

UCH-FC
Biotecnología
R 741
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Aislamiento e identificación de hongos de suelo semiárido para la construcción de comunidades fúngicas experimentales

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

ENRIQUE IGNACIO ROJAS GONZÁLEZ

Abril 2013

Santiago-Chile

Director(a) del Seminario de Título: Dra. MARGARITA CARÚ

Co-Director(a) del Seminario de Título: Dra. JULIETA ORLANDO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Enrique Ignacio Rojas González:

“Aislamiento e identificación de hongos de suelo semiárido para la construcción de comunidades fúngicas experimentales”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Margarita Carú
Co-Directora Seminario de Título

Dra. Julieta Orlando
Co-Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Inmaculada Vaca
Presidente Comisión

Dra. Jennifer Alcaíno
Evaluador



Santiago de Chile,.....



Dedicado a mi familia por todo su apoyo

AGRADECIMIENTOS



En primer lugar quiero agradecer a mis padres por todo su esfuerzo y sacrificio, a pesar de todas las adversidades, para permitirme surgir en la vida, desarrollar mis estudios y lograr llegar hasta este punto. Gracias a ellos estoy donde estoy.

Le agradezco a la profe Margarita Carú por permitirme trabajar en su laboratorio y de entregarme su confianza para poder realizar este trabajo, el cual al comienzo no conocía del todo bien, pero que al ir desarrollándolo fui descubriendo lo mucho que me gustaba. Agradezco también a mi co-directora de tesis, Julieta Orlando, por todo el tiempo y paciencia que tuvo cada vez que necesité su apoyo, siempre mostrándose dispuesta a ayudarme, tanto en el desarrollo de mi tesis como también en actividades complementarias.

Quiero agradecer también a todos los miembros del laboratorio con los que pasé a diario muy buenos momentos. Agradezco a la Juanita por su apoyo y buena onda, a la Vale y a la Clari por su ayuda en los experimentos de mi tesis, a la Catalina por siempre estar dispuesta a ayudarme cuando lo necesité, al Gabriel por sus consejos fúngicos, al Diego por los partidos, a Felipe por ayudarme en mis primeros pasos en el laboratorio, a la Merly por ayudarme también en este tiempo, y a la Araceli y a mis compañeras nuevas Camila y Lauri por su gran simpatía. No me puedo olvidar de mis grandes compañeros que ya no están en el laboratorio, como la Lía, la Cami Saldías, el José, la Caro, el Ricardo y la Made por ser grandes personas con los que la pasé muy bien.

Por último Quiero agradecer a mis compañeros y amigos de Carrera que me acompañaron en este difícil camino universitario y con los que pasé momentos excelentes.

Este seminario de título se realizó gracias al financiamiento del proyecto Fondecyt 1120508.

BIOGRAFÍA

Mi nombre es Enrique Ignacio Rojas González, nacido en la comuna de San Miguel en Santiago. Por razones del destino mi infancia se desarrolló en varios lugares, siempre apegado a mis padres, los que siempre me brindaron todo su apoyo y cariño.



Mis estudios de básica los realicé en una humilde escuela de mi comuna, para luego comenzar la enseñanza media en mi viejo y querido liceo Manuel Barros Borgoño, en el cual hice grandes amigos, adquirí nuevas experiencias de vida, y en el que fui descubriendo mi gusto por el área de la Biología.

Posteriormente ingresé a la Universidad de Chile, a la carrera de Licenciatura en Biología. A pesar de que las Ciencias en particular no era en esos momentos mi primera opción, en el camino fui descubriendo lo interesante que ésta es y cuánto me gustaba. Fue así como fui aprendiendo más de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, a la que me cambié en el año 2009. En el duro camino universitario, conocí también grandes amigos con los que he pasado grandes momentos.

Mi seminario de título lo desarrollé en el laboratorio de Ecología microbiana, donde conocí grandes personas, siempre dispuestas a ayudarme, además de contar siempre con el apoyo de la profesora Margarita Carú y también de Julieta Orlando. En este paso, descubrí que el área que más me interesaba de las ciencias era la Microbiología, y que ese tema sería mi norte. Además en este laboratorio, perfeccionaré mis estudios desarrollando un Magister en ciencias biológicas, que es la próxima meta que debo alcanzar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS	1
1.2. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS FÚNGICOS	4
1.3. COMUNIDADES EXPERIMENTALES MICROBIANAS	8
1.4. OBJETIVOS	11
1.4.1. Objetivo General.....	11
1.4.2. Objetivos Específicos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	12
2.2. AISLAMIENTO DE HONGOS DESDE LAS MUESTRAS DE SUELO	12
2.3. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LOS AISLADOS FÚNGICOS 13	
2.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS FÚNGICOS	14
2.4.1. <i>Purificación del DNA de los aislados</i>	15
2.4.2. <i>Amplificación y secuenciación de los marcadores moleculares</i>	15
2.5. CONSTRUCCIÓN DE LA COMUNIDAD EXPERIMENTAL	17
2.5.1. <i>Perfiles genéticos de los aislados fúngicos y la comunidad experimental</i> ..	17
2.5.2. <i>Perfiles metabólicos de los aislados fúngicos y la comunidad experimental</i> 18	
3. RESULTADOS.....	20
3.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS HONGOS AISLADOS.....	20
3.1.1. <i>Aspergillus</i>	21
3.1.2. <i>Aureobasidium</i>	23
3.1.3. <i>Purpureocillium</i>	25
3.1.4. <i>Ulocladium</i>	27
3.1.5. <i>Paecilomyces</i>	28
3.1.6. <i>Cladosporium / Davidiella</i>	30
3.1.7. <i>Penicillium / Talaromyces</i>	32

