



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

**Caracterización morfo-molecular de hongos anamorfos del cepario UTPL y
evaluación de su potencial antibacteriano.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Estrada Sotomayor Karla del Rocío

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, Ph. D.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, “Caracterización morfo-molecular de hongos anamorfos del cepario UTPL y evaluación de su potencial antibacteriano.” realizado por Karla del Rocio Estrada Sotomayor, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo del 2017

.....

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Karla del Rocío Estrada Sotomayor declaro ser el autor (a) del presente trabajo de titulación: Caracterización morfo-molecular de hongos anamorfos del cepario UTPL y evaluación de su potencial antibacteriano, de la titulación de Biología siendo Darío Javier Cruz Sarmiento director (a) 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"

.....

Estrada Sotomayor Karla del Rocío
1104906746

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios, mi eterna fortaleza.

A mis padres, por ser mi mayor ejemplo de perseverancia y esfuerzo, gracias por llenarme de amor y enseñarme a no rendirme nunca, por ser el pilar fundamental de mi vida.

A mis hermanos, Carlos y Danna, por su apoyo incondicional y brindarme siempre su alegría.

Karla del Rocío Estrada Sotomayor

AGRADECIMIENTO

A mis abuelos, por siempre creer en mí y alentarme a dar lo mejor de mí.

A mi tía, por ser un apoyo indispensable en mi vida y que de una otra forma ha contribuido con la culminación de esta etapa.

Al Ph.D. Darío Cruz, por permitirme ser parte del Fungario por brindarme su confianza, enseñanzas y disposición en todo momento durante la realización de esta tesis.

Al equipo humano del Fungario, en especial a Oscar y Arianna por apoyarme cuando lo necesité y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis amigas, por haberme brindado siempre su amistad y compartir gratos momentos.

Al M.Sc Luis Cartuche por su colaboración y enseñanzas que aportaron a la finalización del presente trabajo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera especial a la Titulación de Biología, y a todos los maestros que fueron parte de mi formación académica.

Karla del Rocío Estrada Sotomayor

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Los hongos.....	6
1.2. Ciclo de vida y sexualidad de los hongos.	7
1.3. Diversidad en el mundo y distribución en el Ecuador.....	7
1.4. Clasificación morfo-molecular.....	8
1.5. Importancia de los hongos en biotecnología.....	8
1.6. Métodos de evaluación antibiótica.....	9
1.7. Pruebas de sensibilidad.....	9
1.8. Objetivos	9
CAPÍTULO II.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1. Especímenes fúngicos y bacterianos.....	12
2.2. Análisis morfo-molecular.....	13
2.3. Análisis filogenético.....	14
2.4. Evaluación del potencial antibiótico.....	14
2.4.1 Pruebas antagónicas - medio sólido.....	14
2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	15
CAPÍTULO III.....	16
RESULTADOS	16

3.1. Caracterización morfo-molecular.	17
3.2. Pruebas antagónicas en medio sólido.	24
3.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI).	26
CAPÍTULO IV	28
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	33
RECOMENDACIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	42
ANEXO 1. Protocolo De Extracción De ADN: DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen:.....	43
ANEXO 2. Obtención De Extractos Fúngicos.....	44
ANEXO 3. Crecimiento micelial en medio PDA, mostrando diversidad macro-morfológica según la cepa.....	45
ANEXO 4. Secuencias ITS-5.8S, obtenidas para las diferentes cepas estudiadas.....	46
ANEXO 5. Secuencias LSU (D1/D2), obtenidas para las diferentes cepas estudiadas.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A-O. Microscopía de 15 cepas de hongos anamorfos, teñidas al 1% con Ploxine, aumento de 100x. A-C. Género <i>Trichoderma</i> A, UTPL(CF)-72 flechas negras indicando conidióforos ramificados en dos verticilios y conidios en forma circular B, UTPL(CF)-85 conidioesporas redondas agrupadas (flecha negra) y clamidioespora intercalar globosa (flecha negra) C, UTPL(CF)-92 clamidioespora terminal globosa (flecha negra) D-F. Género <i>Fusarium</i> D, UTPL(CF)-81 macroconidio en formación (flecha negra).....	18
Figura 2: A-F. <i>Trichoderma viride</i> , cepa UTPL(CF)-9. A, Micelio verdoso-amarillento sobre medio de cultivo PDA+madera a los 15 días a 27°C. B, Ilustración indicativa de conidioforos en verticilios de tres a cuatro en forma de pino y conidias redondas. C-D. Fotografías flechas negras indican: conidióforos ramificados, fiálides dispuesta simetricamente y conidias redondos teñidos con Ploxine 1%.....	19
Figura 3: A-F. <i>Trichoderma asprellum</i> , cepa UTPL(CF)-80. A, Micelio verde oscuro distribuido uniformemente sobre medio de cultivo PDA+madera a los 15 días a 27°C. B, Ilustración indicativa (flechas negras) conidióforos en verticilos de dos a tres en forma de pino y conidias subglobosas. C-D. Fotografías, flechas negras indican: conidióforos ramificados, fiálides dispuesta simetricamente y conidias redondos teñidos con Ploxine 1%..	20
Figura 5: Halos de inhibición generados por <i>Trichoderma asprellum</i> como antagonismo positivo sobre las bacterias A, <i>Klebsiella pneumoniae</i> B, <i>Proteus vulgaris</i> C, <i>Staphylococcus aureus</i> .	25
Figura 6: Antagonismo positivo con halos de inhibición generados por <i>Trichoderma asprellum</i> frente a A, <i>Escherichia coli</i> B, <i>Proteus vulgaris</i> C, <i>Staphylococcus aureus</i> D, <i>Salmonella typhimurium</i>	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Códigos de colecta y almacenamiento de las cepas fúngicas estudiadas.....	12
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para las pruebas antagónica y medios de cultivos líquidos específicos según la especie.	12
Tabla 4. Comparación entre la identificación morfológica de las diferentes cepas versus la similitud por Blast desde las secuencias obtenidas para cada cepa estudiada.	21
Tabla 5. Diámetro del halo de inhibición obtenido mediante pruebas antagónicas de dos cepas de Trichoderma frente a siete bacterias de interés clínico. diámetro del halo de inhibición.	24
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria de los diferentes extractos de Trichoderma spp. frente a siete especies de bacterias de interés clínico.	27

RESUMEN

Los hongos poseen una enorme diversidad, escasamente conocida. Sobreviven en diferentes ambientes por lo que son importantes sintetizadores de una elevada diversidad de compuestos químicos. Bajo este contexto, este estudio busca caracterizar morfológica y molecularmente 20 cepas de hongos anamorfos y evaluar su potencial antimicrobiano a través de pruebas antagónicas con bacterias de interés clínico. La identificación morfológica se llevó a cabo mediante la descripción y comparación de estructuras microscópicas. Molecularmente se caracterizaron amplificando la región ITS-5.8S y LSU de ADNrn. El potencial antimicrobiano se evaluó a través del método de difusión en agar considerándose positiva cuando presentaban halos de inhibición. El CMI se determinó a partir de los extractos por el método de microdilución en caldo. Integrando los datos morfológicos y moleculares, 11 cepas correspondieron a especies dentro de cinco géneros de ascomycetes. Dos especies *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp.2 generaron halos de inhibición contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria mostraron que los extractos de estas dos especies fueron poco eficientes contra las bacterias evaluadas.

Palabras clave: Morfología, molecular, actividad antibacteriana, ascomycetes, CMI, *Trichoderma*.

ABSTRACT

Fungi have an enormous but little known diversity. They survive in different environments so they are important synthesizers of a high diversity of chemical compounds. In this context, this study aims to characterize morphologically and molecularly 20 strains of anamorphic fungi and evaluate their antimicrobial potential through antagonistic tests including bacteria with clinical interest. The morphological identification was carried out by the description and comparison of microscopic structures. Molecularly they were characterized by amplifying the region ITS-5.8S and partial LSU of rDNA. The antimicrobial potential was evaluated through the agar diffusion method and considered positive in presence of inhibition halos. The Minimum Inhibitory Concentration MIC was determined from the extracts by the broth microdilution method. Integrating the morphological and molecular data, 11 strains correspond to different species within five genera of ascomycetes. Two species *Trichoderma* sp.1 and *T.* sp.2 generate inhibition halos against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. The MIC values shows that the extracts for the two species were inefficient against the evaluated bacteria.

Key words: Morphology, molecular, antibacterial activity, ascomycetes, CMI, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación tiene como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente varios hongos anamorfos (estados asexuales) del cepario UTPL y evaluar su potencial antimicrobiano a través de pruebas antagónicas con bacterias de interés clínico.

Este trabajo está dividido en cuatro capítulos los mismos que poseen los siguientes apartados: Capítulo I contiene el marco teórico en donde se describe a los hongos, su ciclo de vida y sexualidad, la clasificación morfo-molecular y su importancia, así como a los métodos de evaluación antimicrobiano. El capítulo II está enfocado a materiales y métodos, donde se detalla ordenadamente desde la selección de los especímenes fúngicos y bacterianos, el análisis morfo-molecular, filogenético y las pruebas antagónicas tanto en medio sólido como la concentración mínima inhibitoria (CMI). El capítulo III detalla cada uno de los resultados obtenidos gracias a la metodología empleada. Por último, el Capítulo IV contiene la discusión, en la cual se compara y se discute nuestros resultados con respecto a los estudios ya publicados por otros investigadores para así poder elaborar algunas conclusiones.

Ecuador es un país que posee las condiciones favorables para el desarrollo de una gran diversidad biológica como flora, fauna y microbiota (Bussmann, 2005). No obstante organismos como los hongos han sido escasamente estudiados. Los hongos son muy diversos, principalmente en su morfología y ecología, pero también muy diversos con respecto a los compuestos químicos que sintetizan (Piepenbring, 2015). Se ha evidenciado que muchos de sus compuestos bioactivos presentan actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida o nematocida (Meneses, 2003, Yandry et al. 2006, González et al. 2012). Sin embargo, organismos como las bacterias desarrollan mecanismos de resistencia frente a sustancias como los antibióticos, por lo que hay que buscar nuevos compuestos para combatir enfermedades infecciosas (Hernández et al. 2008, Leiva et al. 2004). Estas sustancias activas pueden ser de mucha utilidad para el ser humano, por lo que se investigan con fines de bioprospección (Adrio & Demian, 2003). Así mismo, estos estudios tienen que ir de la mano con la taxonomía (caracterización morfológica y molecular), para identificar a que grupos taxonómicos pertenecen estas especies y así redireccionar futuras investigaciones (Infante et al., 2009). Los hongos se pueden convertir a futuro en fuentes renovables de metabolitos para el control de enfermedades infecciosas causadas principalmente por bacterias (Fernández et al., 2003).

Por esta razón, se identificó (morfológica y molecularmente) varias cepas de hongos almacenados en el cepario UTPL y evaluar su potencial antagónico contra bacterias, para a

futuro aprovecharlos como fuentes naturales de metabolitos bioactivos. Para ello se utilizó 20 de las cepas de hongos almacenadas en el del cepario UTPL y siete cepas bacterianas patógenas para seres humanos proporcionadas por la sección de Bioensayos perteneciente al área de Química Aplicada de la UTPL. Para la caracterización morfológica nos basamos en revisión de estructuras microscópicas (ej. conidias) de cada una de las cepas. Se registró fotográficamente todas las estructuras más relevantes para describirlas y compararlas con diferentes claves taxonómicas. Las técnicas moleculares usadas fueron la extracción de ADN, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis y secuenciación. Los protocolos a aplicarse para hongos en cultivo están debidamente estandarizados en varios trabajos anteriormente realizados por el equipo del fungario. La prueba de antagonismo contra bacterias se realizó por el método de antibiograma (Duraipandiyar et al., 2006), la misma que nos permitió identificar que hongos tienen potencial actividad antibiótica frente a varias especies de bacterias de interés clínico. Desde las especies de hongos activas contra bacterias se obtuvieron extractos para evaluar a que concentraciones son eficaces de actividad, por medio de la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI; Trigos et al., 2005). Correlacionando los datos morfológicos y moleculares, 11 cepas fueron identificadas, las mismas que pertenecieron a cinco géneros de ascomycetes. De todas las cepas analizadas, dos demostraron actividad antagónica *Trichoderma viride* y *Trichoderma asperellum*. A través del método de antibiograma estas dos cepas fueron activas contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*, con halos de inhibición desde 10 mm hasta 34 mm. En la prueba de CMI los extractos resultaron poco eficientes contra las bacterias evaluadas.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Los hongos.

Originalmente fueron descritos como parte del reino vegetal hasta que Whittaker (1969) desarrollo una nueva clasificación, ubicándoles dentro del reino Fungi. Este reino encierra una inmensa biodiversidad con funciones ecológicas que son clave en todos los ecosistemas (Herrera & Ulloa, 1990). Contienen una membrana nuclear y otros orgánulos rodeados de membrana, característica que define a los eucariontes. Sin embargo, su morfología y modo de vida le permite diferenciarse fundamentalmente de animales y plantas (Adl et al., 2005). Dentro del núcleo se encuentran uno o dos nucleoides pequeños y varios cromosomas. Su pared celular está constituida principalmente por quitina y en pocos casos con celulosa. Las hifas constituyen la unidad estructural de los hongos altamente septados, en algunos casos fibulados es decir la unión entre dos células binucleadas cercanas una misma hifa (Basidiomicetes) (Herrera y Ulloa, 1990) Las hifas en conjunto forman una masa conocida como micelio. El micelio es el encargado de dar lugar al cuerpo fructífero y posicionar las estructuras germinales. El himenio (estructura fértil) forma los orgánulos reproductores, ya sea basidias, esterigmas y esporas que son claves en la reproducción sexual (Crespo, 2008). Los hongos carecen de procesos fotosintéticos y no fijan carbono por la falta de clorofila, además son heterótrofos y en su gran mayoría aerobios, es decir necesitan oxígeno libre (Papagianni, 2004).

