 1.8-2 | ADN de pureza óptima |
| 260/280 | 1.6-1.8 | ADN pureza aceptable |
| | <1.6 | Presencia de compuestos aromáticos |
| | >2.1 | Contaminación con ARN |

Fuente. Banco Nacional de ADN, Salamanca

Tabla 25. Determinación de pureza de ADN contenido en las muestras analizadas, en base a valores indicativos preestablecidos

| # | 260/280 | Nivel de Pureza |
|-----------|----------------|------------------------------------|
| 1 | 1.96 | Pureza Óptima |
| 2 | 1.92 | Pureza Óptima |
| 3 | 2.2 | Contaminación con ARN |
| 4 | 1.72 | Pureza Aceptable |
| 5 | 1.93 | Pureza Óptima |
| 6 | 2.82 | Contaminación con ARN |
| 7 | 1.01 | Presencia de compuestos aromáticos |
| 8 | 2.45 | Contaminación con ARN |
| 9 | 2.46 | Presencia de compuestos aromáticos |
| 10 | 2.41 | Contaminación con ARN |
| 11 | 0.97 | Presencia de compuestos aromáticos |
| 12 | 1.57 | Pureza Aceptable |

| | | |
|-----------|------|-----------------------|
| 13 | 1.55 | Pureza Aceptable |
| 14 | 1.64 | Pureza Aceptable |
| 15 | 1.73 | Pureza Aceptable |
| 16 | 1.75 | Pureza Aceptable |
| 17 | 1.75 | Pureza Aceptable |
| 18 | 2.03 | Pureza Óptima |
| 19 | 2.5 | Contaminación con ARN |
| 20 | 1.71 | Pureza Aceptable |

Fuente: El Autor

5.5 Proyección futura

Se plantea llevar a cabo un análisis biomolecular de las cepas tratadas, para corroborar las características macroscópicas y microscópicas identificadas actualmente que nos permitiera confirmar la validez del trabajo de sistematización del cepario realizado actualmente. Además se proyecta realizar un análisis metagenómico completo que permita determinar las características microbiológicas del suelo del Área del Bosque Protector Aguarongo.

CONCLUSIONES

- Se conservaron 181 cepas de hongos filamentosos dentro de un cepario sistematizado, con información detallada de sus características y los parámetros para su preservación almacenada dentro de fichas técnicas de cada una de ellas.
- Se identificaron cuatro géneros de interés: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* y *Fusarium sp.*, conservados bajo un nivel de bioseguridad de laboratorio (#2) en condiciones de humedad y luz normal, y una temperatura que oscilan entre los 15 – 22°C (ambiente).
- Se reconocieron sus aspectos de crecimiento, desarrollo estructural y metodología de preservación.
- Las condiciones ambientales *in situ* y las de preservación *ex situ*, así como las características de adaptabilidad de las cepas conservadas, nos permitieron establecer que estos hongos pueden desarrollarse en una amplia variedad de climas sin comprometer sus funciones, estructura o actividad metabólica.
- La conservación en tubos a pico de clarín con aceite mineral nos garantiza una preservación a largo plazo.
- Como precedente de un análisis metagenómico a desarrollar, se procedió a la extracción y determinación de pureza del ADN de las muestras de suelo, que garanticen un análisis molecular correcto a futuro.