3.1.8.	<i>Beauveria</i>	39
3.1.9.	<i>Mortierella</i>	41
3.1.10.	<i>Absidia</i>	43
3.1.11.	<i>Coniochaeta / Lecythophora</i>	44
3.1.12.	<i>Coniothyrium</i>	46
3.1.13.	<i>Phoma</i>	47
3.1.14.	Aislado MR-32.....	49
3.1.15.	Aislado MR-33.....	49
3.1.16.	Aislado MR-34.....	50
3.1.17.	Aislado MR-35.....	51
3.1.18.	Aislado MR-36.....	51
3.2.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.....	52
3.2.1.	<i>Obtención del DNA y amplificación de los marcadores moleculares</i>	53
3.2.2.	<i>Secuenciación de los marcadores moleculares y análisis de las secuencias.</i> 53	
3.2.3.	<i>Comparación de los resultados de la caracterización de la fracción cultivable con los de una caracterización independiente de cultivo.</i>	60
3.3.	COMUNIDAD FÚNGICA EXPERIMENTAL.....	63
3.3.1.	<i>Perfiles genéticos</i>	63
3.3.2.	<i>Perfiles metabólicos</i>	65
4.	DISCUSIÓN	70
4.1.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA VERSUS IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS.....	70
4.2.	COMPARACIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FÚNGICA CULTIVABLE CON LA CARACTERIZACIÓN INDEPENDIENTE DE CULTIVO.....	72
4.3.	COMUNIDAD EXPERIMENTAL Y DETECCIÓN DE SUS COMPONENTES.....	75
5.	CONCLUSIONES	80
6.	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXO	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares analizados.....	16
Tabla 2. Resultados de la identificación de los aislados basada en los caracteres morfológicos.....	20
Tabla 3. Resultados de la identificación de los aislados basada en los marcadores moleculares.....	54
Tabla 4. Identificación de los aislados propuesta de acuerdo a la caracterización morfológica y molecular.....	56
Tabla 5. Hongos utilizados para la construcción de la comunidad experimental.....	63
Tabla 6. T-RFs (pb) obtenidos experimentalmente por T-RFLP y los esperados por análisis <i>in silico</i>	64
Tabla 7. Categorías de fuentes de carbono de la placa FF-Microplate (BIOLOG) y el número de fuentes utilizadas por cada muestra.....	66
Tabla 8. Perfil metabólico de la comunidad experimental y de la comunidad teórica...	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del clúster génico del RNA ribosomal fúngico. Se muestran la localización de las subunidades pequeña (rRNA 18S) y grande (rRNA 28S) separadas por la región intergénica que incluye los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 junto con el gen del rRNA 5,8S.	5
Figura 2. Fuentes de Carbono en la FF-Microplate (Biolog).....	7
Figura 3. Colonias y conidióforos de los aislados MR-1, MR-2 (ambas en medio PDA) y MR-3 (en medio Sabouraud) del género <i>Aspergillus</i> . La barra indica 250 µm.	23
Figura 4. Colonias y desarrollo conidial de <i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i> (MR-4) y de <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> (MR-5) en medio PDA. La barra indica 250 µm.	25
Figura 5. Colonia en PDA, conidióforos con sus fiáldes y conidios de <i>P. lilacinum</i> (MR-6). La barra indica 250 µm.....	26
Figura 6. Colonias en medio Sabouraud y conidios tréticos septados de <i>Ulocladium</i> sp. (MR-7 y MR-8). La barra indica 250 µm.....	28
Figura 7. Colonia en medio PDA, conidióforo y conidios en cadenas de <i>P. variotii</i> (MR-9). La barra indica 250 µm.....	29
Figura 8. Colonias en medio PDA, conidióforos ramificados y conidios creciendo en cadenas de <i>Cladosporium/Davidiella</i> (MR-10) y <i>Cladosporium</i> sp. (MR-11 y MR-12). La barra indica 250 µm.....	31
Figura 9. Colonias en medio PDA y conidióforos de <i>P. canescens</i> (MR-13). La barra indica 250 µm.....	32
Figura 10. Colonias en medio PDA y conidióforos de <i>P. chrysogenum</i> (MR-14). La barra indica 250 µm.....	33
Figura 11. Colonias en medio PDA y conidióforos de <i>P. expansum</i> (MR-15). La barra indica 250 µm.....	34
Figura 12. Colonias en medio PDA y conidióforos de <i>P. polonicum</i> (MR-16). La barra indica 250 µm.....	35
Figura 13. B. Colonias en medio Sabouraud y conidióforos de <i>Penicillium</i> sp. (MR-18, MR-19, MR-20). La barra indica 250 µm.....	37
Figura 14. Colonias en medio PDA y conidióforos con conidios de <i>T. flavus</i> (MR-25). La barra indica 250 µm.....	39
Figura 15. Colonias, conidióforos y conidios de MR-21 en medio PDA y de MR-22 en medio Sabouraud. La barra indica 250 µm.	41
Figura 16. Colonia en medio PDA, esporangióforo y esporas de <i>Mortierella</i> (MR-23). La barra indica 250 µm.....	42
Figura 17. Colonia en medio Sabouraud y esporangióforo con esporas en su cabeza de <i>Absidia</i> sp. (MR-24). La barra indica 250 µm.....	43
Figura 18. Colonias en medio PDA de los aislados MR-26 y MR-27.....	44

Figura 19. Colonias en medio PDA y fiálides intercalares de <i>Lecythophora</i> (MR-28 y MR-29). La barra indica 250 μm .	46
Figura 20. Colonia de <i>Coniothyrium sp.</i> en medio PDA y un picnido entre sus hifas (MR-30). La barra indica 250 μm .	47
Figura 21. Colonia en medio PDA y sección longitudinal del picnidio de <i>Phoma sp.</i> (MR-31). La barra indica 250 μm .	48
Figura 22. Colonia en medio PDA y conidióforo de MR-32. La barra indica 250 μm .	49
Figura 23. Colonias en medio PDA del aislado MR-33.	50
Figura 24. Colonias en medio Sabouraud del aislado MR-34 y sus esporas. La barra indica 250 μm .	51
Figura 25. Colonias en medio Sabouraud del aislado MR-35.	51
Figura 26. Colonias del aislado MR-36.	52
Figura 27. Electroforesis en gel de los marcadores rDNA 28S (A), 18S (B) e ITS (C), usando el marcador de peso molecular 100bp (100-3000).	53
Figura 28. Coincidencias entre las diferentes herramientas usadas en la identificación de los aislados fúngicos y la identificación consenso.	57
Figura 29. Coincidencias entre las diferentes herramientas usadas en la identificación de los aislados fúngicos y la identificación consenso a nivel de género.	58
Figura 30. Distribución de los aislados fúngicos identificados a nivel de género.	59
Figura 31. Análisis de agrupamiento de las secuencias obtenidas del marcador molecular rDNA 18S de la fracción cultivable (círculos verdes) y de la genoteca (independiente de cultivo; cuadrados rojos). La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 500 iteraciones de bootstrap y siguiendo el modelo Kimura 2- parámetros. La secuencia de <i>Phytophthora riparia</i> (JQ626604.1) se utilizó como raíz del árbol.	61
Figura 32. Frecuencia relativa de secuencias presentes exclusivamente en la fracción cultivada, exclusivas de la fracción no cultivada, y comunes a ambas fracciones.	62
Figura 33. Perfil de T-RFLP del marcador molecular ITS de la comunidad de los aislados seleccionados para el montaje de la comunidad fúngica experimental.	65
Figura 34. Utilización de las diferentes fuentes de carbono en la comunidad teórica (azul) y la comunidad experimental (rojo).	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Herramienta de búsqueda por alineamiento local básico)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP: *Deoxyribonucleotide triphosphate* (desoxirribonucleotido trifosfato).