Su fuente de energía son carbohidratos complejos que se pueden encontrar en la materia orgánica muerta u organismos vivos (saprófitos), causando daño siendo parásitos (patógenos) u obteniendo beneficio mutuo (simbiontes) (Berbee & Taylor, 1992). El rol principal que cumplen los hongos en el medio ambiente es ser descomponedores de sustratos orgánicos, pero también tienen funciones como formadoras de micorrizas, colonizadores de sustratos estériles en el medio ambiente y controladoras de patógenos tanto en plantas o animales (Webster & Weber, 2007).

Dentro de todos los grupos de hongos existen varias especies microscópicas, entre las que se destacan los hongos anamorfos (con reproducción asexual), que poseen una extensa distribución tanto en ambientes naturales y antrópicos adaptándose a todos los ecosistemas (Shenoy et al., 2007). Sin embargo, Arias et al. (2010) señala que la mayoría de los estudios sobre hongos anamorfos se han enfocado en los patógenos, dejando un vacío de conocimiento sobre diversidad de otros grupos de hongos no patógenos y con alto potencial en la biotecnología como facilitadores de descomposición de restos vegetales y el reciclaje de nutrientes (Figuerola et al., 2016).

1.2. Ciclo de vida y sexualidad de los hongos.

El ciclo de vida de los hongos es versátil, puesto que se evidencian cambios estructurales que comprenden fases nucleares en distintas generaciones, muchas veces simultáneamente durante el desarrollo asexual y sexual del organismo (Hawker, 2016). Generalmente el hongo con multiplicación sexual se denomina teleomorfo y con reproducción asexual se denomina anamorfo. Solo ciertas especies presentan las dos formas de reproducción, denominándose holomorfo (Gams, 1995), ejemplo de ello son las levaduras que en su fase sexual forman esporas y en su fase asexual realizan gemación o fisión binaria (Zeng & Zhuang, 2014).

Generalmente los hongos conocidos como verdaderos son haplontes, es decir sus núcleos haploides se multiplican por mitosis y solo un pequeño grupo son diplo-haplontes. Los ciclos de vida tanto de Basidiomycota y Ascomycota tienen una fase dicariótica que no presentan el resto de grupos de hongos. El proceso empieza cuando dos células con núcleos haploides se fusionan por plasmogamia, al pasar de un tiempo desde la plasmogamia los dos núcleos se fusionan (cariogamia) y se ubican en una célula madre de un meiosporangio. Este meiosporangio se llama asco (ascomycetes) o basidio (basidiomicetes). La división de los núcleos haploides se da por meiosis donde hay recombinación genética. Los resultantes de estos núcleos haploides son repartidos generalmente en cuatro meiosporas haploides que serán las encargadas de dispersar la recombinación genética (Taylor et al., 2000).

La reproducción sexual permite el intercambio del material genético. Por otro lado, la reproducción asexual es un proceso en el cual las distintas fases mitóticas promueven la proliferación del organismo obteniendo abundantes individuos con células reproductoras especializadas (Charya, 2015).

1.3. Diversidad en el mundo y distribución en el Ecuador.

Las distintas estrategias de reproducción hacen que a nivel mundial existan más de cinco millones de especies de hongos, donde alrededor de 75000 especies han sido descritas hasta el momento (Blackwell, 2011). Hawksworth (2001) hizo una estimación de 1.5 millones de especies de hongos fundamentada en la relación de 6:1 (seis hongos por cada planta vascular). Ecuador es un país megadiverso, con alrededor de unas 16500 plantas vasculares (Læssøe & Petersen, 2008), por lo que si hacemos la relación de 6:1 tendríamos un estimado de 96000 especies de hongos. Algunas bases de datos e investigaciones reportan aproximadamente 3776 taxones conocidos en Ecuador, lo que representa solo el 4% de la diversidad de hongos que potencialmente habría en este territorio (Læssøe & Petersen, 2008).

1.4. Clasificación morfo-molecular.

Durante muchos años se ha debatido sobre la correcta clasificación de los organismos, en especial los hongos. El uso de descripciones simples, la falta de un registro fósil útil, y la elevada diversidad de hongos han sido los principales impedimentos para una correcta identificación, principalmente a nivel de especies. La nomenclatura actual para la clasificación taxonómica de los hongos generalmente incluye reino, división o filum, clase, familia, género y especie (Haro & Melic, 2002). Históricamente, la clasificación de estos organismos se fundamentaba en los caracteres observables, es decir, a través de características macroscópicas (ej. tamaño, color de fructificaciones) y microscópicas (ej. hifas, esporas etc.). Esto dejó muchas veces varios taxones dentro una misma especie, lo que causa actualmente discrepancias taxonómicas (Guarro et al., 1999). El descubrimiento de la secuenciación del ADN y el uso de filogenias permitió el análisis de una multitud de especímenes en los diferentes grupos clasificados a través de la taxonomía clásica, reformulándose y permitiendo la nueva clasificación de 10 filos como miembros del reino de los hongos. Los grupos descritos más importantes que hasta la actualidad posee el reino de los hongos son Basidiomycota y Ascomycota. Además posee otras divisiones como Glomeromycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota (Hibbet et al., 2007).

1.5. Importancia de los hongos en biotecnología.

Los hongos se reportan en varias investigaciones como potenciales sintetizadores de compuestos o sustancias útiles en diversos campos, especialmente el biotecnológico. Por lo que es importante descubrir nuevos especímenes con mayores alcances en el campo industrial (Piepenbring, 2015).

La industria alimenticia ha involucrado a los hongos como facilitadores de varios procesos, por ejemplo las levaduras aplicadas en la fermentación de vino (*Saccharomyces ellipsoideus*), fermentación de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y en la maduración de los quesos (*Geotrichum candidum*, *Penicillium candidum* y *Penicillium roqueforti*). Existe otro grupo de hongos que son utilizados en la cocina como por ejemplo los champiñones (*Agaricus bisporus*, *Tricholoma matsutake*), y otros que pertenecen a *Agaricales*, *Boletales* y *Cantharellales* (Pitt & Hocking, 2009).

En la actualidad se conoce productos eficientes obtenidos a partir de hongos para combatir patógenos, como la penicilina aislado desde *Penicillium chrysogenum*, o las cefalosporinas extraídas desde *Cephalosporium chrysogenum*. Estos antibióticos son empleados para control bacteriano en medicina humana (Adrio & Demian, 2003), en la agricultura se destaca la

beauvericina de *Beauveria brongniartii* (Strasser et al., 2000), las ofiobolinas de *Cochliobolus heterostrophus* empleadas como nematocidas (Anke & Sterner, 1997), y alantrifenona, alantripineno y alantrileunona aislado desde *Eupenicillium* spp. como insecticidas (Fabio et al., 2005).

1.6. Métodos de evaluación antibiótica.

Estas técnicas son básicas para encontrar nuevos organismos que contrarresten el crecimiento de patógenos (Murugaiyan, 2015). Estos ensayos son prácticamente simples, ágiles, repetibles, económicos y permiten obtener un amplio rango de muestras evaluando varios extractos en periodos cortos de tiempo (Amraoui et al., 2014). La producción de enzimas, cambios en su metabolismo y la producción de sustancias nocivas son los mecanismo de resistencia para los agentes antimicrobianos (Gómez et al., 2003).

1.7. Pruebas de sensibilidad.

Actualmente se cuenta con distintos métodos de referencia para pruebas de sensibilidad de hongos frente a bacterias. Una de ellas es la difusión en agar o denominado método de Kirby-Bauer, descrito por Bauer et al. (1966). Esta técnica se fundamenta en la inhibición del crecimiento antimicrobiano mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido formando halos de inhibición. Otro método es la técnica de microdilución en caldo que permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), este método consiste en obtener extractos desde cultivos líquidos bacterianos o fúngicos para ser inoculados dentro de pocillos de una microplaca (ej. TC96, por sus 96 pocillos). La inoculación es sobre distintas diluciones del extracto a ensayar y así obtener concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo. Es decir define la menor concentración del extracto necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba (Langfield et al., 2004).

1.8. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar morfológica y molecularmente varios hongos anamorfos (estados asexuales) del cepario UTPL y evaluar su potencial antimicrobiano a través de pruebas antagónicas con bacterias de interés clínico.

Objetivos específicos del proyecto

-Analizar morfológicamente y molecularmente 20 hongos anamorfos del cepario parte del herbario UTPL.

-Realizar un “screening” con pruebas antagónicas de cepas de hongos frente a cepas de bacterias de interés clínico.

-Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para todos los hongos positivos en pruebas antagónicas.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Especímenes fúngicos y bacterianos.

Se trabajó con 20 cepas de hongos puros (Tabla 1), aislados desde hongos que fueron recolectados por el equipo de la sección fungario del herbario UTPL. Estos especímenes pertenecen a la colección cepario UTPL, almacenados en medio agar papa dextrosa (PDA). Estas cepas fueron seleccionadas por características como su morfología, pigmentación y rápido crecimiento.

Tabla 1. Códigos de colecta y almacenamiento de las cepas fúngicas estudiadas.

N°	CÓDIGO	CEPARIO UTPL(CF)
1	IR026	UTPL(CF)-7
2	IR028	UTPL(CF)-9
3	IR072	UTPL(CF)-44
4	IR076	UTPL(CF)-46
5	IR078	UTPL(CF)-47
6	IR084	UTPL(CF)-51
7	IR097	UTPL(CF)-72
8	IR110	UTPL(CF)-80
9	IR123	UTPL(CF)-81
10	IR127	UTPL(CF)-82
11	IR128	UTPL(CF)-83
12	IR130	UTPL(CF)-85
13	IR131	UTPL(CF)-86
14	IR148	UTPL(CF)-89
15	IR166	UTPL(CF)-92
16	IR223	UTPL(CF)-98
17	IR238	UTPL(CF)-125
18	IR298	UTPL(CF)-252
19	EM183	UTPL(CF)-290
20	EM371	UTPL(CF)-337

Fuente: Autora

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizaron siete bacterias entre Gram + y Gram - (Tabla 2), las mismas que estaban almacenadas en crioreservas a -80 °C en el Departamento de Química Aplicada de la UTPL.

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para las pruebas antagónica y medios de cultivos líquidos específicos según la especie.

	Microorganismo	
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> = (Ec)*	Caldo Tryptisoya
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> = (Kp)*	Caldo Tryptisoya
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> = (Pa)*	Caldo Tryptisoya
	<i>Proteus vulgaris</i> = (Pv)*	Caldo Muller Hinton (Difco)

	<i>Salmonella typhimurium</i> = (Wt)*	Caldo Oxoid No (Oxoid)
Gram Positivas	<i>Enterococcus faecalis</i> = (Ef)*	Caldo Infusión Cerebro Coraz+ON (Bacto TM)
	<i>Staphylococcus aureus</i> = (Sa)*	Caldo Triptisoya

*Abreviaturas usadas en el texto para las diferentes bacterias

Fuente: Autora

2.2. Análisis morfo-molecular.

Se describió macroscópicamente a cada cepa de acuerdo a sus características físicas, como por ejemplo: crecimiento, coloración de micelio, formación de sclerocios. Se analizó microscópicamente el micelio del cultivo teñido con Phloxine 1%, seguida con decoloración por medio de KOH 10%. Se buscó estructuras como hifas, esporas (conidios), fíbulas etc. usando magnificaciones de 10x hasta 100x y registrando fotográficamente cada una de estas estructuras. Se hicieron ilustraciones detalladas únicamente para los especímenes positivos en pruebas antagónicas con el fin de definir su especie por medio de claves taxonómicas.

Se realizó la extracción de ADN para las 20 cepas recogiendo una pequeña cantidad de micelio evitando tomar demasiado agar. El proceso se siguió acorde a las normas de manufactura para *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) (Anexo 1). El ADN obtenido se amplificó mediante PCR usando primers universales: ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3', White et al., 1990) y NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3', White et al., 1990), y así obtener la región ITS1-5.8S-LSU parcial (D1/D2) (White et al., 1990). Las condiciones de PCR fueron como sigue: 35 ciclos, empezando con una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, cada ciclo contiene un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, las temperaturas de anillamiento según la combinación de primers, (55 °C) por 30 segundos, una extensión a 72 °C durante 2 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. El volumen de reacción de la PCR fue de 20 µL: 18 µL de Platinum ® PCR Supermix de Invitrogen, 0,2 µL de cada primer, 0.4 µL de BSA (albúmina de suero bovino) al 10% y 1,5 µL de ADN.

Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% más solución 1X de Gel Red (Biotium) y sus condiciones de corrida 128 V, 300 mA, 25 min. Se usó 1.5 µL de marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen), así mismo 2 µL de producto de PCR más 2 µL 5X Green GoTaq® Reaction Buffer. El medio líquido de corrida fue el buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA).

Para la purificación de los productos positivos se utilizó el Kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol, empleando volúmenes 1.1 de PEG (20% Polietilenglicol 8000, 2.5 M NaCl) e

incubados a 37 °C por 15 min. Se esperó la formación de pellet por centrifugación a velocidad de 14000 rpm, por 15 min. El residuo de pellet recuperado se lavó con etanol (frío) al 80%. Se dejó secar el pellet para luego resuspenderlo con agua desionizada. Finalmente, se envió los productos de PCR para ser secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul - Korea).

2.3. Análisis filogenético.

Las secuencias obtenidas se editaron en el programa Codon Code Aligner V.4.2.4. Cada secuencia fue comparada con otras secuencias de la base de datos GenBank (NCBI) mediante búsqueda rápida de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de las cuales se seleccionó la secuencia que tenga el porcentaje más elevado de similitud (80-100).

Las secuencias de este estudio y las obtenidas desde la base datos GenBank se alinearon por separado para las regiones ITS y LSU. Los alineamientos se efectuaron con la opción "GINS-i" implementada en MAFFT v5.667 sin correcciones manuales (Kato et al., 2002). De estos alineamientos se construyeron dos árboles filogenéticos (Figura 2). El primer árbol fue a partir únicamente de las secuencias ITS-5.8S (Figura 2, A). En el segundo árbol solamente se utilizó la región LSU parcial (D1/D2) (Figura 2, B).