RECOMENDACIONES

- Mantener un control y seguimiento periódico del estado y condiciones del cepario.
- Incrementar la diversidad de géneros de la colección, con el propósito de disponer de una fuente completa de material microbiológico de interés, que puedan ser usados en procesos investigativos relacionados a metodologías de biorremediación ambiental.
- Realizar el análisis biomolecular de las cepas nos permita establecer las especies de los aislados funginos en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 19, s79–s84.
- Alarcon, D. (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. *Facultad de Ciencias de Microbiología*.
- Arias, L., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde*.
- Banco Nacional de ADN, S. (2010). ADN de pureza óptima ADN pureza aceptable presencia de compuestos aromáticos contaminación con ARN. Retrieved from bancoadn.org
- Bojorquez Morales, G. (2010). *Cepas nativas de Trichoderma spp. (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre Fusarium sublutinans y F. oxysporum (Hyphomycetes:Hyphales)*. Ucol.Mx. Retrieved from http://www.ucol.mx/interpretextos/pdfs/909_inpret1009.pdf
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, 5, 166–168.
- Camero-Rodríguez, J., & Linares-Gómez, M. F. (2013). *Implementación de un protocolo para la conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del laboratorio de química microbiológica de la pontifica universidad javeriana*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Campoverde, M. J. (2012). *Determinación de Mohos y Levaduras del Sistema de Agua de la Junta Administradora de Agua Potable de la Parroquia Baños*.
- Carrillo, L. (2001). Aspergillus. *Los Hongos de Los Alimentos Y Forrajes*, 44–60.
- Carrillo, L. (2003). Hongos. *Revista Microbiología Agrícola*, (2), 14.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D. A. N., & Bissett, J. (1998). Morphological and Molecular Identification of Trichoderma Isolates on North American Mushroom Farms, 64(1), 133–137.
- Cecilia Tapia y José Amaro. (2014). Retrato Microbiológico. *REvista Chilena Infectol*, 31(1), 85–86. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>
- Chavez García, M. (2006). *Produccion de Trichoderma sp. Y Evaluación de su Efecto en Cultivo de Crisantemo (Dentranthema grandiflora)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Diba, K., Rezaie, S., & Mahmoudi, M. (2007). IDENTIFICATION OF ASPERGILLUS SPECIES USING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS.
- Eduardo, O., Rey, L., Rubio, J. D., Andrei, C., & Zambrano, C. (2016). Evaluación de dos hongos filamentosos métodos patógenos de conservación de. *Centro Agrícola*, 43(2), 36–41.

- Eltem, R., Askun, T., Sarigul, N., Oskale, E., & Efendiler, H. (2004). Colonial and Morphological Characteristics of Some *Aspergillus* Fr.: Fr. Species Isolated from Vineyards in Manisa and Çizirli Provinces (Turkey), 28, 287–298.
- FBA, F. B. A. (1809). *Penicillium*. *Fundación Bioquímica Argentina*.
- Fernández, C., Martínez, G., Perurena, M., Illnait, M., & Valdés, I. (2005). La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “ Pedro Kourí ”: funciones y retos. *Rev Cubana Med Trop*, 57(3), 1–7.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial a *Penicillium* , action of cultures of with special reference to their use in the isolation of.
- García, M. D., & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30(1), 12–16.
- Garzón Grajales, N. (2013). *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelos aislados de los paramos de guasca y cruz verde. Trabajo de Tesis.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gato Cárdenas, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Gemma Rodríguez. (2000). Cuantificación de ácidos nucleicos. *SERVICIO DE GENOMICA DEL IIBm (SQP)*, 1000.
- Gómez, J. (1930). clave determinativa de las especies del género *Penicillium*, 132. Retrieved from https://digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/6407/1/N17_Clave_determinativa_de_las_especies_del_genero_Penicillium.pdf
- González, E. A. P., & Llópiz Janer, N. D. (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 18(1), 34–36.
- Gonzalez Salgado, A. (2010). *DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ESPECIES DE Aspergillus PRODUCTORAS DE OCHRATOXINA A*. Universidad Complutense de Madrid.
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm, 968, 959–968.
- Hernández, D., & Loaiza, S. (2014). Selección De Un Método Para La Conservación Y Preservación De Actinomicetos Aislados Del Suelo Del Jardín Botánico De La Universidad Tecnológica De Pereira. *Universidad Tecnológica De Pereira*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Instituto de Seguridad e Higiene Nacional, E. (2012). Fichas de agentes biológicos: *Aspergillus* spp. *Databio*. Retrieved from http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Hongos/Ficha_Aspgillus_spp.pdf
- Kennedy, N. A., Walker, A. W., Berry, S. H., Duncan, S. H., Farquarson, F. M., Louis, P., ... Hold, G. L. (2014). The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing. *PLoS*

ONE, 9(2), e88982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088982>

- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. a, Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Silva Lopes, T. Da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia E Investigación Agraria*, 35(1), 77–86.
- Martínez, B. I., I, D. I., & Ii, Y. R. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg.*
- Martínez, E., Martínez, P., Guillén, D., Peña, G., & Hernández, V. M. (2015). Diversidad de Fusarium en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología*, 42, 33–43.
- Medrano, Ana y Ortuño, N. (2007). Control del Damping off mediante la aplicación de bioinsumos en almacigos de cebolla en el Valle Alto de Cochabamba – Bolivia, 3, 660–679.
- Morales Gallego, M. L. (2009). Los hongos, 1–8.
- Nabors, M. W. (2011). *Introducción a la Botánica* (Pearson, A). Guatemala.
- Nanodrop, M. (2009). Nanodrop nd 1000. Manual NanoDrop 100.
- Olaya, D. V., & Rachez, D. (2014). *Colección Digital de Microorganismos del Cepario de Bacterias*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ortiz Paucay, P. (2016). *Biodiversidad fúngica en el suelo del Bosque Protector Aguarongo Provincia del Azuay - Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca.
- Pinzón, A., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2011). EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL ÑAME (*Dioscorea* sp).
- Pinzón Gutiérrez, Y. A., Lizette Bustamante, S., & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). (Spanish). *Evaluating Methods for Preserving Yam (Dioscorea Sp)phytopathogenic Fungii. (English)*, 11(2), 8–18.
- Pontón, J. &, & Cabañes, J. (2000). Aspergillus y aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, (October 2000), 77–78.
- Randy, H; Adams, S. (1999). Bioremediation Potential of Oil Impacted Soil and Water in the Mexican Tropics. *Terra*, 17, 159–174.
- Rodrigues, P., Kozakiewicz, Z., Soares, C., Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 527–534. <https://doi.org/10.1001/jama.1965.03080170050015>
- Saha, S., Nasreen, S., & Sheikh, P. A. (2012). Cultural and Morphological Characterization of *Trichoderma* spp. Associated with Green Mold Disease of *Pleurotus* spp. in Kashmir. *Research Journal of Microbiology*.
- Sánchez, J., & Rodríguez, J. (2010). Fundamentos y Aspectos Microbiológicos:

- Biorremediación. *Universidad de Oviedo, 1*, 12–16.
- Se, P. (1993). Estandarización de la técnica para extraer ADN de bacterias en filtros conteniendo partículas del aire de la ciudad de Hermosillo., 16–24.
- Sempere, F., García, F., & Santamaría, M. (2004). Caracterización morfológica y cultural de *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc . *Phytoma España, 162*, 101–105.
- Sobrado, S., Cabral, E., & Romero, F. (2013). Hongos Diversidad Vegetal.
- Soesanto, L., & Rahayuniati, R. F. (2011). Morphological characteristics of four *Trichoderma* isolates and two endophytic *Fusarium* isolates ., (June 2017).
- Suchodolski, P. F., Izumiya, Y., Lupiani, B., Ajithdoss, D. K., Gilad, O., Lee, L. F., ... Reddy, S. M. (2009). Homodimerization of Marek's Disease Virus-Encoded Meq Protein Is Not Sufficient for Transformation of Lymphocytes in Chickens. *Journal of Virology, 83*(2), 859–869. <https://doi.org/10.1128/JVI.01630-08>
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Manual De Prácticas De Laboratorio Microbiología General. *Journal of Chemical Information and Modeling, 53*(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Torrenegra, R., & Rueda, L. (2001). Contribución Fotográfica al estudio de mohos filamentosos del páramo de Guasca.
- Tovar Castaño, J. C. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. *Pontificia Universidad Javeriana, 81*.
- Uribe Vélez, D. (2009). Metagenómica ¿Una oportunidad para el estudio de la diversidad microbiana en Colombia? *Rev. Colomb. Biotecnol. Diciembre, XI*(2), 4–7.
- Vallejo, T. (2014). *Caracterización y clasificación de trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal*.
- Valobra, A., & Martinelli, G. (2014). Cuantificación de ADN y electroforesis en gel de agarosa. *Introducción A La Biología Celular Y Molecular.Tp5: Cuantificación de ADN Y Electroforesis En Gel de Agarosa .Introducción a La Biología Celular Y Molecula, 5–6*.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aerobios: organismos que pueden vivir o desarrollarse en presencia de oxígeno

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

Basipétalas: Cadena que tiene su conidia más joven en la base.

Cepas: población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitivas.

Conidias: Propágulo asexual producido de novo por una célula especializada (conidiogénesis blástica) o a partir de hifas preexistentes (conidiogénesis talica).

Conidióforo: Hifa especializada y diferenciada donde son formadas las conidias.

Cósmidos: son vectores de clonación, que han sido ampliamente usados en la elaboración de genotecas de ADN genómicos de gran tamaño.

Espora: cuerpo microscópico unicelular o pluricelular con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas, (haploide).

Fiálides: células conidiógenas con abertura en forma de botella a través de la cual se forman conidias.

Filamentos o hifas: hifa larga y cilíndrica similar a un hilo

Higroscópicos: capacidad de absorber humedad

Micotoxinas: metabolitos de degradación de la materia orgánica

Nano Drop: espectrofotómetro empleado para cuantificar precisamente ácidos nucleicos y proteínas

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

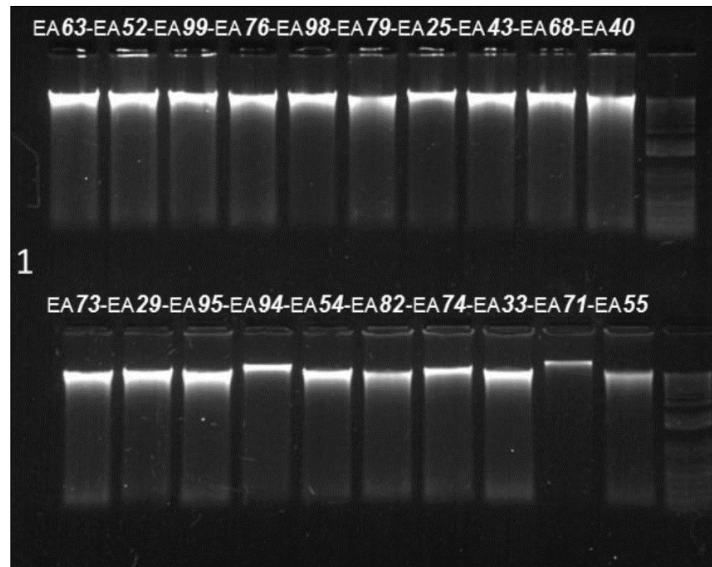
Plásmidos: son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico.

Pleomorfismo: aparición de más formas estructurales

SNPS: Polimorfismos de nucleótido único.

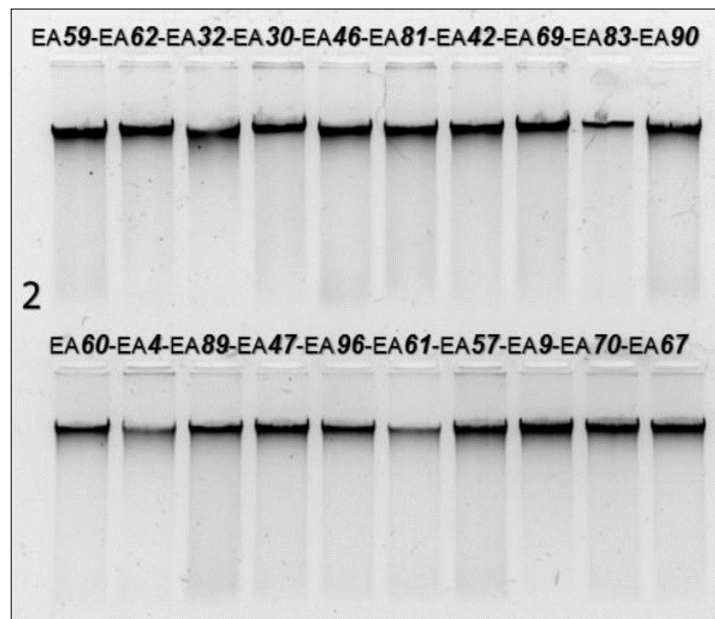
Vórtex: dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos de líquido

ANEXOS:



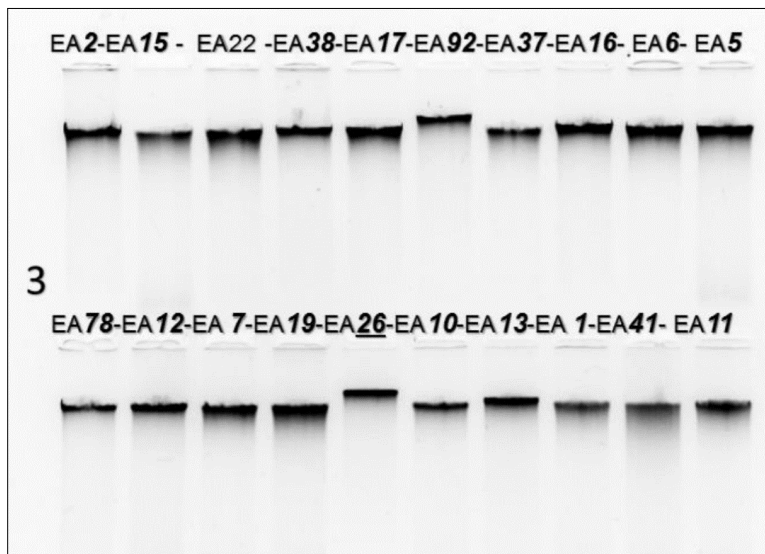
Anexo 2. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR.

Fuente: El Autor, Nano Drop 2000



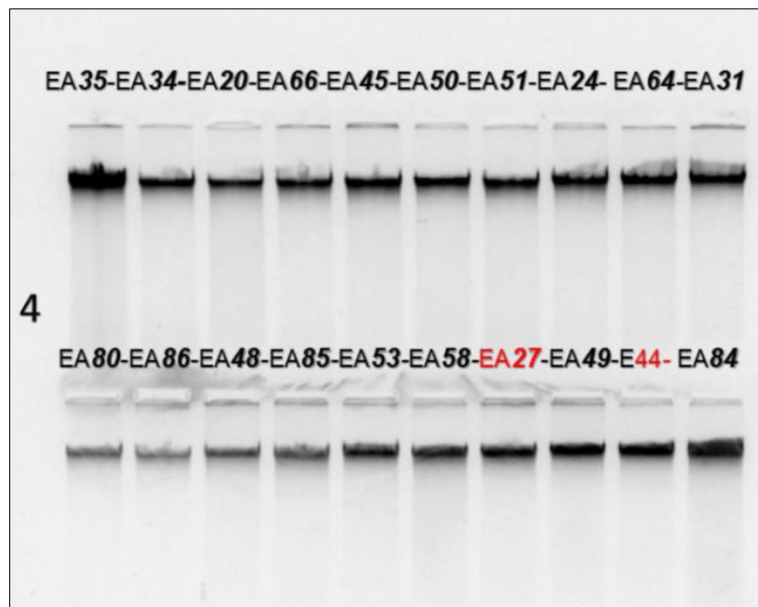
Anexo 1. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR.

Fuente: El Autor, Nano Drop



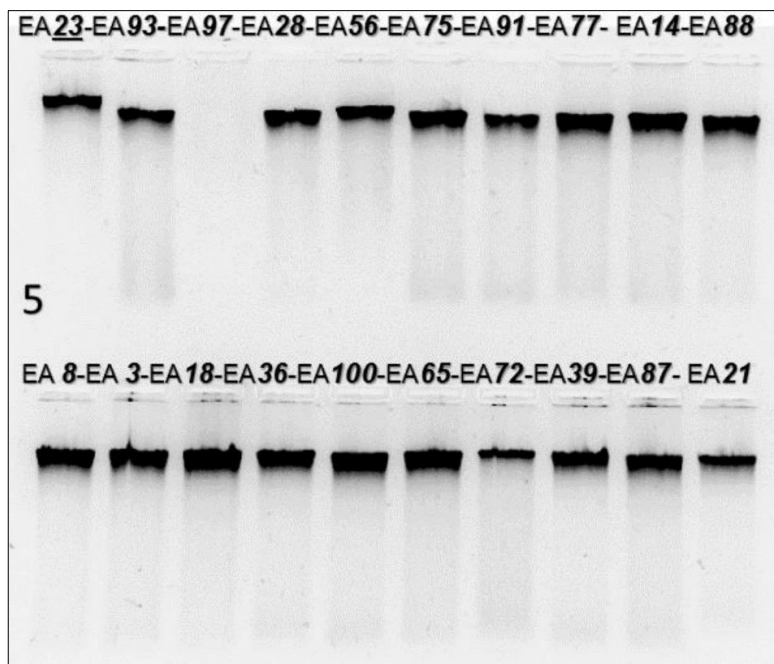
Anexo 4. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR.

Fuente: El Autor, Nano Drop 2000

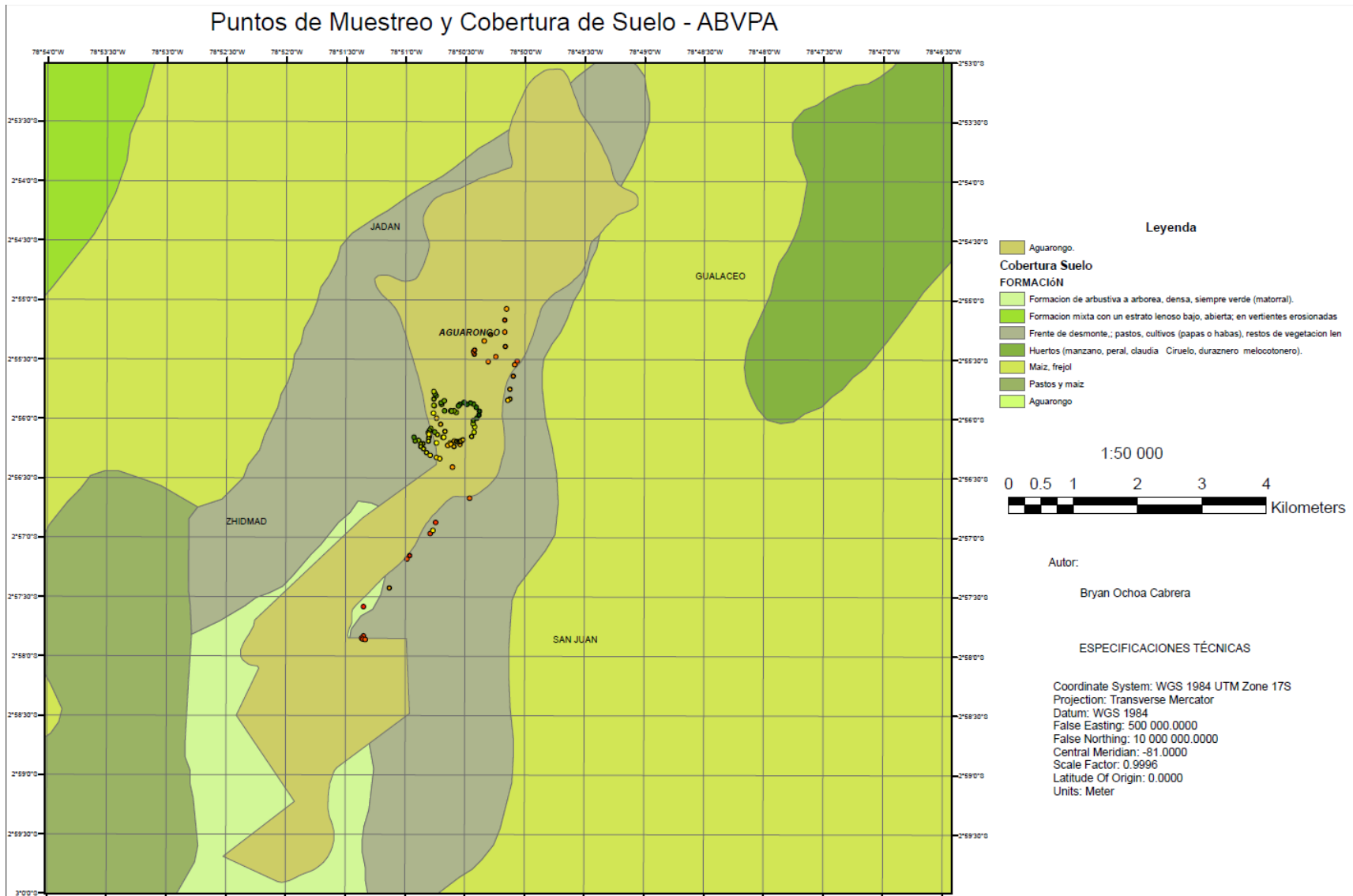


Anexo 3. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR.

Fuente: El Autor, Nano Drop 2000



Anexo 5. Cromatografía de gel de agarosa que identifica el nivel de especificidad de productos de PCR.
Fuente: El Autor, Nano Drop 2000



Anexo 6. Mapa de ubicación de los puntos del segundo muestreo y las características de cobertura del suelo del ABVPA
 Fuente: El Autor