EDTA: *Ethylene diamine tetra-acetic acid* (ácido etilen diamino tetraacetico)

INT: *Iodonitrotetrazolium* (yodonitrotetrazolio)

ITS: espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 junto con el gen del rRNA 5,8S

NCBI: centro nacional para información biotecnológica

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

rDNA: *Ribosomic deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico ribosomal)

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

TE: Tris-EDTA

T-RFLP: *Terminal restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales)

Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano

UF: Unidades de fluorescencia

RESUMEN

Los hongos son organismos unicelulares o multicelulares que cumplen roles claves en los ecosistemas, aportando con una alta diversidad de especies y participando en los ciclos biogeoquímicos. Ellos presentan variadas estrategias reproductivas, encontrando hongos que desarrollan ciclos de vida asexual, sexual, o que desarrollan el ciclo de vida completo. Históricamente, las estructuras microscópicas que participan en estos ciclos de reproducción han sido utilizadas como carácter taxonómico en la identificación de hongos. Además, el uso de marcadores moleculares, tales como los genes ribosomales, también han sido de gran ayuda en la identificación y clasificación taxonómica de las especies fúngicas. La primera parte de este trabajo se centró en el aislamiento e identificación de hongos desde un suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile central. Para esto se realizó un aislamiento de hongos desde muestras de suelo los cuales se caracterizaron inicialmente a nivel morfológico. La identificación taxonómica se complementó con un análisis molecular mediante el uso de los marcadores moleculares rDNA 18S, rDNA 28S, y la región intergénica ITS, en conjunto con la búsqueda por similitud de secuencia en base de datos. Ninguna de las herramientas de identificación, morfológica y molecular, permitió la identificación de la totalidad de los aislados (n=36), lo que refleja la necesidad de un análisis que involucre diferentes aproximaciones. Mediante la caracterización morfológica y molecular se asignó una identificación a los aislados, los que se agruparon en 3 divisiones, siendo la más abundante Ascomycota; en 15 familias, donde la más representada fue Trichocomaceae; y en 21 géneros, siendo el más abundante *Penicillium*.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas herramientas que faciliten el estudio de la ecología microbiana, ha sido un gran aporte para esta disciplina. Entre éstas, destaca la construcción de comunidades microbianas experimentales, que tienen como función reducir la complejidad asociada a los estudios de ecología microbiana, y permitir analizar sus componentes por separado. La elección de un modelo fúngico obedece a la importancia que estos organismos tienen en los ecosistemas. Por lo tanto, a partir de una fracción de los aislados fúngicos se construyó una comunidad experimental, como modelo para el estudio de interacciones biológicas. Para la construcción de la comunidad experimental, se eligieron 5 de los aislados fúngicos, los cuales se seleccionaron por pertenecer a los géneros de la familia fúngica más abundante según lo determinado mediante la aproximación dependiente de cultivo. Para poder evaluar la estructura de la comunidad, se utilizó la técnica del T-RFLP, la cual permitió identificar a los hongos constituyentes de ésta. Además, se evaluó el perfil metabólico de la comunidad experimental y los datos obtenidos se compararon con los perfiles metabólicos individuales de los hongos constituyentes, observándose diferencias entre ambos patrones metabólicos, lo cual da cuenta de la existencia de interacciones entre los hongos de la comunidad.

ABSTRACT

Fungi are unicellular or multicellular organisms that play key roles in the ecosystems, providing a high diversity of species which contribute to the biogeochemical cycles. They have varied reproductive strategies, finding fungi that develop asexual, sexual, or their full life cycles. Historically, the microscopic structures involved in their reproduction, have been used as taxonomic characters in fungal identification. Furthermore, the use of molecular markers, such as the ribosomal genes, has also been of great help in the identification and taxonomic classification of the fungal species. The first part of this work was focused in the isolation and identification of fungi from a semi-arid soil from the sclerophyllous matorral from Central Chile. For this, fungal isolation was performed from soil samples, which were initially characterized at morphological level. The taxonomic identification was complemented with molecular analysis using the molecular markers 18S rDNA, 28S rDNA, and the intergenic region ITS, altogether with sequence similarity search in databases. Neither identification tool, morphological or molecular, allowed the identification of the totality of the isolates (n=36), reflecting the need for analysis involving different approaches. Using the morphological and molecular characterization, an identification was assigned to each isolated, which were grouped into three divisions, the most abundant Ascomycota; in 15 families, being the most represented Trichocomaceae; and in 21 genera, *Penicillium* being the most abundant.

On the other hand, the development of new tools to facilitate the study of microbial ecology has been a great contribution to this discipline. Amongst them is the construction

of experimental microbial communities, reducing the complexity associated with microbial ecology studies, and allowing to analyze the components separately. The choice of a fungal model is due to the importance of these organisms in ecosystems. Therefore, from a fraction of the fungal isolates, an experimental community was built as a model to study their biological interactions. For the experimental community building, 5 of the fungal isolates were chosen which were chosen as they represented the most abundant fungal family as determined by a culture-dependent approach. In order to evaluate the community structure, the T-RFLP technique was used, which allowed the identification of fungal components. Additionally, the metabolic profile of the experimental community was evaluated and compared with the individual metabolic profiles of the fungal components. This analysis revealed differences between both metabolic patterns, indicating accounts for the existence of interactions between the fungi of the community.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes pertenecientes al Reino Fungi, Dominio Eucarya, los cuales pueden ser multicelulares con una forma filamentosa, aunque también existen en formas unicelulares llamados levaduras (Mc Laughlin y col. 2009). Entre sus características destacan sus variadas estrategias de vida, ya que pueden ser organismos saprófitos, parásitos o simbioses, lo que los convierte en importantes componentes de los ecosistemas (Piontelli-Laforet 2011). Sólo se han logrado identificar aproximadamente 100.000 especies de hongos, de un total estimado de 5,1 millones de especies (Blackwell 2011). Las células fúngicas carecen de clorofila, tienen paredes celulares compuestas por quitina y poseen uno o más núcleos, con un número de cromosomas que varía entre 3 a 20, y un tamaño de genoma de entre 10 a 60 millones de pares de bases (Gregory y col. 2007).

En cuanto a su taxonomía, los Phyla o divisiones que se reconocen tradicionalmente dentro del reino son Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, aunque las últimas evidencias moleculares sugieren que la división Zygomycota es polifilética (Lutzoni y col. 2004), siendo algunos grupos de este phylum incorporados a una nueva división llamada Glomeromycota (Schübler y col 2001).