Las filogenias fueron inferidas por medio de análisis Neighbor Joining y Maximun likelihood empleando el software MEGA V.5, con los parámetros de corrida: 1000 réplicas de bootstrap (BS), modelo General time reversible (GTR) y probabilidad Distribución Gamma (Felsenstein, 1985).

2.4. Evaluación del potencial antibiótico.

2.4.1 Pruebas antagónicas - medio sólido.

Previo a la prueba antagónica en medio sólido, se prepararon los inóculos bacterianos en caldos de cultivos nutritivos específicos para cada cepa (Tabla 2). Las condiciones de incubación para todas fueron de 37 °C durante 14–16 horas. El crecimiento y concentración adecuada para inoculación bacteriana se evaluó visualmente hasta que el medio llegue a la turbidez.

Las cepas bacterianas que pasaron toda la noche (14-16 horas) en medio líquido se colocaron en una solución salina de cloruro de sodio 0,9%, equivalente a 0,5 McFarland, durante 10 minutos, previo a su sembrado en estriado en caja Petri con medio sólido Muller Hinton (DIFCO). Una vez realizada la siembra y luego de aproximadamente 15 min se procedió a

realizar tres pocillos u orificios libres de 10 mm con un tubo estéril, orientados dentro de la caja como puntos de un triángulo. Estos pocillos sirvieron para inocular el hongo a evaluar.

Finalmente inoculado el hongo se incubaron las placas de forma invertida a 36 °C por un periodo de 24, 48 ó 72 horas dependiendo del surgimiento de los halos de inhibición para su medición.

2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se obtuvieron extractos a partir de los hongos que resultaron positivos con halos de inhibición bacteriana en los medios sólidos. El procedimiento detallado para la obtención de extractos se describe en el Anexo 2.

Para evaluación de CMI se utilizaron microplacas de 96 pocillos siguiendo el procedimiento de dilución doble seriada de la siguiente manera: 180 µL de caldo Muller Hinton o Caldo Sabouroud según corresponda al primer pocillo y 100 µL a todos los pocillos restantes, luego se adicionó 20µL de la disolución del extracto a probar en el primer pocillo, después se realizaron diluciones seriadas tomando 100 µL del primer pocillo y diluyendo con 100 µL del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener ocho diluciones consecutivas. El mismo procedimiento se siguió para el control de esterilidad (180 µL caldo + 20 µL extracto), el control negativo (180 µL caldo + 20µL DMSO) y el control positivo (180 µL caldo + 20 µL Gentamicina® o Itraconazol). Se selló las placas y se incubó a 37°C por un período de 24 horas, para su posterior lectura.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3.1. Caracterización morfo-molecular.

De las 20 cepas seleccionadas se eliminaron tres por motivos de contaminación. De las 17 cepas restantes, se pudo caracterizar morfológicamente 11 cepas, utilizando como criterio de separación el crecimiento miceliar que generó diferentes formas y colores sobre medio sólido PDA (Anexo 3). Además, las cepas produjeron estructuras de desarrollo asexual como por ejemplo conidióforos, conidias, clamiosporas (Figura 1). Estos estados asexuales permitieron determinar los especímenes hasta nivel de género. Todas las cepas evaluadas pertenecen a ascomycetes. Seis cepas (UTPL(CF)-7,46,47,82,89,124) presentaron micelio estéril (carecen de estructuras reproductivas) por lo que no se pudieron ubicar en ningún grupo fúngico (Figura 1, J–O).

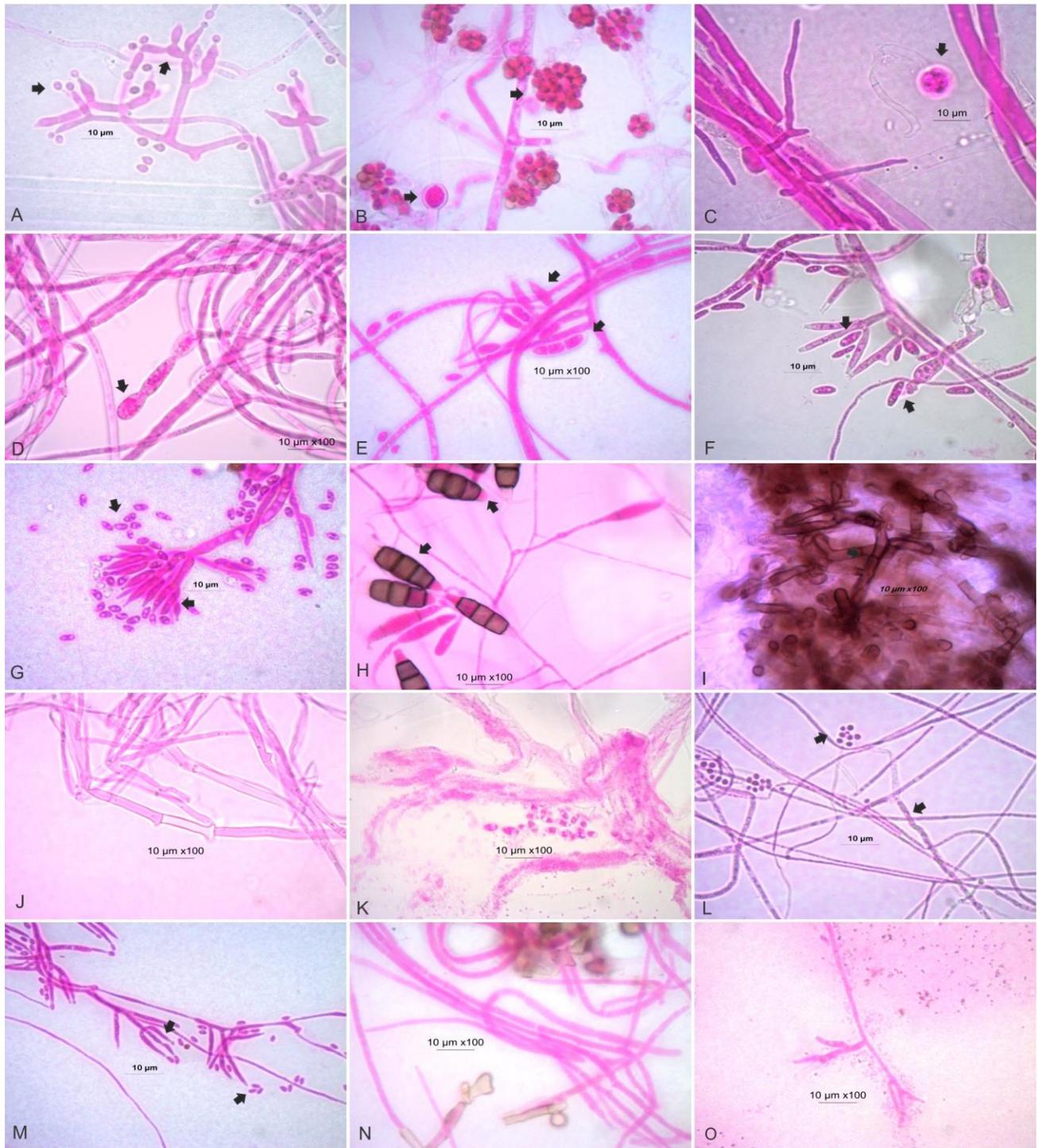


Figura 1: Observaciones microscópica de 15 cepas (dos cepas ver más adelante) de hongos anamorfos, teñidas con Ploxine al 1%, aumento de 100x. A-C: Género *Trichoderma*, UTPL(CF)-72 (A), las flechas negras indican conidióforos ramificados en dos verticilios y conidios en forma circular. UTPL(CF)-85 (B), conidioesporas redondas agrupadas (flecha negra) y clamidioespora intercalar globosa (flecha negra). UTPL(CF)-92 (C), clamidioespora terminal globosa (flecha negra). D-F: Género *Fusarium* UTPL(CF)-81 (D), macroconidio (flecha negra).UTPL(CF)-86 (E), flechas negras indican macroconidios curvados o elipsoidal. UTPL(CF)-290 (F), fiálides alargadas y microconidios ovoides. Género *Clonostachys* (G), UTPL(CF)-44 conidióforos sencillos verticilados (flecha negra) y conidias subglobosas (flecha negra) Género *Pestalotiopsis* (H),UTPL(CF)-83 conidios segmentados pigmentados. Género *Xylarya* (I), UTPL(CF)-371 hifas septadas J-O: Cepas con micelio estéril UTPL(CF)-46 (J), células con fluidos celulares. UTPL(CF)-82 (K), hifas, conidios. UTPL(CF)-124 (L), hifas delgadas, alargadas. UTPL(CF)-7

(M), fiálides rectangulares (flecha negra) y conidios ovoides (flecha negra). UTPL(CF)-47(N), hifas alargadas UTPL(CF)-89 (O), hifas en formación. A-O. Barras = 10 μ m

Fuente: Autora

Paralelamente al análisis morfológico se efectuaron las pruebas antagónicas donde se determinó dos cepas potencialmente productoras de antibióticos por lo que se analizaron y describieron con más detalle. A continuación se describen estas cepas.

***Trichoderma viride*.** Ascomycete de la familia Hypocreaceae, puede crecer en medio sólido PDA, pero en medio sólido PDA + madera produce una colonia densa amarillenta y verdosa, hifas aéreas abundantes, conidiación notada después de cinco días en numerosos gránulos o mechones escamosos de color verde amarillo y gradualmente remarcando una zona con un anillo concéntrico. Conidióforos ramificados (2-) 3 (-5) μ m de ancho, fiálides en su mayoría dispuestos simétricamente, solitarios o divergentes en verticilos de tres a cuatro (2-) 2.5 μ m de ancho, rectos o ligeramente curvos o sinuosos. Conidios verdes, globosos o subglobosos, lisos (2-) 3 (-4) μ m \times (2-) 3 (-4) μ m (n=31). Las clamidosporas son terminales o intercalares globosas (3-) 4 (-5) μ m \times (4-) 4 (-5) μ m (n=31) (Figura 2).

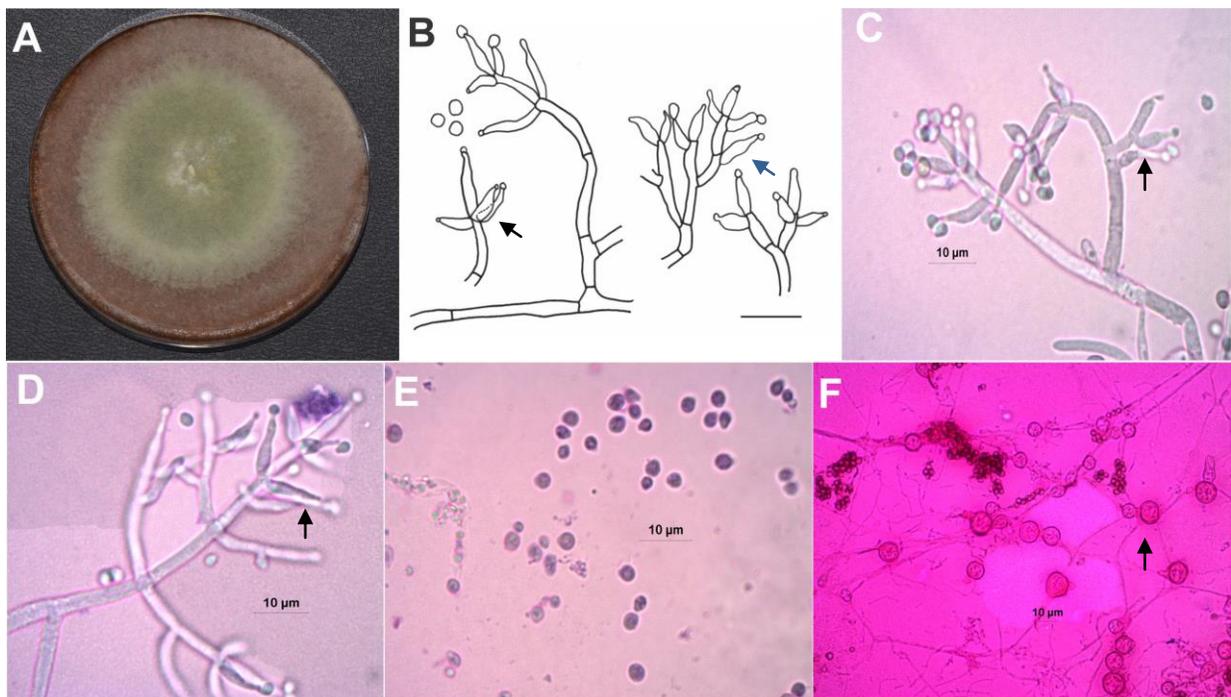


Figura 2: Observación macro y microscópica de *Trichoderma viride*, cepa UTPL(CF)-9. A: Micelio verdoso-amarillento sobre medio de cultivo PDA + madera a los 15 días a 27°C. B: Ilustración, las flechas negras muestran los conidióforos, la flecha azul indica fiálides. C-D: Conidióforos, la flecha negra muestra las fiálides, teñidos con Ploxine al 1%. E: conidios redondos teñidos con Ploxine al 1%. F: hifas en desarrollo, flechas negras indican la formación de clamidosporas globosas. Barras = 10 μ m.

Fuente: Autora

Trichoderma asprellum. Asomycete familia Hypocreaceae en medio PDA + madera. Colonia densa, verde oscura, superficialmente, farinosa a floccosa. Hifas superficiales, microscópicamente septadas. Conidióforos, que surgen del eje principal en verticilos de dos a tres. Fiálides sobre todo dispuestos simétricamente, rectos, alargados en forma de botellas (2-) 2 (-3) μm de ancho en la base. Conidios verdes, principalmente subglobosos o elipsoidales, lisos (2-) 3 (-4) μm x (2-) 3 (-4) μm (n = 35). Las clamidosporas terminales globosa a ovoides (3-) 4 (-5) μm x (3-) 4 (-5) μm (n = 35) (Figura 3).

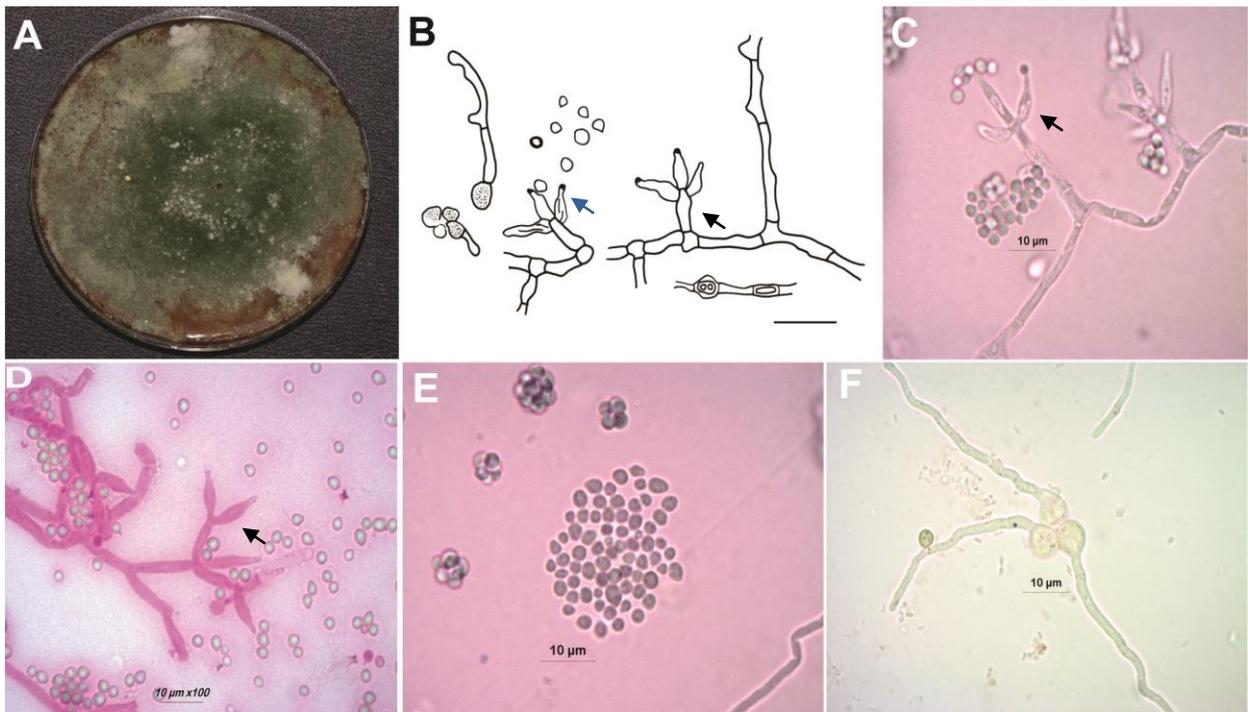


Figura 3: A-F: *Trichoderma asprellum*, cepa UTPL(CF)-80. A, Micelio verde oscuro distribuido uniformemente sobre medio de cultivo PDA+madera a los 15 días a 27°C. B, Ilustración indicativa. Ilustración, las flechas negras muestran los conidióforos, la flecha azul indica fiálides. C-D: Conidióforos, la flecha negra muestra las fiálides, teñidos con Ploxine al 1%. E, conidios globosos teñidos con Ploxine 1%. F, hifas produciendo clamidosporas terminales globosas (flecha negra). Barras=10 μm .

Fuente: Autora

De las 17 cepas estudiadas, mediante análisis moleculares se obtuvieron 12 secuencias sin errores de quimeras para 11 cepas correspondientes a: (UTPL(CF)-44, 46, 80, 83, 85, 86 y 92) para ITS-5.8S y secuencias desde las cepas (UTPL(CF)-9, 72, 46, 214 y 337) para LSU parcial. Tres secuencias para las cepas (UTPL(CF)-81, 82, 290) presentaron porciones quiméricas por lo cual se las elimino de los análisis filogenéticos, aunque sirvieron parcialmente para la determinación de tres géneros en la búsqueda de similitud de Blast (Tabla 4). No fue posible obtener productos de PCR de tres cepas (UTPL(CF)-89,47 y 7).

Al contrastar los datos morfológicos con los datos moleculares desde Blast con similitudes de entre 91%-100% (Tabla 4) y filogenéticamente ITS-5.8S y LSU parcial (D1/D2) con valores de soporte sobre los nodos entre 60 y 100 (Figura 2) se logró identificar 11 cepas hasta nivel de género y algunas hasta nivel de especie (Tabla 4 y Figura 2).

Tabla 3. Comparación entre la identificación morfológica de las diferentes cepas versus la similitud por Blast desde las secuencias obtenidas para cada cepa estudiada.

Cepas	Identificación		Similitud	Nº accesión GenBank	Orden
	Morfología	BLAST			
UTPL(CF)-9	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i>	99%	KM078038	
UTPL(CF)-72	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	FJ430784	
UTPL(CF)-80	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	97%	KF723005	
UTPL(CF)-85	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma gamsii</i>	94%	GQ337421	
UTPL(CF)-92	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	KM099499	
UTPL(CF)-81	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (secuencia quimera)	91%	HQ130669	HYPOCREALES
UTPL(CF)-86	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium lateritium</i>	94%	AF310978	
UTPL(CF)-290	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium tricinctum</i> (secuencia quimera)	94%	KP137448	
UTPL(CF)-44	<i>Clonostachys</i> sp.	<i>Clonostachys byssicola</i>	100%	KC806270	
UTPL (CF)-46	Micelio estéril	<i>Tolyposcladium inflatum</i>	94%	JF796050	
UTPL (CF)-124	Micelio estéril	<i>Sarocladium kiliense</i>	99%	KT878333	
UTPL (CF)-82	Micelio estéril	<i>Phoma</i> sp. (secuencia quimera)	83%	JN003230	PLEOSPORALES

UTPL (CF)-83	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100%	KP306939	AMPHISPHAERIALES
---------------------	------------------------------	------------------------------	------	----------	------------------

UTPL(CF)-337	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> cf. <i>heliscus</i>	95%	JQ761642	XYLARIALES
---------------------	--------------------	---------------------------------------	-----	----------	------------

Fuente: Autora

Las dos filogenias ITS-5.8S y LSU ubican 12 secuencias para 11 cepas estudiadas con soportes superiores a 55 sobre los diferentes clados para cada especie (Figura 4). La filogenia ITS-5.8S principalmente presentó cuatro clados con valores superiores a 90% para los géneros *Clonostachys*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Tolypocladium* y *Trichoderma* (Figura 4, A). Por otra parte el árbol de LSU muestra cuatro clados principales con buenos soportes de bootstrap de 96 a 100 para los géneros *Sarocladium*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, y *Xilarya* (Figura 4-B). La búsqueda de Blast y la filogenia determinó a nuestras cepas dentro de tres grandes órdenes Amphisphaeriales, Hypocreales y Xylariales (Tabla 4, Figura 4).

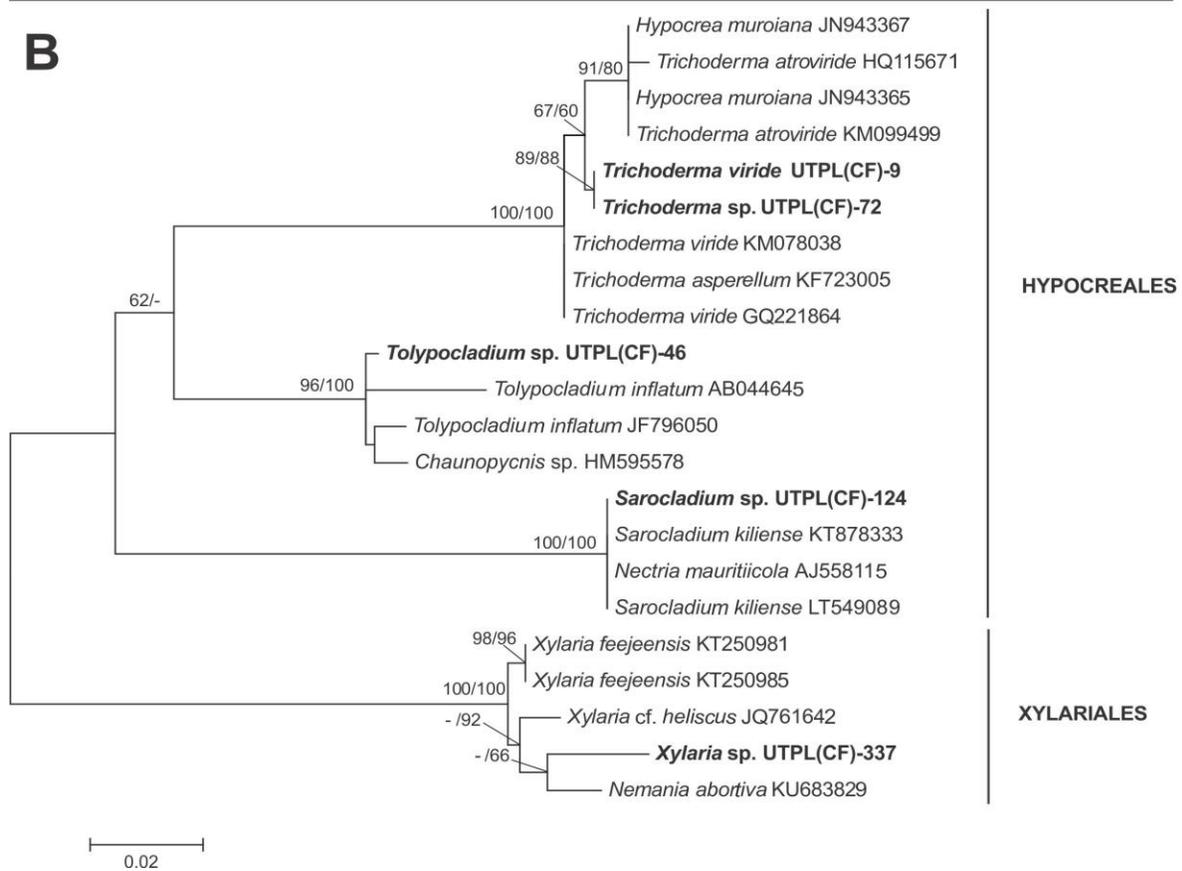
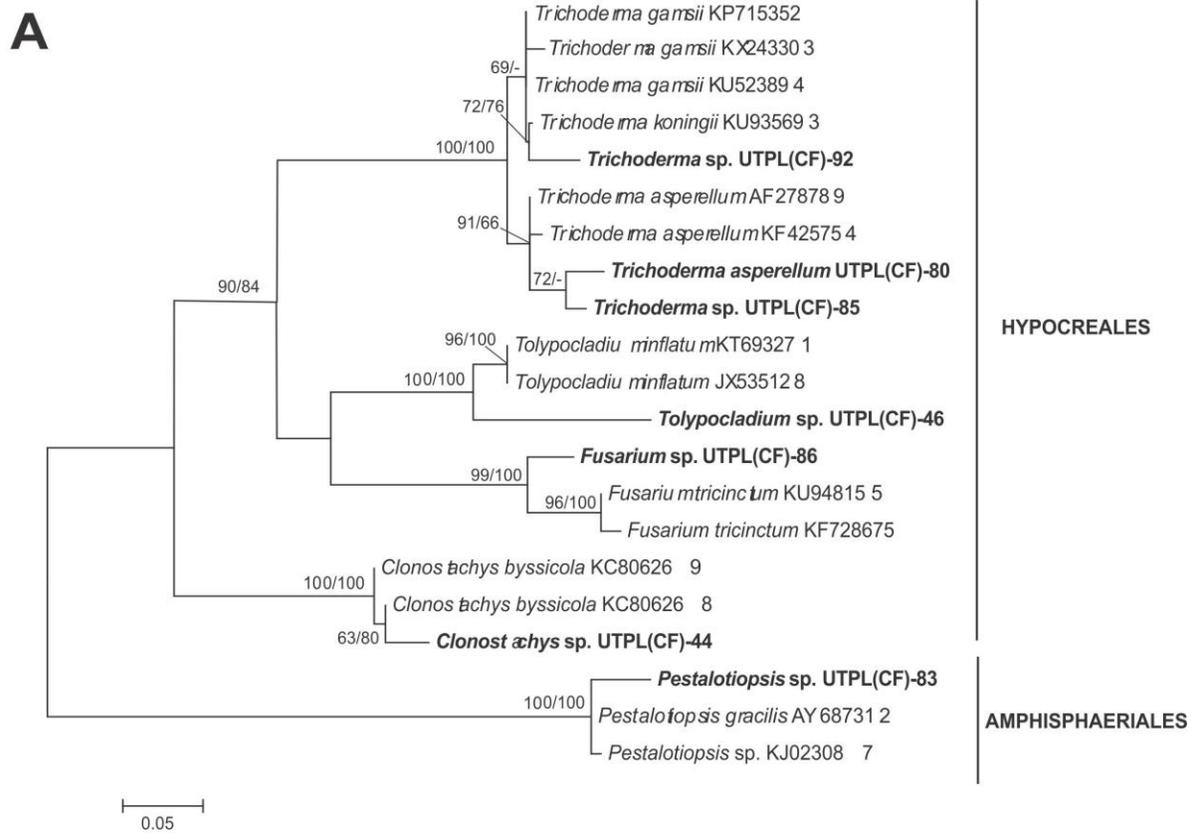


Figura 4: Hipótesis filogenética basada en Maximun Likelihood de secuencias obtenidas a partir de 11 cultivos de hongos anamorfos para la región región ITS-5.8S (A) y para la región región LSU parcial (B). Los nombres de género y especie para las diferentes cepas se muestran en negrita. Los valores corresponden a los análisis de Maximun Likelihood y Neighbor Joining respectivamente.

Fuente: Autora

3.2. Pruebas antagónicas en medio sólido.

Los 17 hongos fueron evaluados contra siete bacterias patógenas (Tabla 2). Se observó que dos cepas (UTPL(CF)-9 y 80) fueron capaces de reducir el crecimiento y desarrollo de determinadas bacterias generando halos de inhibición (Tabla 5). Estas cepas fueron identificadas morfo-molecularmente (Tabla 4, Figuras 2, 3, y 4) como *T. viride* (UTPL(CF)-9) y *T. asperellum* (UTPL(CF)-80).

Tabla 4. Diámetro del halo de inhibición obtenido mediante pruebas antagónicas de dos cepas de *Trichoderma* frente a siete bacterias de interés clínico. diámetro del halo de inhibición.

Especímenes	Bacterias Patógenas						
	Gram Positivas		Gram Negativas				
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Trichoderma viride</i> (UTPL(CF) -9)	NA	Activo Ø 14 mm Ø 16 mm	NA	Activo Ø 10 mm	Activo Ø 14 mm Ø 19 mm	NA	NA
<i>Trichoderma asperellum</i> (UTPL(CF)-80)	NA	Activo Ø 34 mm Ø 34 mm Ø 30 mm	Activo Ø 26 mm Ø 26 mm Ø 29 mm	NA	Activo Ø 25 mm Ø 34 mm Ø 30 mm	NA	Activo Ø 25 mm Ø 25 mm Ø 30 mm

NA: No activo

Ø: Diámetro de inhibición

Fuente: Autora

Trichoderma viride (UTPL(CF)-9) (Tabla 5), inhibió tres cepas bacterianas, resultando ser más eficiente sobre *Staphylococcus aureus*, con promedio de halos de inhibición de 15 mm (Figura 5, C). Las cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae* (Figura 5, A) y *Proteus vulgaris* (Figura 5, B), se inhibieron con halos de 10 mm y 16,5 mm respectivamente.

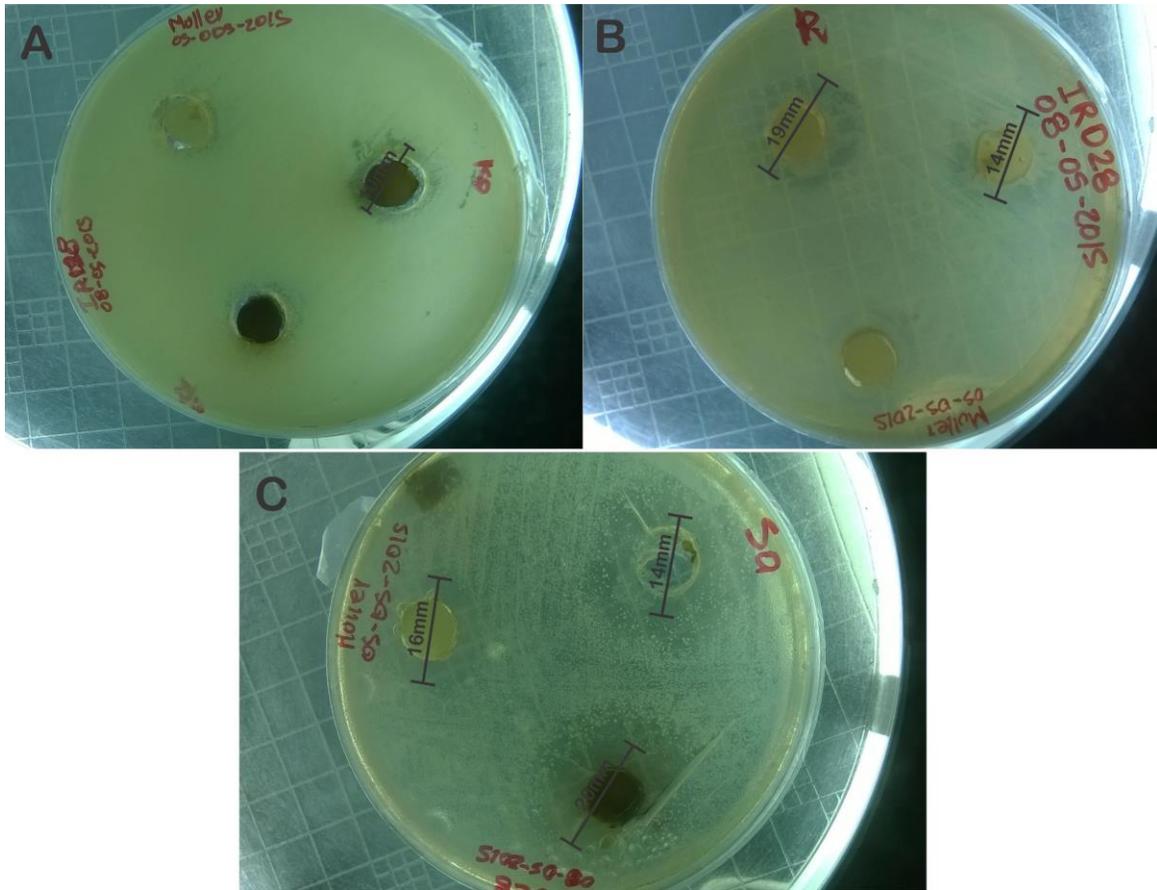


Figura 4: Diámetro de los halos de inhibición (barras) generados por *Trichoderma viride* como antagonismo positivo sobre las bacterias *Klebsiella pneumoniae* (A), *Proteus vulgaris* (B) y *Staphylococcus aureus* (C).

Fuente: Autora

Por otra parte *T. asperellum* (UTPL(CF)-80) (Tabla 5), fue positiva al inhibir el crecimiento bacteriano para una cepa *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) con halos de inhibición superiores a 25 mm (Figura 6, C). Mientras que para las cepas gram negativas este hongo mostró inhibición en *Escherichia coli*, con un promedio de los halos de inhibición de 27 mm (Figura 6,B) para *Proteus vulgaris* con halos de 22 mm y para *Salmonella typhimurium* con halos de 26,6 mm de diámetro (Tabla 5, Figura 6,D).

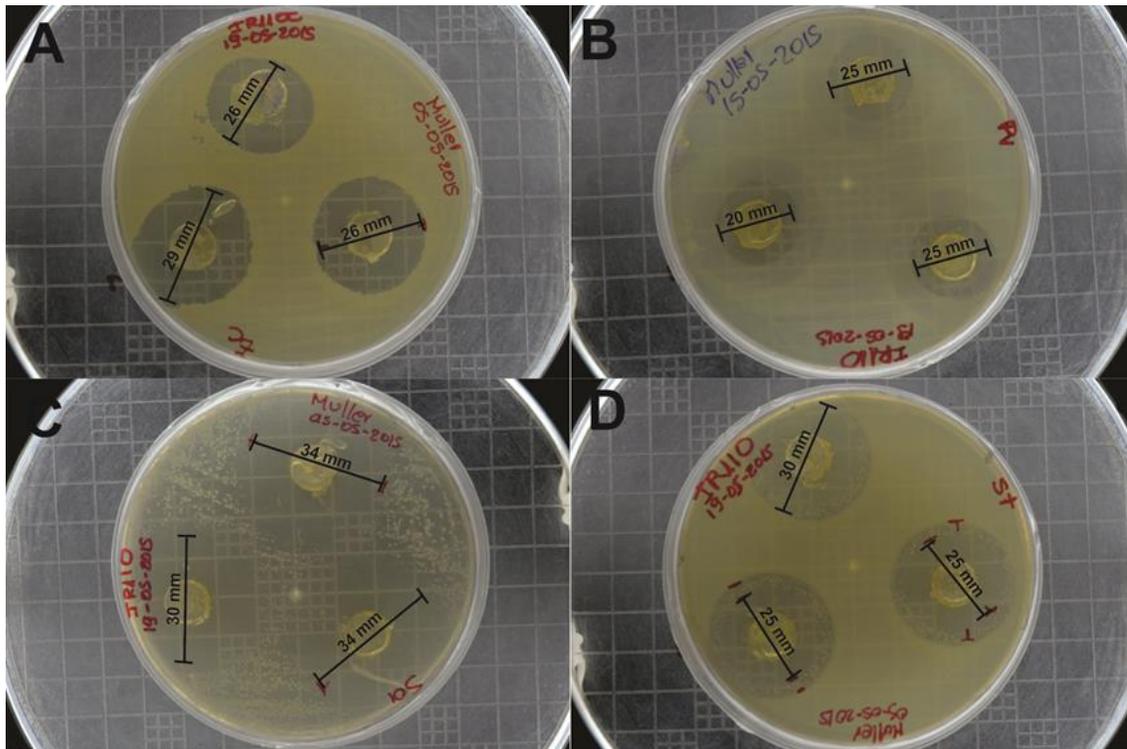


Figura 5: Diámetro de lo halos de inhibición (barras) generados por *Trichoderma asperellum* como antagonismo positivo sobre las bacterias *Escherichia coli* (A), *Proteus vulgaris* (B), *Staphylococcus aureus* (C) y *Salmonella typhimurium* (D).

Fuente: Autora

Otras cepas resultaron ser menos eficientes mostrando solamente resistencia sobre las bacterias evaluadas y después del segundo o tercer día fueron colonizadas totalmente por la bacteria (Tabla 2).

3.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Los extractos obtenidos a partir de los cultivos que resultaron positivos en medio sólido presentaron características similares como la coloración tanto en medio sólido como en líquido. Ambos extractos se probaron separadamente sobre los cultivos bacterianos sin observarse un gran efecto inhibitorio.

Para poder definir la potencialidad de los extractos *T. viride* y *T. asperellum* tomamos como referencia a Holetz et al. (2002), quien establece valores y clasifica la actividad antibacteriana: > 1000 µg/mL “inactiva”, 500 a 1000 µg/mL “débil”, 100 a 500 µg/ml “moderada”, y < 100 µg/mL “buena”.

En la Tabla 6, se muestran los valores obtenidos de CMI para los extractos seleccionados. En los cuales *Trichoderma viride* fue “inactiva” para *Klebsiella pneumoniae*, y *Proteus vulgaris* (Gram Negativas), donde la CMI fue >2000 µg/ml. Por otro lado *Trichoderma asperellum* exhibió

la más baja concentración “débil” con 312 ug/ml para *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris* fue “inactiva” con valores de 1000 µg/ml y > 2000 µg/ml respectivamente.

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria de los diferentes extractos de *Trichoderma* spp. frente a siete especies de bacterias de interés clínico.

EXTRACTOS	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA						
	Bacterias Patógenas						
	Gram Positivas			Gram Negativas			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Trichoderma viride</i> (UTPL(CF)-9)	NA	NA	NA	2500 µg/ml	5000 µg/ml	NA	NA
<i>Trichoderma asperellum</i> (UTPL(CF)-80)	1000 µg/ml	312 µg /ml	NA	2500 µg/ml	5000 µg/ml	NA	NA

NA: No activo
Fuente: Autora

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN

La diversidad de hongos en el Ecuador es aún poco bioprospectada (Rundell et al., 2015). Según Guigón et al. (2010) la ubicación taxonómica de las cepas es clave para investigaciones donde se evalúa actividad biológica puesto que se puede determinar con mayor exactitud los mecanismos de acción que tiene cada organismo. Nuestro estudio deja 11 cepas morfológicamente identificadas dentro de los géneros *Clonostachys*, una especie para *Fusarium*, tres especies, *Pestalotiopsis*, una especie, *Trichoderma*, cinco especies y *Xylaria* una especie. , donde todas estas generaron estados asexuales lo cual es muy común, en especial en ascomycetes, puesto que in vitro no cumplen con ciertas condiciones para realizar una reproducción sexual (Cepero et al., 2012, Deacon, 2006).

Uno de los géneros con más especies identificadas fue *Trichoderma*, el cual es un estado asexual perteneciente a Hypocreales cuyo teleomorfo es *Hypocrea* (Kullnig et al., 2002). Sus aplicaciones en bioprospección evaluadas en varios estudios son importantes ya que han sido utilizados como productores de enzimas industriales y agentes de biocontrol contra patógenos (hongos, bacterias) (Ahmed et al., 2009, Martínez et al., 2009, Richter et al., 1999). Otros hongos como *Fusarium*, son generalmente reportados como patógenos altamente peligrosos para cultivos y el ser humano, además desarrolla mecanismos de resistencia a químicos (Gilmore et al, 2009, Ma et al., 2013, Ye et al.,2004). *Clonostachys* ha demostrado ser controlador de patógenos en plantas (Shrestha, 2012, Cota et al., 2008, Jensen et al., 2004). *Xylaria* también encontrado en nuestro estudio, no tiene registro como antagonista según la bibliografía revisada (Persoh et al., 2009, Rogers et al., 2005). Los hallazgos de diferentes morfotipos sugieren la presencia de varias especies dentro de estos géneros, lo cual demuestra que Ecuador es un país prometedor en diversidad de hongos posibles para bioprospección.

Es importante resaltar que la gran mayoría de las cepas evaluadas no presentaron estructuras morfológicas definitorias por lo que no pueden ser identificadas morfológicamente a nivel de especie dentro de los cinco géneros respectivamente, esto debido a que poseen descripciones vagas y ambiguas (Gilmore et al, 2009, Persoh et al., 2009, Jeewon et al., 2004, Meyer, 1991).

Tres de nuestras cepas (UTPL(CF)-46, 82,124) no generaron estructuras asexuales como conidias, clamidospora o estados sexuales como ascas, manteniéndose únicamente como micelio estéril (Tabla 4). Muchas cepas *in-vivo* no esporulan por falta de nutrientes y desadaptación al medio, por lo cual sus estructuras reproductivas asexuales no pueden ser observadas impidiendo su identificación (Prada et al., 2009). Dos de las especies de *Trichoderma* (*T. viride* y *T. asperellum*) fueron descritas a detalle (ver descripción) donde se reconoce sus estructuras como conidióforos ramificados, conidias y clamidosporas redondas,

las cuales son características principales de estas especies (Shahid et al., 2014, Lieckfeldt et al., 1999, Samuels, et al., 1999).

La taxonomía clásica o molecular utilizadas por separado pueden aportar resultados ambiguos a la hora de determinar o describir especies (Jayasirii et al., 2015). Por ende se recomienda la combinación de características morfológicas correlacionando con análisis filogenéticos que ayuden a unificar la identificación de la especie (Druzhinina & Kubicek, 2005).

El NCBI, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) posee un gran número de secuencias con nombres dados especialmente para ascomycetes y sus regiones ITS y LSU. Molecularmente se obtuvieron 12 secuencias para 11 cepas, las cuales al compararlas en BLAST nos permiten corroborar que nuestras definiciones morfológicas son equivalentes a nivel de género, y a nivel de especie para algunos morfotipos. No se pudo obtener productos de PCR de tres cepas (UTPL(CF)-7, 47 y 89), o si se obtenían, sus secuencias poseían mucho ruido. Ya es conocido que varios factores pueden afectar negativamente los productos de PCR, como por ejemplo puede haber contaminación con ADN extraños, manipulación errónea (Castillo et al., 2016).

Los dos árboles filogenéticos ITS-5.8S y LSU nos permitieron identificar siete géneros: *Clonostachys*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Sarocladium* y *Xylaria*. Se registraron dos especies (*T. viride*, *T. asperellum*). Los resultados para ITS demuestran que este marcador muchas veces es bueno para hongos, lo que lo corrobora como el barcode universal de hongos (Schoch et al. 2012) y por otro lado LSU es otro marcador filogenético favorito entre algunos micólogos (Inglis & Tigano, 2006). Ambos marcadores son frecuentemente aplicados para identificar ascomycetes (Nilsson et al., 2009). Para Schoch et al. (2012) ITS permite una mayor discriminación de especies obteniendo un agrupamiento correcto de los grupos filogenéticos. Sin embargo no es aplicable para todos los grupos de hongos como por ejemplo *Xylaria* (Krüger, et al., 2009, Lee et al., 2000) por lo que se debería corroborar nuestros datos con otros marcadores como B-Tubulina el cual es recomendado para algunos ascomycetes (Proaño et al., 2014). Basándose en su rendimiento, LSU posee un rango más restringido para reconocer especies (Schochet et al., 2012). Algunas de nuestras secuencias no se pudo verificar su similitud con las almacenadas en la base de datos del NCBI. Nilsson et al. (2006) argumenta que hay un amplio número de secuencias que no están inventariadas en el NCBI y por otro lado pueden corresponder a secuencias erróneas.

Nuestros resultados filogenéticos sugieren tres órdenes dentro de ascomycetes los cuales se los ha reportado comunes y con grandes potencialidades biológicas. El orden más diverso fue

Hypocreales con tres géneros, y dentro del género *Trichoderma* con al menos cuatro especies. *Trichoderma* contiene especies cosmopolitas que habitan en el suelo, en la madera en descomposición o como contaminantes (Harman et al., 2004). Sus aplicaciones en bioprospección son importantes ya que pueden ser productores de enzimas industriales, antibióticos o agentes de biocontrol contra patógenos de plantas, hongos y bacterias (Ahmed et al., 2009, Martínez et al., 2009, Richter et al., 1999), convirtiéndoles en un gran atractivo a nivel académico e industrial (Kullnig et al., 2002).

Se realizaron pruebas antagonicas la cuales determinan que cepa fúngica es antagonista frente a bacterias Gram Positivas y Gram negativas. Se define como antagonismo a la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra (Pérez et al., 2014). Varios hongos no presentaron antagonismo (UTPL(CF)-44, 46, 47, 72, 81, 82, 83, 85, 86, 89, 92, 124, 337, 252, 290) y dos por el mecanismo de competencia resultaron positivos *T. viride*, *T. asperellum*, con halos buenos de inhibición. *T. viride* ha sido documentado como controlador biológico de otros organismos, especialmente de hongos. Además genera enzimas líticas y/o antibióticos (Neethu et al., 2012, Hermosa et al., 2000). Spasova et al., (2011), Dean & Anderson (1991) & Kusakab et al., (1980) atribuyen este potencial antagonico a la producción de una gran variedad de enzimas, como celulosa, xilanasa, L-lisina alfa-oxidasa y endoxilanas, que pueden estar causando inhibición. De igual forma, la producción de compuestos (metabolitos secundarios) que se difunden por el medio pueden causar la ausencia de contacto físico entre la bacteria y el hongo (Vinale et al., 2008). En nuestro estudio *T. viride* no mostró en todos las cepas bacterianas su capacidad antagonica. Esto puede deberse a las condiciones de cultivo, pues Neethu et al. (2012) indica que la falta de azúcares y polisacáridos afectan a la producción de metabolitos secundarios en *T. viride*. Sin embargo Vinale et al. (2008) señala que este hongo tiene mayor potencial como controlador biológico de hongos patógenos que como antagonista de bacterias, y así lo demuestran varios autores (Mishra et al., 2011, Tapwal et al., 2011, Morsy et al., 2009, Soyton et al., 2005, Manjula et al., 2004).

Por otra parte *T. asperellum* ya se ha reportado como agente de control biológico contra un amplio espectro de plantas, hongos, nematodos y bacterias (Hernández et al., 2014, Yedidia et al., 2003, Cotxarrera et al., 2002). Se ha demostrado su capacidad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Echericha coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus* (Sadykova et al., 2015, Prasad et al., 2014, Gholami- et al., 2013). Dentro de estos estudios se puede mencionar que compuestos como peptaiboles trichotoxin son los responsables de mostrar actividad antimicrobiana,

producido generalmente dentro de este género (Chutrakul et al., 2008). Las cepas en las que fue más sobresaliente la inhibición de *T. asperellum* fue *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, lo que se puede atribuir a la morfología y metabolismo que posee cada bacteria para combatir a los antibióticos u otro organismo (Fernández et al., 2003).

Los resultados del análisis de CMI demostraron que existe un evidente efecto antimicrobiano de los extractos de *T. viride* y *T. asperellum* sobre algunas de las bacterias evaluadas. Determinando que el extracto de *T. viride* fue “inactiva” contra *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*. La incapacidad de inhibir de *T. viride* se relaciona probablemente con el desconocimiento de la concentración de las moléculas bioactivas en los extractos (Almaraz et al., 2012). En cambio, *T. asperellum* contra *Staphylococcus aureus* fue “débil” y para *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Proteus vulgaris* fue “inactiva”. Estos datos son similares a los encontrados por Sadykova et al. (2015), el cual halló inhibición en medios sembrados con varias bacterias entre ellas *Staphylococcus aureus*, sin embargo su inhibición era mayor que el encontrado en el presente estudio. Esta propiedad fue atribuida a los compuestos (metabolitos secundarios) que secreta el hongo, pues los autores destacaron que estos compuestos irrumpen en el crecimiento de la bacteria permitiendo su inhibición.

Finalmente la diversidad fúngica que se encuentra en Ecuador es abundante y puede aplicarse en distintos estudios de bioprospección. Nuestros datos demuestra el gran potencial que tienen los hongos especialmente los del género *Trichoderma*, pues se ha evidenciado como productores de metabolitos, enzimas y controladores de varios patógenos. Nuestros extractos no son la mejor alternativa para el tratamiento de enfermedades producidas por estas bacterias para el ser humano, puesto que la cantidad que se necesita del hongo para que sea efectivo contra la bacteria es demasiado alto y además no es eficaz en todas las cepas bacterianas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que un espécimen cercano pueda tener mejores espectros de inhibición o que estas cepas puedan inhibir otras bacterias. Adicionalmente, estos hongos podrían utilizarse en otros análisis de prospección como por ejemplo biorremediación (micorremediación) o en la industria, pues los hongos tienen una amplia variedad de aplicaciones (Aguirre et al., 2014, Argumedo et al., 2009).

CONCLUSIONES

La integración de datos morfo-moleculares permite una mejor identificación de géneros y/o especies, como se muestra en nuestros resultados, donde se determinaron 11 especies y géneros como *Clonostachys*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pestalotiopsis* y *Xilarya*.

Especies de *Trichoderma* se mostraron como las más diversas y comunes en este estudio, dos especies *T. viride* y *T. asperellum* poseen altos potenciales bioactivos frente a bacterias como por ejemplo *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

Es importante efectuar pruebas de antagonismo rápidas (“screening”) para los hongos, puesto que estas pruebas permiten determinar el potencial de acción de cada espécimen de manera rápida, previo a desarrollar técnicas detalladas como la producción de extractos.

Se recomienda ampliar estudios para *Trichoderma*, pues su potencial biotecnológico se muestra prometedor como productor de metabolitos antagónicos de bacterias y también puede ser útil en diversos campos biotecnológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S; Simpson, A; Farmer, M, Andersen, R, Anderson, Barta, J. R, & James, T. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52: 399-455.
- Adrio, J, & Demain, A. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6: 191-199.
- Aguirre, E, Ulloa, M, Aguilar, S, Cifuentes, J, & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad* 85: 76-81.
- Almaraz, A, Alvarado-Rosales, D, Tlapal, B, & Espinoza, D. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo*. Serie ciencias forestales y del ambiente 18: 341-355.
- Ahmed, S, Bashir, A, Saleem, H;, Saadia, M, & Jamil, A. (2009). Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pakistan Journal of Botany* 41: 1411-1419.
- Amraoui, B, Amraoui, M, Cohen, N, & Fassouane, A. (2014). Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Elsevier Masson 72: 107-111.
- Anke, H, & Sterner, O. (1997). Nematicidal metabolites from higher fungi. *Current organic chemistry* 1: 361-374.
- Arias, R;, Heredia, G; & Mena-Portales, J. (2010). Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos anamorfos del bosque mesófilo de montaña del estado de Veracruz III. *Acta botánica mexicana* 90: 19-42.
- Argumedo, R, Alarcón, A, Ferrera, R, & Peña, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental* 25: 257-269.
- Bauer, A, Kirby, W, Sherris, J, & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-6.
- Berbee, M, & Taylor, J. (1992). Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Biosystems* 28: 117-125.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany* 98: 426-438.
- Bussmann, R. (2003). Los Bosques Montanos de la Reserva Biológica San Francisco (Zamora-Chinchipe, Ecuador) zonación de la vegetación y Regeneración naturales. *Lyonia* 3: 57-72.
- Castillo, A, Sánchez, A, Cueva, A, & Orellana, M. (2016). Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales de suelo en ecosistemas tropicales del sur de Ecuador. *Ciencia del suelo* 34:145-154.

- Cepero, M, Restrepo, S, Franco, A, Cárdenas, M, & Vargas, N. (2012). *Biología de Hongos*. (E. Uniandes, Ed.). Bogotá - Colombia.
- Charya, MS (2015). *Hongos: una visión general*. En *Biología Vegetal y Biotecnología* (pp. 197-215). Springer India.
- Chutrakul, C, Alcocer, M, Bailey, K, & Peberdy, J. (2008). La producción y caracterización de peptaiboles trichotoxin, por *Trichoderma asperellum*. *Química y la biodiversidad* 5: 1694-1706.
- Cota, L, Maffia, L, Mizubuti, E, Macedo, P, & Antunes, R. (2008). Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.
- Cotxarrera, L, Trillas, M, Steinberg, C, & Alabouvette, C. (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 467-476
- Crespo, A. (2008). *Botánica Farmacéutica Micología*, Facultad de Farmacia UCM.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology*. 4th ed. Blackwell Publishing. Malden-EE UU.
- Dean, J, & Anderson, J. (1991). Ethylene biosynthesis-inducing xylanase II. Purification and physical characterization of the enzyme produced by *Trichoderma viride*. *Plant physiology* 95: 316-323.
- Druzhinina, I, & Kubicek, C. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University. Science* 6: 100-112.
- Fabio, A, Barros, E, Rodrigues, F. (2005). Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 257-268.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernández, F, López, J, Ponce, L, & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar* 32: 44-48.
- Figuroa, R, Bran, C, Morales, O, & Castañeda, R. (2016). Nuevos registros de hongos anamórficos para Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* 26: 40-50.
- Gams, W. (1995). How natural should anamorph genera. *Canadian Journal of Botany* 73: 747-753.
- Gholami, M. H, Akbarzadeh, A, Mortazavi, M, & Emadzadeh, M. (2013). Evaluation of the antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized with *Fusarium oxysporum* and *Escherichia coli*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2: 27-33.
- Gilmore, S, Graefenhan, T, Louis, G, & Seifert, K. (2009). Multiple copies of cytochrome oxidase

- 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* 9: 90-98.
- González, M, Aguilar, C, & Rodríguez, R. (2012). Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Acta Química Mexicana* 4: 42-55
- Guigón, C, Guerrero, V, Vargas-Albores, F, Carvajal, E, Ávila, G, Bravo, L, & Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología* 28(2): 87-96.
- Harman, G, Howell, C, Viterbo, A, Chet, I, & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology* 2: 43-56.
- Haro, J, and Melic, A. (2002). Clasificación de los microorganismos.
- Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422–1432.
- Hermosa, M, Grondona, I, Iturriaga, E, Diaz-Minguez, J. M, Castro, C, Monte, E, & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890-1898.
- Hernández Ochandía, D. (2014). Potencialidades de cepas nativas de *Trichoderma asperellum* Samuels para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal* 29: 153-153.
- Hernández, L, Hernández, M, & Troccoli, L. (2008). Actividad antibacteriana y antimicótica de *Spirobranchus giganteus giganteus* (Serpulidae: Polychaeta) de Guayacán, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* 20:282-287.
- Herrera, T, & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hibbett, D, Binder, M, Bischoff, J, Blackwell, M, Cannon, P, Eriksson, O, & Lumbsch, H. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111: 509-547.
- Holetz, F, Pessini, G, Sanches, N, Cortez, D, Nakamura, C, & Dias, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Infante, D, Martínez, B, González, N, & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal* 24: 14-21
- Inglis, P. W, & Tigano, M. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetics and Molecular Biology* 29: 132-136.
- Jayasiri, S, Hyde, K, Ariyawansa, H, Bhat, J, Buyck, B, Cai, L, & Jeewon, R. (2015). The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human

- impacts. *Fungal diversity* 74: 3-18.
- Jeewon, R, Liew, E, & Hyde, K. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of Pestalotiopsis in relation to host association. *Fungal Diversity* 17: 39-55
- Jensen, B, Knudsen, I, Madsen, M, & Jensen, D. (2004). Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology* 94: 551-560.
- Katoh, K, Misawa, K, Kuma, K, and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–66.
- Krüger, M, Stockinger, H, Krüger, C, & Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212-223.
- Kullnig, C, Szakacs, G, & Kubicek, C. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106: 757-767.
- Kusakabe, H, Kodama, K, Kuninaka, A, Yoshino, H, Misono, H, & Soda, K. (1980). A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *Journal of Biological Chemistry* 255: 976-981.
- Laessle, T, & Petersen, J. H. (2008). Svampelivet på ækvator. Retrieved January 9, 2017, from <http://www.mycology.com/Ecuador/LaesslePetersen2008.pdf>.
- Langfield, R, Scarano, F, Heitzman, M, Kondo, M, Hammond, G, & Neto, C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of ethnopharmacology* 94: 279-281.
- Lee, J, Ko, K, & Jung, H. (2000). Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8 S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters* 187: 89-93.
- Leiva, S, Yáñez, M, Zaror, L, Rodríguez, H, & García, H. (2004). Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. *Revista médica de Chile* 132: 151-159.
- Lieckfeldt, E, Samuels, G, Nirenberg, H, & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2418-2428.
- Ma, L, Geiser, D, Proctor, R, Rooney, A, O'Donnell, K, Trail, F, & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology* 67: 399-416.
- Manjula, K, Kishore, G, Girish, A, & Singh, S. (2004). Combined application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an improved biocontrol activity against stem rot in groundnut. *Plant Pathology Journal* 20: 75-80.
- Martínez, B, Reyes, Y, Infante, D, González, E, Baños, H, & Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de

- Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal* 23: 118-125.
- Meneses, A. (2003). Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Meyer, R. (1991). Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. *Applied and environmental microbiology* 57: 2269-2276.
- Metuku, R, Pabba, S, Burra, S, Gudikandula, K, & Charya, M. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum radiatum* HE 863742.1: their characterization and antimicrobial activity. *Biotech* 4: 227-234.
- Mishra, B, Mishra, R, Mishra, R, Tiwari, A, Yadav, R, & Dikshit, A. (2011). Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. *Archives of Applied Science Research* 3: 361-369.
- Murugaiyan, K. (2015). Marine fungal diversity and bioprospecting. En Kim, SK. (First edition), Springer handbook of marine biotechnology. New York.
- Neethu, K, Rubeena, M, Sajith, S, Sreedevi, S, Priji, P, Uni, K, & Benjamin, S. (2012). Una nueva cepa de *Trichoderma viride* muestra lignocelulolíticas actividades completas 3: 1160-1166
- Nilsson, R, Bok, G, Ryberg, M, Kristiansson, E, & Hallenberg, N. (2009). A software pipeline for processing and identification of fungal ITS sequences. *Source code for biology and medicine* 4: 1-6.
- Nilsson, R, Ryberg, M, Kristiansson, E, Abarenkov, K, Larsson, K, & Kõljalg, U. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1: 10-59.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances* 22(3): 189-259.
- Peršoh, D, Melcher, M, Graf, K, Fournier, J, Stadler, M, & Rambold, G. (2009). Molecular and morphological evidence for the delimitation of *Xylaria hypoxylon*. *Mycologia* 101: 256-268.
- Pérez, R, Terrón, T, & Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3: 53-60.
- Piepenbring, M. (2015). Introducción a la micología en los Trópicos. 1st ed. American Phytopathological Society [ed.], APS press, Frankfurt.
- Pitt, J, & Hocking, A. (2009). Fungi and Food Spoilage. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki* (Third Edit, p. 524). Boston, MA: Springer US.
- Prada, H, Avila, L, Sierra, R, Bernal, A, & Restrepo, S. (2009). Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endofito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia*

- sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. *Revista Iberoamericana de Micología* 26: 198-201.
- Proaño, M. (2014). Relación Filogenética de cepas de *Pythium irregulare* sensu lato de Long Island, New York en base al análisis de secuencias del gen B-Tubulina (Doctoral dissertation, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera Ingeniería en Biotecnología.) 1: 1-12
- Richter, S, Cormican, M, Pfaller, M, Lee, C, Gingrich, R, Rinaldi, M, & Sutton, D. (1999). Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. *Journal of clinical microbiology* 37: 1154-1160.
- Rogers, J, Ju, Y, & Lehmann, J. (2005). Some *Xylaria* species on termite nests. *Mycologia* 97: 914-923.
- Rundell, S, Spakowicz, D, Narváez, A, & Strobel, S. (2015). The biological diversity and production of volatile organic compounds by stem-inhabiting endophytic fungi of Ecuador. *Journal of Fungi* 1: 384-396.
- Sadykova, V, Kurakov, A, Kuvarina, A, & Rogozhin, E. (2015). Antimicrobial activity of fungi strains of *Trichoderma* from Middle Siberia. *Applied biochemistry and microbiology* 51: 355-361
- Samuels, G, Lieckfeldt, E, & Nirenberg, H. (1999). Description of *T. asperellum* sp. nov. and comparison to *T. viride*. *Sydowia* 51: 71-88.
- Schoch, C, Seifert, K, Huhndorf, S, Robert, V, Spouge, J, Levesque, C, & Miller, A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241-6246.
- Shahid, M, Srivastava, M, Singh, A, Kumar, V, & Pandey, S. (2014). Comparative study of biological agents, *Trichoderma harzianum* (Th-Azad) and *Trichoderma viride* (01PP) for controlling wilt disease in pigeon pea. *J. Microbial. Biochemical & Technol* 6: 110-115.
- Shenoy, B, Jeewon, R, & Hyde, K. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26:1-54
- Shrestha, G, Leavitt, S, Proulx, M, Glacy, L, Call, C, Hendrickson, J, & Clair, L. (2012). A Checklist of the Lichens of the Beaver Dam Slope, Washington County, Utah, USA. *North American Fungi* 7: 1-7.
- Soytong, K, Srinon, W, Rattanacherdchai, K, Kanokmedhakul, S, & Kanokmedhakul, K. (2005). Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. *Journal of Agricultural Technology* 1: 33-41.
- Spasova, M, Manolova, N, Naydenov, M, Kuzmanova, J, & Rashkov, I. (2011). Electrospun biohybrid materials for plant biocontrol containing chitosan and *Trichoderma viride* spores. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 26: 48-55.

- Strasser, H, Abendstein, D, Stuppner, H, & Butt, T. M. (2000). Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research* 104: 1227-1233.
- Taylor, J, Jacobson, D, Kroken, S, Kasuga, T, Geiser, D, Hibbett, D, & Fisher, M. (2000). Reconocimiento de la especie filogenética y conceptos de especie de hongos. *La genética y la biología de hongos* 31: 21-32
- Trigos, Á, Mendoza, G, Luna, M, Heredia, G, & Arias, R. M. (2005). Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología* 20: 89-92.
- Vinale, F, Sivasithamparam, K, Ghisalberti, E. L, Marra, R, Barbetti, M. J, Li, H, & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:80-86.
- Webster, J, & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi* (3rd ed.). Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- White, T, Bruns, T, Lee, B, & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ (eds) *PCR-protocols and applications: a laboratory manual*. Academic, San Diego 315 – 322.
- Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* 163: 150–160.
- Yandry, R, Fernandez, E, Rodolfi, M, & Solveig, T. (2006). Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico* 21: 49-53.
- Ye, S, Yu, J, Peng, Y, Zheng, J, & Zou, L. (2004). Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil*, 263:143-150.
- Yedidia, I, Shores, M, Kerem, Z, Benhamou, N, Kapulnik, Y, & Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 12: 7343-7353.
- Zeng, Z, & Zhuang, W. (2014). A new holomorphic species of *Mariannaea* and epitypification of *M. samuelsii*. *Mycological progress* 13: 967-973.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo De Extracción De ADN: DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen:

Previo: Mantener el bloque calentador a 65°C, calentar el buffer AE a 65°C.

1. Rompa el tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido hasta convertirlo en un fino polvo usando micropestles.
2. Añada 400 µL de buffer AP1 y 4 µl de RNAasa solución stock (100 mg/µl) a un máximo de 100 µg tejido peso húmedo a 20 µg peso seco y mézclelo por vortex vigoroso.
3. Incube la mezcla por 10 min a 65 °C. Mezcle 2-3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.
4. Añada 130 µl de buffer AP2 para lisar, mezcle e incube en hielo por 5 minutos. Opcional: centrifugue el lisado por 5 min a máxima velocidad.
5. Vierta el lisado en una columna lila colocada en un tubo de colección de 2 mL y centrifugué por 2min a máxima velocidad.
6. Transfiera la fracción sobrenadante del paso 5 a un nuevo tubo (no incluido) sin alterar el pelet de células.
7. Añada 1.5 volúmenes de buffer AP3/E a producto del paso 5 y mezcle por pipeteo.
8. Aplique 650 µl de la mezcla del paso 7, incluido cualquier precipitado que se pueda haber formado, a una columna blanca colocada en un tubo de colección de 2 mL. Centrifugue por 1 min a 6000 g (8000 rpm) y descartar el sobrenadante.
9. Repita el paso 8 con el resto de la muestra. Descarte el sobrenadante y el tubo de colección.
10. Coloque la columna blanca en un nuevo tubo de colección y añada 500 µl de buffer AW a la columna y centrifugue por 1 min.

ANEXO 2. Obtención De Extractos Fúngicos

Medio líquido YNPD preparación para 1000mL	
Glucosa	10 g
Extracto de malta	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄.7H₂O	1 g
Vitamina	10 mL

Se siembra una pequeña porción de micelio en medio YNPD en un total de tres litros, una vez que se ha obtenido un crecimiento total en el medio se procedió a filtrarlo al vacío para separar el micelio y el líquido del medio, posteriormente el residuo de micelio fue puesto a secar por aproximadamente 24 horas. Seguidamente la muestra fue sometida a un proceso de maceración con movimiento por 5 horas empleando acetona como disolvente, en una relación acetona micelo 1:1, el cual por su dureza se debió agregar cloroformo en pequeñas concentraciones. Se filtró nuevamente al vacío obteniendo el extracto fluido del micelio. El líquido del medio fue macerado en constante movimiento por 10 horas, empleando acetona en una relación 1:1 como disolvente, luego se procedió a decantar obteniendo el extracto fluido del medio. Estos dos extractos fluidos se mezclaron y fueron rotaevaporados a temperatura moderada de 30-35°C para así evitar la degradación de compuestos termolábiles, hasta obtener un extracto seco.

Se sembró una pequeña porción de micelio en medio YNPD en un total de tres litros, una vez que se ha obtenido un crecimiento total en el medio se procedió a filtrarlo al vacío para separar el micelio y el líquido del medio, posteriormente el residuo de micelio fue puesto a secar por aproximadamente 24 horas. Seguidamente la muestra fue sometida a un proceso de maceración con movimiento por 5 horas empleando acetona como disolvente, en una relación acetona micelo 1:1, el cual por su dureza se debió agregar cloroformo en pequeñas concentraciones. Se filtró nuevamente al vacío obteniendo el extracto fluido del micelio. El líquido del medio fue macerado en constante movimiento por 10 horas, empleando acetona en una relación 1:1 como disolvente, luego se procedió a decantar obteniendo el extracto fluido del medio. Estos dos extractos fluidos se mezclaron y fueron rotaevaporados a temperatura moderada de 30-35°C para así evitar la degradación de compuestos termolábiles, hasta obtener un extracto seco.

ANEXO 3. Crecimiento miceliar en medio PDA, mostrando diversidad macro-morfológica según la cepa.

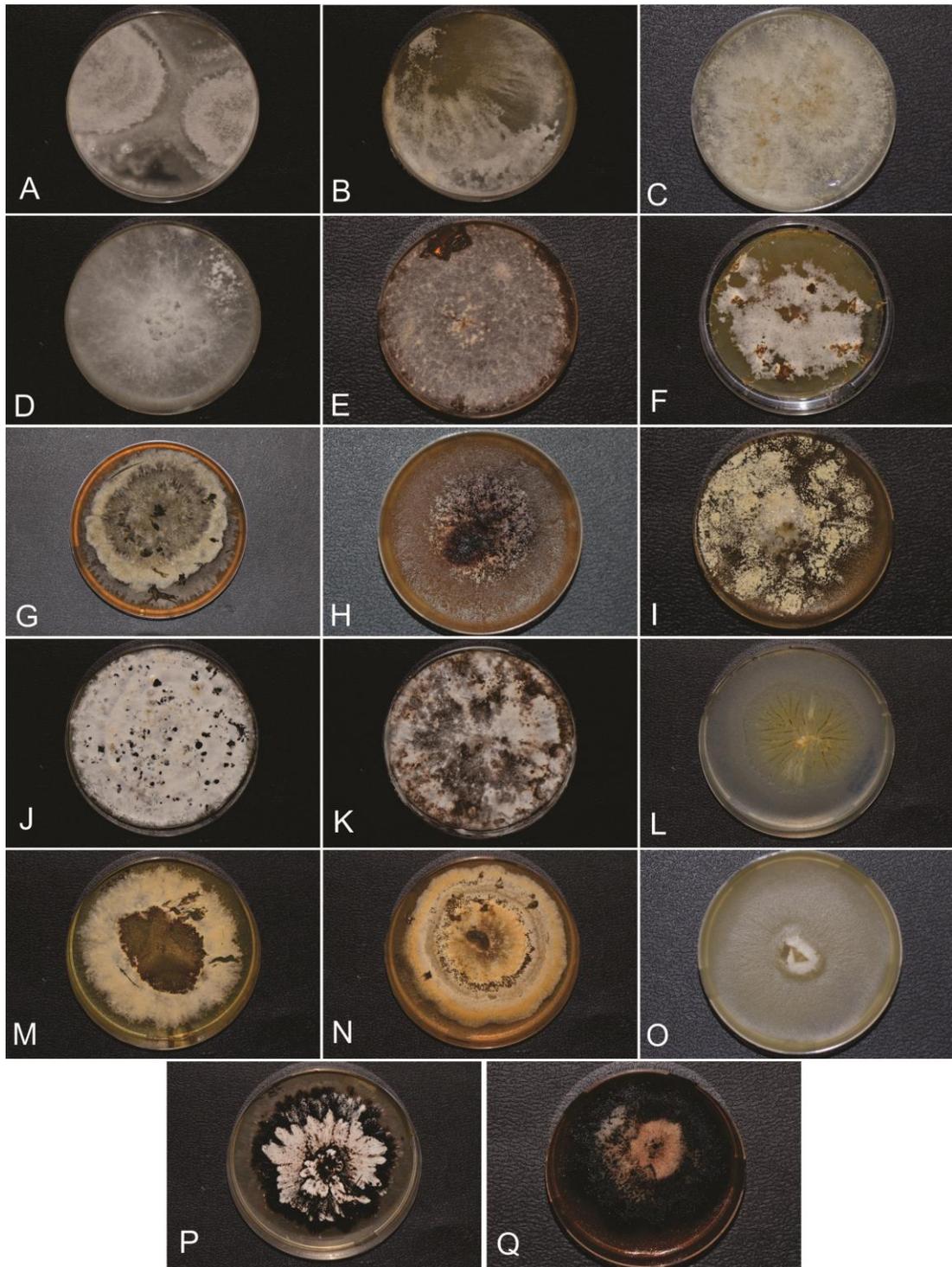


Figura 1. A-D. *Trichoderma* spp. UTPL(CF)-9,80,72&92 F. *Clonostachys* sp. UTPL (CF)-44 G-I. *Fusarium* spp. UTPL(CF)-86,81,290 J. *Pestalotiopsis* sp. UTPL(CF)-83 K. *Xylarya* sp. UTPL(CF)-371 L. *Tolyocladium* sp. UTPL(CF)-46 M. *Sarocladium* sp. UTPL(CF)-124 N. *Phoma* sp. UTPL(CF)-82 O-Q. Micelio estéril UTPL(CF)-7,47,89.

ANEXO 4. Secuencias ITS-5.8S, obtenidas para las diferentes cepas estudiadas.

UTPL(CF)-44

-----TTGTCCGACACACTCCGTGCCCATGTGC--CCATACGCTATTGTTGC-
TTCGGCGGGATT—GCCCCGGGCGCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTCA
----ACTC-TTGTTTTA-----TTATGAATCTTCTGAGTAGTTTTT—ACAAATAAATAAAAACCTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCT---AGGGCGTGGTGTGGGGA—TCGGC
CAAAGCCCGCGAG GGACGGCCGGCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTG
CGAAGTAGT-GATAT--TCCGCATCGG--AGA-GCGACGAGCCCTG-CCGTAAACCCCA
ACTTTC--AAGGTTGACCTCAGATCAGGT

UTPL(CF)-46

-----TGGCTCGCGAAACACTCCAACCCTGTG--ACATACCCGAACGTTGC
-CTCGGCGGGACC--GCCCCGG-CGCCCTCGCGGCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGACCCAA----ACTC-
TTGCTTTGAAC-----AGTGGCATACTCTCTGAGTCTCACAAACATAAATGAATCAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAGGGAACCCCGGGGACTGGGTGTGGGGG—CCGGCC---
GCC-----GCGCCGCCCCGAAATGCAGTGGCGACCTCGCCGAGCCTCCCCTGCG
TAGTAGC-ACAAC--CTCGCACCGG--AGCGCGGAGACGGTCACG-CCGTAAAACGCCCAACTTTCA--
AGAGTTGACCTCGGATCAGGT

UTPL(CF)-72

GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAA
CCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGG--
CCCCTCCGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCGAGTTCCC
TGGAACGGGACGCCGAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGCTGGC-CACCGAGCCTCTGTAAAGC
TCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAG
CTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTG
AAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCG
CGGCGGATCATCCGGGGTTC-TCCCCGGTGCACCTTCGCCGCGTCCAGGCCAGCATCAGTTCGT
CGCGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCC--GGGA-
GTGTTATAGCCCG TTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCG

UTPL(CF)-80

-----TGGCTGGGCGGATACAGCTCCGACCC-ATGTG-A-CGTTACCAAACCTGTTGC-
CTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTAAAAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGAACCA
ACCAAACCTC-TTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGA
ATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG
GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGA
--TCGGGA---CCCCTCAC---CGGGTGCCGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTC
CTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCGG--GAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCC
AAC-TTCTGAAATGTTGACCT

UTPL(CF)-81

GTTGCATGCGAGTTCACCTCCAACCCCTGTGACATACCTTAATAGTTGCCTCCGGCGGATCAGCCCGCGC
CCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGTAGGATCCAAACTCTTAGCTGTTATTGTAACCTTCTGAG
TAAAACAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC
CCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCAAGCCTTCTGGCGAGCCGCCCCCTAAATCTAGTGGC
GGTCTCACTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAGCTGGAACGCGGTGCGGCCATG
CCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCACGTAAGAATAACCGCTGAACTTAAGCA
TATCAGTAACCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTATTAACGGCGAGTGAAG
CGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGACCGAATTGTAATTTGTAGAGGATACTTTTG
ATGCGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAACGGCAAGCCGTAAACGGCGACA
GCCTGGACGGGGTGGATGCACCATCTCTGTATAGATCCTTCGGCGAGTCGAGAAGCTTGGC
AATGCTGCTCTCCATGGGAGGTATATGTCTTCTTGAGCTAAATACTCGGCCAGAGA
CCGACCGCCGCACAACCTAGAGTGGTGAATGGATGATCAGCACATTCGAATGAGA
CAGTTGAAATTGTACAGTGTCACTTGTACGTAATCGCATGCGTGCTGCGACCCGGAC
TTCGGACGTCGGGAAACTCAAACAAGCGAGTTCGTGCAAGTTGTACTATTTTACATTGTCAAGGTC
TTTCGTCTAAAATTCCACAGTATCCAACAAAGAGGATTAAGAGGCCTGGAGGGCACACCCGGCG
CGCGAAATTGCACGTATATACGAAGCTGAACACGTCCAGAAAGCAAGCATTAGGTAGGAA
TAATTGAAGAAGAGTCGGCAGGATCGGGTTGAGTGAACAAGGCGCGAAAACAGAAAGGCAATT
ATACACATCCCATCCGAAAATATTCGTAAACACACCAAGTAAATAAAACGAAGGGGAAATTCTATTCACCGGA
GGATTTTTCAAATGACTTCATACAACCCCACTTGGGGTACAAAAGTAACTTTCAAAAAAAGGGTTTCCTC
CCCGCCGGGAAAATCAATTCCTTCGTTCCCGGGGGATTATAATAACTGGTGGGATATTGGTTTCCGGTCCC
TAGAAAAGGTATAATTCTAATACTCCCTTTGGGGCCTTGGTTTTATTTTTAGGGGGTTAAAAAC
CATTTTCCCCCAGGAAAAGGGTTTAAAAAACCACAAAAACCCCTGGAAATTTTTCTAAAAATTT

TCCAAATAAAAAAACCTTTTTTTTTTTCAACCCCAAAAAAGGGGGGGCAAAAAACCCTCTTTTTTAGGGGG
GAGGGTTTTTTTTCCCCCTTTGGGGGGGCCCCCTTCCCCCAAATTTTTTTAAAAATAAAAAAAAAAAAA
GGCCCCCATCCCCTAAAAATATTGGGGTCTCCCTTAATAATTTAATTTAATTTAATTTATGT
GGGTGGGTTGGAAATAATTTTTGGGGCAAGGAAAAATTTATTTTTCCCAGCGGGTTGGGGGGAAAAACCAA
CCCACACCCCAAAAAACCCTCAATAAAAAATCCAAAAACCAATACTCATAATAAAAAGGA

UTPL(CF)-82

-----CTCCCAAACCCATGTGA--ACATAC-CTATTGTTGC
-TTCGGCGGGATT--GCCCGGGCGCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTTA-
---ACTC-TTGTTTTA-----TTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTT—ACAAATAAATAA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTC
TGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCT---AGGGCGTGGTGTGGGGA--TCGGCCAAAGCCCGCGAG--
GGACGGCCGGCCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGT-GATAT--
TCCGCATCGG--AGA-GCGACGAGCCCCTG-CCGTTAAACCCCAACTTTCT-AAGGTTGACCTCAGATCAGGT

UTPL(CF)-83

-----ATTTGTTGGGATACTACTCCACCCATGTGACTTACCTTTTGTTC -
CTCGGCAGAAGT-----TATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATT--AAACTC-TTGTTA-----
-----TTTTATGTAATCTGAGCGTCTTAT—TTTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGG CATGCCTGTTTCGAG
CGTCATTTCAACCCTTAAGCCT-----AGCTTAGTGTTGGGAA--TCTACT---TCTCTTAG---
GAGTTGTAGTTCCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCT-GAGCGTAGTAATTTTTTT--
CTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCCAG-CCGCTAAACCCCAATTTTTT—GTGGTTGACCTC
GGATCAGGT

UTPL(CF)-85

-----AGAGGGATGATCTGTGG---TCGACAACCTCCACC---ATGTG-A-CGTTACCAAACCTGTTGC
-CTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAG
GAACCAACCAAACCTC-TTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATT--
CAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTA
TTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGC
GTTGGGGA--TCGGGA---CCCCTCACA CGGGTGCCGGCCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGC
AGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCAC

UTPL(CF)-86

-----TTGCACGTCGAGTTCACCTCCCAACCCCTGTG---ACATACCTTA
ATGTTGC-CTCGGCGGATCA--GCCCGCG---CCCGGTAAAACGGGAC----GGCCCGCCAGAGGATCCAA----
ACTC-TTGCT-----GTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAA—
ACAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCC---
GGGTTTGGTGTGGGGA--TCGG--CAAGCCTTCTGG---CGAGCCGCCCCCTAAATCTAGTGG
CGGTCTCACTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACAC--CTCGCAACTG—GAACGCGGT
GCGGCCATG-CCGTAAACCCCAACTTCTG--AATG TTGACCTCGGATCAGGT

UTPL(CF)-92

-----GGTACAGCGCCTCGGCTACTCCAACCC-ATGTG-A-CCATACCAA
ACTGTTGC-CTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCCGCCGG
AGGGACCAGCCAACTC-TTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTT-TTACAGCTCTGAGCAAAAATT--
CAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCC
TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGACTTCGGGA---ACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCCGAAATA
CAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCGG—GAGCG
CGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAAC-TTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGT

UTPL(CF)290

GCTGTCGATAGTCTTGTCACCTGACCACCTCCTTGAAGCTGCGTCCGCGGAGCACCCCGGTCCGGTATGCGG
CACGCCCTGGGGAGGATCCCAACTCTTGCTGTTATTGTAACCTTCGGACTAAAACAAA
CAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCTATGAACAACGCATCACAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCATGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCTCCCG
CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCAGCGTCATTTCCACCCTCGGGCCCCCG
GGTTTGATGGTGATATTGACGGTTAAGTGTGGGATGTTCCCAGTCGTGATTTATTTGAGGGGTTG
TCCCCCCTTTGAGTTGCAGAGTTAGCTCACTGAATAGACGCATCTTCTCCTTTTCCCCGCTATGCTTGGAT
CTATCCCAGCGGTTAACTTCGCGAATTTTCGCGGTTGACTTAGAATCGGCTCAGGTACAC
ACAGTTTATTGAAGCATCTTAGTCTGCAAAGGAAAAGAACTAACAGGGATATCCTATAGGATATAGTG
AATCGTCAACAGATTACATTTGATATCAGATCCTCGGGTTCAGTTGATTTGTTTTAGGATGTTTTTATGA
CGGTGCATTCCTAG

ANEXO 5. Secuencias LSU (D1/D2), obtenidas para las diferentes cepas estudiadas.

UTPL(CF)-9

GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAA
CCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAA
TCTGG--CCCCTCCGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCC
GCCCGAGTTCCTTGAACGGGACGCCGAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGCTGGC-CACCGAG
CCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTA
TATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGA
TGAAAAGCACCTTGAAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTC-TCCCCGGTGCACTTCGCC
GCGTCCAGGCCAGCATCAGTTCGTGCGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCT
CCTCC—GGGAGTGTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGC?

UTPL(CF)-72

GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAA
CCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGG--
CCCCTCCGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCC
TGGAACGGGACGCCGAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGCTGGC-CACCGAG
CCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATA
TGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATG
AAAAGCACCTTGAAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGT
GACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTC-TCCCCGGTGCACTTCGCCGCGTCCAG
GCCAGCATCAGTTCGTGCGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCC--GGGA-GT
GTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCG

UTPL(CF)-124

GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAAT
CTGG--CCGC--AAGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGCCTTC
CGAGTTCCTTGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTAGGACCACCAAG
CCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGT
GTACGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGC
ATTCATGACCAGACTTGGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTC-TCGCCGGTGCACTCTGCC
A-GTCCAGGCCAGCATCAGTTTCCCCGGGGATAAAGGCGGCGGGAATGTGGCTCCCTT

CGGGGA-GTGTTATAGCCCG TCGTGTAATGCCCTGGGGCGGACTGAGGAACGCG

UTPL(CF)-337

??AGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC
AACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGG--
CCCTC-GGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGCGGTGCCTTCCGAGT
TCCCTGGAACGGGACGCCTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGTCGGA-
CACCAAGCCTCTGTATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGA
GGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAG
ATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTACGA
CCAGACCTTCTCCCGGCGGATCATCCGGTGTTT-TCACCGGTGCACTTCGCCGGGTCTAGGCCA
GCATCGGTTTTTCGCGGGGGGATAAAAGCTCTGGGAACGTAGCTCCTCC--GGGA-
GTGTTATAGCCCTCTGCATAATACCGCCGCGGGGACCGAGGACCGCG
