

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque

Protector la Prosperina

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogas

Presentado por:

Gladys Paola Carreño Bulgarin

Genny Andrea Quijije Franco

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

A mi familia por el apoyo incondicional durante mi formación profesional. En especial a mis padres Gladys y Taylor.

A mi segunda mamá, Doris Bulgarin.

A mi mayor fuente de inspiración, Valeria.

Gladys Paola Carreño Bulgarín

A mis padres, Genny y Andrés, que confiaron en mis capacidades y fueron ejemplo de sabiduría y compromiso.

A Víctor que es amigo y hermano, a Isis por sus consejos y a Don Víctor e Isita con infinito cariño.

A Alex quien me acompañó durante esta trayectoria y a los amigos que estuvieron durante los momentos difíciles.

Genny Andrea Quijije Franco

AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestra sincera gratitud a Juan Manuel Cevallos PhD, a la máster María Gabriela Maridueña y al ingeniero Byron Díaz por su guía y apoyo continuo.

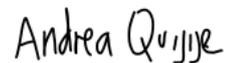
Agradecemos también a los profesores que nos acompañaron durante nuestra carrera universitaria y nos guiaron por el camino de la investigación.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Gladys Paola Carreño Bulgarin y Genny Andrea Quijije Franco damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Gladys Paola Carreño
Bulgarin



Genny Andrea Quijije
Franco

EVALUADORES

Diego Gallardo Polít

PROFESOR DE LA MATERIA

Juan Manuel Cevallos

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El suelo ofrece recursos, microclimas y nutrientes favorables para el crecimiento de microorganismos como los hongos filamentosos. Uno de los remanentes de Bosque Seco Tropical en Guayaquil es el Bosque Protector la Prosperina fundamental para la preservación de especies y por los servicios ecosistémicos que ofrece. No obstante, no se han realizado estudios de biodiversidad de hongos filamentosos por lo que existen limitaciones en torno a su conservación e investigación. En consecuencia, surge la necesidad de determinar la biodiversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través de métodos moleculares para el desarrollo de estrategias de conservación, educación ambiental y productos comerciales. Para ello, se analizaron muestras de suelo recolectadas en las estaciones Cuevas, Cañas y FCV durante la época seca. Como resultados, se identificaron 38 especies, en cada estación se obtuvieron 16, 16 y 14 respectivamente. En las tres estaciones se encontró *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Absidia*. También se identificó *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces*, *Curvularia*, *Humicola*, *Gongronella*, *Clonostachys* y *Mariannea*. Se criopreservaron un total de 37 cepas de hongos filamentosos en la Colección de Cultivos Microbianos del CIBE, de las cuales 23 eran especies únicas. Estos podrán investigarse a futuro en las industrias alimentaria, textil, farmacéutica o agrícola para su aplicación en torno al desarrollo sostenible. Por último, se diseñó una guía ilustrada de hongos filamentosos como aporte a la educación ambiental. Además, se establecieron propuestas como un videojuego para niños y productos comerciales para el financiamiento a corto plazo para futuros proyectos de investigación.

Palabras Clave: Hongos filamentosos, identificación molecular, criopreservación, ITS, LSU.

ABSTRACT

*The soil offers resources, microclimates and nutrients favorable for the growth of microorganisms such as filamentous fungi. One of the remnants of the Tropical Dry Forest in Guayaquil is the Bosque Protector la Prosperina, fundamental for the preservation of species and for the ecosystem services it offers. However, biodiversity studies of filamentous fungi have not been carried out in this ecosystem, so there are limitations regarding their conservation and research. Consequently, there is a need to determine the biodiversity of filamentous fungi associated with the soil of the Bosque Protector la Prosperina through molecular methods for the development of conservation strategies, environmental education and commercial products. Soil samples were collected at Cuevas, Cañas and FCV stations during the dry season and analyzed in the laboratory. As a result, 38 species were identified, 16, 16 and 14 were obtained at each station, respectively. In the three stations *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Absidia* were found. *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces*, *Curvularia*, *Humicola*, *Gongronella*, *Clonostachys* and *Mariannea* were also identified. A total of 37 strains corresponding to 23 different species of filamentous fungi were cryopreserved in the CIBE Microbial Culture Collection. These may be investigated in the future in the food, textile, pharmaceutical or agricultural industries for their application around sustainable development. Finally, an illustrated guide to filamentous fungi was designed as a contribution to environmental education. In addition, proposals such as a children's video game and commercial products were established for short-term funding for future research projects.*

Keywords: Filamentous fungi, molecular identification, cryopreservation, ITS, LSU.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema	3
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Bosque Protector La Prosperina	5
1.4.2 Los hongos filamentosos	6
1.4.3 Identificación de hongos filamentosos	9
1.4.4 Métodos de conservación de hongos filamentosos.....	11
1.4.5 Los hongos filamentosos y el desarrollo sostenible	12
CAPÍTULO 2.....	15
2. Metodología.....	15
2.1 Área de estudio	15
2.1.1 Estación 1: Albarrada Cuevas.....	15
2.1.2 Estación 2: Albarrada Cañas	16

2.1.3	Estación 3: FCV	17
2.2	Recolección de muestras	18
2.3	Aislamiento de hongos filamentosos	19
2.3.1	Diluciones seriadas.....	19
2.3.2	Siembra por agotamiento.....	20
2.3.3	Aislamiento de colonias viables	21
2.4	Purificación de hongos filamentosos	22
2.5	Registro fotográfico para la guía ilustrada	22
2.6	Métodos moleculares previos a la identificación	23
2.6.1	Extracción de ADN	23
2.6.2	Cuantificación de ADN.....	24
2.6.3	Amplificación por PCR	24
2.6.4	Electroforesis en gel	24
2.6.5	Secuenciación Sanger	25
2.7	Identificación de especies	25
2.8	Análisis filogenéticos	26
2.9	Criopreservación	26
2.10	Consideraciones éticas y legales	27
CAPÍTULO 3		28
3.	Resultados y Análisis	28
3.1	Especies identificadas.....	28
3.2	Análisis filogenético.....	40
3.3	Criopreservación	42
3.4	Propuestas de educación ambiental.....	43
3.4.1	Guía ilustrada de hongos filamentosos del BPP.	43
3.4.2	Videojuego para niños: “Descubriendo el mundo invisible”	44

3.5	Diseño de productos comerciales.....	45
CAPÍTULO 4.....		47
4.	Conclusiones y Recomendaciones.....	47
	Conclusiones	47
	Recomendaciones	48
BIBLIOGRAFÍA.....		50
APÉNDICES		64

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
BPP	Bosque Protector la Prosperina
CCM	Colección de Cultivos Microbianos
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FCV	Facultad de Ciencias de la Vida
INABIO	Instituto Nacional de Biodiversidad
ITS	Espaciador Transcrito Interno
LSU	Ácido Ribonucleico Ribosómico de Subunidad Grande
ODS	Objetivos del Desarrollo Sostenible
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Potencial de Hidrógeno
PDA	Agar Papa Dextrosa
SNAP	Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador
SSU	Ácido Ribonucleico Ribosómico de Subunidad Menor

SIMBOLOGÍA

cm	Centímetro
mg	Miligramo
g	Gramo
μl	Microlitro
ml	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema de las regiones de <i>barcoding</i> para el ADN fúngico.	10
Figura 1.2 Primers para la amplificación de ADN en hongos filamentosos.	10
Figura 1.3 Industrias que se benefician de los hongos filamentosos.	13
Figura 2.1 Estaciones de muestreo en el Bosque Protector La Prosperina.	15
Figura 2.2 Estación 1: Albarrada Cuevas (noviembre, 2021).....	16
Figura 2.3 Estación 2: Albarrada Cañas (noviembre, 2021).	17
Figura 2.4 Estación 3: FCV (noviembre, 2021).....	18
Figura 2.5 Réplicas (R1, R2, R3) para cada estación.....	18
Figura 2.6 Recolección de muestras de suelo por triplicado.....	19
Figura 2.7 Técnica de dilución seriada para el cultivo de los hongos filamentosos.....	20
Figura 2.8 Preparación de placas Petri con PDA para el aislamiento.	21
Figura 2.9 Vista de las hifas a través de un estereoscopio.	22
Figura 2.10 egistro fotográfico de hongos filamentosos.....	23
Figura 3.1 Géneros asociados al suelo del BPP por estación.	39
Figura 3.2 Árbol filogenético a partir del gen ITS.....	40
Figura 3.3 Árbol filogenético a partir del gen LSU.	42
Figura 3.4 Guía ilustrada de hongos filamentosos del BPP.	44
Figura 3.5 Videojuego para niños: “Descubriendo el mundo invisible”.....	45
Figura 3.6 Diseño de productos comerciales.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Especies identificadas en la Estación Cuevas (E1).	28
Tabla 3.2 Especies identificadas en la Estación Cañas (E2).	31
Tabla 3.3 Especies identificadas en la estación FCV (E3).....	35
Tabla 3.4 Códigos para la criopreservación en la CCM-CIBE.	42

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un ambiente que ofrece varios microhábitats que promueven la biodiversidad de microorganismos (Pacasa-Quisbert et al., 2017). Entre los microorganismos que se encuentran en el suelo se pueden encontrar hongos micorrízicos, hongos ectomicorrízicos, hongos micorrízicos arbusculares, hongos patógenos, entre otros (Wang et al., 2021). Estos seres vivos son fundamentales porque cumplen diferentes roles en el ecosistema; por ejemplo, establecen relaciones intraespecíficas de mutualismo o patogenicidad con otras especies como plantas o animales que también influyen en la comunidad de especies presentes en el suelo (Wang et al., 2021).

Los hongos logran habitar este ambiente debido a su alta plasticidad y pueden cumplir el rol de controladores biológicos, regulares de ecosistemas o transformadores de compuestos (Gardi et al., 2009). El estudio de las comunidades de hongos permite identificar el rol de estos microorganismos en la regulación de la biodiversidad de plantas y las interacciones con otros seres vivos (Wang et al., 2021).

Adicionalmente, los hongos filamentosos pueden ser empleados en la biotecnología fúngica porque permiten fomentar la economía circular, mitigar el cambio climático y generar la producción sostenible de alimentos, combustibles, textiles, fármacos, entre otros (Meyer et al., 2020). Para ello, se requiere de investigaciones con el objetivo de determinar la biodiversidad de hongos filamentosos y desarrollar futuros proyectos en el campo de la investigación, la conservación y la educación ambiental.

Dado lo anterior, en estudios internacionales se utilizan herramientas moleculares para identificar y describir los organismos encontrados en muestras de suelo (Miyachi et al., 2020; Zoll et al., 2016). Los hongos filamentosos dominantes a escala mundial pertenecen al filo Ascomycota y Basidiomycota aunque existe una remarcada heterogeneidad entre los ecosistemas forestales debido a las condiciones del biotopo y la biocenosis correspondiente a cada ambiente (Zhou et al., 2021).

En investigaciones a escala regional se ha determinado que la diversidad de hongos filamentosos encontrados en el agroecosistema K'iphak'iphani en Bolivia, corresponde a la división Ascomycota encontrando principalmente *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Pacasa-Quisbert et al., 2017). Con aquellos proyectos de diversidad es posible encontrar el potencial de los hongos filamentosos. Tal es el caso de una investigación en Colombia en la cual se determinó la composición de hongos filamentosos aislados en suelo contaminado y se determinó que tienen potencial para la biorremediación debido a su eficiencia en la degradación de hidrocarburos de petróleo (Contreras & Carreño, 2018).

A nivel nacional, se han realizado estudios en la provincia del Azuay en los cuáles se utilizaron técnicas de aislamiento y análisis metagenómico encontrando géneros representativos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* los cuales variaban según el tipo de suelo, las condiciones ambientales y la cobertura vegetal (Delgado, 2017). Además, en la misma provincia se realizó el estudio de muestras de suelo de diferentes pisos altitudinales del Bosque Protector Aguarongo y se identificaron hongos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Fusarium* que fueron conservados en un cepario bajo condiciones controladas para futuros proyectos (Cabrera, 2017).

A escala local, los estudios sobre la diversidad y composición de las comunidades de hongos filamentosos son limitados en los ecosistemas de bosque seco tropical. En la región costa se han realizado estudios sobre la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a plantas de cacao que dependen de estos microorganismos para realizar procesos fisiológicos y desarrollar resiliencia al cambio global (Astudillo-Echeverría et al., 2019).

No obstante, en el Bosque Protector La Prosperina no se han realizado estudios de biodiversidad de hongos filamentosos por lo que existen limitaciones en las investigaciones futuras, políticas de conservación y estrategias de concientización ciudadana para los habitantes de la ciudad. En función a ello, surge la necesidad de determinar la biodiversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través de métodos moleculares para el desarrollo de estrategias de conservación, educación ambiental y productos comerciales. Además,

se desarrollará una guía ilustrada de hongos filamentosos a partir de las fotografías obtenidas de las especies aisladas.

A continuación, se describe la necesidad antes identificada y se realiza la justificación respectiva referente a los aspectos económico, ambiental y científico. Adicionalmente se presenta el marco teórico, la descripción de la metodología, los resultados obtenidos y las conclusiones del estudio con sus respectivas recomendaciones finales para futuros estudios.

1.1 Descripción del problema

El bosque seco de la costa ecuatoriana es un ecosistema amenazado por el impacto antropogénico debido a las actividades agrícolas y comerciales que se han desarrollado en este territorio (Aguirre & Erazo, 2017). Los estudios sobre diversidad de hongos filamentosos asociados al suelo de estos bosques son escasos, por ende, se desconoce cuáles son las especies de hongos filamentosos presente en los bosques secos, especialmente en la ciudad de Guayaquil. La falta de información impide que se establezcan políticas de conservación eficaces proteger a las especies que dependen de ellos. Por otra parte, se desaprovecha el potencial de este recurso biológico para el desarrollo de nuevas tecnologías que involucran proyectos científicos, económicos y turísticos.

1.2 Justificación del problema

El presente estudio se encuentra justificado a nivel económico, social, ambiental y científico. Es un proyecto viable porque se cuenta con los recursos necesarios y la infraestructura requerida en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Además, se encuentra alineado al Objetivo del Desarrollo Sostenible #13 denominado 'Vida de Ecosistemas Terrestres' dado que los hongos filamentosos realizan servicios ecosistémicos vitales para el desarrollo de otros seres vivos.

En primer lugar, es posible diseñar productos comerciales inspirados en las especies encontradas para su posterior comercialización. Lo antes planteado permitiría obtener fondos para el Bosque Protector La Prosperina y el

financiamiento de otras iniciativas en el Bosque Seco Tropical. Además, la propuesta de una guía ilustrada de hongos filamentosos, el desarrollo de estrategias de educación ambiental y la venta de aquellos productos comerciales tienen un impacto social porque vinculan a la comunidad con las especies identificadas.

A nivel ambiental, con el material fotográfico obtenido se podría potenciar el turismo sostenible en el Bosque Protector La Prosperina al dar a conocer aquellos microorganismos a los senderistas y a la población en general a través de las redes sociales de esta institución. Asimismo, gracias al conocimiento obtenido se podrían establecer estrategias de conservación considerando los servicios ecosistémicos que proveen los hongos filamentosos tanto al Bosque Protector Prosperina como a la ciudad de Guayaquil.

Por último, el beneficio científico estaría relacionado con el estudio de investigaciones aplicadas relacionadas con la investigación de metabolitos secundarios y el uso de los hongos filamentosos en la biotecnología. En adición, se ha demostrado el amplio uso de estos microorganismos en la economía circular y la obtención de productos sostenibles como alimentos, combustibles, textiles y materiales para la construcción, el transporte, la farmacéutica, la agricultura, entre otros (Meyer et al., 2020).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la biodiversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través de métodos moleculares para el desarrollo de estrategias de conservación, educación ambiental y productos comerciales.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar los hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través del análisis molecular de ADN asociados a las regiones ITS y LSU.

2. Conservar las cepas de los hongos filamentosos aislados a través de la criopreservación a -80°C en la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.
3. Diseñar una guía ilustrada de hongos filamentosos asociados al suelo del BPP, una propuesta de videojuego para niños y productos comerciales para promover el vínculo con la sociedad y la comunidad científica.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Bosque Protector La Prosperina

El Bosque Protector La Prosperina (BPP) se localiza en la zona oeste del Ecuador en la ciudad de Guayaquil en la provincia del Guayas. Cuenta con una extensión de 332,3 hectáreas que corresponden a la Zona Núcleo 1, la Zona Núcleo 2 y la Zona de Protección Permanente. Este territorio pertenece a un bosque deciduo de tierras bajas con un rango altitudinal de 0 a 1000 msnm.

El BPP se encuentra rodeada por 5 cuencas hidrográficas y forma parte de la cordillera Chongón Colonche (López et al., 2018). En adición, estos ecosistemas presentan un clima cálido, con temperaturas que oscilan entre $23 - 27^{\circ}\text{C}$. Estas características lo clasifican en la categoría de Bosque Seco Tropical, según el criterio de Sierra (1999). Esto significa que el BPP es un área estratégica para la conservación de la biodiversidad biológica ya que se poseen árboles nativos caducifolios dadas las dos temporadas seca y lluviosa en la región (Quinteros et al., 2010).

Entre los servicios ecosistémicos que provee el BPP se encuentran aquellos de abastecimiento, soporte, regulación y culturales (Aguirre-Padilla et al., 2018). Los servicios de abastecimiento están vinculados con aquellos alimentos, agua, maderas, fibras y plantas que podrían emplearse de forma directa. Asimismo, los servicios de soporte. Además, los de regulación se encuentran relacionados con la captura del carbono, la regulación hídrica, la formación del suelo, el mantenimiento de la biodiversidad, etc. Por último, los servicios ecosistémicos culturales se relacionan con el vínculo de la

comunidad con el bosque a través de actividades recreativas al aire libre, senderismo, entre otros.

Debido a los servicios de abastecimiento que ofrece, este bioma ha sido explotado de manera no regulada por lo que surge la necesidad de conservar los valores naturales de estos bosques. Es por ello que, en 2008 se propuso el Acuerdo Ministerial No. 144 para otorgar la administración del territorio a la Escuela Superior Politécnica del Litoral específicamente en el campus Gustavo Galindo.

En la actualidad, según el Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador (SNAP), el BPP se considera como una extensión territorial en la cual se encuentran especies vegetales naturales o cultivadas en zonas de dominio privado o público que cumplen el rol de preservar el agua, el suelo y la diversidad biológica y silvestre según la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre (Congreso Nacional del Ecuador, 2004)

1.4.2 Los hongos filamentosos

La mayor abundancia de hongos filamentosos se encuentra en las capas superficiales del suelo donde se poseen recursos disponibles, microclimas óptimos y nutrientes favorables para el crecimiento (Hu et al., 2019). No obstante, su actividad depende de las características climáticas, el tipo de uso de suelo y las comunidades de plantas (Pacasa-Quisbert et al., 2017).

Los hongos asociados al suelo desempeñan funciones importantes en los ecosistemas como reguladores de los ecosistemas porque son responsables de la formación de la estructura del suelo, la modificación de los hábitats y la regulación de los procesos en el suelo (Frąc et al., 2018). En adición, los hongos pueden tener un rol como simbiosis, saprótrofos o patógenos provocando un efecto positivo o antagónico hacia las plantas, animales o bacterias circundantes (Wang et al., 2021).

Es decir, los hongos pueden actuar como controladores biológicos porque pueden regular enfermedades, plagas y el crecimiento de microorganismos

(Qayyum et al., 2021; Zeilinger et al., 2016). Asimismo, también tienen relaciones mutualistas con las plantas porque participan en la fijación del nitrógeno, la producción de hormonas, la protección contra la sequía, entre otros (Acosta-Martínez et al., 2007).

A continuación, se describen los géneros más representativos de hongos filamentosos asociados al suelo.

1.4.2.1 *Aspergillus*

Por lo general, las especies del género *Aspergillus*, son hongos saprófitos que se destacan por desempeñar un papel esencial en la degradación de la materia orgánica del suelo y gracias a su capacidad enzimática se consideran descomponedores (Romero et al., 2021).

Adicionalmente, este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y se encuentra en cualquier ambiente (Ramírez-Camejo et al., 2012); en cuanto a su propagación, se conoce que se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Peterson, 2003).

1.4.2.2 *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo endófito extenso, se encuentran distribuidos en el suelo y en asociación con especies vegetales (Wei & Wu, 2020). La gran mayoría de las especies se consideran saprófitas y son miembros relativamente abundantes en la microbiota del suelo (Thrane, 2014). Tienen la capacidad de crecer a 37°C y de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Pires da Silva et al., 2014).

1.4.2.3 *Penicillium*

Son hongos saprófitos pertenecientes al filo Ascomycota y macroscópicamente se caracterizan por ser de crecimiento rápido (Asthana &

Kumar, 2018). Posee un metabolismo variado y adaptable que le permite asimilar la materia orgánica como fuente de nutriente y producir biomoléculas de interés como péptidos, antibióticos, antibacterianos, antifúngicos, entre otros (Rabha & Jha, 2018).

Sus colonias al principio son de color blanco, sin embargo, con el tiempo adquieren color azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados, con reverso amarillo cremoso (Mendoza & Espinoza, 2017). La textura puede ser plana, filamentosa, aterciopelada o algodonosa dependiendo de la especie; además puede presentar gotas de exudado (Mendoza & Espinoza, 2017).. Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género (Mendoza & Espinoza, 2017).

1.4.2.4 *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos de la familia Hypocreaceae, Es anaeróbico y un habitante natural del suelo y las diferentes especies se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo (Infante et al., 2009). Las especies de este género se conocen por colonizar paredes, alimentos y plantas por lo cual destacan como agentes de control biológico (Metz & Hausladen, 2022).

Adicionalmente, poseen la habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, tienen una alta capacidad reproductiva, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción del crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa (Sharma et al., 2022; Vicente et al., 2022).

1.4.2.5 Talaromyces

Este grupo taxonómico comprende los estados teleomorfos del género *Penicillium* y se caracteriza por la presencia de ascomas superficiales globosos y redes densas de hifas (Tranchida et al., 2016). Asimismo, las especies son reconocidas como saprófitas debido a su rol en la descomposición de diversos sustratos (Manoch et al., 2013). Adicionalmente, algunas especies de *Talaromyces* producen ascosporas resistentes al calor y se encuentran adaptados a una amplia variedad de hábitats (Pitt, 2014).

1.4.3 Identificación de hongos filamentosos

Para clasificar los hongos filamentosos encontrados en estudios de biodiversidad se recomienda el uso de herramientas moleculares. Actualmente no existe una herramienta única para la identificación de hongos, aunque el código de barras de ADN utilizando el espaciador transcrito interno (ITS) sigue siendo un primer diagnóstico, particularmente en estudios de metabarcoding (Bellemain et al., 2010; Lücking et al., 2020)

La región ITS del ADNr se encuentra en una amplia variedad de eucariotas y se emplea para el análisis de relaciones filogenéticas principalmente en levaduras y hongos (Coleman, 2015). Entre los genes que codifican los ARNr de la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) para formar los ribosomas, se encuentra la región de ADNr denominada ITS1 e ITS2 como indica la Figura 1.1.

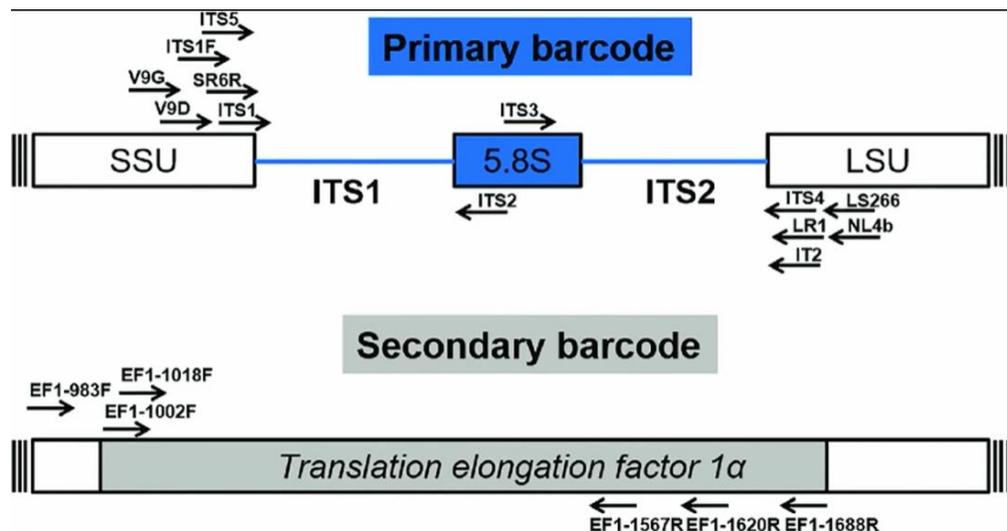


Figura 1.1 Esquema de las regiones de *barcoding* para el ADN fúngico.
Fuente: Hoang y colaboradores (2019).

Dado lo anterior, en estudios moleculares de hongos filamentosos, se escogen cebadores que tienen como objetivo la sección ITS o la LSU para la amplificación del ADN mediante la PCR; los primeros cebadores empleados fueron ITS1 e ITS4 que amplifican las secuencias variables ITS1 e ITS2 (Martin & Rygiewicz, 2005) (Figura 1.2).

Locus	Primer	Oligo nucleotidos (5'-3')	Reference
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Ward & Adams (1998)
	ITS4	TCCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. (1990)
	ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns (1993)
LSU	LROR	ACCCGCTGAACCTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	
TUB2	Blub2Fd	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	Woudenberg et al. (2009)
	Blub4Rd	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	Lesage-Meessen et al. (2011)
	Bsens	ATCACWCACTCICTIGTGGTGG	
	Brev	CATGAAGAARTGIAGACGIGGG	
ACT	ACT512f	ATGTGCAAGGCCGTTTCG	Carbone & Kohn (1999)
	ACT783r	TACGAGTCCCTTCTGGCCAT	Daniel et al. (2001), Daniel & Meyer (2003)
	CA5R	GTGAACAATGGATGGACCAGATTCTGCG	
	CA14	AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC	
RPB2	fRPB2-5f	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Liu et al. (1999), Binder & Hibbett (Clark University website)
	fRPB2-7cF	ATG GGY AAR CAA GCY ATG GG	
	fRPB2-7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	
TEF1α	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Rehner & Buckley (2005)
	EF1-1567R	ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT	

Figura 1.2 Primers para la amplificación de ADN en hongos filamentosos.
Fuente: Stielow et al. (2015).

Posteriormente, los productos de la PCR son sometidos a la secuenciación. El método de secuenciación de Sanger fue desarrollado en 1970 empleando las propiedades de la ADN polimerasa y didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia para generar un cromatograma basado en un patrón de picos

de fluorescencia mediante la electroforesis de matriz capilar (Deharvengt et al., 2020). Dependiendo de la calidad del ADN secuenciado, aquellos cromatogramas deben ser procesados para verificar su calidad de manera manual y posteriormente realizando análisis bioinformáticos para la identificación de las especies.

1.4.4 Métodos de conservación de hongos filamentosos

El tipo de uso de suelo, la compactación y la agricultura modifican la diversidad de plantas y por ende la diversidad de hongos filamentosos (Pacasa-Quisbert et al., 2017). Es por ello que surge la necesidad de conservar tanto las zonas de interés como las especies identificadas en los estudios de biodiversidad. Además, la preservación de los hongos es necesaria para realizar investigaciones a largo plazo evaluando las cepas sin que estas hayan sufrido cambios genéticos o patogénicos en el tiempo (Batz et al., 2013).

En algunos basidiomicetos la conservación de especies posee como desventaja la ausencia de esporas asexuales por lo cual se quiere que el micelio vegetativo permanezca a condiciones ambientales estables (Zaghi et al., 2020). No obstante, una de las estrategias aplicadas durante los años 1980s eran los subcultivos continuos en agar inclinado, sin embargo a través de estas se pierde la patogenicidad y las propiedades genéticas o fisiológicas de las cepas (Batz et al., 2013). Además, este método da paso a la contaminación de los medios por otros microorganismos o ácaros (Smith & Onions, 1994).

En consecuencia, surge la crioconservación como uno de los métodos más confiables para el almacenamiento de los hongos filamentosos por largos periodos de tiempo (Crahay et al., 2013). Para ello, se requiere del uso de agentes crioprotectores que controlen el estrés osmótico, los cristales de hielo, la nucleación y la muerte celular en los tejidos de interés a pesar de las tasas de enfriamiento y descongelación (Jungare et al., 2021). Asimismo, la temperatura empleada para el almacenamiento es de -80 °C para mantener las propiedades de los aislados originales (Batz et al., 2013).

En Ecuador, una de las iniciativas para la conservación de microorganismos con potencial para la biotecnología farmacéutica, agrícola y alimentaria es la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador a través de la conservación en agua, la conservación en aceite mineral, la crioconservación y la liofilización para hongos, levaduras y bacterias (Maridueña-Zavala et al., 2021).

1.4.5 Los hongos filamentosos y el desarrollo sostenible

Se ha demostrado que los hongos filamentosos poseen más genes en su genoma por lo que producen diversos metabolitos secundarios (Soanes et al., 2008). Es decir, los hongos filamentosos pueden secretar una amplia variedad de enzimas que les permiten degradar sustratos como celulosa, lignina o almidones.

Asimismo, estos organismos también pueden producir vitaminas, fibras, pigmentos y proteínas de interés ya que pueden ser aplicados en la industria de alimentos, combustibles, transportes, farmacéutica, textiles, entre otros (Wikandari et al., 2022). En el caso de la industria de los combustibles, los hongos pueden ser empleados para la producción de bioetanol y biodiesel de manera sostenible (Zhao et al., 2011).

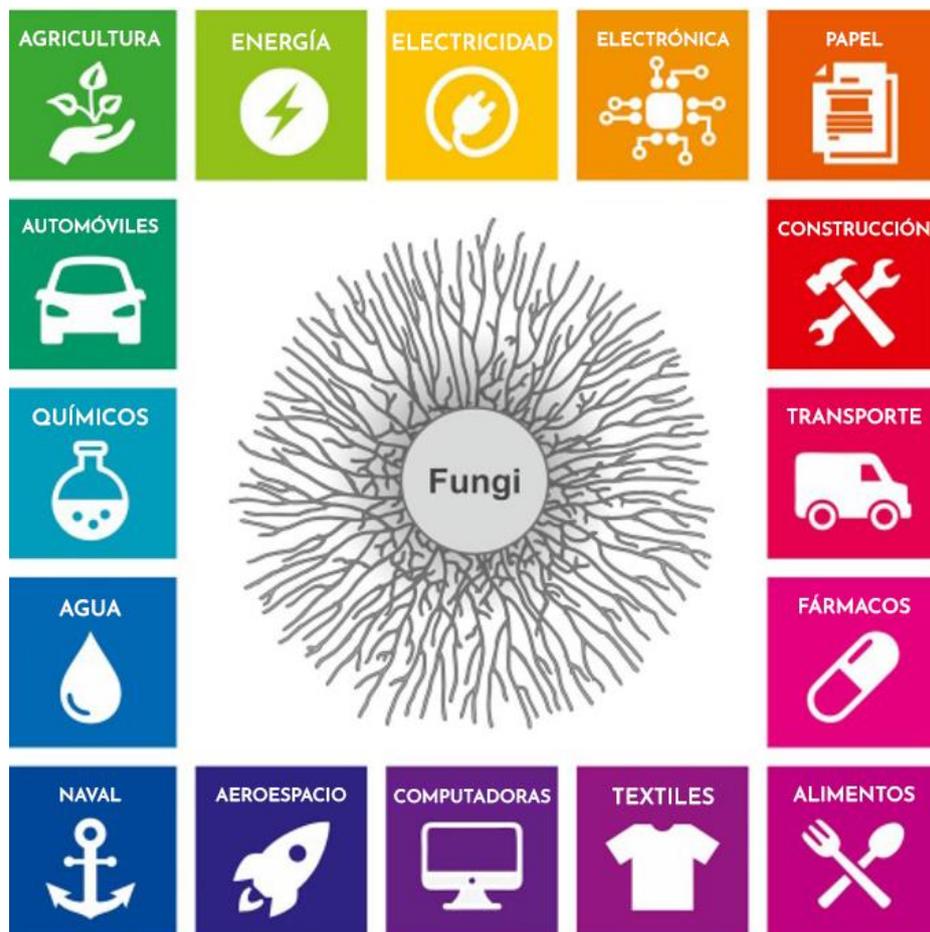


Figura 1.3 Industrias que se benefician de los hongos filamentosos.

Fuente: Meyer y colaboradores (2020).

Existen hongos que son fuente de alimento gracias a sus texturas y su rol como modificadores de sabor en los alimentos o capacidad para la producción de micoproteínas (Meyer et al., 2020). De igual manera, estos organismos también pueden ser empleados como biomateriales a través de su micelio mejorando la homogeneidad, la resistencia y la rigidez del material simulando corchos o maderas sintéticas (Appels et al., 2019).

Algunas especies del género *Trichoderma* pueden ser empleadas para la producción de biopesticidas o biofertilizantes debido a la variedad de metabolitos secundarios que producen con propiedades bioactivas (Vicente et al., 2022). Respecto al género *Penicillium*, este ha sido empleado como promotor de crecimiento vegetal en la agricultura sostenible gracias a sus

beneficios para solubilizar fosfato, producir sideróforos y regular el crecimiento vegetal (Altaf et al., 2018).

Asimismo, hongos de los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phoma* y *Rhizopus* han tolerado concentraciones de aceites dieléctricos usados y bifenilos policlorados en suelos contaminados por lo que podrían ser empleados para la biorremediación de estos xenobióticos (García et al., 2017). Adicionalmente, el hongo *Talaromyces flavus* tiene potencial en la biorremediación debido a su tolerancia a bifenilos policlorados (García et al., 2017).

Algunas especies de *Absidia* pueden ser empleadas para la biorremediación de xenobióticos que poseen lignina, compuestos cloroaromáticos e hidrocarburos aromáticos en su composición (Guiraud et al., 2003). Asimismo, estos hongos poseen una superficie biológica extensa y alta reactividad por lo que realizan la biotransformación de contaminantes no disponibles para otros organismos como lo son los metales pesados (Albert et al., 2018).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

Como indica la Figura 2.1, se establecieron tres estaciones en la superficie del Bosque Protector La Prosperina: E1) Albarrada Cuevas; E2) Albarrada Cuevas y E3) FCV.



Figura 2.1 Estaciones de muestreo en el Bosque Protector La Prosperina.

Fuente: Autoría propia

2.1.1 Estación 1: Albarrada Cuevas

Se encuentra ubicada a 127 msnm en el núcleo 1 del BPP, específicamente en las coordenadas $2^{\circ}9'23''S$ y $79^{\circ}57'47''W$. Es una albarrada estacionaria que permanece seca durante los meses de junio a noviembre mientras que entre diciembre y mayo se mantiene con agua debido al aumento de precipitaciones.

Según las observaciones realizadas, posee una alta densidad de especies vegetales herbáceas ubicadas en el centro de la estación y se visualizaron

lagartijas. Alrededor se ubican especies arbóreas caducifolias que desarrollan hojas al empezar la temporada lluviosa (Figura 2.2).



Figura 2.2 Estación 1: Albarrada Cuevas (noviembre, 2021).

Fuente: Autoría propia

2.1.2 Estación 2: Albarrada Cañas

Se ubica en el núcleo 1 del BPP a una altitud de 211msnm y sus coordenadas son 2°9'26"S y 79°57'56"W. Es una albarrada no estacionaria por lo que permanece con agua durante todo el año, aunque los niveles de agua decrecen durante los meses de junio a noviembre.

En sus alrededores, se encuentra una alta densidad de plantas pteridofitas y gramíneas que permanecen con hojas durante todo su ciclo de vida. (Figura 2.3). En consecuencia, existe cobertura de hojarasca en la zona. Adicionalmente, se registró la presencia de anfibios (*Epipedobates machalilla*) y mamíferos como el oso hormiguero *Tamandua tetradactyla*.



Figura 2.3 Estación 2: Albarrada Cañas (noviembre, 2021).
Fuente: Autoría propia

2.1.3 Estación 3: FCV

Se ubica en la zona de protección permanente del BPP, cerca de la Facultad de Ciencias de la Vida (FCV) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Se encuentra a una altitud de 80 msnm específicamente en las coordenadas 2°9'10"S y 79°56'23"W.

El suelo es más compacto que en las otras estaciones y en sus alrededores se encuentra una alta densidad de especies arbóreas y se registra la presencia de diversos grupos de aves y murciélagos (Figura 2.4).



Figura 2.4 Estación 3: FCV (noviembre, 2021).

Fuente: Autoría propia

2.2 Recolección de muestras

Las muestras de suelo fueron recolectadas en el mes de noviembre durante la época de verano. Se utilizó un extractor de núcleos para suelos y las muestras se tomaron a una profundidad de 0 a 25 cm según el criterio del uso de suelo por Mendoza & Espinoza (2017).

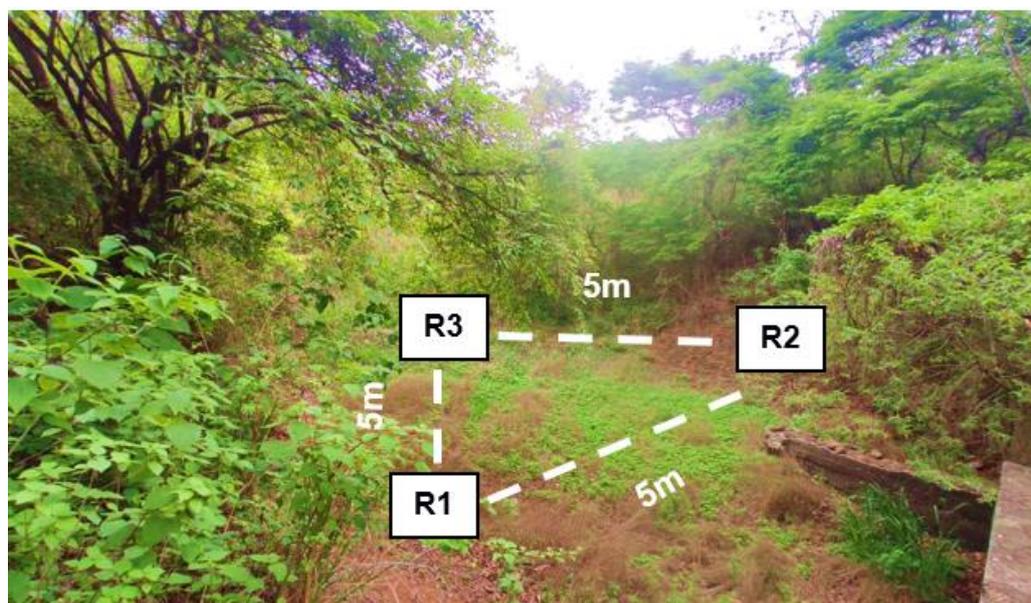


Figura 2.5 Réplicas (R1, R2, R3) para cada estación.

Fuente: Autoría propia

En cada estación (E1; E2; E3) se recolectaron 3 réplicas (R1; R2; R3) con equidistancia de 5 metros, para así una muestra representativa en cada zona (Figura 2.5). Se pesaron 100 g de suelo por réplica y se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético, previamente esterilizadas con radiación UV (Figura 2.6)

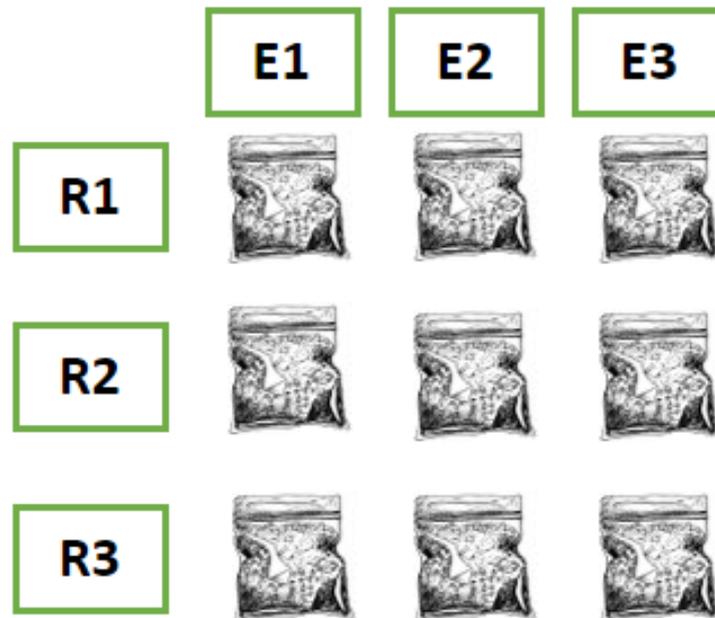


Figura 2.6 Recolección de muestras de suelo por triplicado.

Fuente: Autoría propia

Para cada extracción de suelo se emplearon guantes descartables y se desinfectaron los materiales utilizados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%, con la finalidad de evitar la contaminación cruzada. Terminada la recolección, las muestras fueron trasladadas en una nevera portátil el mismo día para su procesamiento en el laboratorio de Fitopatología del CIBE.

2.3 Aislamiento de hongos filamentosos

2.3.1 Diluciones seriadas

Se homogeneizaron las réplicas recolectadas y para cada una de ellas se pesaron 10 g de suelo. Posteriormente se colocaron en un vaso de precipitación con 90 ml de agua peptonada estéril (10^{-1}) y se agitó la

suspensión hasta visualizar una mezcla homogénea que se dejó reposar durante 5 minutos para que los sólidos decantaran.

A continuación, se recolectó una alícuota de 1 ml de esta solución y se dispensó en un tubo Falcón con 9 ml de agua peptonada para preparar la dilución 10^{-2} . Se utilizó un agitador tipo vortex durante 2 minutos por cada uno de los tubos. De manera sucesiva se realizaron las diluciones seriadas hasta obtener la correspondiente a 10^{-4} (Figura 2.7).

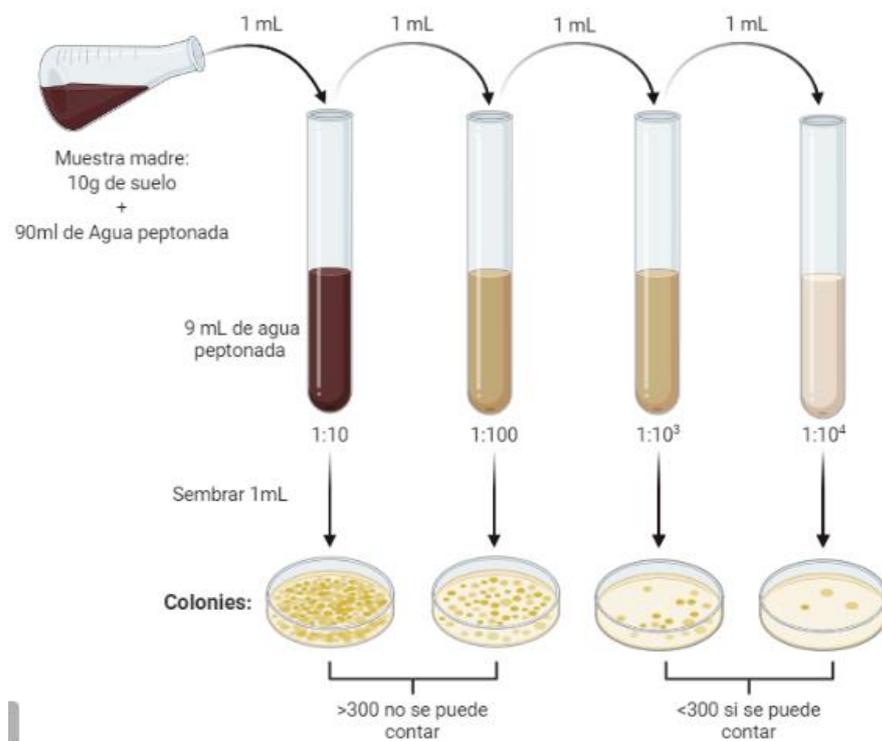


Figura 2.7 Técnica de dilución seriada para el cultivo de los hongos filamentosos.

Fuente: Autoría propia

2.3.2 Siembra por agotamiento

Se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa (PDA), preparado con cloranfenicol (400 ppm) para evitar el crecimiento bacteriano (Figura 2.8). Para la siembra por agotamiento se emplearon alícuotas de 1 ml por cada dilución y con ayuda de un asa de Drigalsky se extendió el inóculo por la superficie de acuerdo al protocolo de Gaddeyya y colaboradores (2012). El ensayo se realizó por duplicado, dando un total de 72 placas Petri que fueron incubadas a 25 °C por

un total de 7 días y que fueron revisadas cada 24 horas para la inspección del crecimiento de colonias.

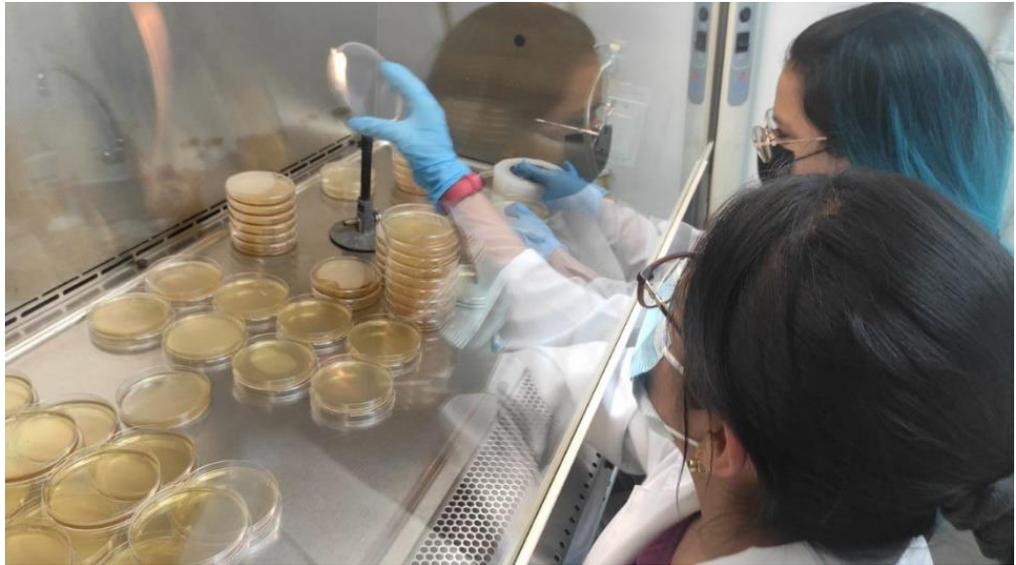


Figura 2.8 Preparación de placas Petri con PDA para el aislamiento.

Fuente: Autoría propia

2.3.3 Aislamiento de colonias viables

Durante las revisiones diarias, se identificó el crecimiento de las colonias con la ayuda de un estereoscopio para garantizar que estas se encuentren distanciadas para los futuros análisis (Figura 2.9). Se aisló las colonias conforme a su aparición principalmente en las placas Petri de las diluciones 10^{-2} - 10^{-4} . Para ello, se utilizó un bisturí previamente esterilizado con alcohol para cotar cubos de agar con las hifas más jóvenes del micelio y reinsertarlo en placas Petri con PDA y cloranfenicol (400ppm).

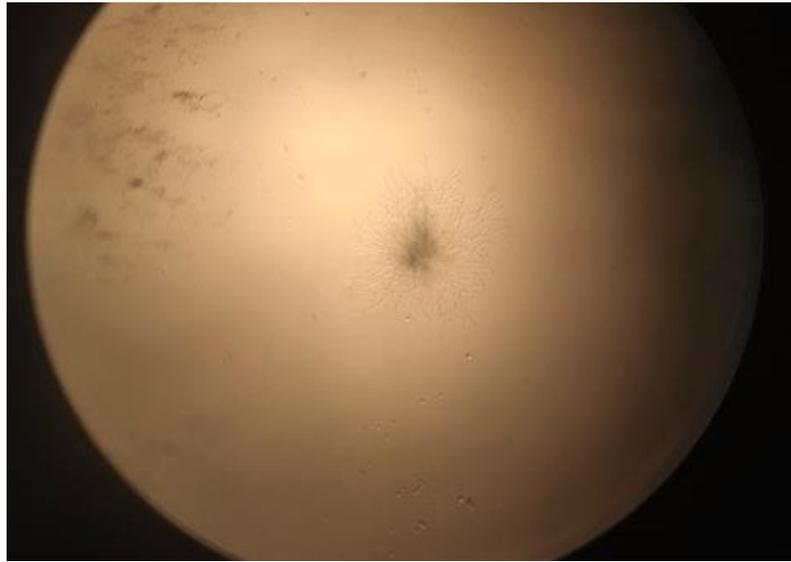


Figura 2.9 Vista de las hifas a través de un estereoscopio.

Fuente: Autoría propia

Asimismo, las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días en ausencia de luz y fueron inspeccionadas diariamente para revisar el crecimiento de los hongos y su viabilidad para la futura purificación.

2.4 Purificación de hongos filamentosos

Para garantizar la homogeneidad genética de las cepas para su identificación molecular, estas se purificaron a través de la técnica de cultivo monospórico. Para esto se realizó un lavado del micelio aéreo con 2 ml de agua estéril que debían cubrir la superficie del micelio.

Se recolectó una alícuota de 10 µl de esta solución y se dispersó en una placa Petri con medio PDA y cloranfenicol (400ppm). Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días en la oscuridad y se inspeccionaron cada 24 horas de manera continua para observar el crecimiento de las colonias. Este ensayo se realizó por duplicado con la finalidad de tener una placa para el registro fotográfico y otra para la identificación molecular.

2.5 Registro fotográfico para la guía ilustrada

Una de las estrategias planteadas para la educación ambiental es la elaboración de una guía ilustrada de hongos filamentosos asociados al suelo

del BPP. Para ello, se tomaron fotografías macroscópicas de los cultivos purificados de cada estación (E1; E2; E3) con 7 días de crecimiento en PDA.

Las placas fueron colocadas en una celda fotográfica con fondo de color negro y luces led para que resalten las características morfológicas (Figura 2.10). Con estas fotografías se realizó adicionalmente el diseño de los productos comerciales y otras estrategias de educación ambiental.



Figura 2.10 egistro fotográfico de hongos filamentosos.

Fuente: Autoría propia

2.6 Métodos moleculares previos a la identificación

2.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción se emplearon los cultivos monospóricos con 7 días de crecimiento en medio de cultivo PDA. Para cada cepa, se agregaron 30 μ l de NaOH 0,5 M a un tubo Eppendorf con capacidad de 0,2 ml. Se extrajo una cantidad de micelio del hongo al tubo y se lo trituró con el buffer de extracción dejando reposar esta solución durante 10 minutos.

A continuación, a cada tubo se agregaron 150 μ l de una solución Tris HCL 100 mM + EDTA 0.5 M, con un pH de 8. Posteriormente, todos los recipientes fueron llevados los tubos al termociclador a 95 °C durante 10 minutos.

Finalmente, se centrifugaron durante 5 min a 15 000 rpm (van Burik et al., 1998).

2.6.2 Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Primero, se limpiaron superficies ópticas superiores e inferiores del sistema. Se abrió el software NanoDrop, se seleccionó la aplicación de ácidos nucleicos y se realizó la medición del blanco. Posterior, se cargó 1µl de ADN. Se cerró el brazo de palanca, asegurando que el pedestal superior entrara en contacto con el ADN cargado. A continuación, se levantó el brazo de palanca y se limpiaron las superficies ópticas con un paño de laboratorio limpio, seco y sin pelusa. Se repitió el proceso con cada una de las muestras.

2.6.3 Amplificación por PCR

Se amplificaron las regiones ITS y LSU para la identificación de los hongos filamentosos. Para ITS se utilizaron los cebadores: ITS1-F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), mientras que para LSU se emplearon: LROR (5'ACCCGCTGAACTTAAGC3') y LR5 (5'TCCTGAGGGAACTTCG3') (Martin & Rygielwicz, 2005),

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 32 µl compuesto por: 12,72 µl de H₂O, 16µl de 1X Taq polimerasa, 0,64 µl de cada cebador 0,2 µM y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 63 °C y 2 min a 72°C, en base al protocolo de Stielow y colaboradores (2015).

2.6.4 Electroforesis en gel

Los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% que se tiñó con SYBR- Safe DNA gel stain. Para correr el gel se cargaron 2 µl del producto de PCR y 5 µl del ladder, esto en un amortiguador TAE 1X omitiendo la carga en los pocillos de los extremos para evitar sesgos. El tamaño de los fragmentos fue verificado por comparación

con el marcador de peso molecular con 1000 pares de bases. Las condiciones en las que se corrió el gel fueron a 150 V durante 40 minutos. Posteriormente el gel se observó con la ayuda de un transiluminador (trans-UV y epi-white) con Image Lab™ Software, BIO-RAD.

2.6.5 Secuenciación Sanger

Al confirmar la presencia y tamaño de los amplicones obtenidos para las regiones ITS y LSU, se realizó nuevamente la cuantificación de ADN para obtener una concentración final de 100 ng/μl (Stielow et al., 2015). De esta concentración final, se colocaron 20 μl en una placa que fue enviada a la empresa Macrogen con sede en Corea del Sur para la secuenciación de las muestras a través del método de Sanger (Nilsson et al., 2019), concretamente el modelo “3730XL” desarrollado por “Applied Biosystems”.

Del proceso de secuenciación se recibieron 3 tipos de archivos para analizar.

- Archivo de electroferograma de ADN (.ab1), contiene un electroferograma y la secuencia de bases de ADN, incluidos los datos sin procesar. Para visualizar este tipo de archivo se utilizó el software Geneious.
- Archivo de secuencias con extensión (.fasta, .txt), contiene las secuencias de la región ITS y LSU correspondientes a cada una de las muestras.
- Archivo de calidad (.qual, .phd.1), en donde se visualizan las puntuaciones de calidad de cada base de cada una de las secuencias.

2.7 Identificación de especies

Para la limpieza de las secuencias se eliminaron los nucleótidos de baja calidad de los extremos aplicando el software Geneious (Kearse et al., 2012). Adicionalmente, se descartó aquellos archivos con menos de 400 pb.

Se realizó la comparación de las secuencias de ADN procesadas con la base de datos de GenBank, mediante Blastn y Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Empleando Geneious, para cada secuencia se obtuvieron los primeros 10 *hits* considerando que exista un porcentaje de identidad mayor al

98% de acuerdo a lo estipulado por Kõljalg y colaboradores (2013) para el análisis de unidades taxonómicas operativas empleando las regiones ITS y LSU.

Posteriormente, se realizó la selección considerando el porcentaje de identidad, el número de *gaps*, el e-value, la longitud de la secuencia, entre otros. A continuación, se realizó la comparación de las especies obtenidas con las fotografías tomadas previamente y con artículos científicos en los que se obtuvieran muestras de suelo y se empleara el medio de cultivo PDA para la comparación cualitativa.

Luego, se obtuvo un listado de las especies identificadas con su respectivo código de acceso a la base de datos de GenBank y estos fueron utilizados para los siguientes análisis bioinformáticos.

2.8 Análisis filogenéticos

Teniendo los archivos en formato multi-FASTA para las secuencias ITS y LSU, se realizaron los árboles filogenéticos utilizando el software Mega X (Kumar et al., 2018). Se empleó el método Maximun Likelihood y se diseñaron arboles circulares para identificar la relación evolutiva entre las especies asociadas al suelo del BPP.

2.9 Criopreservación

Se siguió el protocolo estipulado por Maridueña-Zavala y colaboradores (2021) para la conservación en la Colección de Cultivos Microbianos del CIBE. Se emplearon 5 tubos de 2 ml con agua y 5 con aceite mineral previamente rotulados para cada cepa. Cuando el hongo hubiera crecido lo suficiente para abarcar hasta el 80% de la superficie en la placa Petri, se realizaron cubos simétricos con bisturís esterilizados para colocar aproximadamente 7 en cada recipiente. Posteriormente, los tubos de agua fueron colocados a 20 °C mientras que los de aceite se almacenaron a 80 °C.

2.10 Consideraciones éticas y legales

Para la recolección de muestras se contó con el permiso de la dirección del BPP. Además, al ingresar al CIBE se firmó un compromiso de confidencialidad respecto a las investigaciones que se realizaban en los laboratorios de manera simultánea.

CAPÍTULO 3

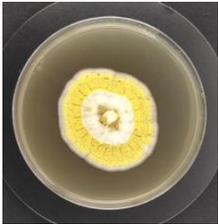
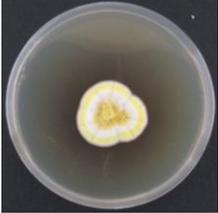
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

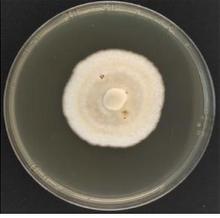
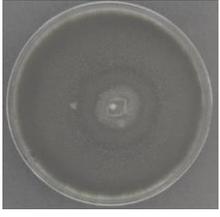
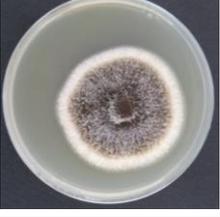
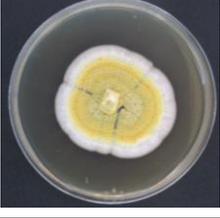
3.1 Especies identificadas

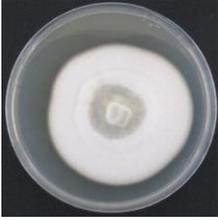
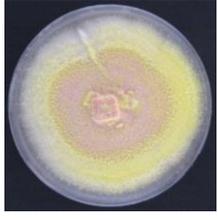
Para la identificación de especies, las secuencias obtenidas por el método de sanger fueron comparadas con secuencias del GenBank a través de la herramienta BLASTn, se identificaron los principales hits para los amplicones de ITS y LSU (Apéndice A y Apéndice B). De estas, se seleccionó aquel resultado con mayor porcentaje de identidad y relación morfológica con las fotografías previamente realizadas y referencias bibliográficas. En total se fotografiaron 86 cepas que fueron analizadas y dieron como resultado un total de 38 especies únicas de hongos filamentosos asociados al suelo del BPP.

En la estación Cuevas se encontraron los siguientes *hits* con sus respectivos porcentajes de identidad y códigos de acceso para cada cepa (Tabla 3.1). En total, se obtuvo un total de 20 cepas y 16 especies únicas. En dónde predomina el género *Aspergillus*, seguido de *Penicillium*.

Tabla 3.1 Especies identificadas en la Estación Cuevas (E1).

Fotografía	Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Organismo
	PITS_A01	99.1%	MH472977	<i>Aspergillus flavipes</i>
	PLSU_B01	100.0%	OL772705.1	<i>Aspergillus neoflavipes</i>

	PLSU_D01	99.82%	HQ646592.1	<i>Penicillium guttulorum</i>
	PITS_E01	99.8%	MK690419	<i>Curvularia lunata</i>
	PLSU_F01	100.0%	NG_070046.1	<i>Aspergillus keveii</i>
	PLSU_H01	100.0%	NG_069830.1	<i>Trichoderma spirale</i>
	PLSU_A02	98.95%	MH870507.1	<i>Gongronella butleri</i>
	PITS_B02	99.8%	MW757343	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
	PLSU_C02	100.0%	OL772705.1	<i>Aspergillus neoflavipes</i>

	PLSU_E02	99.8%	NG 069001.1	<i>Penicillium limosum</i>
	PLSU_F02	100.0%	OL897074	<i>Talaromyces liani</i>
	PLSU_G02	99.64%	NG 070044.1	<i>Cladosporium crousii</i>
	PLSU_H02	99.82%	OL711683.1	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>
	PLSU_A03	99.4%	MW671548	<i>Absidia sp.</i>
	PLSU_B03	99.63%	NG 069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>
	PLSU_D03	99.42%	NG 069001.1	<i>Penicillium limosum</i>

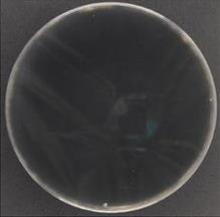
	PITS_E03	100.0%	MT074667	<i>Talaromyces flavus</i>
	PLSU_F03	99.8%	NG_069001.1	<i>Penicillium limosum</i>
	PLSU_G03	99.8%	NG_069001.1	<i>Penicillium limosum</i>
	PITS_C04	99.19%	LT993581.1	<i>Humicola fuscogrisea</i>

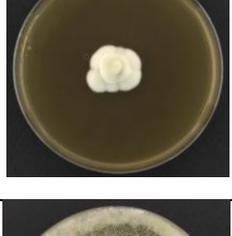
Fuente: Autoría propia

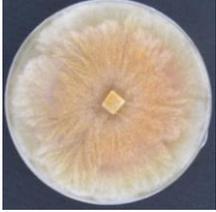
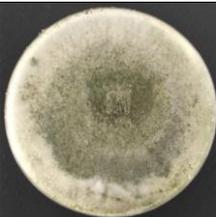
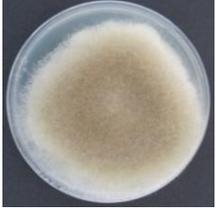
Para la estación Cañas se identificaron 26 cepas de las cuales 16 tuvieron una identificación única, donde predomina el género *Trichoderma*, seguido de *Penicillium* como indica la Tabla 3.2.

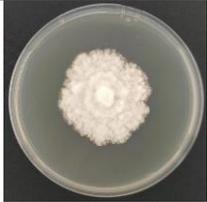
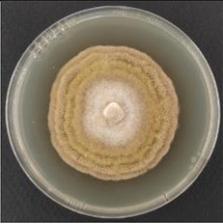
Tabla 3.2 Especies identificadas en la Estación Cañas (E2).

Fotografía	Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Organismo
	PLSU_E04	100.0%	NG_056277.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>

	PLSU_F04	99.8%	NG_056277.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
	PLSU_G04	100.0%	MN818596	<i>Curvularia trifolii</i>
	PLSU_H04	100.0%	OL897074	<i>Talaromyces liani</i>
	PLSU_A05	100.0%	OL772705.1	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
	PITS_B05	99.8%	MW763075	<i>Absidia sp.</i>
	PLSU_C05	100.0%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>
	PLSU_D05	99.8%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>

	PLSU_E05	100.0%	MN017874	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
	PLSU_G05	100.0%	NG_070052	<i>Aspergillus assiutensis</i>
	PITS_A06	100.0%	MH874891	<i>Trichoderma pleuroti</i>
	PLSU_B06	99.64%	NG_063999.1	<i>Penicillium vinaceum</i>
	PLSU_C06	100.0%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>
	PLSU_D06	99.1%	NG_069831.1	<i>Trichoderma tomentosum</i>
	PLSU_B03	99.63%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>

	PLSU_E06	99.6%	NG_069830	<i>Trichoderma spirale</i>
	PLSU_F06	99,29%	NG_064073.1	<i>Penicillium sizovae</i>
	PITS_G06	99.1%	MK784067	<i>Trichoderma harzianum</i>
	PLSU_H06	99.6%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>
	PLSU_A07	100.0%	MG189915.1	<i>Fusarium falciforme</i>
	PLSU_D07	99.4%	MW671548.1	<i>Absidia sp.</i>
	PLSU_E07	100.0%	NG_069973.1	<i>Trichoderma amazonicum</i>

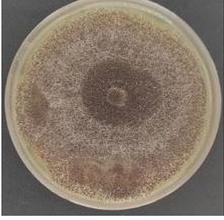
	PLSU_F07	99.6%	MH874053.1	<i>Clonostachys rossmaniae</i>
	PLSU_G07	99.29%	NG_064073.1	<i>Penicillium sizovae</i>
	PLSU_H07	100.0%	NG_069229.1	<i>Mariannaea humicola</i>
	PLSU_A08	100.0%	NG_070052.1	<i>Aspergillus assiutensis</i>

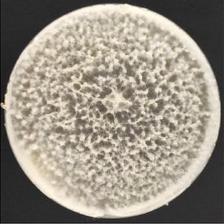
Fuente: Autoría propia

Por último, la estación FCV presentó un total de 18 cepas identificadas en total y 14 especies únicas. En donde predominan los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Especies identificadas en la estación FCV (E3).

Fotografía	Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Organismo
	PLSU_C08	100.0%	MH483572	<i>Penicillium rubidurum</i>

	PLSU_D08	99.6%	MW791866	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	PLSU_E08	99.8%	OL711761	<i>Aspergillus keveii</i>
	PLSU_F08	99.8%	LC573561	<i>Aspergillus aculeatus</i>
	PLSU_G08	99.7%	MG569562	<i>Cunninghamella echinulata</i>
	PLSU_H08	99.6%	MT560198	<i>Purpureocillium sp.</i>
	PITS_B09	100.0%	NR_164424.1	<i>Fusarium falciforme</i>
	PITS_C09	99.79%	MH856410.1	<i>Penicillium vinaceum</i>

	PLSU_D09	99.5%	MH876804	<i>Penicillium shearii</i>
	PLSU_E09	100.0%	MT533257	<i>Fusarium solani</i>
	PLSU_H09	99.4%	MH877919	<i>Trichoderma erinaceum</i>
	PLSU_A10	100.0%	MT582790	<i>Penicillium steckii</i>
	PITS_B10	98.58%	KU324795.1	<i>Fusarium solani</i>
	PLSU_C10	100.0%	MN396388	<i>Aspergillus aculeatus</i>
	PITS_D10	99.6%	MH856410	<i>Penicillium vinaceum</i>

	PLSU_E10	99.8%	NG_063999	<i>Penicillium vinaceum</i>
	PLSU_H10	100.0%	MK353174	<i>Penicillium citrinum</i>
	PITS_A11	98.38%	MN044891.1	<i>Absidia caatinguensis</i>

Fuente: Autoría propia

Como se muestra en la Figura 3.1, se realizó el análisis de los géneros únicos identificados con su respectiva frecuencia por estación. Las principales especies fueron *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* en el BPP.

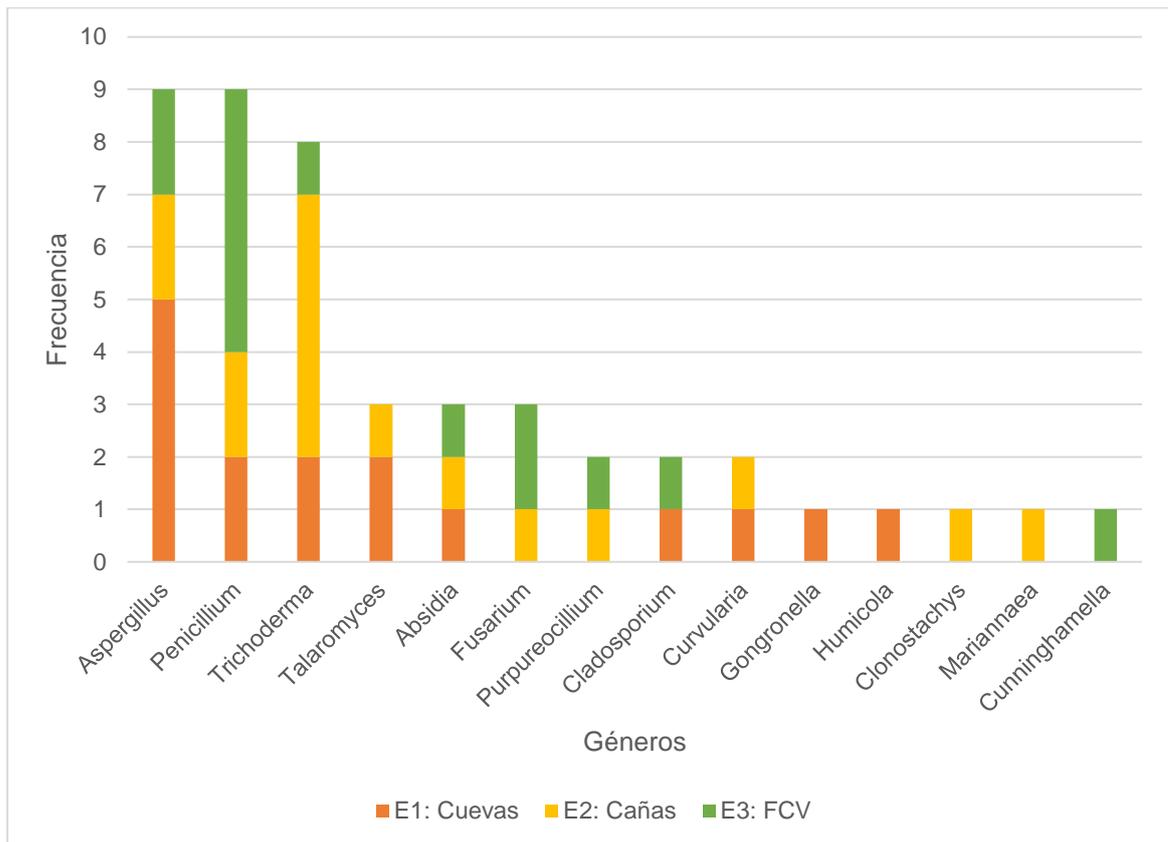


Figura 3.1 Géneros asociados al suelo del BPP por estación.

Fuente: Autoría propia

Para la Estación Cuevas se encontró una mayor abundancia de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Talaromyces* mientras que otros géneros con menor frecuencia fueron *Absidia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Gongronella* y *Humicola*.

Por otra parte, en la Estación Cañas además de *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* se presentaron especies de *Talaromyces*, *Absidia*, *Fusarium*, *Purpureocillium*, *Curvularia*, *Clonostachys* y *Mariannaea* con menor frecuencia.

Por último, la Estación FCV estuvo dominada por *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, y en menor proporción se encontraron especies de *Trichoderma*, *Absidia*, *Purpureocillium*, *Cladosporium* y *Cunninghamella*.

Las tres estaciones poseen géneros diferentes posiblemente debido a las características del suelo y otros factores ambientales como la presencia de agua de acuerdo a lo estipulado por Buée y colaboradores (2009). Cabe que cada estación tuvo sus géneros dominantes lo cual podría estar relacionado con factores bióticos

como las plantas, animales o microorganismos que cohabitan en el mismo ecosistema; y factores abióticos como la precipitación, la humedad, la temperatura, el tipo de suelo, entre otros.

3.2 Análisis filogenético

Con la ayuda del programa MEGA y de un análisis Maximun Likelihood, se obtuvo el árbol filogenético de las secuencias analizadas. A partir de las especies únicas identificadas, se realizó el estudio de la relación filogenética según el gen ITS y se obtuvo la Figura 3.2. En el apéndice C se puede observar el árbol filogenético de forma rectangular.

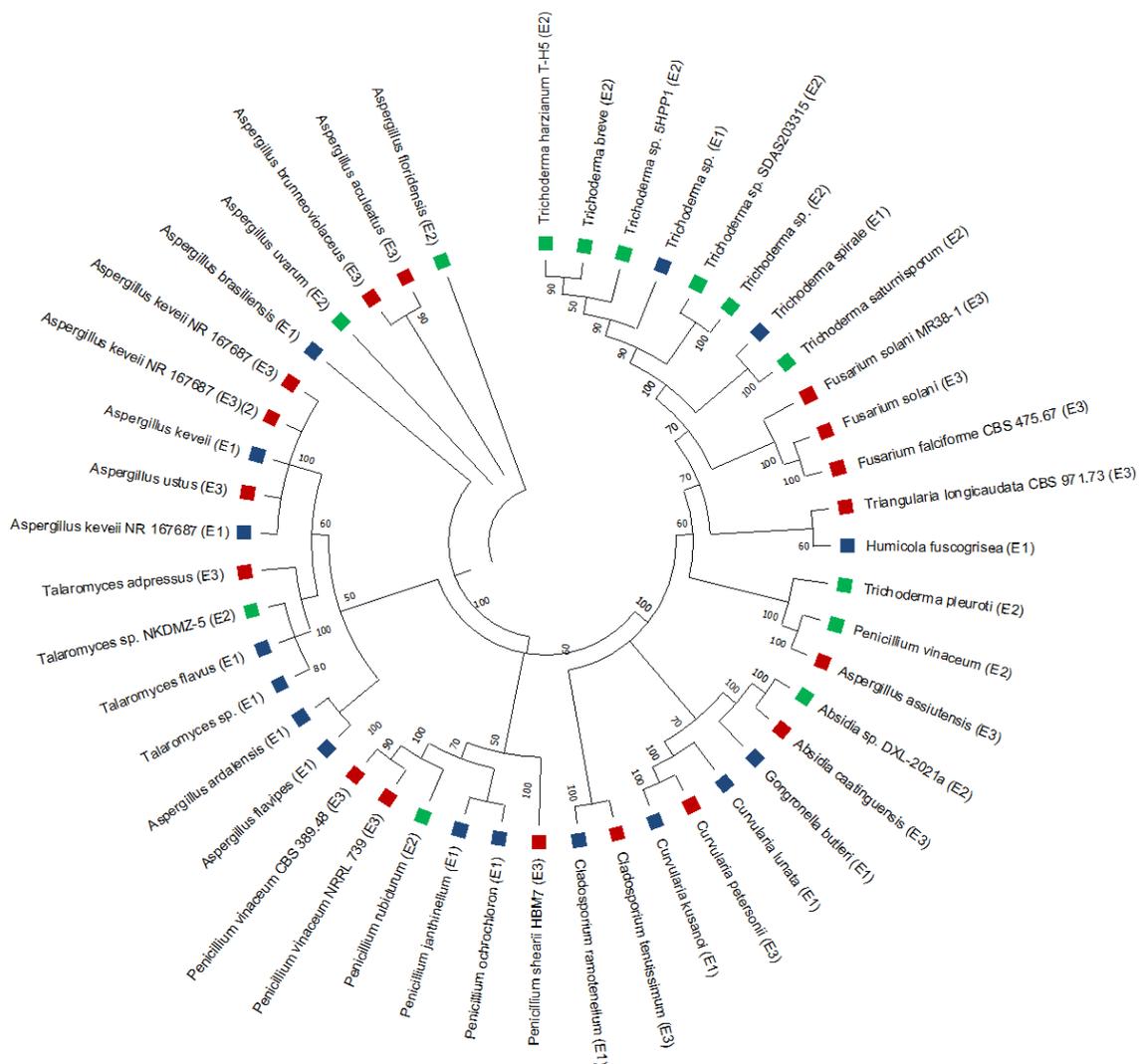


Figura 3.2 Árbol filogenético a partir del gen ITS.

Fuente: Autoría propia

Figura 3.3 Árbol filogenético a partir del gen LSU.

Fuente: Autoría propia

Como se puede observar, los géneros con mayor relación evolutiva fueron *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Por otro lado, *Humicola*, *Absidia* y *Cladosporium* se presentaron como taxones aislados.

3.3 Criopreservación

A continuación, se muestran las 37 cepas conservadas con su respectivo código de registro, código de criopreservación en la CCM-CIBE y nombre de la especie de acuerdo a los análisis bioinformáticos previamente realizados (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Códigos para la criopreservación en la CCM-CIBE.

Código de registro	Código de criopreservación	Especie
PLSU_B01	CCM763	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
PLSU_D01	CCM768	<i>Penicillium guttulosum</i>
PITS_E01	CCM724	<i>Curvularia lunata</i>
PLSU_F01	CCM767	<i>Aspergillus keveii</i>
PITS_H01	CCM736	<i>Trichoderma spirale</i>
PLSU_A02	CCM746	<i>Gongronella butleri</i>
PLSU_C02	CCM765	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
PITS_E02	CCM731	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_F02	CCM747	<i>Talaromyces liani</i>
PLSU_A03	CCM725	<i>Absidia sp.</i>
PLSU_B03	CCM727	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_D03	CCM762	<i>Penicillium limosum</i>
PITS_E03	CCM759	<i>Talaromyces flavus</i>
PITS_G03	CCM760	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_E04	CCM748	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
PLSU_G04	CCM745	<i>Curvularia trifolii</i>
PLSU_H04	CCM721	<i>Talaromyces liani</i>
PLSU_C05	CCM734	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_E05	CCM740	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
PLSU_A06	CCM741	<i>Trichoderma pleuroti</i>
PLSU_C06	CCM722	<i>Trichoderma amazonicum</i>

PITS_E06	CCM730	<i>Trichoderma spirale</i>
PLSU_H06	CCM733	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_A07	CCM735	<i>Fusarium falciforme</i>
PLSU_F07	CCM756	<i>Clonostachys rossmanniae</i>
PLSU_H07	CCM753	<i>Mariannaea humicola</i>
PITS_D08	CCM738	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
PLSU_E08	CCM757	<i>Aspergillus keveii</i>
PITS_B09	CCM729	<i>Fusarium falciforme</i>
PITS_C09	CCM743	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_E09	CCM739	<i>Fusarium solani</i>
PLSU_H09	CCM728	<i>Trichoderma erinaceum</i>
PLSU_D10	CCM764	<i>Penicillium vinaceum</i>
PLSU_C11	CCM758	<i>Aspergillus germanicus</i>
PLSU_E11	CCM750	<i>Penicillium vinaceum</i>

Fuente: Autoría propia

3.4 Propuestas de educación ambiental

3.4.1 Guía ilustrada de hongos filamentosos del BPP.

Se han realizado guías sobre hongos macroscópicos en países como Argentina (Romano et al., 2020), México (Barajas, 2015; Gómez & Gómez, 2017), Honduras (Morán & Sarmiento, 2005), Chile (Furci, 2018), Europa y África (Cortecuisse, 2005), las guías sobre hongos filamentosos son escasas y se fundamentan en las especies de importancia clínica (St. Germain & Summerbell, 2015).

Asimismo, en el BPP han surgido iniciativas para la conservación y la educación ambiental. Por ejemplo, se ha implementado la guía de identificación de aves realizada por Quintero-Trelles y colaboradores (2017); además de que se encuentra en desarrollo el Catálogo de Mariposas y Polillas del BPP en el que colaboraron Dueñas y Palomeque (2021). No obstante, en el país no se han realizado textos educativos dedicados a los hongos filamentosos.

En consecuencia, surge la necesidad de utilizar las fotografías obtenidas para realizar una guía ilustrada de hongos filamentosos del BPP (Figura 3.4).

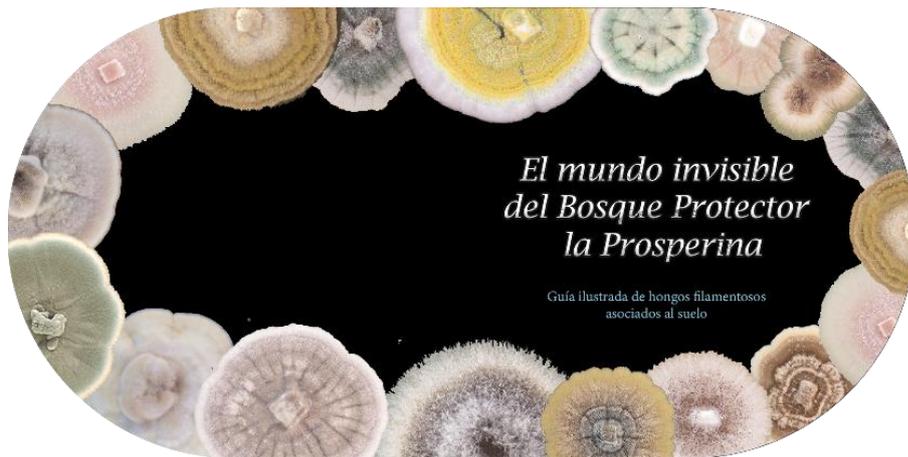


Figura 3.4 Guía ilustrada de hongos filamentosos del BPP.

Fuente: Autoría propia

La guía contendrá información general sobre los hongos filamentosos y su importancia en el desarrollo sostenible. De igual manera, cada especie tendrá su fotografía, clasificación taxonómica y detalles generales de la especie acerca de su morfología, rol en el ecosistema e importancia para la industria en caso de poseerla. A través de esta iniciativa se vinculará a la población con los hongos filamentosos ya que será de acceso gratuito y libre distribución.

3.4.2 Videojuego para niños: “Descubriendo el mundo invisible”

Campo y Dangles (2020) establecen que los videojuegos pueden involucrar a los jóvenes con temas relacionados al desarrollo sostenible. A través de estas herramientas digitales los niños son preparados para enfrentar las consecuencias el cambio climático y establecer cambios en sus vidas y en sus familias (Corner et al., 2015).

Algunos atributos propuestos por Ouarichi y colaboradores (2019), Dahlstrom (2014) y Morris y otros (2013) para el desarrollo de estas estrategias son:

- Promover actividades al alcance de los niños.
- Desafiar al público objetivo.
- Evitar textos largos y utilizar gráficos novedosos.
- Conectar los aprendizajes con las experiencias personales.
- Promover el desarrollo de los personajes.
- Impulsar el juego a través de la narrativa y el *storytelling*.

- Simular la realidad.

Dado lo anterior, otra de las estrategias para el acercamiento con la comunidad es el desarrollo de recursos digitales para niños. Se sugiere el desarrollo de un videojuego didáctico titulado 'Descubriendo el mundo invisible'. Consistirá en una historia a través de la cual los niños aprenderán sobre los hongos filamentosos para involucrarlos con la conservación del medio ambiente, el bosque seco tropical y el BPP (Figura 3.5).



Figura 3.5 Videojuego para niños: “Descubriendo el mundo invisible”.

Fuente: Autoría propia

Los niños tendrán el rol de exploradores y científicos para el análisis de los hongos filamentosos y la conservación del bosque. A través de ello realizarán diversas elecciones, obtendrán datos curiosos y construirán su conocimiento.

3.5 Diseño de productos comerciales

El proyecto planteado es viable económicamente ya que permite obtener fondos a además de que es tecnológicamente factible. A largo plazo, las secuencias genéticas

y los organismos conservados en la CCM-CIBE podrán ser investigados para su aplicación práctica en las industrias agrícola, farmacéutica y textil.

Asimismo, es posible obtener beneficios económicos a corto plazo dado que las fotografías de las especies identificadas podrán ser empleadas para el diseño y producción de mercadería (Figura 3.6). Según Healy (1994), la venta de mercancías turísticas puede generar beneficios locales gracias a la elaboración de productos novedosos, sostenibles y culturalmente aceptables. Además, la comercialización de este tipo de productos cotidianos permitirá vincular al resto de la comunidad con la conservación de los hongos filamentosos.



Figura 3.6 Diseño de productos comerciales.

Fuente: Autoría propia

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Gracias a la investigación realizada se determinó la biodiversidad de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través de métodos moleculares para el desarrollo de estrategias de conservación, educación ambiental y productos comerciales. A continuación, se muestran las fortalezas y limitaciones del estudio además de las respectivas conclusiones obtenidas:

- El proyecto tuvo como limitación el tiempo de desarrollo ya que fue ejecutado en un periodo de 4 meses que fue interrumpido por las medidas de bioseguridad dispuestas por el Centro de Operaciones de Emergencia Nacional debido a la pandemia por el COVID-19 en Ecuador. No obstante, se logró ejecutar ya que se tuvieron los recursos necesarios para el análisis de las tres estaciones. Además, entre las fortalezas del proyecto se tuvo el apoyo del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador y el Bosque Protector la Prosperina.
- Respecto al primer objetivo específico, se identificaron 38 especies únicas de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector la Prosperina a través del análisis molecular de ADN de las regiones ITS y LSU. Se encontró que los géneros más abundantes en el BPP fueron *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* con 9, 9 y 8 especies respectivamente. Además, en la estación Cuevas se identificaron aquellos géneros acompañados de *Cladosporium*, *Talaromyces*, *Absidia*, *Curvularia*, *Humicola* y *Gongronella*. En la estación Cañas adicionalmente se registraron especies de *Talaromyces*, *Absidia*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Purpureocillium*, *Clonostachys* y *Mariannea*. Por último, en la estación FCV también se presentaron los géneros *Cladosporium*, *Absidia*, *Purpureocillium*, *Cunninghamella* y *Cladosporium*. Adicionalmente, a pesar de que existen trabajos realizados en la provincia del Azuay para la identificación de hongos, el presente proyecto es base para el estudio de la biodiversidad de hongos filamentosos en los bosques secos tropicales de la costa ecuatoriana.

- Para el segundo objetivo, se criopreservaron un total de 35 cepas y 23 especies únicas de hongos filamentosos en la Colección de Cultivos Microbianos del CIBE reconocida por el Instituto Nacional de Biodiversidad. De esta manera, los tejidos serán conservados sin que su composición genética o su actividad se vea modificada por los subcultivos continuos en agar. Adicionalmente, a partir de estos tejidos se podrán establecer investigaciones a futuro para la búsqueda de enzimas o metabolitos secundarios de interés en la biotecnología y el desarrollo sostenible.
- En respuesta al tercer objetivo, se propusieron estrategias de conservación, educación ambiental y productos comerciales inspirados en las especies de hongos filamentosos asociados al suelo del Bosque Protector Prosperina. Respecto a la conservación, se realizó la criopreservación de los hongos y se entregaron las secuencias de ADN al CIBE para la ejecución de futuros proyectos. Además, se diseñaron propuestas de educación ambiental como una guía ilustrada de hongos filamentosos para la población en general y un videojuego para niños. Por último, se esbozaron productos comerciales que podrían ser comercializados por el BPP para la obtención de financiamiento a corto plazo. En consecuencia, a partir de las propuestas planteadas se obtendrá el vínculo con la sociedad y con la comunidad científica además de beneficios económicos para futuros estudios en el bosque seco tropical.

Recomendaciones

- Establecer puntos de muestreo en la zona 2 del Bosque Protector Prosperina durante la época lluviosa principalmente para las áreas que permanecen sin agua el resto del año. También se sugiere estudiar aquellas estaciones con menor intervención humana a más de 250 msnm.
- Desarrollar estudios de ADN ambiental utilizando métodos de secuenciación de nueva generación para la identificación de especies no cultivables en el laboratorio.
- Analizar el gremio ecológico al que pertenecen las especies a través de los análisis bioinformáticos con herramientas como FUNGuild y experimentos adicionales en el laboratorio.

- Realizar ensayos de laboratorio para identificar especies para las industrias textil, farmacéutica, de alimentos y la biotecnología agrícola. Además, implementar experimentos para el descubrimiento de metabolitos de interés que puedan ser empleados en la degradación de contaminantes como metales pesados, tintes industriales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Martínez, V., Mikha, M., & Vigil, M. (2007). Microbial communities and enzyme activities in soils under alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. *Applied Soil Ecology*, 37(1-2), 41-52. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.03.009>
- Aguirre, N., & Erazo, A. (2017). Valoración económica ambiental del compartimiento leñoso como una alternativa para conservar la biodiversidad del bosque seco de la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 7(1), Article 1. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/188>
- Aguirre-Padilla, N., Alvarado-Espejo, J., & Granda-Pardo, J. (2018). Bienes y servicios ecosistémicos de los bosques secos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 8(2), Article 2. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/499>
- Albert, Q., Leleyter, L., Lemoine, M., Heutte, N., Rioult, J., Sage, L., Baraud, F., & Garon, D. (2018). Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. *Chemosphere*, 196, 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.156>
- Altaf, M. M., Imran, M., Abulreesh, H. H., Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2018). Diversity and Applications of *Penicillium* spp. In Plant-Growth Promotion. En V. K. Gupta & S. Rodriguez-Couto (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 261-276). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00015-6>
- Appels, F. V. W., Camere, S., Montalti, M., Karana, E., Jansen, K. M. B., Dijksterhuis, J., Krijgsheld, P., & Wösten, H. A. B. (2019). Fabrication factors influencing

mechanical, moisture- and water-related properties of mycelium-based composites. *Materials & Design*, 161, 64-71.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.027>

Asthana, M., & Kumar, A. (2018). Understanding the Diversity of Penicillium Using Next-Generation Sequencing. En V. K. Gupta & S. Rodriguez-Couto (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 19-43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00002-8>

Astudillo-Echeverría, A., León, B., Franco, W., Torres, R., Sislema, S., Carrera, A., Apunte, K., Naranjo-Briceño, L., Pérez-Cárdenas, M., Ascencio-Lino, T., Montero-Calderón, A., Sandoya, V., Barcos-Arias, M., Naranjo-Morán, J., Oviedo-Anchundia, R., & Pacheco-Coello, R. (2019). *Descubriendo la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares autóctonos asociados a cacao (Theobroma cacao), cedro (Cedrela montana) y guayusa (Ilex guayusa): Un primer paso hacia la obtención de biofertilizantes y el desarrollo sustentable de la agroforestería*. 1.

Barajas, O. (2015). *Hongos del Bosque La Primavera*.

Batz, M., Henke, E., & Kowalcyk, B. (2013). Long-Term Consequences of Foodborne Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), 599-616.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.05.003>

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal

diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449-456. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>

Cabrera, B. (2017). *Sistematización del cepario de hongos filamentosos de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14431/1/UPS-CT007094.pdf>

Campo, P., & Dangles, O. (2020). An overview of games for entomological literacy in support of sustainable development. *Current Opinion in Insect Science*, 40, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.05.018>

Coleman, A. W. (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*, 31(3), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.002>

Congreso Nacional del Ecuador. (2004). *Ley forestal y de conservación de áreas naturales y vida silvestre* (p. 19) [Registro Oficial Suplemento 418 de 10-sep-2004]. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/ley-forestal.pdf>

Contreras, H., & Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. <https://doi.org/10.25127/ucni.v1i1.269>

Corner, A., Roberts, O., Chiari, S., Völler, S., Mayrhuber, E. S., Mandl, S., & Monson, K. (2015). How do young people engage with climate change? The role of knowledge, values, message framing, and trusted communicators. *WIREs Climate Change*, 6(5), 523-534. <https://doi.org/10.1002/wcc.353>

- Cortecuisse, R. (2005). *Guía de los Hongos Península Ibérica, Europa y Norte de África*. Omega.
- Crahay, C., Declerck, S., Colpaert, J. V., Pigeon, M., & Munaut, F. (2013). Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biology*, 117(2), 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.003>
- Dahlstrom, M. F. (2014). Using narratives and storytelling to communicate science with nonexpert audiences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(Supplement 4), 13614-13620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320645111>
- Deharvengt, S., Petersen, L., Jung, H., & Tsongalis, G. (2020). Nucleic acid analysis in the clinical laboratory. En W. Clarke & M. Marzinke (Eds.), *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)* (pp. 215-234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00013-2>
- Delgado, D. (2017). *Niveles de Coliformes totales y Escherichia coli en Anadara tuberculosa y Anadara similis en el Recinto El Morro, Provincia Del Guayas*. [Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29451/1/Dayana%20Delgado.pdf>
- Dueñas, E., & Palomeque, M. (2021). *Diversidad de Lepidóptera en el Bosque Protector la Prosperina y el Campus Gustavo Galindo de la ESPOL* [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Fraç, M., Hannula, S. E., Bełka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Frontiers in Microbiology*, 9, 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- Furci, G. (2018). *Guía de Campo Hongos de Chile*. Fundación Fungi.

- Gaddeyya, G., Shiny, P., Bharathi, P., & Ratna, P. (2012). Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salud Mandal. *Advances in Applied Science Research*, 3(4), 2020-2026.
- García, A., Medina, A., & Lara, J. (2017). Aislamiento e Identificación de Hongos filamentosos tolerantes a aceites dieléctricos usados y los Bifenilos Policlorados (PCBs) de suelos contaminados. *Biociencias*, 12(1), 25-30. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2431>
- Gardi, C., Montanarella, L., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., Jolivet, C., Mulder, C., Ranjard, L., Römbke, J., Rutgers, M., & Menta, C. (2009). Soil biodiversity monitoring in Europe: Ongoing activities and challenges. *European Journal of Soil Science*, 60(5), 807-819. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01177.x>
- Gómez, M., & Gómez, V. (2017). *Guía ilustrada de la Estación Biológica Vasco de Quiroga: Macrolíquenes y macromicetos del bosque mesófilo de montaña*. UMSNH.
- Guiraud, P., Villemain, D., Kadri, M., Bordjiba, O., & Steiman, R. (2003). Biodegradation capability of *Absidia fusca* Linnemann towards environmental pollutants. *Chemosphere*, 52(4), 663-671. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00229-7)
- Healy, R. G. (1994). Tourist merchandise' as a means of generating local benefits from ecotourism. *Journal of Sustainable Tourism*, 2(3), 137-151. <https://doi.org/10.1080/09669589409510691>
- Hoang, M. T. V., Irinyi, L., Chen, S. C. A., Sorrell, T. C., The ISHAM Barcoding of Medical Fungi Working Group, Meyer, W., Arabatzis, M., Arthur, I., Cano-Lira, J. F., Cardinali, G., Castañón, L. R., Chen, S., Chen, W., Chindamporn, A., Colombo, A. L., Desnos-Ollivier, M., de Beer, W., de Hoog, S., Dromer, F., ... Maria Zancopé-

- Oliveira, R. (2019). Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01647>
- Hu, Y., Veresoglou, S. D., Tedersoo, L., Xu, T., Ge, T., Liu, L., Chen, Y., Hao, Z., Su, Y., Rillig, M. C., & Chen, B. (2019). Contrasting latitudinal diversity and co-occurrence patterns of soil fungi and plants in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 131, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.01.001>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a otros fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Jungare, K. A., Radha, R., & Sreekanth, D. (2021). Cryopreservation of biological samples – A short review. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.11.203>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., ... Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm

- for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271-5277.
<https://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- López, R., Carrillo, F., Carrillo, V., Neira, G., & Poveda, G. (2018). *Revisión de la sustentabilidad ecológica de las áreas verdes protegidas en la ciudad de Guayaquil—Provincia del Guayas—Ecuador*. 16.
<https://www.eumed.net/actas/18/economia-social/1-revision-de-la-sustentabilidad-ecologica.pdf>
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R., Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., ... Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Manoch, L., Dethoup, T., Yilmaz, N., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2013). Two new *Talaromyces* species from soil in Thailand. *Mycoscience*, 54(5), 335-342.
<https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.12.002>
- Maridueña-Zavala, M., Quevedo, A., Aguaguiña, K., Serrano, L., & Sosa, D. (2021). Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): Una colección para la investigación. *Latin American Journal of Biotechnology and Life Sciences*, 6(1), 1664-1668. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.32>

- Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Mendoza, R., & Espinoza, A. (2017). *Guía Técnica para muestreo de suelos* (Primera edición). Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>
- Metz, N., & Hausladen, H. (2022). Trichoderma spp. As potential biological control agent against *Alternaria solani* in potato. *Biological Control*, 166, 104820. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104820>
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., de Vries, R. P., Endy, D., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, R. I., Keller, N. P., Kraševac, N., Mortensen, U. H., Perez, R., Ram, A. F. J., ... Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: A white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>
- Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E., Kohler, A., Sánchez-García, M., Morin, E., Andreopoulos, B., Barry, K. W., Bonito, G., Buée, M., Carver, A., Chen, C., Cichocki, N., Clum, A., Culley, D., Crous, P. W., Fauchery, L., Girlanda, M., ... Martin, F. M. (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications*, 11(1), 5125. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18795-w>
- Morán, S., & Sarmiento, M. (2005). *Guía ilustrada de macrohongos de Uyuca* [Tesis de pregrado]. Universidad Zamorano.

- Morris, B., Croker, S., Zimmerman, C., Gill, D., & Romig, C. (2013). Gaming science: The “Gamification” of scientific thinking. *Frontiers in Psychology*, 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2013.00607>
- Nilsson, R., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: High-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Ouariachi, T., Olvera-Lobo, M. D., Gutiérrez-Pérez, J., & Maibach, E. (2019). A framework for climate change engagement through video games. *Environmental Education Research*, 25(5), 701-716. <https://doi.org/10.1080/13504622.2018.1545156>
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., VINO-NINA, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25. http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a02.pdf
- Peterson, S. (2003). Identification of Common Aspergillus species by M. A. Klich. *Mycologist*, 17(3), 128. <https://doi.org/10.1017/S0269915X03243123>
- Pires da Silva, F., Vechiato, M., & Harakava, R. (2014). EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Vasinfestum* and *F. oxysporum* f. Sp. *Phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology*, 39, 64-73. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>
- Pitt, J. (2014). PENICILLIUM | *Penicillium* and *Talaromyces*: Introduction. En C. Batt & M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 6-13). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00248-2>

- Qayyum, M., Saeed, S., Wakil, W., Nawaz, A., Iqbal, N., Yasin, M., Chaurdhry, M., Bashir, M., Ahmed, N., Riaz, H., Bilal, H., Hashem, M., & Alamri, S. (2021). Diversity and correlation of entomopathogenic and associated fungi with soil factors. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101520. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101520>
- Quinteros, A., Ramos, R., & Rodríguez, A. (2010). *Evaluación del Uso Recreativo del Bosque Protector Prosperina*. 256. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/31809/D-64592.pdf>
- Quinteros-Trelles, A., Pino-Acosta, A., Pozo-Cajas, M., & Piedrahita-Piedrahita, P. (2017). *Un paraíso a grandes alturas. Guía de identificación de aves del Bosque Protector La Prosperina*. Espol - Unidad de Publicaciones.
- Rabha, J., & Jha, D. K. (2018). Metabolic Diversity of Penicillium. En V. K. Gupta & S. Rodriguez-Couto (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 217-234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0>
- Ramírez-Camejo, L. A., Zuluaga-Montero, A., Lázaro-Escudero, M., Hernández-Kendall, V., & Bayman, P. (2012). Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: Is everything everywhere? *Fungal Biology*, 116(3), 452-463. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.006>
- Romano, G., Grassi, E., Majul, L., García, R., & Kuhar, J. (2020). *Guía ilustrada de recolección de hongos*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

- Romero, S. M., Giudicessi, S. L., & Vitale, R. G. (2021). Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage? *Journal of Cultural Heritage*, 51, 107-124.
<https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.08.002>
- Sharma, A., Salwan, R., & Sharma, V. (2022). Extracellular proteins of *Trichoderma* and their role in plant health. *South African Journal of Botany*, 147, 359-369.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.036>
- Sierra, R. (1999). *Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental*. Editorial Rimana.
<https://doi.org/10.13140/2.1.4520.9287>
- Smith, D., & Onions, A. (Eds.). (1994). *The preservation and maintenance of living fungi* (2nd ed). CABI.
- Soanes, D. M., Alam, I., Cornell, M., Wong, H. M., Hedeler, C., Paton, N. W., Rattray, M., Hubbard, S. J., Oliver, S. G., & Talbot, N. J. (2008). Comparative Genome Analysis of Filamentous Fungi Reveals Gene Family Expansions Associated with Fungal Pathogenesis. *PLOS ONE*, 3(6), e2300.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002300>
- St. Germain, G., & Summerbell, R. (2015). *Identifying filamentous fungi: A clinical laboratory handbook*.
- Stielow, J., Lévesque, C., Seifert, K., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A., Damm, M., Yilmaz, N., Houbraken, J., Lombard, L., ... Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* -

- Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 242-263.
<https://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- Thrane, U. (2014). Fusarium. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 76-81). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>
- Tranchida, M. C., Centeno, N. D., Stenglein, S. A., & Cabello, M. N. (2016). First record of *Talaromyces udagawae* in soil related to decomposing human remains in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 86-90.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.002>
- van Burik, J., Schreckhise, R., White, T., Bowden, R., & Myerson, D. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*, 36(5), 299-303. <https://doi.org/10.1080/02681219880000471>
- Vicente, I., Baroncelli, R., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., & Sarrocco, S. (2022). Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma* ecophysiology. *Fungal Biology Reviews*, 39, 83-99.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.004>
- Wang, Y., Liu, Y., Li, J., Bai, S., & Tian, T. (2021). Fungal community composition and diversity in the rhizosphere soils of Argentina (*syn. Potentilla*) *anserina*, on the Qinghai Plateau. *Fungal Ecology*, 54, 101107.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2021.101107>
- Wei, J., & Wu, B. (2020). Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. *Fitoterapia*, 146, 104638.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104638>

- Wikandari, R., Hasniah, N., & Taherzadeh, M. J. (2022). The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, *345*, 126531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126531>
- Zaghi, L., Delgado, M., Silva, J., Quaresma, O., Lopes, A., Pereira, S., Silveira, J., Linde, G., & Barros, N. (2020). Five-year cryopreservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. *Journal of Microbiological Methods*, *176*, 106030. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106030>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K.-M., & Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(2), 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H., & Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(5), 627-632. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0808-4>
- Zhou, Y., Jia, X., Han, L., Tian, G., Kang, S., & Zhao, Y. (2021). Spatial characteristics of the dominant fungi and their driving factors in forest soils in the Qinling Mountains, China. *CATENA*, *206*, 105504. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105504>
- Zoll, J., Snelders, E., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2016). Next-Generation Sequencing in the Mycology Lab. *Current Fungal Infection Reports*, *10*, 37-42. <https://doi.org/10.1007/s12281-016-0253-6>

APÉNDICES

APÉNDICE A

Hits para el gen ITS

Estación Cuevas.

Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PITS_A01	99.1%	MH472977	Aspergillus	<i>Aspergillus flavipes</i>
PITS_B01	98.9%	KT221879	Aspergillus	<i>Aspergillus ardalensis</i>
PITS_E01	99.8%	MK690419	Curvularia	<i>Curvularia lunata</i>
PITS_F01	99.8%	KC426999	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PITS_H01	99.6%	KM011996	Trichoderma	<i>Trichoderma spirale</i>
PITS_B02	99.8%	MW757343	Aspergillus	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
PITS_E02	99.8%	MT510010	Penicillium	<i>Penicillium janthinellum</i>
PITS_F02	99.4%	MW820291	Talaromyces	<i>Talaromyces sp.</i>
PITS_G02	99.6%	MH884095	Cladosporium	<i>Cladosporium sp.</i>
PITS_B03	98.7%	MK139981	Trichoderma	<i>Trichoderma sp.</i>
PITS_E03	100.0%	MT074667	Talaromyces	<i>Talaromyces flavus</i>
PITS_F03	99.4%	MZ701978	Penicillium	<i>Penicillium ochrochloron</i>
PITS_G03	99.8%	MT510010	Penicillium	<i>Penicillium janthinellum</i>
PITS_H03	99.2%	MG847354	Curvularia	<i>Curvularia kusanoi</i>
PITS_C04	99.19%	LT993581.1	Humicola	<i>Humicola fuscogrisea</i>
PITS_D04	100.0%	NR_167687.1	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>

Fuente: Autoría propia

Estación Cañas.

Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PITS_H04	100.0%	MH325927	Talaromyces	<i>Talaromyces sp.</i>
PITS_B05	99.8%	MW763075	Absidia	<i>Absidia sp.</i>
PITS_C05	99.6%	MK870544	Trichoderma	<i>Trichoderma sp.</i>
PITS_D05	99.8%	MK870544	Trichoderma	<i>Trichoderma sp.</i>
PITS_G05	99.0%	OL711838	Aspergillus	<i>Aspergillus floridensis</i>
PITS_A06	100.0%	MH874891	Trichoderma	<i>Trichoderma pleuroti</i>
PITS_B06	98.4%	HQ608058	Penicillium	<i>Penicillium rubidurum</i>
PITS_E06	99.8%	KY767640	Trichoderma	<i>Trichoderma saturnisporum</i>
PITS_G06	99.1%	MK784067	Trichoderma	<i>Trichoderma harzianum</i>
PITS_H06	99.1%	MK139981	Trichoderma	<i>Trichoderma sp.</i>
PITS_A07	99.10%	NG_063999.1	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_E07	100.0%	NR_154574.1	Trichoderma	<i>Trichoderma breve</i>
PITS_A08	99,81%	OL711726.1	Aspergillus	<i>Aspergillus uvarum</i>

Fuente: Autoría propia

Estación FCV.

Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PITS_B08	99.6%	NR_167687.1	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PITS_C08	99.6%	AF033461	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_D08	99.2%	MH864840.1	Cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
PITS_E08	99.6%	NR_167687.1	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PITS_F08	98.9%	NR_138279.1	Aspergillus	<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>
PITS_A09	100.0%	NG_070052	Aspergillus	<i>Aspergillus assiutensis</i>
PITS_B09	100.0%	NR_164424.1	Fusarium	<i>Fusarium falciforme</i>
PITS_C09	99.79%	MH856410.1	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_D09	98.7%	MN427870	Penicillium	<i>Penicillium shearii</i>
PITS_E09	99.8%	EF483928	Fusarium	<i>Fusarium solani</i>
PITS_B10	98.58%	KU324795.1	Fusarium	<i>Fusarium solani</i>
PITS_C10	99.2%	OM218666	Aspergillus	<i>Aspergillus aculeatus</i>
PITS_D10	99.6%	MH856410	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_E10	99.8%	MH856410	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PITS_H10	99.79%	MW325183.1	Curvularia	<i>Curvularia petersonii</i>
PITS_A11	98.38%	MN044891.1	Absidia	<i>Absidia caatinguensis</i>
PITS_C11	100.0%	MT328520.1	Aspergillus	<i>Aspergillus ustus</i>
PITS_E11	99.19%	KU866657.1	Talaromyces	<i>Talaromyces adpressus</i>

Fuente: Autoría propia

APÉNDICE B

Hits para el gen LSU

Estación Cuevas.

Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PLSU_A01	98.7%	EF669600	Aspergillus	<i>Aspergillus flavipes</i>
PLSU_B01	100.0%	OL772705.1	Aspergillus	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
PLSU_C01	100.0%	NG_069001.1	Penicillium	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_D01	99.82%	HQ646592.1	Penicillium	<i>Penicillium guttulorum</i>
PLSU_E01	100%	MH260290.1	Curvularia	<i>Curvularia xishuangbannaensis</i>
PLSU_F01	100.0%	NG_070046.1	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PLSU_H01	100.0%	NG_069830.1	Trichoderma	<i>Trichoderma spirale</i>
PLSU_A02	98.95%	MH870507.1	Gongronella	<i>Gongronella butleri</i>
PLSU_B02	100.0%	NG_069877.1	Aspergillus	<i>Aspergillus costaricensis</i>
PLSU_C02	100.0%	OL772705.1	Aspergillus	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
PLSU_E02	99.8%	NG_069001.1	Penicillium	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_F02	100.0%	OL897074	Talaromyces	<i>Talaromyces liani</i>
PLSU_G02	99.64%	NG_070044.1	Cladosporium	<i>Cladosporium crousii</i>
PLSU_H02	99.82%	OL711683.1	Aspergillus	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>
PLSU_A03	99.4%	MW671548	Absidia	<i>Absidia sp.</i>
PLSU_B03	99.63%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_D03	99.42%	NG_069001.1	Penicillium	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_E03	100.0%	MH870315.1	Aspergillus	<i>Aspergillus cremeus</i>
PLSU_F03	99.8%	NG_069001.1	Penicillium	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_G03	99.8%	NG_069001.1	Penicillium	<i>Penicillium limosum</i>
PLSU_B04	99.1%	NG_069273.1	Subramaniula	<i>Subramaniula thielavioides</i>
PLSU_C04	99,08%	KP336838.1	Chaetomium	<i>Chaetomium laterale</i>
PLSU_D04	100.0%	NG_069767.1	Aspergillus	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>

Fuente: Autoría propia

Estación Cañas.

Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PLSU_E04	100.0%	NG_056277.1	Purpureocillium	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
PLSU_F04	99.8%	NG_056277.1	Purpureocillium	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
PLSU_E04	100.0%	MT560198	Purpureocillium	<i>Purpureocillium sp.</i>
PLSU_G04	100.0%	MN818596	Curvularia	<i>Curvularia trifolii</i>
PLSU_H04	100.0%	OL897074	Talaromyces	<i>Talaromyces liani</i>
PLSU_A05	100.0%	OL772705.1	Aspergillus	<i>Aspergillus neoflavipes</i>
PLSU_B05	99.85%	MW762874.1	Absidia sp.	<i>Absidia sp.</i>
PLSU_C05	100.0%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_D05	99.8%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_E05	100.0%	MN017874	Purpureocillium	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
PLSU_G05	100.0%	NG_070052	Aspergillus	<i>Aspergillus assiutensis</i>
PLSU_A06	99.46%	MG189926.1	Fusarium	<i>Fusarium tonkinense</i>
PLSU_B06	99.64%	NG_063999.1	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PLSU_C06	100.0%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_D06	99.1%	NG_069831.1	Trichoderma	<i>Trichoderma tomentosum</i>
PLSU_E06	99.6%	NG_069830	Trichoderma	<i>Trichoderma spirale</i>
PLSU_F06	99,29%	NG_064073.1	Penicillium	<i>Penicillium sizovae</i>
PLSU_G06	99.8%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_H06	99.6%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_A07	100.0%	MG189915.1	Fusarium	<i>Fusarium falciforme</i>
PLSU_D07	99.4%	MW671548.1	Absidia	<i>Absidia sp.</i>
PLSU_E07	100.0%	NG_069973.1	Trichoderma	<i>Trichoderma amazonicum</i>
PLSU_F07	99.6%	MH874053.1	Clonostachys	<i>Clonostachys rosmaniae</i>
PLSU_G07	99.29%	NG_064073.1	Penicillium	<i>Penicillium sizovae</i>
PLSU_H07	100.0%	NG_069229.1	Mariannaea	<i>Mariannaea humicola</i>
PLSU_A08	100.0%	NG_070052.1	Aspergillus	<i>Aspergillus assiutensis</i>

Fuente: Autoría propia

Estación FCV.

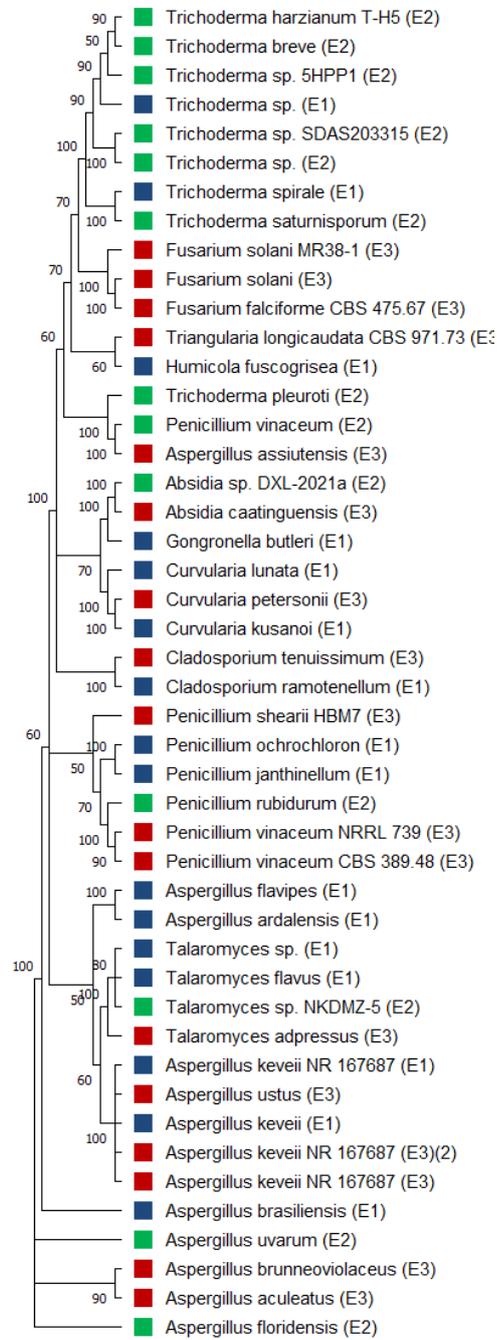
Código	Porcentaje de identidad	Código de acceso	Género	Especie
PLSU_B08	100.0%	OL711761	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PLSU_C08	100.0%	MH483572	Penicillium	<i>Penicillium rubidurum</i>
PLSU_D08	99.6%	MW791866	Cladosporium	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
PLSU_E08	99.8%	OL711761	Aspergillus	<i>Aspergillus keveii</i>
PLSU_F08	99.8%	LC573561	Aspergillus	<i>Aspergillus aculeatus</i>
PLSU_G08	99.7%	MG569562	Cunninghamella	<i>Cunninghamella echinulata</i>
PLSU_H08	99.6%	MT560198	Purpureocillium	<i>Purpureocillium sp.</i>
PLSU_A09	100.0%	EF669595	Aspergillus	<i>Aspergillus polyporicola</i>
PLSU_C09	99.6%	NG_063999	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PLSU_D09	99.5%	MH876804	Penicillium	<i>Penicillium shearii</i>
PLSU_E09	100.0%	MT533257	Fusarium	<i>Fusarium solani</i>
PLSU_H09	99.4%	MH877919	Trichoderma	<i>Trichoderma erinaceum</i>
PLSU_A10	100.0%	MT582790	Penicillium	<i>Penicillium steckii</i>
PLSU_C10	100.0%	MN396388	Aspergillus	<i>Aspergillus aculeatus</i>
PLSU_D10	99.6%	NG_063999	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PLSU_E10	99.8%	NG_063999	Penicillium	<i>Penicillium vinaceum</i>
PLSU_F10	99.6%	MT582790	Penicillium	<i>Penicillium steckii</i>
PLSU_H10	100.0%	MK353174	Penicillium	<i>Penicillium citrinum</i>
PLSU_A11	99.4%	MW671548	Absidia	<i>Absidia sp.</i>
PLSU_B11	99.8%	NG_075152.1	Humicola	<i>Humicola floriformis</i>
PLSU_C11	99.8%	OL711794	Aspergillus	<i>Aspergillus germanicus</i>
PLSU_E11	100.0%	MH876987	Talaromyces	<i>Talaromyces funiculosus</i>

Fuente: Autoría propia

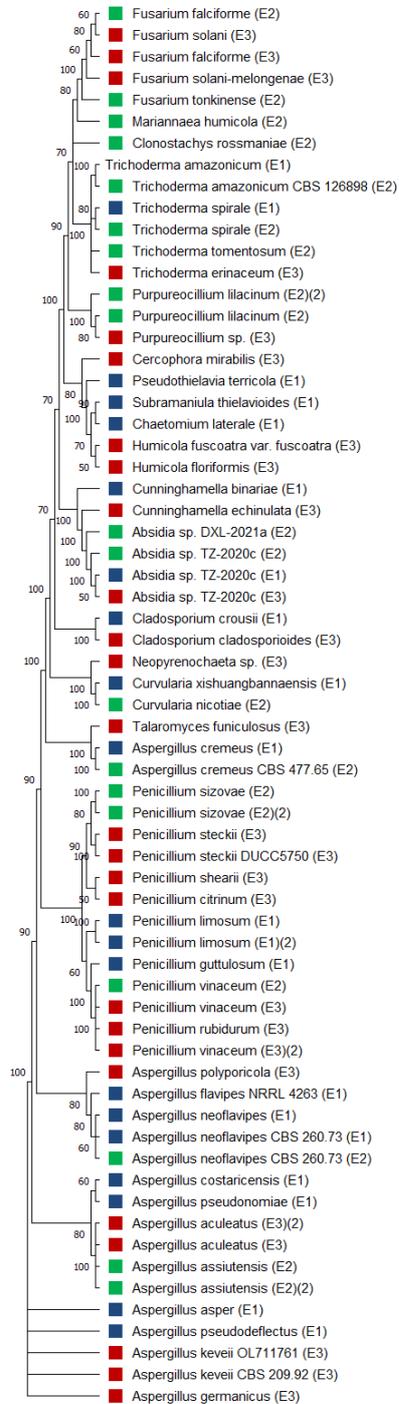
APÉNDICE C

Árboles filogenéticos

Árbol obtenido a partir del gen ITS



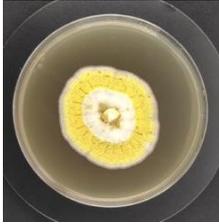
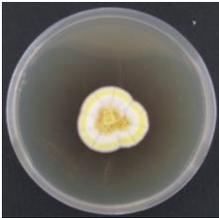
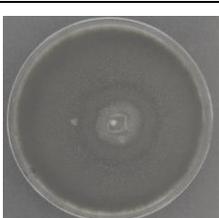
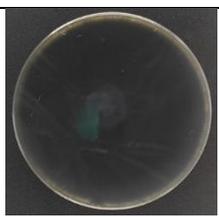
Árbol obtenido a partir del gen LSU

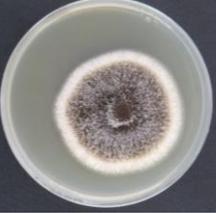
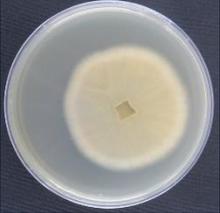
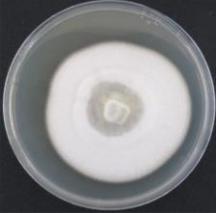
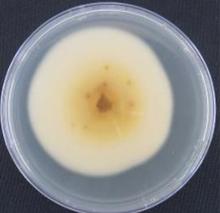
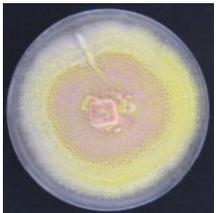
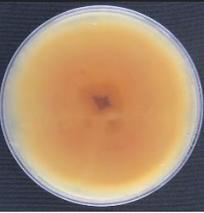
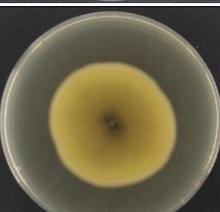


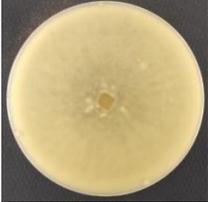
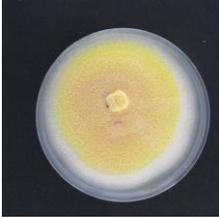
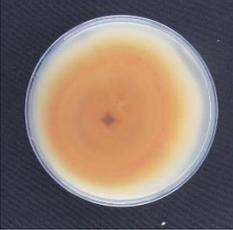
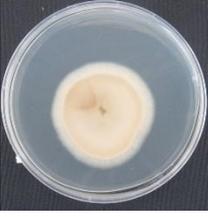
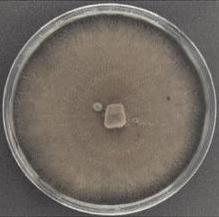
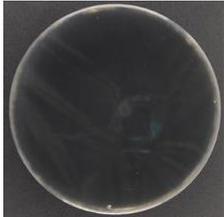
APÉNDICE C

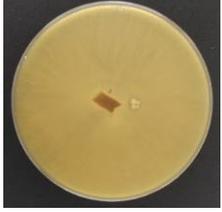
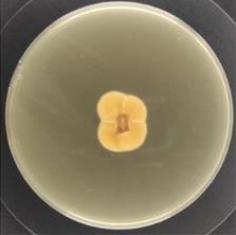
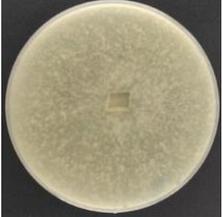
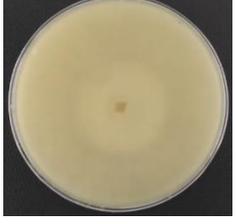
Registro fotográfico Hongos filamentosos identificados

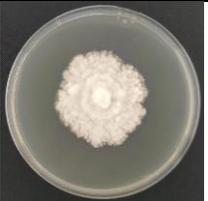
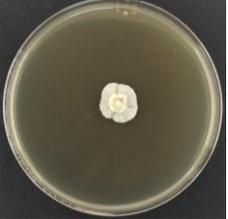
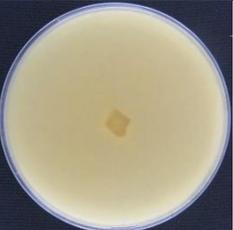
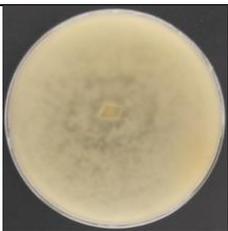
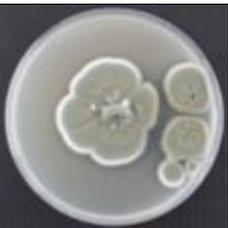
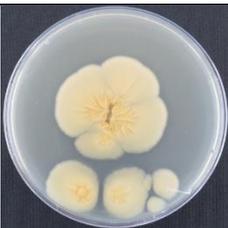
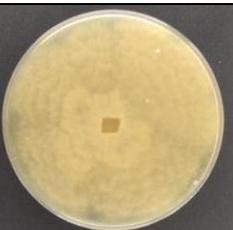
Hongos filamentosos en medio PDA con 7 días de crecimiento

Anverso	Reverso	Organismo
		<i>Aspergillus flavipes</i>
		<i>Aspergillus neoflavipes</i>
		<i>Penicillium guttulosum</i>
		<i>Curvularia lunata</i>
		<i>Aspergillus keveii</i>

		<i>Trichoderma spirale</i>
		<i>Gongronella butleri</i>
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>
		<i>Penicillium limosum</i>
		<i>Talaromyces liani</i>
		<i>Cladosporium crousii</i>
		<i>Aspergillus pseudonomiae</i>

		<i>Absidia sp.</i>
		<i>Trichoderma amazonicum</i>
		Talaromyces flavus
		<i>Humicola fuscogrisea</i>
		<i>Purpureocillium lilacinum</i>
		<i>Curvularia trifolii</i>
		<i>Aspergillus assiutensis</i>

		<i>Trichoderma pleuroti</i>
		<i>Penicillium vinaceum</i>
		<i>Trichoderma tomentosum</i>
		<i>Penicillium sizovae</i>
		<i>Trichoderma harzianum</i>
		<i>Fusarium falciforme</i>

		<i>Clonostachys rossmaniae</i>
		<i>Mariannaea humicola</i>
		<i>Penicillium rubidurum</i>
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>
		<i>Cunninghamella echinulata</i>
		<i>Trichoderma erinaceum</i>
		<i>Penicillium steckii</i>
		<i>Absidia caatinguensis</i>