Estructuralmente, los hongos multicelulares se caracterizan por sus células que crecen en filamentos microscópicos denominados hifas, las que son su unidad básica. También existen hongos que pueden tener transiciones entre estados filamentosos (multicelulares) con estados de levadura (unicelulares), los que reciben el nombre de

hongos dimórficos, aunque la mayoría presenta sólo un estado (Moore 1998). Los hongos levaduriformes forman colonias semejantes a las bacterianas, con una textura suave y uniforme, a diferencia de los filamentosos que forman colonias generalmente con aspecto veloso o lanoso. Las hifas de los hongos filamentosos son estructuras tubulares de longitud variable formadas por una fila de células alargadas recubiertas por pared celular, con numerosas ramificaciones laterales y con un crecimiento apical. En los hongos superiores, estas hifas se encuentran tabicadas por septos. El conjunto de hifas recibe el nombre de micelio o talo del hongo, el cual le permite crecer sobre un sustrato. En el micelio de un hongo se distinguen tres tipos: i) el micelio vegetativo, que corresponde a la zona del hongo adherida al sustrato, formado por un conjunto de hifas indiferenciadas y asociado a una función nutritiva; ii) el micelio aéreo, formado por hifas vegetativas que crecen y se diferencian en hifas aéreas que presentan una orientación vertical y que se proyectan sobre la superficie; y iii) el micelio reproductivo, el cual está formado por hifas aéreas que dan origen a las estructuras reproductivas (Carrillo 2003).

Los hongos son organismos quimioheterotróficos, ya que utilizan una fuente química de energía, y sustratos orgánicos como principal fuente de carbono (Stainer y col. 1992). La obtención de esta fuente de carbono se realiza por medio de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan biopolímeros complejos que permiten su digestión exógena y la posterior absorción de sus subproductos, los cuales son almacenados como glicógeno (Deacon 2006).

La reproducción de los hongos ocurre por medio de esporas, que son pequeñas unidades propagativas envueltas por pared celular, que se dispersan y germinan en una gran diversidad de ambientes cuando encuentran un sustrato y condiciones favorables, produciendo nuevas colonias fúngicas (Kües & Fischer 2006). Los hongos

poseen diferentes estrategias y modalidades reproductivas que permiten su multiplicación y perdurabilidad en el tiempo, encontrando hongos que se reproducen asexualmente, conocidos como hongos anamorfos, y hongos que se reproducen sexualmente, llamados hongos teleomorfos (Guarro 2012). Los hongos que desarrollan el ciclo reproductivo completo, involucrando tanto las fases asexual como sexual, se denominan hongos holomorfos (Shenoy y col. 2007). Una misma especie de hongo teleomorfo, bajo ciertas condiciones, puede desarrollarse asexualmente (anamorfo) con una morfología diferente a la del teleomorfo, lo cual es conocido como pleomorfismo (Burnett 2003). A pesar de ser la misma especie, un hongo teleomorfo posee un nombre taxonómico distinto al de su anamorfo, existiendo una nomenclatura binominal para ellos (Seifert & Samuels 2000).

El ciclo de vida completo general de los hongos comienza con una espora generalmente haploide (n) la cual germina y da origen a un micelio. La siguiente etapa del ciclo depende del encuentro y apareamiento de dos micelios con distintos "mating type" o tipo de apareamiento. Cuando las hifas de estos micelios de distinto tipo de apareamiento se encuentran, ocurre una fusión de los citoplasmas de sus células en una etapa llamada plasmogamia. Los núcleos de las células fusionadas permanecen independientes, en un estado dicariótico ($n + n$). Posteriormente, ocurre la etapa de cariogamia en la que los núcleos de las células dicarióticas se fusionan para obtener micelios diploides ($2n$). Finalmente, el núcleo diploide entra en meiosis generando esporas haploides (n) que corresponden a los productos meióticos, terminando así la fase teleomorfa del ciclo. La fase anamorfa del ciclo corresponde al crecimiento vegetativo donde el micelio se reproduce por mitosis y se diferencia en esporas, las cuales formarán nuevas colonias fúngicas (Savada y col. 2008).

1.2. Identificación de aislados fúngicos

Las características de las estructuras reproductivas que participan en las fases anamorfas y teleomorfas son muy importantes en la identificación y clasificación taxonómica de los hongos (Guarro y col. 1999). Entre las estructuras utilizadas para la clasificación taxonómica de hongos destacan las esporas asexuales, como los conidios, que son aquellas esporas que nacen de forma externa y que destacan en divisiones como la Ascomycota y Basidiomycota; o también pueden ser esporangioesporas, las cuales nacen de forma interna dentro de estructuras especializadas y que son propias de divisiones como la Zygomycota (Carrillo 2003). Las características de las estructuras que producen estas esporas también son usadas como carácter taxonómico. Dentro de éstas se distinguen el conidióforo, que es una parte del micelio o una hifa estructuralmente diferenciada en la producción de conidios. En los conidióforos nacen las células conidiógenas, las que según su morfología pueden ser fiálides o anélides. El análogo de los conidióforos en el caso de las esporangioesporas son los esporangióforos (Pemán y col. 2007). Además de la morfología de las estructuras reproductivas, la forma en la que son producidas las esporas también es usado como carácter taxonómico, existiendo hongos con un tipo de desarrollo blástico, en el cual la espora nace por una proyección desde la célula productora con una posterior delimitación entre ambas por un septo, o también un tipo de desarrollo tálico en el que la producción de la espora ocurre después de la delimitación de la estructura por uno o más septos y conlleva a que una porción de la hifa reproductora se desarticule al formar los conidios (Castañeda 2001). La morfología de las estructuras de reproducción sexual o teleomorfas también son útiles en la clasificación de hongos (Berbee & Taylor 1992). Los cuerpos fructíferos, son tejidos

especializados en los cuales se forman las estructuras encargadas de la producción de las esporas sexuales, llamados basidios o ascos que generan basidioesporas o ascoesporas, respectivamente, y que permiten ubicarlos en las principales divisiones fúngicas (Guarro y col. 1999).

Aunque la identificación y caracterización de los hongos por medio de caracteres morfológicos se utiliza ampliamente, existen muchos casos en que éste método presenta dificultades, especialmente en aquellos que presentan características fenotípicas muy parecidas, razón por la cual se requiere de otros métodos para complementar esta caracterización (Unda y col. 2011). Entre estos métodos destaca el uso de los marcadores moleculares como los genes que codifican para los RNA ribosomales, que se encuentran en todas las especies cumpliendo la misma función, tienen baja tasa de transferencia horizontal y sus secuencias poseen regiones conservadas y variables las cuales son informativas a distintos niveles taxonómicos (Olsen y col. 1986). El clúster génico ribosomal (Figura 1) está formado por tres genes altamente conservados, llamados rDNA 18S, rDNA 5,8S y rDNA 28S, que codifican para los rRNA 18S (subunidad menor del ribosoma), rRNA 5,8S y rRNA 28S (ambos de la subunidad mayor del ribosoma), respectivamente, y que se encuentran separadas por dos espaciadores intergénicos llamados ITS1 e ITS2 (Atkins & Clark 2004). El clúster ribosomal se encuentra repetido en tándem en el genoma fúngico.

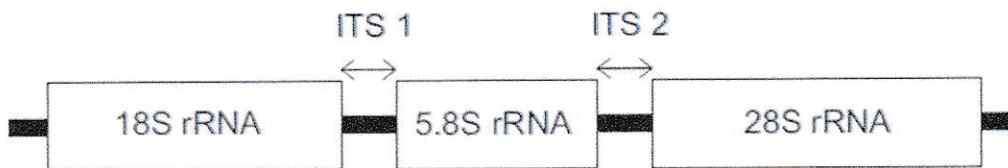


Figura 1. Representación esquemática del clúster génico del RNA ribosomal fúngico. Se muestran la localización de las subunidades pequeña (rRNA 18S) y grande (rRNA 28S) separadas por la región intergénica que incluye los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 junto con el gen del rRNA 5,8S.

El marcador molecular rDNA 18S es uno de los más utilizados, debido principalmente a sus secuencias altamente conservadas y a su baja tasa de sustitución, lo que lo convierte en una herramienta muy útil en el estudio de relaciones filogenéticas con tiempo de divergencia muy antiguos (Hill & Dixon 1991). El marcador molecular rDNA 28S también es muy utilizado en la taxonomía fúngica y presenta una mayor variabilidad en su secuencia que el rDNA 18S (Ninet y col. 2003). Sin embargo, el hecho de que estos marcadores sean tan conservados representa un inconveniente al identificar organismos muy relacionados filogenéticamente, por lo cual estos marcadores están limitados al nivel de género o familia de los hongos (Anderson & Calrney 2004). Por otra parte, el marcador molecular ITS (espaciador transcrito interno), está compuesto por las regiones ITS1 e ITS2 del clúster ribosomal, las que presentan tasas de sustitución muy elevadas en sus secuencias, convirtiéndolo en uno de los marcadores moleculares útiles para la identificación de hongos a nivel de especie (Seifert 2009).

Una de las mayores ventajas del uso de marcadores moleculares ribosomales es que se pueden amplificar fácilmente a partir del DNA genómico de un hongo por medio de la técnica de PCR utilizando partidores universales (Anderson & Calrney 2004). Las secuencias nucleotídicas de los amplicones se pueden analizar con herramientas bioinformáticas como el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que permite su alineamiento con secuencias de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para asociar una identidad a los hongos estudiados (Singh y col. 2012).

Como complemento a la caracterización morfológica y molecular, los hongos también se pueden estudiar por medio de una caracterización fisiológica, en base a sus

propiedades metabólicas que son únicas para cada uno de estos organismos (Singh 2009). Sin embargo, la identificación y caracterización metabólica se dificulta en hongos cercanamente relacionados requiriéndose análisis más extensivos. Algunos test metabólicos como el “FF MicroPlate”, entregan una rápida y eficaz caracterización metabólica de hongos filamentosos (Singh 2009). Este ensayo permite determinar la utilización de una batería de 95 sustratos diferentes (Figura 2), que son utilizados diferencialmente entre las distintas especies de hongos. Cada especie fúngica tiene un perfil metabólico característico que permite utilizarlo como un rasgo fisiológico con valor taxonómico (Currah, 2005). Adicionalmente, este patrón de utilización de nutrientes permite caracterizar metabólicamente comunidades fúngicas y compararlas con los patrones individuales para estudios de interacciones y/o del efecto de perturbaciones bióticas o abióticas de las comunidades (Buyer y col. 2001).

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-D- Galactosamine	A4 N-Acetyl-D- Glucosamine	A5 N-Acetyl-D- Mannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 α -Cyclodextrin	B2 β -Cyclodextrin	B3 Dextrin	B4 L-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 α -D-Glucose
C1 Glucose-1- Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 α -D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 α -Methyl-D- Galactoside	D6 β -Methyl-D- Galactoside	D7 α -Methyl-D- Glucoside	D8 β -Methyl-D- Glucoside	D9 Palatinose	D10 D-Palcose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagalose	E9 D-Trehalose	E10 Turanose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 γ -Amino-butyric Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 β -Hydroxy-butyric Acid	F5 γ -Hydroxy-butyric Acid	F6 p -Hydroxyphenyl- acetic Acid	F7 α -Keto-glutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quinic Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebaic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Nanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Ornithine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyroglutamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Threonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Putrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5'- Monophosphate

Figura 2. Fuentes de Carbono en la FF-Microplate (Biolog).

1.3. Comunidades experimentales microbianas

El estudio de la Ecología Microbiana busca comprender la diversidad, distribución y abundancia de los microorganismos presentes en los distintos hábitats donde forman comunidades y establecen una red de interacciones dinámica y compleja. Estos estudios se basan en aproximaciones que consisten en modelos matemáticos, observaciones de sistemas naturales y manipulaciones a nivel de campo o de microcosmo. Una herramienta de estudio que está actualmente siendo utilizada, consiste en la construcción de ensamblajes microbianos experimentales, los cuales permiten estudiar procesos ecológicos de interés, tales como la generación y mantención de la diversidad, interacciones ecológicas o las respuestas frente a perturbaciones entre otros (Jessup y col. 2005).

Los primeros estudios con sistemas microbianos en Ecología datan de finales del siglo XIX, fueron los experimentos de Gause (1934) que marcaron la historia de este tipo de aproximaciones experimentales. Gause construyó sistemas microbianos experimentales constituidos por bacterias, levaduras y protistas, acoplando estos experimentos de laboratorio con modelos matemáticos de competencia e interacción predador-presa. Esta combinación de experimentos y teoría fue muy poderosa, permitiéndole hacer predicciones cuantitativas de las interacciones entre especies, para luego probar esas predicciones con nuevos diseños de experimentos con microorganismos. Aunque varios principios claves de la Ecología son atribuidos a los estudios de sistemas microbianos experimentales, su uso es aún limitado (Jessup y col. 2005). Sólo recientemente con el auge de la Ecología Microbiana, el uso de estos sistemas experimentales han ido en aumento dado las ventajas que éstos poseen, tales como el alto grado de control experimental que ofrecen, combinado con el

pequeño tamaño de estos sistemas y el corto tiempo generacional de los microorganismos, en adición a la abundante información genética y fisiológica disponible para éstos. Además, con el advenimiento de nuevas herramientas moleculares que permiten monitorear el comportamiento microbiano, la aplicación de estos sistemas experimentales podría ser más eficaz. Estas ventajas permiten el diseño de experimentos que buscan reducir la complejidad de los sistemas naturales y abordarlos por medio de sus componentes por separado, siendo esto el principal propósito de estos sistemas (Jessup y col. 2004).

Las principales críticas a este tipo de sistemas están relacionadas principalmente con su simplicidad estructural y taxonómica, y a su potencial pérdida de heterogeneidad espacial y temporal (Carpenter 1996), debida a las restricciones experimentales. A pesar de esto, se ha llegado al consenso de que estas limitaciones son irrelevantes si los sistemas microbianos experimentales se ven solo como una parte importante de una rica red interrelacionada de aproximaciones que permiten comprender y predecir el comportamiento de poblaciones y sistemas en ecología (Lawton 1995).

Uno de los objetivos de este trabajo fue la construcción de una comunidad fúngica experimental, como un modelo biológico para el estudio de interacciones, a partir de especies de hongos aisladas del suelo, pero que coexisten en condiciones naturales. La elección de una comunidad fúngica se basa en la importancia ecológica de los hongos, ellos son agentes relevantes de la microbiota, ya que aportan una alta diversidad de especies, con una gran versatilidad metabólica (Hawksworth 2001). Los hongos también son importantes en los ecosistemas por su participación en los ciclos biogeoquímicos y en el proceso de descomposición orgánica, ya que son capaces de

recuperar el carbono fijado que reintegran al ciclo en forma de dióxido de carbono a la atmósfera para su uso en la fotosíntesis (Bardgett y col. 2008). En el ciclo del nitrógeno, los hongos ayudan a recuperar el nitrógeno de la materia orgánica para convertirlo en amoníaco, que a la vez es facilitado a las plantas. Este proceso es más eficiente en las micorrizas, en el cual el hongo intercambia el amoníaco a nivel de las raíces de las plantas por compuestos carbonados producidos por la fotosíntesis (Govindarajulu y col. 2005). Estas micorrizas son también importantes en el ciclo del fósforo, ya que de esa manera los hongos devuelven este elemento a las plantas en forma de fosfato (Harrison & Van Buuren 1995). Además, en suelos áridos en particular, los hongos tienen un rol muy importante, ya que se ha descrito que son capaces de establecer una red denominada "fungal loop", que permite la comunicación e integración de la macrobiota y la microbiota optimizando el flujo de elementos como el carbono y el nitrógeno entre ellos (Collins y col. 2008), lo que permite a la vez mejorar la resistencia a la desecación, la mantención de la humedad, y además a mejorar la fertilidad de estos suelos (Green y col. 2008).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Aislar e identificar especies fúngicas desde un suelo semiárido para la construcción de una comunidad modelo experimental.

1.4.2. Objetivos Específicos

- 1) Aislar y caracterizar morfológicamente hongos desde un suelo semiárido.
- 2) Identificar los hongos aislados mediante análisis de marcadores moleculares.
- 3) Construir una comunidad fúngica experimental y detectar sus componentes mediante perfiles genéticos y metabólicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de las muestras

Las muestras de suelo se recolectaron en el matorral esclerófilo en la localidad del "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. Las muestras se tomaron a 10 cm de profundidad y se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético (Ziploc) a 4°C hasta el momento de su análisis. La localidad de "El Romeral" se encuentra en la zona precordillerana de la región metropolitana, y corresponde a una comunidad vegetal compuesta de arbustos esclerófilos y pequeños árboles donde las áreas descubiertas poseen un escasa cubierta herbácea. Esta localidad pertenece a una zona semiárida del matorral de Chile Central, que presenta un clima Mediterráneo con veranos secos y precipitaciones invernales con un promedio anual de 350 mm (Gajardo 1994).

2.2. Aislamiento de hongos desde las muestras de suelo

Para el aislamiento de los hongos se tomaron 2 g de suelo y se agregaron a 20 ml de solución estéril de agua destilada y Tween 20 al 0,5%. La suspensión de suelo se agitó en un agitador orbital a 25°C por 24 horas para luego mantenerla en incubación estática por 2 horas para decantar el material grueso del suelo. A partir del líquido sobrenadante se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos con agua peptonada al 0,1%. Desde la dilución 10^{-1} hasta la 10^{-6} , se sembraron por triplicado 0,1 ml de cada dilución en placas con medio papa dextrosa agar (PDA) y de agar Sabouraud, que contenían cloranfenicol a una concentración de 30 µg/ml para impedir

el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 25°C entre 4 y 7 días hasta observar el crecimiento de colonias fúngicas.

A partir de las colonias fúngicas aisladas se prepararon suspensiones de esporas y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1%, desde la dilución 10^{-1} hasta la 10^{-6} . Una alícuota de 0,1 ml de las diluciones se sembró en placas con medio PDA y otras con medio Sabouraud que contenían antibiótico como se mencionó anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta obtener los aislados puros (cultivos axénicos). Una vez obtenidos los cultivos axénicos, las colonias se inocularon en tubos de vidrio con 9 ml de medio PDA inclinado almacenados a 5°C, para mantener los stocks fúngicos. Los aislados obtenidos se designaron con las letras MR (Matorral-Romeral) seguidas por un número.

2.3. Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados fúngicos

Los aislados se caracterizaron en primer lugar macroscópicamente de forma visual directamente o con ayuda de una lupa estereoscópica. De este modo se registraron las características de las colonias crecidas en medio PDA, tales como forma de las colonias, color (tanto por el frente como por el reverso), textura y producción de pigmentos en el medio. También se determinó la velocidad de crecimiento radial de las colonias en medio PDA, para lo cual se midió el radio de éstas cada 24 h utilizando un pie de metro bajo una lupa estereoscópica. Se construyó un gráfico del radio de las colonias en función de los días de crecimiento, del que por regresión lineal se obtuvo la pendiente de la recta que indica la velocidad de crecimiento radial. Para la identificación y registro de las características morfológicas del micelio, las esporas, estructuras reproductivas y otros rasgos importantes para la

identificación taxonómica de los distintos aislados fúngicos, se realizaron preparaciones para la observación microscópica. Para esto se utilizó un procedimiento modificado de la técnica de crecimiento de los hongos en cubreobjetos (Riddell 1950). Esta técnica consiste en preparar placas con medio PDA con cloranfenicol (30 µg/ml) para cada uno de los aislados y con el uso de un asa de siembra estéril cortar cuatro cubos de agar (de aproximadamente 7 x 7 mm), los cuales se colocan sobre la superficie del medio PDA. Finalmente, se inoculan los costados de los cubos de agar con los distintos aislados fúngicos y sobre ellos se coloca un cubreobjeto estéril para que las hifas del hongo crezcan adheridas a éste. Cada placa se incubó a 25°C hasta la aparición de esporas en las colonias. Una vez ocurrido esto, los cubreobjetos se retiraron de las placas y se les aplicó una gota de azul de metileno para la tinción de las muestras. Los cubreobjetos secos, se colocaron sobre portaobjetos limpios para su observación utilizando un microscopio "Swift optical instruments M10" y se obtuvieron imágenes digitales mediante el programa "Motic Image Plus" (Motic®). Las observaciones realizadas se compararon con claves taxonómicas de hongos (Piontelli-Laforet 2011).

2.4. Identificación molecular de los aislados fúngicos

Para la identificación molecular de los aislados fúngicos se analizó la secuencia de los siguientes marcadores moleculares que se describen en la literatura como genes con valor taxonómico: los genes ribosomales codificantes de la subunidad pequeña (rDNA 18S) y de la subunidad mayor (rDNA 28S) del ribosoma de hongos. También se utilizó la región intergénica de estos marcadores, llamadas secuencias transcritas internas (región ITS).

2.4.1. Purificación del DNA de los aislados

Los aislados fúngicos se cultivaron en 20 ml de medio Vogel 1X (Anexo Tabla A1), sacarosa al 1,5%, y cloranfenicol (30 µg/ml), en un agitador orbital a 25°C hasta observar la aparición de micelio en el medio (aproximadamente de 5 a 7 días). El micelio se transfirió a un tubo estéril de 15 ml con un asa de siembra, se lavó con 10 ml de agua destilada estéril y se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min; este procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el micelio se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se almacenó a -20°C. El DNA se purificó a partir de 100-200 mg de micelio utilizando el kit "PowerSoil DNA isolation" (MoBio Lab. Inc.). El DNA obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El resultado de la extracción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Los geles se tiñeron con GelRed™ (Biotium) y se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

2.4.2. Amplificación y secuenciación de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se amplificaron por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el marcador rDNA 18S, se utilizaron los partidores EF4 y EF3, para el marcador 28S se utilizaron los partidores LIC24R y LR7, y para el marcador ITS se utilizaron los partidores ITS1 e ITS4 (Tabla 1). Las correspondientes amplificaciones se realizaron utilizando el kit "GoTaq PCR Master Mix" (Promega), que incluye la GoTaq® DNA polimerasa en buffer de reacción "Green GoTaq" (pH 8,5), 200 mM de cada dNTP y 1,5 mM de MgCl₂. Las amplificaciones de los respectivos marcadores moleculares se realizaron en un termociclador Maxygen

(Axygen). El programa para el marcador rDNA 18S consistió en una denaturación inicial a 94°C, para luego seguir con 40 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, una hibridación a 48°C por 1 min y una extensión a 72°C por 3 min, con una extensión final a 72°C por 10 min. El programa de amplificación del marcador rDNA 28S consistió en una primera denaturación a 94°C por 1 min, para luego seguir con 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 seg, una hibridación a 52°C por 30 seg y una extensión a 72°C por 90 seg, con una extensión final a 72°C por 4 min. Finalmente, el programa para el marcador ITS consistió de una denaturación inicial a 94°C por 3 min, para seguir con 30 ciclos de denaturación por 30 seg, una hibridación a 57°C por 30 seg, y una extensión a 72°C por 90 seg, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v) teñidos con GelRed™ (Biotium), y se utilizó el marcador de peso molecular 100bp (Fermentas). Los productos amplificados se secuenciaron con un equipo Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). Las secuencias de los amplicones se analizaron por medio del programa Mega 5.0 (Tamura y col. 2011) y luego se alinearon con la herramienta de búsqueda por similitud del NCBI, BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST).

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares analizados

Blanco	Partidor	Secuencia (5'-3')	Referencia
rDNA 18S	EF4	GTTTGAACCAGTAAATCTCCT	Smit y col. 1999
	EF3	GTTTGAACCAGTAAATCTCCT	
rDNA 28S	LIC24R	GAAACCAACAGGGATTG	Kauff & Lutzoni 2002
	LR7	TACTACCACCAAGATCT	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Gardes & Bruns 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

2.5. Construcción de la comunidad experimental

La comunidad experimental fúngica se preparó en frascos de 20 ml, usando como sustrato 0,5 g de lana de roca estéril y medio de cultivo conteniendo solución salina Vogel 1X, dextrosa 0,5 %, extracto de levadura 0,5%, tiamina 0,5% y cloranfenicol 30 µg/ml. El medio de cultivo se aplicó a una capacidad de retención de la matriz de un 60%. Para obtener las esporas de los hongos seleccionados para el montaje de la comunidad, los mismos se cultivaron en tubos con medio PDA inclinado entre 7-10 días. Al final de la incubación, se agregaron 2 ml de agua destilada estéril para obtener una suspensión densa de esporas. Se utilizó una cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas de cada aislado. La comunidad fúngica se preparó inoculando 2×10^4 esporas de cada uno de los 5 hongos aislados seleccionados para conformar la comunidad, y se incubó a 24°C durante 72 h para determinar los perfiles de T-RFLP y los perfiles metabólicos. Se realizaron triplicados de los microcosmos.

2.5.1. Perfiles genéticos de los aislados fúngicos y la comunidad experimental

Los perfiles genéticos de los aislados y la comunidad experimental se obtuvieron mediante la técnica de T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*). Para ello, a partir del DNA extraído desde cada uno de los aislados seleccionados para construir la comunidad experimental de manera independiente, y desde la comunidad experimental en su conjunto (obtenido a partir de una resuspensión del micelio comunitario), se amplificó por PCR el marcador molecular ITS, utilizando el partidor ITS1 marcado en su extremo 5' con el fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) y con el partidor ITS4 sin marcar. Los productos de amplificación

se purificaron con el kit "UltraClean PCR Clean-up purification" (MoBio Lab. Inc.). Mediante un análisis *in silico* con el programa "MEGA 5.0", se determinó que la enzima de restricción de corte frecuente *Bst*UI, genera fragmentos de restricción terminales (T-RFs) en los amplicones de ITS de diferentes tamaños; por lo tanto, los productos de amplificación purificados se digirieron en forma separada con 20 U de la enzima seleccionada siguiendo las recomendaciones del fabricante (Fermentas). Los productos de digestión se purificaron y los T-RFs se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). Para cada muestra se generó un electroferograma y se compararon los T-RFs obtenidos, con los esperados mediante el análisis *in silico*.

2.5.2. Perfiles metabólicos de los aislados fúngicos y la comunidad experimental

El patrón metabólico de cada aislado fúngico se determinó usando el test "FF MicroPlate" (BIOLOG). Este ensayo consiste de placas que poseen 96 pocillos, con 95 fuentes de carbono distintas y un control (agua), en los cuales se inocula una suspensión de esporas fúngicas. Los pocillos poseen yodo-nitro-tetrazolio (INT), el cual es usado como un indicador redox para medir colorimétricamente la oxidación de las fuentes de carbono metabolizadas. Cuando el compuesto es oxidado, el INT se reduce de forma irreversible a un compuesto de color rojo llamado formazán, que posee su máxima absorbancia a 490 nm (Kubicek y col. 2002).

Cada aislado fúngico se cultivó en medio PDA inclinado hasta observar abundante esporulación. A partir de este cultivo se preparó una suspensión de esporas en agua destilada estéril. La concentración de esporas se determinó con una cámara de Neubauer. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 10^2

esporas/pocillo en medio de inoculación "FF Fluid" (BIOLOG). Se inocularon 0,1 ml de la suspensión de esporas en cada pocillo utilizando una micropipeta multicanal. Las placas se incubaron a 24°C y se analizaron cada 24 horas con un espectrofotómetro de multiplaca Epoch (Biotek) a 490 nm. Los datos de absorbancia obtenidos se procesaron restando a cada pocillo el valor de absorbancia medido en el primer pocillo que contiene agua (control). Un valor de absorbancia mayor o igual a 0,1 indica un resultado positivo para un pocillo, es decir, que el hongo utiliza la fuente de carbono ensayada (Dobranic & Zak 1999). Las 95 fuentes de carbono se agruparon en 6 categorías, que corresponden a ácidos carboxílicos, amidas y aminas, aminoácidos, carbohidratos, polímeros y una categoría de misceláneos (Preston y col. 2002). Cada aislado se caracterizó de acuerdo al patrón metabólico obtenido.

Para determinar el perfil metabólico comunitario, luego de la incubación, el micelio de la comunidad se resuspendió en agua destilada estéril mediante agitación del sustrato por dos horas en un agitador orbital. La suspensión micelial se diluyó 10 veces en "FF Fluid" (BIOLOG). Se inocularon 0,1 ml de la suspensión micelial en cada pocillo de las placas "FF Microplate" (BIOLOG), se incubaron a 24°C y se realizaron mediciones de absorbancias en cada pocillo a 490 nm. Los datos obtenidos se procesaron como se describió anteriormente. Los valores de absorbancia obtenidos en los 96 pocillos del test FF MicroPlate de los hongos creciendo individualmente, se sumaron para crear una única matriz de absorbancias que refleja el perfil metabólico esperado de una comunidad teórica. Este perfil teórico se comparó con el perfil obtenido del test FF MicroPlate de la comunidad experimental. Se utilizaron los valores de absorbancia medidos hasta las 72 h, ya que después de ese tiempo los pocillos se encuentran muy esporulados, lo que afecta la medición de la absorbancia.

3. RESULTADOS

3.1. Características morfológicas de los hongos aislados

A partir del aislamiento directo desde la muestra de suelo se obtuvo una variedad de organismos fúngicos, tanto levaduras como hongos filamentosos. De las distintas colonias obtenidas en las placas de purificación, se seleccionaron y purificaron 36 hongos filamentosos, utilizando como criterio de discriminación sus características macroscópicas. Cada uno de los aislados se caracterizaron morfológicamente, tanto con las características de las colonias (macroscópicas) como en sus estructuras miceliales y reproductivas (microscópicas). Según estas características se identificaron al menos a nivel de género, 29 de los 36 aislados (Tabla 2), los cuales se distribuyeron en 2 divisiones, 10 familias y 14 géneros (Tabla A7). En las secciones posteriores se describen las principales características de los aislados que permitieron su identificación.

Tabla 2. Resultados de la identificación de los aislados basada en los caracteres morfológicos.

Aislado	Identificación Morfológica	Aislado	Identificación Morfológica
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	MR-12	<i>Cladosporium sp.</i>
MR-2	<i>Aspergillus sp.</i>	MR-13	<i>Penicillium canescens</i>
MR-3	<i>Aspergillus sp.</i>	MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans var. pullulans</i>	MR-15	<i>Penicillium expansum</i>
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans var. melanogenum</i>	MR-16	<i>Penicillium polonicum</i>
MR-6	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	MR-17	<i>Penicillium sp.</i>
MR-7	<i>Ulocladium sp.</i>	MR-18	<i>Penicillium sp.</i>
MR-8	<i>Ulocladium sp.</i>	MR-19	<i>Penicillium sp.</i>
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	MR-20	<i>Penicillium sp.</i>
MR-10	<i>Cladosporium /Davidiella</i>	MR-21	<i>Beauveria sp.</i>
MR-11	<i>Cladosporium sp.</i>	MR-22	<i>Beauveria sp.</i>

Continuación Tabla 2.

MR-23	<i>Mortierella sp.</i>	MR-30	<i>Coniothyrium sp.</i>
MR-24	<i>Absidia sp.</i>	MR-31	<i>Phoma sp.</i>
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	MR-32	NI
MR-26	NI	MR-33	NI
MR-27	NI	MR-34	NI
MR-28	<i>Lecytophora sp.</i>	MR-35	NI
MR-29	<i>Lecytophora sp.</i>	MR-36	NI

NI = no identificado

3.1.1. *Aspergillus*

3.1.1.1. Aislado MR-1

Una de las características macroscópicas más importantes que permiten la distinción de hongos dentro del género *Aspergillus*, es el color de sus conidios. Los conidios de este aislado muestran un color característico que varía desde el café oscuro al negro. Las colonias de MR-1 creciendo en medio PDA poseen una textura rugosa y muestran un color negro. Por el reverso de las placas, las colonias muestran un color que va desde el gris al amarillo. Estas características permiten asociar a este aislado a la especie *Aspergillus niger*. Su velocidad de crecimiento radial (VCR) en medio PDA fue de 2,3 mm/día (Anexo Tabla A2).

En *A. niger* el conidióforo nace de una estructura llamada célula pie que se dilata en el ápice formando una vesícula esférica. De la vesícula del conidióforo nacen las células conidiogénicas (fiálides) que se encuentran sobre otras estructuras llamadas métulas, por lo cual *A. niger* presenta fiálides biseriadas. El conjunto de vesícula, métulas y fiálides recibe el nombre de cabeza conidial, que para el caso de *A. niger* tiene un aspecto radiado. Los conidios son globosos y rugosos (Figura 3).

3.1.1.2. