



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

**Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo
asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Recalde Rodríguez, Joselyn Xiomara.

DIRECTOR: Sánchez Rodríguez, Aminaél, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor.

Aminael Sánchez Rodríguez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, "Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno" realizado por Joselyn Xiomara Recalde Rodríguez; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Joselyn Xiomara Recalde Rodríguez declaro ser el autora del presente trabajo de titulación: “Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno”, de la titulación de Biología siendo Aminael Sánchez Rodríguez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autora: Recalde Rodríguez Joselyn Xiomara

Cédula: 1104113194

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A mi madre Anita del Rocío Rodríguez, que es el motor de mi vida y que gracias a su esfuerzo, ejemplo y constancia ha forjado mi personalidad y me ha ayudado a cumplir esta meta profesional.

A mis hermanas Paula, Allison, Emilia y Anita por su apoyo incondicional en cada paso de mi vida.

A mis amigos por hacer que el camino a esta meta este lleno de aprendizaje y de experiencias inolvidables.

Joselyn Xiomara Recalde Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de esta investigación y a su vez en la culminación de mi carrera universitaria, hago extenso mis agradecimientos al Doc. Aminael Sánchez Rodríguez, que gracias a su dirección hizo posible el desarrollo de este trabajo de fin de carrera; aportando con sus conocimientos y experiencia.

Agradezco a mis colegas y amigos, José Francisco Ochoa y Juan Sebastian Eguiguren por su apoyo y aportes en la realización de este proyecto.

A mi madre y familiares por estar presentes a lo largo de mis estudios.

Joselyn Xiomara Recalde Rodríguez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.	5
MARCO TEÓRICO.....	5
OBJETIVOS	6
1. Nitrógeno en los suelos Tropicales.	7
1.1 Fijación del nitrógeno por microorganismos.	8
1.2 Reino de los Hongos.....	9
1.3 Degradación del Nitrógeno por la Composición Fúngica del Suelo.	10
1.4 Diversidad de hongos fijadores de nitrógeno.....	10
1.5 Caracterización de Morfología Básica de Hongos.	11
1.6 Métodos de aislamiento y cultivo en Hongos.....	11
1.6.1 Métodos de cultivo <i>In Vitro</i> Sólido.	12
1.6.2 Métodos de cultivo <i>In Vitro</i> líquido.....	13
1.7 Criopreservación en Hongos.	13
1.8 Caracterización Molecular de Hongos.	13
1.8.1 Extracción de ADN del Material Fúngico.	14
1.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada a Hongos.....	14
CAPÍTULO II.	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Área de estudio.....	16
2.2 Muestreo de campo.	16
2.3 Análisis de laboratorio.	17
2.3.1 Medios de Cultivo.....	18
2.3.2 Siembra de las disoluciones en medio semisólido.....	18
2.3.3 Conteo de colonias por placa.	19
2.3.4 Purificación de colonias de hongos.....	19

2.3.5	Criopreservación de los aislados puros.....	20
2.3.6	Siembra de hongos en medio líquido.....	20
2.3.7	Filtrado del material fúngico.....	21
2.3.8	Extracción de ADN.....	21
2.3.9	PCR.....	21
2.3.10	Análisis de datos.....	22
CAPÍTULO III.....		23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		23
3.1	Caracterización Morfológica básica de los hongos cultivables del suelo.....	24
3.2	Criopreservación.....	24
3.3	Análisis de Filogenéticos.....	24
3.4	Discusión.....	28
CONCLUSIONES.....		31
RECOMENDACIONES.....		32
BIBLIOGRAFÍA.....		33
ANÉXOS.....		39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema modificado de ciclo de nitrógeno (López, 2015).	10
Figura 2: Modificado del Transecto Numex, identificación de la zona de muestreo (Homeier et al. 2012).	16
Figura 3: Puntos de muestreo dentro de las parcelas predeterminadas.....	17
Figura 4: Árbol filogenético de la región ITS 1 obtenida de los aislados. El árbol presenta los géneros que se obtuvieron de la RBSF.; fue soportado con secuencias obtenidas del GenBank.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cuadro de asignación de género mediante búsqueda por homología (BLAST) a cada uno de los aislados puros. Se detalla además el origen de cada aislado (bloques y tratamientos.....	25
Tabla 2: Caracterización morfológica de hongos cultivables del suelo	40
Tabla 3: Reactivación de Muestras Criopreservadas.....	42

RESUMEN

La fijación biológica del Nitrógeno es un proceso que aporta con un 65% de fijación anual de N al ecosistema; ejecutada por microorganismos fúngicos capaces de reducir la forma atmosférica del N en forma asimilable. Existen varias actividades antrópicas que han favorecido el aumento de la adicción de N, lo que ha generado la duplicación de la cantidad de N que es incorporado por año en los diferentes ciclos biológicos del suelo. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar molecularmente y criopreservar hongos asociados con la respuesta al estrés por N. Seleccionando suelos sometidos a un alto estrés por adicción de N junto a suelos control, de los cuales se aisló los hongos cultivables para ser caracterizados a través de técnicas moleculares. Obteniendo como resultado 43 cepas caracterizadas por morfología básica (color, forma y tamaño). La filogenia indico la presencia del Phylum Ascomycota con dos clados. Eurotiales (*Penicillium* cf. *Citrinum*, *Aspergillus* cf. *Nigger* y *Aspergillus* sp). El clado Hypocreales presenta los géneros (*Metarrhizium* sp. *Clonostachys* sp y *Tolypocladium* sp) y el filum Zygomycota con el género *Morlierella* sp. El porcentaje de reactivación de las cepas criopreservadas fue de un 98%.

Palabras Clave: Actividad antrópica., caracterización molecular., criopreservación., hongos cultivables.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is a process that provides a 65% annual N fixation ecosystem; executed by fungal microorganisms capable of reducing atmospheric form of nitrogen in an assimilable form. There are several human activities that have favored increasing addition of N, which has led to the doubling of the amount of nitrogen that is incorporated by year in the different life cycles of the earth. This study aims to characterize molecularly and cryopreserved fungi associated with the stress response of nitrogen, soils subjected to high stress addition nitrogen with soil control, which cultivable fungi was isolated to be characterized and classified were selected morphologically through molecular techniques. Which resulted in 43 strains characterized by basic morphology (color, shape and size), the genera found *Penicillium* cf. *citrinum*, *Aspergillus* sp, *Aspergillus* cf. *nigger*, *Metarrhizium* sp, sp *Clonostachys*, *Tolyposcladium* sp and sp *Morlierella*; reactivating the percentage of strains cryopreserved were was 98%.

Keywords: anthropic activity, molecular characterization, cryopreservation, culturable fungi.

INTRODUCCIÓN

Los bosques montanos tropicales son ecosistemas con un alto grado de diversidad biológica, pero se encuentran altamente amenazados por su vulnerabilidad ante los cambios globales (cambio climático y mal uso de los suelos (Cuesta et al., 2009). Aparte de su gran diversidad biológica, estos ecosistemas favorecen el desarrollo de microorganismos del suelo debido a la gran cantidad de variaciones ambientales (Torrachi, 2002). La deposición atmosférica ha aumentado notablemente por fuentes antropogénicas en los últimos décadas (Baldos, Corre, & Veldkamp, 2015), debido a la industrialización, los vehículos; el uso de productos químicos, el uso de fertilizantes, la quema de biomasa.(Montaño & Sandoval, 2007). Por eso, actualmente los suelos tropicales no administrados aportan con el 30% de las emisiones globales de N_2O , el cual es un principal gases de invernadero. Eso se debe a los altos niveles de N en los suelo tropicales que resulta, aparte de la modificación de la biota, en la aceleración de ciclo de descomposición y fijación de N en estos ecosistemas (Müller, Matson, Corre, & Veldkamp, 2015).

La fijación del nitrógeno depende únicamente de los microorganismos que poseen la capacidad de reducir el N de estado libre, que se encuentra en la atmosfera (N_2) a amonio (NH_4). El amonio puede ser asimilado fácilmente por otros organismos y las plantas. Sin este proceso existía una deficiencia de compuestos nitrogenados en los suelos, porque la fijación de N por microorganismos es esencial para los ecosistemas (Mantilla-paredes et al., 2009).

La adición de N afecta todos los procesos en el suelo, pero especialmente los procesos biológicos. (Craine et al., 2015). Los procesos biológicos son desarrollados por microorganismos (bacterias y hongos) que se encuentran asociados al tipo del suelo. Sus funciones en el ecosistema son de vital importancia para procesos bioquímicos y procesos de degradación, que resultan en una mayor disponibilidad de elementos químicos y nutrientes. Además, los microorganismos influyen de manera directa en el desarrollo de las especies microbianas (Castellanos et al., 2010).

Dentro de las comunidades microbianas las comunidades fúngicas son de gran interés, porque funcionan como un indicador de la salud de los ecosistemas. Una gran diversidad de hongos indica la capacidad de los ecosistemas para recuperarse ante daños ambientales (p.ej. adición excesiva de N). Además, las comunidades fúngicas juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica y en el ciclo

natural de N. Aparte de eso representan la mayor parte de la biomasa microbiana en los suelos (Ramírez, 2014).

El objetivo de este estudio es caracterizar la morfología básica y molecular de la diversidad de hongos de un suelo de bosque montano tropical en el sur del Ecuador. Los bosques montanos de esta región representan el 11% de los bosques montanos tropicales del mundo (Müller et al., 2015), pero sus suelos son altamente afectados por la adición excesiva de N. El presente trabajo analiza el impacto potencial asociado a la adición sostenida de N y la conservación de los hongos aislados mediante el método de criopreservación. El aislamiento implica algunas limitaciones, como la dificultad de obtener toda la composición fúngica del suelo (Ramírez, 2014), debido a que el método de diluciones aplicado solo permite aislar los hongos cultivables del suelo (Kirk et al., 2004). Otra dificultad es la identificación de las cepas fúngicas con métodos basados en la lisis del micelio del hongo y en técnicas moleculares para la extracción de ADN, debido a la descomposición de los ácidos nucleicos que puede causar problemas en el posterior análisis de PCR (Wintzingerode et al., 1997).

El trabajo está dividido en tres capítulos: el primer capítulo incluye el marco teórico donde se detalla la importancia de microorganismos (hongos) en la fijación de N. También se presentan los métodos generales de aislamiento y cultivo junto a los métodos de caracterización molecular (extracción de ADN – PCR). En el segundo capítulo se presentan los Materiales y Métodos usados, incluyendo una descripción del trabajo de campo y el análisis en laboratorio con los métodos aplicados a las muestras recolectadas y la caracterización molecular de cada una de las cepas aisladas. El tercer capítulo describe los resultados donde se expone la caracterización morfológica básica y molecular de los hongos cultivables del suelo.

CAPÍTULO I.

MARCO TEÓRICO

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar los cambios que se producen en la composición fúngica del suelo ante la adición sostenida de altos niveles de nitrógeno

Objetivos Específicos

- Caracterizar la morfología básica y molecular de la diversidad de hongos del suelo que potencialmente estaría asociada a cambios producidos por la adición sostenida de nitrógeno.
- Conservar mediante un método de criopreservación la diversidad de hongos microbianos aislados de suelos sometidos a una adición sostenida de nitrógeno.

1. Nitrógeno en los suelos Tropicales.

El N es un elemento considerado abundante en la atmósfera, se caracteriza por ser estable y debido a esta cualidad presenta dificultad para combinarse con otros elementos presentes en el medio ambiente. Sin embargo gracias a procesos biológicos que son llevados a cabo por bacterias y hongos. Este elemento puede ser asimilable al romper los enlaces de su estructura, por medio de enzimas dando como resultado compuestos nitrogenados que son asimilables por los diversos microorganismos presentes en los suelos (Ciceana, 2007).

La principal fuente de reserva de este elemento es la atmósfera, en donde se encuentra en un 78% (Perdomo & Barbazán, 1999). El N pasa por un proceso para poder asimilado por los diversos organismos. El ciclo del N está formado por 3 etapas: Amonificación, Nitrificación y Asimilación. La Amonificación es el proceso de descomposición de compuestos nitrogenados encontrados en el suelo a complejos orgánicos asimilables, este proceso es realizado por hongos y bacterias. El resultado de este proceso es la liberación del amoníaco (NH_3). La nitrificación es la oxidación del NH_3 y la generación de energía; como resultado óxido nítrico (NO). La asimilación es el consumo de los resultados anteriores por los microorganismos presentes en los suelos (Iñon, 2015).

Se considera que por hectárea de suelo existe aproximadamente 300.000 toneladas de N (Perdomo & Barbazán, 1999). Gracias a procesos microbiológicos el aire que se encuentra en el suelo es halla enriquecido por N_2O o NH_3 (Perdomo & Barbazán, 1999). Otra de las reservas importantes de N en los suelos es la materia orgánica del suelo (MOS) la cual es primordial para flujo del N. Un estudio realizado por Matus, F & Maire G en el 2000 muestra como resultado que la calidad de aportes orgánicos que se realicen en el suelo marcan diferencias en las tasas de mineralización del N. La mineralización del N es un proceso que se produce en los suelos (Echeverría, San Martín, & Bergonzi, 2000). La mineralización de dicho elemento empieza por la fragmentación del N, que se encuentra disponible para ser transformado a elementos que son asimilables por otros microorganismos, y de esta manera permitir la utilización del N en los diversos procesos biológicos (Echeverría et al., 2000).

Los microorganismos presentes en los suelos utilizan los resultados de la mineralización los cuales intervienen en dos grandes procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación. La nitrificación es un proceso que se realiza de manera aerobia (en presencia de oxígeno) que en gran parte depende del amonio ($\text{NH} + 4\text{NH}_4$)

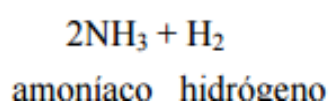
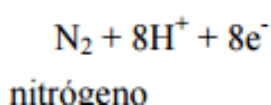
y por N orgánico que son utilizados como fuente de energía y por sustratos. Mientras que la desnitrificación es un proceso anaerobio (sin oxígeno) que se encuentra manejado en gran parte por los microorganismos y por la disponibilidad de nitratos (Müller et al., 2015).

Los procesos antes mencionados juegan un papel importante en el ciclo del N. En el suelo se considera que este ciclo se realiza de manera conservadora (ya que las tasas de producción de N y de consumo son similares), lo que da como resultado que el ciclo del N sea un proceso estable (Porter, Tonnessen, Sherwell, & Richard Grant, 2000)..

1.1 Fijación del nitrógeno por microorganismos.

La interacción y la composición es un factor de gran relevancia en las poblaciones microbianas del suelo (Sivila de Cary & Angulo, 2006). El papel de los microorganismos en la asimilación del N es primordial porque este se encuentra formando parte de los procesos orgánicos dentro de sus células. Una de las principales funciones que cumplen es la inmovilización temporal del N pasando a formar parte del “ciclo interno del Nitrógeno (Frioni, 2005).

El nitrógeno en los suelos se encuentra en valores próximos a 0.02 a 0.4% y en suelos orgánicos en un 2%. La mayor parte del N no puede ser asimilable directamente por los organismos, de tal manera que un gran porcentaje debe ser asimilado por medio de microorganismos (Frioni, 2005). Entre la microflora que se encuentra presente en los suelos y que a su vez interviene en los procesos de asimilación del N tenemos especies de bacterias como por ejemplo bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium* y facultativas como *Klebsiela*, pero también aerobias como *Azotobacter*, , también existen hongos, protozoarios, los cuales cumplen funciones por medio de enzimas extracelulares (Frioni, 2005). La asimilación del N por hongos se da por diversas enzimas, como es el caso de la dinitrogenasa (N₂-asa), que cataliza las reacciones de reducción y permite el paso de N a NH₃, dando paso a su vez a la liberación de hidrógeno (Rodríguez, Sevillano, & Sobramaniam, 1985).



1.2 Reino de los Hongos.

Los hongos son organismos que se pueden presentar de manera macroscópica y microscópica. Estos cumplen una función fundamental en los ecosistemas que habitan, ya que priorizan la degradación de los residuos orgánicos generados por otros seres vivos (Antonio, Castro, Castelán, Elena, & Casselis, 2014).

Comprenden la mayor parte de la biomasa que se encuentra en el suelo, su presencia se considera como un parámetro de evaluación de salud de un ecosistema. Producen un sin número de metabolitos secundarios que tienen propiedades valiosas a diferentes niveles de aplicación. Aunque los hongos han sido estudiados desde la antigüedad la mayoría de los organismos se mantienen sin caracterizar (Borneman & Hartin, 2000). Se conocen cerca de 80000 a 120000 especies de hongos hasta la actualidad, con un estimado de 1,5 millones de especies en total; son un grupo que generalmente se encuentra envuelto es disputas sobre su pertenencia en el grupo de Eucariotas (Webster, J., Weber, 2007).

Los hongos se encuentran interactuando con el suelo y se constituyen como uno de los conjuntos más destacados de organismos que influyen en el suelo. Debido a que interactúan con la parte biótica, abiótica y sus elementos (Blanco & Gutiérrez, 2014). Los procesos de interacción se llevan a cabo por medio de microorganismos como lo son bacterias y hongos, estos pueden ser de por medio de dos métodos químicos (lluvias y rayos) y biológicos (por microorganismos) por los cuales se puede lograr la fijación del N_2 atmosférico (Cerón & Aristizábal, 2012)

El método químico consiste en la combinación del elemento oxígeno con el N que se encuentra en la atmósfera se combinan. Cuando existen procesos naturales como lo son la liberación de rayos y lluvias, fenómenos que forman compuestos nitrogenados que son arrastrados por las lluvias a los suelos. La vía biológica se lleva a cabo por procesos de transformación de N_2 en NH_3 que se encuentra ionizado y pasa a ser NH_4 . Estos cambios son posibles gracias a enzimas nitrogenasas que son segregadas por bacterias y hongos (figura 1) (PQBio. 2007).

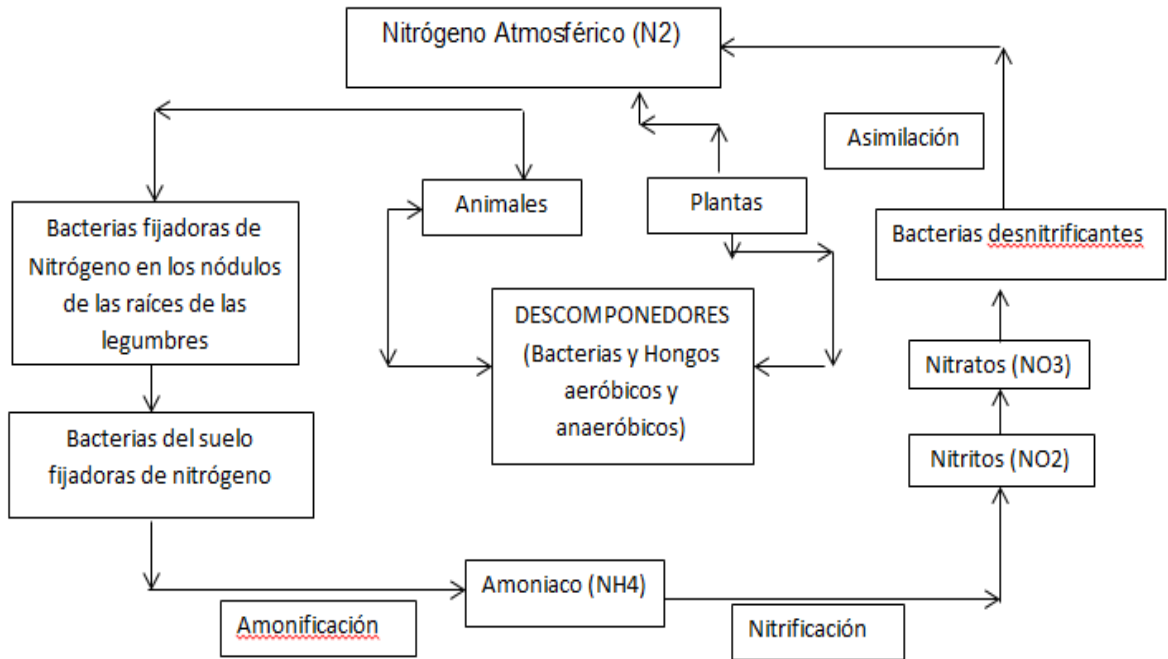
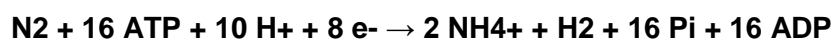


Figura 1: Esquema modificado de ciclo de nitrógeno (López, 2015).

1.3 Degradación del Nitrógeno por la Composición Fúngica del Suelo.

Los hongos son capaces de asimilar el N mediante procesos enzimáticos, los cuales consisten en romper los puentes de N. De esta manera quedan disponibles para ser asimilados por los diferentes microorganismos (Unavarra.es, 2016). La reacción química que se lleva a cabo es la siguiente.



Dicho complejo presenta sensibilidad ante el oxígeno, pero gracias a las adaptaciones que presentan los hongos permiten que se dé la fijación del N en vida libre y también en asociaciones con otros organismos como es el caso de las asociaciones hongo-bacteria (Unavarra.es, 2016).

1.4 Diversidad de hongos fijadores de nitrógeno

La diversidad se define como una propiedad que presentan los microorganismos a presentar variaciones (Tamez, 2003); desde la antigüedad se han realizado trabajos sobre la diversidad que existe en los suelos, sin embargo dichos estudios no describen en su totalidad la diversidad de la microflora del suelo, de aquí la importancia de medir las poblaciones microbianas (Sivila & Dominique, 1994).

Los microorganismos se encuentran distribuidos en gran parte de los ecosistemas, ya que poseen gran plasticidad lo que les permite estar en ecosistemas variados y con gran variedad de subambientes (Olalde & Aguilera, 1998). Una gran parte de microorganismos se encuentran degradando materia orgánica para hacer que esta se encuentre disponible para procesos biológicos y metabólicos de los mismos. La diversidad de hongos que se puede encontrar en los suelos “Según Mayea 1991 son, Giri 2005 los géneros más comunes en los suelos son: *Acrostalagmus*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pillularia*, *Cynlindrocarpon*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorunchus*, *Pythium*, *Chaeteomin*, *Rhizoctonia*”.

La diversidad de hongos que participan en los procesos de descomposición y fijación de nitrógeno según la literatura se encuentran formando parte del Phylum dentro del cual se encuentran *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Glomeromycota*, *Aureobasidium*, *Bionectria*, *Drechslera*, *Geomuces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Leptosphaeria*, *Penicillium*, *Tricoderma* entre otros (Avellaneda-Torres, L.M., Torres-Rojas, E. 2013).

1.5 Caracterización de Morfología Básica de Hongos.

La taxonomía aplicada a la identificación de hongos se basa en la descripción morfológica de las especies y géneros. Que dependen de las condiciones en que se conserven las cepas (González, 2014). Los errores generados por la precaria identificación morfológica de las cepas son solucionados con la aplicación de las técnicas moleculares que se fundamentan en el análisis de ADN extraído de las muestras aisladas (González, 2014).

La caracterización de la morfología básica de los hongos aislados en cultivos puros nos ayuda en la identificación a nivel de familia. Dicha caracterización puede ser acompañada de análisis moleculares (Garibay-Orijel, Morales-Marañón, Domínguez-Gutiérrez, Flores-García², & Flores-García, 2013). La caracterización de la morfología básica de los aislados se realizó tomando en cuenta caracteres básicos como es el tamaño de la colonia (pasado un tiempo de crecimiento de 7 días), de la misma manera se realizó la toma de la coloración que presentó y se obtuvo los datos de la forma que presento cada una de las colonias puras aisladas.

1.6 Métodos de aislamiento y cultivo en Hongos.

Para un mejor estudio de la diversidad de hongos, se realiza el aislamiento de colonias o fructificaciones fúngicas, los cuales pueden ser extraídos de varios tipos de ambientes. Los mismos que juegan un importante papel en procesos biológicos de los suelos (Cepero et al., Webster, J., Weber, 2007). Una de las limitantes del cultivo *in vitro* de los hongos es la incapacidad para esporular que tienen muchos de los aislados en medios de cultivo (Vanegas Berrouet, Gutiérrez Sánchez, & Marín Montoya, 2014)

Para el aislamiento de hongos se presentan varias técnicas que tienen por objeto aislar el material fúngico hasta llegar a un estado puro es decir que no presente contaminación alguna. Los cuales pueden ser específicos o generales. Entre las técnicas a ser utilizadas están el método de aislamiento directo, métodos de esporulación y método de dilución por esporas (Arias & Piñeros, 2008).

El aislamiento directo de las colonias de hongos es una técnica que permite replicar una colonia de hongos pura partiendo de un cultivo primario que se encuentre en estado de fructificación (García, Cappello, Leshner, & Molina, 2011). Para realizar un cultivo puro se parte de una muestra de suelo. A la muestra obtenida se le debe bajar la concentración a la que normalmente se encuentra presente en la muestra, por medio de una dilución. Estas diluciones se aplican por medio de tres métodos que son: siembra por estriado, vertido en placa y extensión de placa. El método que se utilizó en el desarrollo de esta metodología es de extensión en placa, el cual se realiza a partir de una solución madre concentrada de microorganismos de la cual se realiza una serie de diluciones, con la finalidad de obtener una mayor heterogeneidad de los microorganismos en el aislado (Mondino, 2012).

1.6.1 Métodos de cultivo *In Vitro* Solido.

El método de aislamiento para cultivo *in vitro* de hongos es necesario ya que este permite la obtención de aislados de colonias. El método de aislamiento de hongos en agar presta fuentes de energía necesaria, además de otros elementos como C, N, minerales y factores de crecimiento para que se desarrolle de manera óptima el cultivo de material fúngico. El medio utilizado en el presente proyecto es el "Rosa Bengala" y PDA los cuales poseen características que permiten un recuento selectivo, obteniendo una máxima recuperación de hongo. Además posee cloranfenicol que es considerado un antibacteriano de amplio espectro que inhiben la formación de bacterias; con un pH neutro que inhibe el crecimiento de células que se encuentren dañadas (Microkit, 1999).

1.6.2 Métodos de cultivo *In Vitro* líquido.

El cultivo líquido también se denomina caldo de cultivo y son preparados en tubos de ensayo con medios que proporcionan las condiciones necesarias para el crecimiento de los diferentes aislados fúngicos. El medio utilizado en este caso es el medio Potato Dextrose Broth (PDB) el cual es enriquecido con ácido, antibióticos y un pH medio para inhibir el crecimiento bacteriano en el caldo. El medio de cultivo líquido posee una base rica nutricionalmente para mejorar el crecimiento de hongos, que junto a la dextrosa, actúa como fuente de carbono (Conda, 1995).

1.7 Criopreservación en Hongos.

“La criopreservación tiene como objeto el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de los celular a bajas temperatura” (Ávila-Portillo, Madero, & López, 2006). El éxito de la criopreservación depende del crioprotectante utilizado, el cual es una sustancia que posee características hidrosolubles y con una baja toxicidad. Se encargan de disminuir el punto eutéctico (“punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro”) (Ávila-Portillo et al., 2006). Este método presenta algunas limitaciones. Como la formación de cristales de agua que pueden romper a las células y de esta manera causar efectos negativos en la reactivación de los aislados puros (Gutiérrez, 2009). En el presente estudio se utilizó el método de criopreservación, debido a los resultados favorables ante la conservación de hongos (Alarcon, 2006).

1.8 Caracterización Molecular de Hongos.

La caracterización molecular es una herramienta fundamental que utiliza ADN como base para la identificación de familias, géneros o especies de cualquier tipo de microorganismo. También permite la identificación entre cepas aisladas, dándonos a conocer las características de los microorganismos seleccionados (Universidad Complutense, 2016). Existen varias técnicas usadas en la caracterización de un microorganismo.

La técnica que se utilizó en el desarrollo de este proyecto fue la técnica de PCR aplicada a hongos, que nos permitió generar una identificación específica de cepas puras de las muestras aisladas, en nuestro caso nos ayudó en la caracterización de los géneros obtenidos de los cultivos puros aislados. Debido a su adaptabilidad y plasticidad morfológica que presentan los hongos, se hace difícil la identificación total

de una especie por lo cual la aplicación de las técnicas moleculares es necesaria; gracias a la secuenciación de genes ribosomales y sus transcritos internos como ITS (Internal Transcribed Spacer) y a las regiones conservadas de los mismos se puede realizar una identificación específica (Slemmons, Johnson, & Connell, 2012).

1.8.1 Extracción de ADN del Material Fúngico.

La caracterización de las diferentes colonias clasificadas morfológicamente se debe asegurar la secuenciación por medio de la extracción del ADN, para lo cual se utiliza la secuenciación de fragmentos tanto ribosomales como funcionales, ya que en estos dos fragmentos se encuentran las regiones que codifican la evolución de los individuos (Zuluaga, Buritica, & Marrín, 2011). Se utilizó el kit UltraClean Microbial DNA Insolation Kit de la compañía Mo Bio, que nos permite obtener ADN genómico con alta calidad partiendo de 1.8 ml de cultivo aislado de hongo puro (Mobio.com, 2016). El cual mediante procesos de lisis se obtiene un precipitado que ha pasado por una combinación de cambios de temperatura, detergentes y fuerza mecánica, dicho precipitado es el ADN requerido, posteriormente este es lavado para finalmente obtener un ADN de alta calidad (Mobio.com, 2016).

1.8.2 Reacción en cadena de la polimeraza (PCR) aplicada a Hongos.

En la actualidad las herramientas moleculares juegan un papel importante en la identificación de organismos, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Ayra, Cabrera, Gómez, & Hernández, 2001), esta técnica permite la unión de primers o cebadores a la cadena de ADN, el proceso requiere de una serie de ciclos en los cuales existen variaciones de temperatura, con la finalidad de que la cadena original se amplifique. (Costa, 2004).

Existen varios cebadores de PCR que se encargan de amplificar ADN_r de hongos, gracias a que posee una alta especificidad. Los primers utilizados en para el desarrollo de esta investigación son ITS1-F y ITS 5.8S, los cuales son cebadores generales para identificar secuencias de ADN (Borneman & Hartin, 2000).

CAPÍTULO II.
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio.

El muestreo fue realizado en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), ubicada a 30 km de la ciudad de Loja, en la provincia de Zamora Chinchipe dentro del Parque Nacional Podocarpus (P. Paladines, 2003). El muestreo de campo se realizó en el sector T1 específicamente en el transecto preestablecido NUMEX (Parra, 2011)

2.2 Muestreo de campo.

Las muestras fueron recolectadas de un transecto determinado de la reserva llamado Numex, el mismo que cuenta con bloques de muestreo con diferentes niveles de adición de minerales (Fig.4)

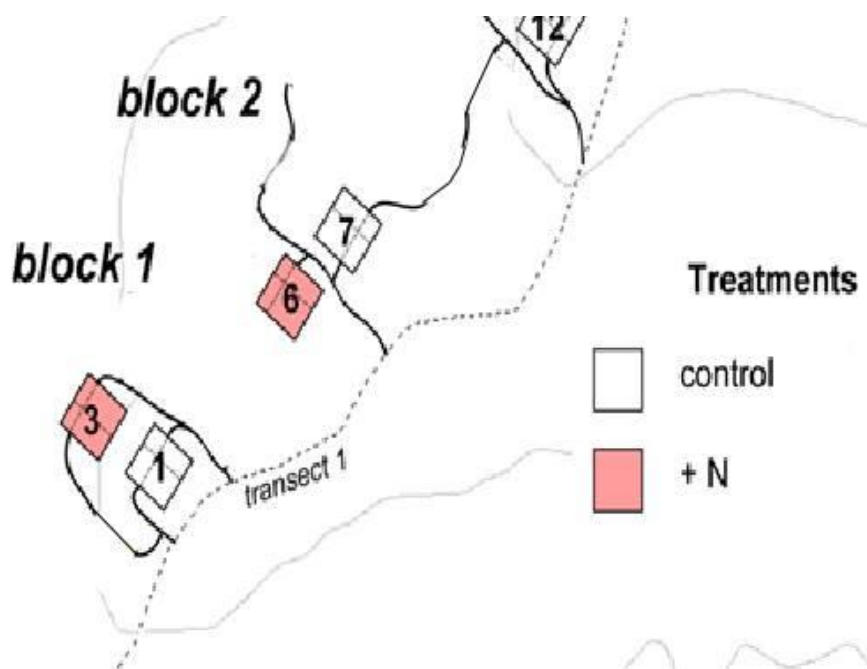


Figura 2: Modificado del Transecto Numex, identificación de la zona de muestreo (Homeier et al. 2012).

Para el realizar el muestreo de campo se utilizó el transecto preestablecido Numex, del cual se seleccionó el bloque 1 y 2 como se pueden observar en la figura 3. Cada bloque contiene dos parcelas la primera con suelos control (suelos sin ningún tratamiento de adición de minerales) y la segunda con adición de nitrógeno sostenido por nueve años consecutivos. Cada parcela tiene una medida aproximada de 10X10 m². Dando como resultado 4 parcelas muestreadas por los dos bloques seleccionados.

De cada parcela se extrajeron cinco muestras de suelo (Fig. 3) a una profundidad de 30 cm para evitar la recolección de materia orgánica, luego se etiquetó cada una de las muestras para mantener un registro de colección. Las muestras de suelo fueron llevadas a la Universidad Técnica Particular de Loja para su posterior análisis. Las muestras fueron almacenadas para mantener su viabilidad en congelador a -20°C en el Instituto de Ecología.

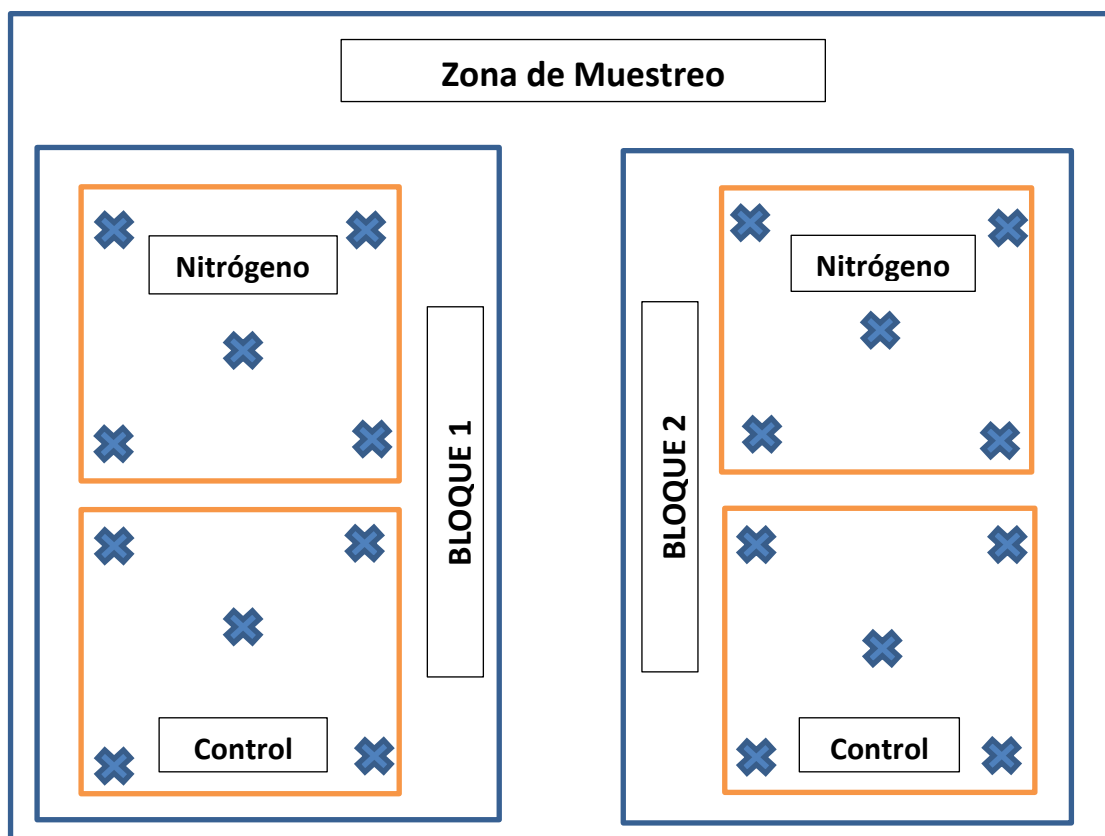


Figura 3: Puntos de muestreo dentro de las parcelas predeterminadas

2.3 Análisis de laboratorio.

El aislamiento de los hongos de suelo de los dos tratamientos se hizo por medio de diluciones seriadas. Primero de cada parcela se homogenizó las cinco muestras colectadas de suelo hasta lograr una muestra uniforme. Se pesó 1 gr de suelo por cada muestra homogenizada para proceder con las diluciones.

Para realizar las diluciones seriadas, se colocó seis tubos de ensayo en una gradilla, en cada tubo se agregó 9 ml de agua destilada previamente autoclavada, (durante 30 min a 120 atm.). Las diluciones se llevaron a cabo en la cabina de flujo laminar. Se colocó 1 gramo de suelo con la ayuda de una espátula en 100 ml de agua destilada autoclavada, la cual se denomina solución madre. Se transfirió 1 ml de la solución

madre al primer tubo de ensayo el cual será la disolución -1, y se agita hasta que se encuentre disuelto el material. Posteriormente a este proceso se tomó del primer tubo 1 ml de la solución para ser agregados al segundo tubo (disolución -2). Se repitió el procedimiento hasta llegar a la disolución -6. El proceso fue repetido para cada una de las 4 muestras, tomando en cuenta el cambio de puntas para la dilución.

2.3.1 Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para los procesos de aislamiento son: el medio Rosa Bengala (medio semisólido) y Potato Dextrose Broth PDB (medio líquido). El medio Rosa Bengala se prepara en 1lt de agua destilada con una medida de 32 gr de medio. Esta solución se calienta a una temperatura de 37° C y con agitación constante hasta que llegue a su punto de ebullición y el medio se haya disuelto totalmente. Posterior a este proceso se sella el matraz y autoclava por 30 min a 120 atm. La dispensación de los medios en las cajas Petri debe ser de manera inmediata pasado el periodo de autoclavado. Esto se realiza en una cabina de flujo laminar para mantener la esterilidad de los medios. El medio Rosa Bengala posee características (nutrientes) que prestan las condiciones ideales para el desarrollo y crecimiento de los hongos sembrados de las diluciones anteriormente realizadas (proceso que se explica en el apartado siguiente).

La elaboración del medio líquido da inicio con la adición de 24gr de medio en 1lt de agua destilada. La solución se lleva a una placa calentadora que debe estar a 37°C y esta debe llegar a hervor. Posteriormente se sella y se autoclava por 30 min a 120 atm. El paso de la solución a los tubos de ensayo previamente esterilizados, debe ser realizado en una cabina de flujo laminar, en donde con ayuda de una pipeta se coloca 20 ml de medio en cada tubo (6 tubos por tratamiento y 3 réplicas por cada tratamiento). Colocado el medio se procede al sellado hermético con un tapón de algodón y sellado con papel film para garantizar que los aislados no se contaminen. El medio de cultivo líquido permite la formación de la fructificación de hongo, lo que luego pasara por un proceso de filtrado para ser almacenado para una posterior extracción de ADN.

2.3.2 Siembra de las disoluciones en medio semisólido.

Para el aislamiento en medio semisólido se seleccionó las disoluciones de 10^{-3} a 10^{-5} , siendo estas las soluciones estándar en la determinación de unidades formadoras de colonia por cada gramo de suelo.

La siembra fue trabajada en la cabina de flujo laminar para garantizar la esterilidad de la zona e instrumentos de trabajo. Para la siembra se colocó 1 ml de cada disolución en cada caja Petri. Posteriormente se procedió a colocar aproximadamente 20 ml de medio de cultivo Rosa Bengala, el medio fue dispersado en una caja petri. Con ayuda de movimientos verticales de las cajas se logra la unificación y homogenización del medio y la disolución colocada.

Al solidificarse el medio se procede al sellado de las cajas con papel film para mantener el cultivo estéril. Finalmente se lleva las cajas petri a incubación por un periodo de 5 días y a una temperatura de 37°C, para luego realizar el conteo de las colonias y realizar un cuadro con la morfología básica de las colonias. Se realizó 3 repeticiones por cada disolución y se mantuvo los códigos iniciales para su posterior identificación.

2.3.3 Conteo de colonias por placa.

La cuantificación de las colonias por placa se realizó a los 2 días de crecimiento, con ayuda de una lupa y un contador. Se tomó en cuenta que las colonias que no se encuentren sobrepuestas por su crecimiento; se obtuvo un número total de colonias por caja petri para luego sacar las unidades formadoras de colonia.

2.3.4 Purificación de colonias de hongos.

Para la clasificación y posterior purificación de las colonias de hongos se tomó en consideración la morfología básica de las colonias como: el color, tamaño, y la forma de crecimiento de la colonia. La purificación se realizó en medio estéril (cabina de flujo laminar), los medios previamente fueron dispensados y gelificados.

Para proceder a aislar las colonias puras se tomó un fragmento de la parte interna de la colonia con un sacabocados, cuidando que esta no se encuentre sobrepuesta por otra, se la transporta con delicadeza para colocarla en el centro de la nueva caja Petri de manera que quede en contacto el hongo y el nuevo medio, finalmente se procede a sellar la caja con papel film para evitar contaminación. Se debe recalcar que entre la extracción de cada muestra se debe esterilizar el sacabocados al fuego hasta que el instrumento se torne de color rojo, para evitar contaminación entre colonias, como también debe ser etiquetada cada placa con el fecha y el código inicial.

Las cajas Petri con las nuevas siembras de cultivos se llevan a la incubadora por un tiempo de 5 días para ver los nuevos crecimientos, a una temperatura de 37°C,

pasado este tiempo se revisan y se siguen purificando para mantener la colonia viable; o se colocan a -4°C para conservar el material fúngico.

2.3.5 Criopreservación de los aislados puros.

El proceso de criopreservación de aislados puros inicio teniendo en cuenta una relación 70:30 de Potato Dextrose Agar (PDA) y glicerina. La elaboración de medio (PDA) (Probiotek, 2016) preparado según las indicaciones del fabricante (39 gr en 1lt de agua destilada). Para lograr la esterilización del material y del medio se procede a autoclavarlo, para posteriormente ser dispensados en tubos de criopreservación (autoclavados), este paso se debe realizar en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de los aislados puros. Seguidamente se procede a la siembra del material fúngico aislado (se mantiene los códigos iniciales) a partir de las cajas Petri con los aislados puros. El proceso consiste en topar una porción del hongo y ser colocado en el tubo de criopreservación, se esteriliza la parte superior del tubo y se sella. El crecimiento de la colonia tiene un tiempo de 7 días. Finalmente después de realizar la verificación del crecimiento de la colonia pura en cada uno de los tubos se procede a la adición del crioprotectante glicerina, para posteriormente ser trasladados a -4°C .

2.3.6 Siembra de hongos en medio líquido.

La siembra en el medio líquido es precisa la utilización del medio Potato Dextrose Broth (PDB), el cual es preparado según los requerimientos del fabricante, se preparan tubos de ensayo estériles en los cuales se coloca 20ml de medio y cada tubo es sellado con una tapón de algodón, estos se autoclavan por 30 min a una presión de 120 atm para ser esterilizados.

Seguidamente en la cámara de flujo laminar se procede a realizar la siembra, con ayuda de un asa estéril se procede a tomar una porción pequeña de la muestra (cultivo puro) y se introduce en el tubo de ensayo que contiene el medio PDB, se agita con el asa, se esteriliza la punta del tubo en el fuego y rápidamente este se sella con ayuda del tapón de algodón y papel film para evitar la contaminación. Este proceso se realiza con cada uno de los cultivos puros anteriormente obtenidos.

Terminado el proceso de sembrado en medio líquido, se procede a poner los tuyos en una incubadora a 37°C equipada con agitador el cual debe estar a 200 rpp por minuto, durante un periodo de 7 días para obtener crecimiento del hongo.

2.3.7 Filtrado del material fúngico.

Luego de obtener el material fúngico del medio de cultivo líquido se procede a filtrar el material. Con ayuda de un papel filtro doblado para evitar la pérdida de material, se debe colocar sobre un frasco recolector de soluciones (previamente esterilizado). Recalcando que el proceso se debe realizar en una cabina de flujo laminar con un mechero para mantener la zona de trabajo estéril. El proceso da inicio al retirar el tapón del tubo cerca del mechero y verter el contenido sobre el papel filtro, con ayuda de un asa estéril, se procede a colocar el hongo en un tubo eppendorf de 1.5 el cual conserva su código individual. Se realiza el mismo proceso para cada una de las muestras, esterilizando el asa con ayuda del mechero hasta que esta quede al rojo vivo entre cada muestra.

2.3.8 Extracción de ADN.

Se extrajo ADN de las muestras anteriormente filtradas (fructificación del hongo), se realizó la extracción con dos protocolos primero se probó con el protocolo estándar sugerido: Extracción DNeasy Plant Mini Kit extraction (Quiagen), por medio de cuantificación se observó que la calidad del ADN era baja en concentración (NanoDrop 2000, Thermo Scientific); se probó un segundo protocolo el kit UltraClean Microbial DNA Isolation Kit Mo Bio, el mismo que nos permite obtener ADN genómico con alta calidad (Mobio.com, 2016), mediante un proceso que conlleva una serie de pasos como: lisis, cambios de temperatura y lavado de ADN para obtener un precipitado final de ADN de alta calidad. El mismo que es evaluado nuevamente en el NanoDro para medir las concentraciones de nuestro producto final.

2.3.9 PCR.

Las PCR se realizaron con ayuda del termociclador (Pro Flex), las condiciones aplicadas fueron: un total de 35 ciclos, dando inicio con la desnaturalización a 95°C por un periodo de 3min, cada ciclo pasa por un estado de desnaturalización a una T° de 95°C por un tiempo de 1min. De acuerdo a los primers utilizados ITS 1f y ITS 5.8S se determinó la temperatura de anillamiento (42-65°C), y la extensión final de 72°C por 5min, con un volumen final de 25 µL, 1 µL de ADN y 0.5 µL de BSA (Suero de albumina bovino).

Cabe recalcar que los primers utilizados poseen secuencias específicas como son: secuencia del primer ITS 1f es: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA. Secuencia del

primer ITS 5.8 S su secuencia es: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (Nature.berkeley.edu, 2016).

2.3.10 Análisis de datos.

Las muestras fueron secuenciadas en la compañía MACROGEN (Korea). Las secuencias obtenidas se guardaron en formato FASTA para posteriormente se comparadas con las secuencias del GenBank, por medio de la utilización de la herramienta BLASTn; las secuencias homólogas seleccionadas de este programa nos sirvieron para brindar soporte a los resultados obtenidos. Esto permitió asignar un género a cada una de nuestras secuencias, tomando en cuenta el mejor hit. Con la ayuda de programa MEGA6 y de un análisis maximun likelihood, para la presentación de los resultados con la presentación del árbol filogenético.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización Morfológica básica de los hongos cultivables del suelo.

Los resultados obtenidos de acuerdo a la caracterización morfológica de los hongos cultivables de suelo, nos indican la variedad y cantidad de hongos encontrados morfológicamente son distintos, es así que se obtuvo un total de 43 morfotipos que son descritos de acuerdo al color, forma y tamaño de colonia como se puede constatar detalladamente en el Anexo 1 tabla 2.

3.2 Criopreservación

La reactivación de las 43 muestras previamente caracterizadas morfológicamente, y criopreservadas, se realizó a los 6 meses posteriores de haber sido criopreservadas, logrando un éxito de 98% de activación de las colonias de hongos anteriormente mencionadas (Anexo 2 Tabla 3).

3.3 Análisis de Filogenéticos.

El material genético proporcionado por las 43 muestras aisladas fue obtenido a partir de la secuenciación la región ITS 1, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos identificar la presencia de dos Phylum: Ascomycota y Zygomycota, dentro del Phylum Ascomycota se encuentran dos clados, Eurotiales y Hypocreales; dentro de Eurotiales se obtuvo los siguientes géneros *Penicillium* cf. *Citrinum*, *Aspergillus* cf. *Nigger* y *Aspergillus* sp. El clado Hypocreales presenta los géneros *Metarrhizium* sp. *Clonostachys* sp y *Tolypocladium* sp. En el filum Zygomycota se obtuvo el género *Morlierella* sp. (Tabla 1). En la figura 4 se muestra el árbol filogenético, obtenido con el método maximum likelihood, en el que se incluyen las 43 secuencias pertenecientes a los aislados puros obtenidos en este estudio.

Tabla 1: Cuadro de asignación de género mediante búsqueda por homología (BLAST) a cada uno de los aislados puros. Se detalla además el origen de cada aislado (bloques y tratamientos).

Código	Especie	Bloque			
		1		2	
		Suelo con Nitrógeno	Suelo Control	Suelo con Nitrógeno	Suelo Control
B1N3_3	<i>Aspergillus</i> sp.	+			
B2C3_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>				+
B2N4_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>			+	
B2C3_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>				+
B2C3_1-2	<i>Clonostachys</i> sp.				+
B2N3_3-4	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_3-7	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_3-6	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_1	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B1N3_2-2	<i>Metarhizium</i> sp.	+			
B1C3_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1C3_2-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1C4_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1C5_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1C3_1-4	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>		+		
B1N4_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N5_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N3_2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N3_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B2C5_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C5_1-1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C5_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C4_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2C5_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>				+
B2N3_3-5	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N3_3-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N4_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N4_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N4_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N4_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B2N3_3-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>			+	
B1N4_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N3_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrium</i>	+			
B1N3_2-1	<i>Tolypocladium</i> sp.	+			
B2N3_3	<i>Tolypocladium</i> sp.			+	
B2C3_1	<i>Zygomycota</i>				+

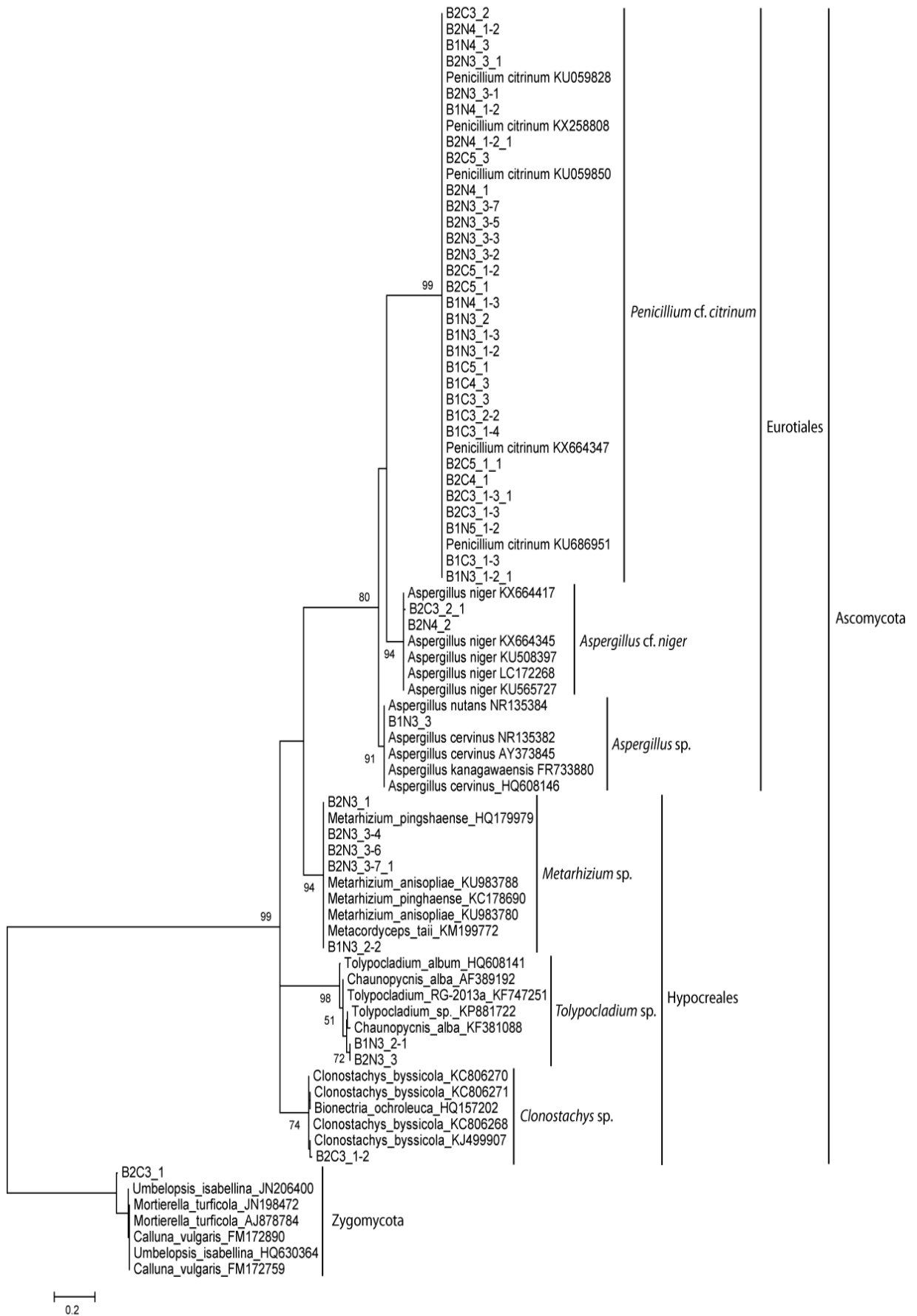


Figura 4: Árbol filogenético de la región ITS 1 obtenida de los aislados. El árbol presenta los géneros que se obtuvieron de la RBSF.; fue soportado con secuencias obtenidas del GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

3.4 Discusión.

De los resultados del aislamiento y posterior identificación de los aislados puros, se logró obtener un total de 43 aislados puros de ambos bloques, estos aislados representan a los hongos cultivables del suelo. Con la metodología aplicada no fue posible obtener un 100% de aislados del suelo; existen varias razones para justificar este hecho. Principalmente se toma en cuenta la distribución, debido a que estos no se encuentran distribuidos de manera uniforme en el suelo (Ramos Zapata, n.d.). La selección del medio es un factor muy importante al momento de incrementar el porcentaje obtenido de hongos cultivables del suelo, debido a que los nutrientes que contiene el medio favorecen el crecimiento del material fúngico. Cabe recalcar que la presencia del Clorofenicol en el medio Rosa Bengala asegura que no exista crecimiento de bacterias en los cultivos (Lynch & Hobie 1983). A pesar de las limitaciones que la metodología presenta, los resultados obtenidos generan un aporte de conocimiento científico sobre la composición fúngica de los suelos con adición de N.

Durante el análisis filogenético realizado fue posible identificar diferentes géneros de hongos presentes en los diferentes tratamientos (suelos con N y suelos control). Se identificaron los géneros *Penicillium cf. Citrinum* y *Aspergillus cf. nigger* en ambos bloques y en los dos tratamientos aplicados. Ello indica que estos géneros son capaces de adaptarse a la variación de disponibilidad de nutrientes (Pernía, Demey, Ysvic Inojosa, & Naranjo-Briceño, 2012). Existen varios estudios realizados en donde se ha encontrado que estos dos géneros pueden desarrollarse en suelos que han sido sometidos a diferentes tipos de estrés, en nuestro caso la adición sostenida de N (Snellman et al. 1988; Bokhary y Parvez, 1993; Oudot et al. 1993; April et al. 2000 and Arias & Piñeros, 2008).

La presencia del género *Penicillium cf. Citrinum* tanto en las parcelas con N como en las parcelas control. Se ve justificado debido a que este género es capaz de crecer en medios que se encuentran alterados, como se ha demostrado en el estudio publicado por (Jos & Posso, 2015). De la misma manera el género *Aspergillus* es versátil al momento de adaptar su metabolismo para utilizar una amplia cantidad de N en los suelos (Hernández, 2014).

Los géneros *Metarrhizium sp* y *Tolyocladium sp* fueron hallados en ambos bloques pero solo en suelos con adición de N. Las especies de estos géneros actúan como entomopatógenos (parásitos de insectos), endófitos y saprofitos, además pueden llegar a ser tóxicos (Gutierrez & Saldarriaga, 2004). La relación C:N que

mantienen los géneros *Metarrhizium sp* y *Tolypocladium sp*. con el suelo ocasiona un efecto positivo en aumento de la funcionalidad. Demostrado en el aumento de la biomasa fúngica y en la degradación e inmovilización del N. En presencia de altos niveles de N en el suelo las especies de estos géneros modifican sus estructuras para elevar su potencial de resistencia a la desecación y a su vez aumenta la producción de microsclerotia (estructuras que ayudan a la fijación de conideas). De esta forma estos hongos reducen la demanda de oxígeno y favorecen la inmovilización de nitrógeno en el suelo (Mascarin, Kobori, de Jesus Vital, Jackson, & Quintela, 2014) (Hermosín et al., 2010).

En el caso de los géneros como *Metarrhizium sp* y *Tolypocladium sp*. se encuentran beneficiados ya que estos aprovechan la disposición en exceso de N para utilizarlo en procesos de degradación de polímeros orgánicos y transformación de nutrientes dejándolo disponible para procesos biológicos de otros organismos (Allison, Czimczik, & Treseder, 2008).

En el bloque dos con tratamiento control se encontraron los géneros *Clonostachys sp* y *Morliarella sp*. Los miembros del género *Clonostachys sp*. se desarrollan como mico parásito de otros hongos. A su vez son vulnerables a alteraciones en la mineralización proveniente de la fertilización del suelo, siendo considerados como bioindicadores de ecosistemas (Moratto, Martínez, Valencia, & Sánchez, 2005) (Bustillos & Soto, 2008). Lo anterior justifica que solo se haya podido aislar el género *Clonostachys sp* y *Morliarella sp* de las parcelas control. En el caso de *Morliarella sp*. es un género que se encuentra ampliamente relacionado con la presencia de C, está involucrado en la degradación de la celulosa. (Ortiz, Rubio, & Benito, 2015). El género *Morliarella sp* no se encuentra presente en los bloques con tratamiento de N, debido a que en este caso el exceso de nitrógeno presente en los suelos estudiados disminuye la producción radical en las plantas. Como resultado que se reduzcan las asociaciones en planta y hongo, por lo tanto que disminuye su crecimiento (Salinas, 2015).

Los resultados de este estudio nos permitieron identificar diversos géneros de hongos que se encuentran asociados a la respuesta por estrés a la adición continua de nitrógeno en los suelos de la RBSF.

La utilización de la combinación del medio PDA más la adición de glicerina en una relación 70:30 respectivamente, permitió obtener el resultado deseado en la criopreservación de los aislados. De los 43 morfotipos aislados e identificados se realizó la criopreservación, con un 99% de éxito en la reactivación de material. Se sabe que los tiempos de conservación de material fúngico en criopreservación son

críticos para la supervivencia celular (Ávila-Portillo et al., 2006). Se ha comprobado que el mejor crioprotectante para la criopreservación de hongos es la glicerina (Gutiérrez, 2009). Debido a que previene la acumulación de agua y la formación de cristales que pueden romper la membrana celular, gracias a su bajo peso molecular (Ávila- Blagodatskaya et al., 2006).

CONCLUSIONES

- El empleo de técnicas de cultivo in vitro de microorganismos es útil para la identificación de hongos con niveles variables de resistencia a N.
- El diseño experimental seguido (segregación de parcelas control y con tratamiento) permitió identificar especies fúngicas con un grado diferente de tolerancia a la deposición de N.
- Se concluyó que los géneros *Metarrhizium* sp y *Tolypocladium* sp presentes en este trabajo, se identifican como más resistentes a la elevación del nitrógeno. Se sugiere la utilización de los géneros antes mencionados en técnicas de inoculación, con la finalidad de ser aplicados en suelos perturbados por alta deposición de N.
- Se sugiere el uso de miembros del género *Clonostachys* sp y *Morliarella* sp como bioindicadores del impacto de la fertilización nitrogenada en ecosistemas tropicales.

RECOMENDACIONES

Para la obtención de más información de la relación que presentan los cultivos puros aislados con la adición de nitrógeno.

- Se recomienda la implementación de N en los cultivos puros de hongos, de tal manera que se pueda controlar las condiciones de crecimiento y a su vez identificar los cambios que se puedan producir en estos.
- En cuanto a la parte morfológica se recomienda la ampliación de los análisis de caracterización morfológica básica a análisis más completos (morfolología a nivel de microscopia), la implementación de estos análisis permitirá la identificación más exacta de los cultivos aislados.
- La recolección de las muestras de suelo se debe hacer tomando en cuenta la época de frutificación de las comunidades fúngicas para asegurar recolectar la mayor cantidad de material fúngico, y de esa manera aumentar las posibilidades de obtener una mayor diversidad de hongos cultivables del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon, D. I. A. (2006). Evaluación de Técnicas de Conservación para Hongos Filamentosos y Levaduriformes en el Cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Álvarez, E., Ospina, C. A., Mejía, J. F., & Llano, G. a. (1998). Caracterización Morfológica, Patogénica y Genética del Agente Causal de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en Guanábana (*Annona muricata*) en el valle Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 28(1), 1–8.
- Allison, S. D., Czimczik, C. I., & Treseder, K. K. (2008). Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest. *Global Change Biology*, 14(5), 1156–1168. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01549.x>
- Antonio, M., Castro, M., Castelán, C., Elena, M., & Casselis, R. (2014). Los hongos, 95, 17–22.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. *PhD Proposal*, 1. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., & López, C. (2006). Fundamentos De Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 57(4), 291–300. <http://doi.org/10.2164/jandrol.106.000869>
- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., & Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. *Dpto. de Ácaros Y Hongos Entomopatógenos, Instituto de Investigaciones En Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.*
- Baldos, A. P., Corre, M. D., & Veldkamp, E. (2015). Response of N cycling to nutrient inputs in forest soils across a 1000–3000 m elevation gradient in the Ecuadorian Andes. *Ecology*, 96(3), 749–761. <http://doi.org/10.1890/14-0295.1>
- Blanco, F., & Gutiérrez, R. (2014). EFECTO DE LA *Mucuna* sp. EN LA COMPOSICION DE LA COMUNIDAD DE BONGOS MA DEL SUELO Y EN LA RESPUESTA DEL MAIZ A LA INOCULACION CON BONGOS MA. *Igarss 2014*, 22(1), 1–5. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Borneman, J., & Hartin, R. J. (2000). PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4356–4360. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4356-4360.2000>

- Castellanos, O., Melissa, D., Zabala, B., Beatriz, L., Botía, R., Mauricio, D., ... Rebeca, R. (2010). CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS ASIMBIÓTICAS ASOCIADAS AL EUCALIPTO (*Eucalyptus* sp.) EN CODAZZI, CESAR (COLOMBIA). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 1–7.
- Cerón, L., & Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285–295.
- Ciceana. (2007). Ciclo del nitrógeno, 56–59. Retrieved from http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/webfm_send/109
- Ciceana. (2007). Ciclo del nitrógeno, 56–59. Retrieved from http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/webfm_send/109
- CONDA. (1995). Potato Dextrose Broth Cat N° : 1261, 1, 1–2.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. <http://doi.org/10.1157/13059826>
- Echeverría, H. E., San Martín, N. F., & Bergonzi, R. (2000). Metodos Rapidos De Estimacion De Nitrogeno Potencialmente Mineralizable En Suelos. *Ciencia Del Suelo*, 18(1), 9–16.
- Froni, L. (2005). *Microbiología Básica, ambiental y agrícola*.
- García, M., Cappello, S., Leshner, J., & Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*, 21–28.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, Flores-García², M., & Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S1870345313728379/1-s2.0-S1870345313728379-main.pdf?_tid=a09b31be-1ca7-11e6-b253-00000aab0f01&acdnat=1463541876_c32869a1d517d76f92ec4daa8d0f5573
- González, A. (2014). Identificación Molecular Y Métodos De Conservación De Levaduras Y Hongos Filamentosos De Muestras Provenientes.
- Gutiérrez, A., & Saldarriaga, Y. (2004). Observacion de la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en soldados *Nasutitermes* sp. (Isoptera Termitidae).
- Gutiérrez, Y. A. P. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*,

11(2), 8–18.

- Hermosín, B., Nováková, A., Jurado, V., Láiz, L., Porca, E., & Rogelio, M. A. (2010). Observatorio microbiológico de cuevas: evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas Caves microbial observatory: assessment and control of fungal communities in show caves, 513–520.
- Hernández, S. D. (2014). “Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma* tomate. Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta.” *Culturas de La Seducción*. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=h6y6BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA11&dq=Universidad+de+salamanca&ots=6M7IkfNK_3&sig=YLozhRFcnOEw1w7tkrt oVBW4InI
- Iñon, N. (2015). Ciclo del Nitrogeno. *Wiki*, 4. Retrieved from http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_del_nitrógeno
- Jos, E., & Posso, S. (2015). Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos.
- Kirk, J.L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.N.; Lee, H.; Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58, pp 169-188.
- Lynch J. M. y Hobie J.E. 1983. *Microorganisms in action: concepts and applications in Microbial ecology*. Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña.
- Mantilla-paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña-venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana, 57(December), 915–927.
- Mascarin, G. M., Koberi, N. N., de Jesus Vital, R. C., Jackson, M. A., & Quintela, E. D. (2014). Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1583–1590. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>
- MICROKIT, L. (1999). Rosa bengala cloranfenicol agar, (34), 1–4.
- Mobio.com. (2016). Isolate high quality DNA from microbial cultures. [online] Available at: <https://mobio.com/products/dna-isolation/microbial/ultracleanr-microbial-dna->

- isolation-kit.html [Accessed 28 Sep. 2016].
- Mondino, P. (2012). Métodos de aislamiento, 1–7.
- Montaño, N. M., & Sandoval, A. L. (2007). Contaminación Atmosférica y salud, 29–33.
- Moratto, C., Martínez, L. J., Valencia, H., & Sánchez, J. (2005). The effect of land use on phosphate solubilising fungi and diazotrophic bacteria on the bleak uplands of páramo of Guerrero, Cundinamarca department. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 299–309. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652005000200015&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Müller, A. K., Matson, A. L., Corre, M. D., & Veldkamp, E. (2015). Soil N₂O fluxes along an elevation gradient of tropical montane forests under experimental nitrogen and phosphorus addition. *Frontiers in Earth Science*, 3(October), 1–12. <http://doi.org/10.3389/feart.2015.00066>
- Nature.berkeley.edu. (2016). Primer Sequences. [online] Available at: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/tour/primers.html> [Accessed 28 Sep. 2016].
- Olalde, V., & Aguilera, L. (1998). Microorganisms and Biodiversity. *Terra Larinoamericana*, 16, 289–292.
- ORTIZ, C., RUBIO, A., & BENITO, M. (2015). Influencia de la composición vegetal en la actividad microbiana del suelo en el límite de árbol en el sistema central. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1, 1–12. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- P. Paladines, R. L. (2003). Fundación Científica San Francisco. *Fundación Científica San Francisco*, 5(2), 139–141.
- Parra, S. (2011). Universidad del Azuay Facultad de Ciencia y Tecnología Autor Silvia Patricia Parra Suárez Danilo Minga Ochoa, 4.
- Perdomo, C., & Barbazán, M. (1999). Nitrógeno, 70. Retrieved from <http://www.fagro.edu.uy/~fertilidad/publica/Tomo N.pdf>
- Pernía, B., Demey, J. R., Ysvic Inojosa, & Naranjo-Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis, (July 2015).
- Porter, E., Tonnessen, K., Sherwell, J., & Richard Grant. (2000). El Nitrógeno en la Lluvia Nacional, 1–66.

- Probiotek. (2016). Agar De Dextrosa y Papa. [online] Available at: <http://www.probiotek.com/producto/agar-de-dextrosa-y-papa/> [Accessed 3 Oct. 2016].
- Ramírez, A. B. (2014). Estudio de la biodiversidad fúngica en el suelo del viñedo de la Finca La Grajera. *Univerdad de La Rioja*.
- Ramos Zapata, J. A. (n.d.). Capítulo III. Los organismos. Microorganismos del Suelo. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/429/organismos.pdf>
- Rodríguez, C., Sevillano, F., & Sobramaniam, P. (1985). La fijación de nitrógeno atmosférico. *Temas Monográficos CSIC-Diputación ...*, 1, 65. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:La+fijaci+n+de+nitr+geno+atmosf+rico#1>
- Rolando Hermes Cerda Bustillos, & Soto, G. (2008). Calidad de suelos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*), banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el valle de Talamanca, Costa Rica, *Maestría e*, 66.
- PQBio. (2007). Los microorganismos del suelo y la biotecnología en la agricultura. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Disponible en: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=87>
- Salinas, C. uriel flores. (2015). Evaluación de la Tasa de Crecimiento de *Phytophthora cinnamoni* Rands en Medios Alternativos.
- Sivila de Cary, R., & Angulo, W. (2006). Efecto del descanso agrícola sobre la microbiota del suelo (Patarani - Altiplano Central boliviano). *Ecología En Bolivia*, 41(3)(3), 103–115. Retrieved from <http://www.scielo.org.bo/pdf/reb/v41n3/v41n3a08.pdf>
- Sivila, R., & Dominique, D. C. (1994). El estado microbiológico del suelo, indicador de una restauración de la fertilidad. *Ecología*, 185–197.
- Slemmons, C., Johnson, G., & Connell, L. B. (2012). Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. *Antarctic Science*, 25(01), 44–50. <http://doi.org/10.1017/S0954102012000879>
- Tamez, C. (2003). *Biodiversidad*, 2, 1–17.
- Torrachi, S. (2002). Deforestación de Bosques Montanos y patrones de pérdida de hábitats en la región sur del Ecuador. Retrieved from

<http://sig.utpl.edu.ec/sigutpl/staftpro/sig/paperambiental.PDF>

Unavarr.es. (2016). organismos fijadores de nitrógeno. [online] Available at: http://www.unavarr.es/herbario/leguminosas/htm/organismos_fijadores_L.htm [Accessed 3 Oct. 2016].

Universidad Complutense. (2016). Detección y Caracterización Molecular de Microorganismos. [online] Available at: <https://www.visavet.es/es/docencia/ciencias-veterinarias/data/Deteccion%20y%20caracterizacion%20molecular%20de%20microorganismos.pdf> [Accessed 28 Sep. 2016].

Vanegas Berrouet, K. M., Gutiérrez Sánchez, P. A., & Marín Montoya, M. A. (2014). Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 143. <http://doi.org/10.15446/abc.v19n2.39154>.

Wintzingerode, F.V.; Gobel, U.B.; Stackebrandt, E. (1997). Determination of Microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol.* 21, pp 213-229.

Webster, J., Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. <http://doi.org/10.2307/2806321>

Zuluaga, C., Buritica, P., & Marrín, M. (2011). Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina Colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28s. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 517–540.

ANÉXOS

ANEXO 1

Tabla 2: Caracterización morfológica de hongos cultivables del suelo

Bloque	Estrés	Número de Muestra	Código	Color	Forma de la colonia	Tamaño de la colonia
1	Control	1	B1C-5 3	BLANCO	CIRCULAR	8.5
		2	B1C-3 2 (2)	ROSA	CIRCULAR	5.5
		3	B1C-3 3	ROSA-AMARILLO	CIRCULAR	3.5
		4	B1C-3 1	CAFÉ-ROSA	ALARGADO	7.4
		5	B1C-3 1(3)	ROSA	CIRCULAR	7.3
		6	B1C-3 1(4)	ROSA	CIRCULAR	8.5
		7	B1C-4 1(3)	ROSA PASTEL	CIRCULAR	0.5
1	Nitrógeno	8	B1N-5 1	ROSA PASTEL	CIRCULAR	5.2
		9	B1N-4 1(2)	NEGRO	CIRCULAR	3.8
		10	B1N-4 3	NEGRO	CIRCULAR	4
		11	B1N-4 2(1)	VERDE-ROSA	ALARGADO	6.7
		12	B1N-3 2	FUCSIA	CIRCULAR	3.9
		13	B1N-3 3	VERDE-AMARILLO	ALARGADO	7.1
		14	B1N-3 1(3)	ROSA	CIRCULAR	6.5
		16	B1N-3 1(2)	BLANCO	CIRCULAR	8.5
		17	B1N-3 2(1)	VERDE	CIRCULAR	5
		18	B2C-3 2	ROSA	CIRCULAR	4.5
2	Control	19	B2C-5 1(2)	VERDE CLARO	ALARGADO	5
		20	B2C-3 1(3)	BLANCO	ALARGADO	8.5
		21	B2C-3 1	VERDE-AMARILLO	ALARGADO	6
		22	B2C-5 1	ROSA PASTEL	CIRCULAR	4.3
		23	B2C-5 3	AMARILLO-VERDE	CIRCULAR	4.1
		24	B2C-4 1	ROSA PASTEL	CIRCULAR	6.8
		25	B2C-3 1(3)	ROSA PASTEL	CIRCULAR	7
		26	B2C-3 1(2)	ROSA PASTEL	CIRCULAR	5
		27	B2C-5 1	ROSA	CIRCULAR	6
		28	B2C-5 2	ROSA	CIRCULAR	4.8
		29	B2N-3 3(5)	CREMA	CIRCULAR	8
2	Nitrógeno	30	B2N-3 3(4)	ROSA	CIRCULAR	5
		31	B2N-3 3(3)	ROJO	CIRCULAR	7.3
		32	B2N-3 3(1)	VERDE-ROSA	CIRCULAR	6.7
		33	B2N-3 3(7)	VERDE	ALARGADO	6.8
		34	B2N-3 3	BLANCO	CIRCULAR	8.5
		35	B2N-4 1	FUCSIA	CIRCULAR	8.5
		36	B2N-4 1(2)	ROSA	CIRCULAR	6.6
		37	B2N-3 3(6)	VERDE-ROSA	CIRCULAR	8.5
		38	B2N-4 1(2)	NEGRO	CIRCULAR	4.7
		39	B2N-4 1	NEGRO	CIRCULAR	4

		40	B2N-4 2	CREMA	CIRCULAR	4.4
		42	B2N-3 3(2)	VERDE	CIRCULAR	8.5
		43	B2N-3 1	ROSA	CIRCULAR	7
		44	B2C-3 2	AMARILLO	CIRCULAR	8.2
		45	B1N-4 1 (3)	ROSA	CIRCULAR	5.8
2	Control	46	B2N-3 3	FUCSIA	CIRCULAR	7.4
1	Nitrógeno	48	B2C-3 2	ROSA-NEGRO	CIRCULAR	7.2
1		54	B1C-3 1	ROSA	CIRCULAR	6.9
		55	B1N-3 1(2)	ROSA	ALARGADO	5.4
2	Nitrógeno	56	B1N-3 2(1)	CAFÉ	CIRCULAR	4.7
	Control	69	B2C-3 2	BLANCO	CIRCULAR	6

ANEXO 2

Tabla 3: Reactivación de Muestras Criopreservadas

Bloque	Estrés	Número de Muestra	Codigo	Reactivación
1	Control	1	B1C-5 3	x
		2	B1C-3 2 (2)	x
		3	B1C-3 3	x
		4	B1C-3 1	x
		5	B1C-3 1(3)	x
		6	B1C-3 1(4)	x
		7	B1C-4 1(3)	x
1	Nitrógeno	8	B1N-5 1	x
		9	B1N-4 1(2)	x
		10	B1N-4 3	x
		11	B1N-4 2(1)	x
		12	B1N-3 2	x
		13	B1N-3 3	x
		14	B1N-3 1(3)	
		16	B1N-3 1(2)	x
17	B1N-3 2(1)	x		
2	Control	18	B2C-3 2	x
		19	B2C-5 1(2)	x
		20	B2C-3 1(3)	x
		21	B2C-3 1	x
		22	B2C-5 1	x
		23	B2C-5 3	x
		24	B2C-4 1	x
		25	B2C-3 1(3)	x
		26	B2C-3 1(2)	x
		27	B2C-5 1	x
		28	B2C-5 2	x
2	Nitrógeno	29	B2N-3 3(5)	x
		30	B2N-3 3(4)	
		31	B2N-3 3(3)	x
		32	B2N-3 3(1)	x
		33	B2N-3 3(7)	x
		34	B2N-3 3	x
		35	B2N-4 1	x
		36	B2N-4 1(2)	x
		37	B2N-3 3(6)	x
		38	B2N-4 1(2)	x
		39	B2N-4 1	x
		40	B2N-4 2	x
		42	B2N-3 3(2)	x

		43	B2N-3 1	x
2	Control	44	B2C-3 2	x
1	Nitrógeno	45	B1N-4 1 (3)	x
	Nitrógeno	48	B2C-3 2	x
		54	B1C-3 1	x
1	Control	55	B1N-3 1(2)	x
		56	B1N-3 2(1)	x
	Control	69	B2C-3 2	x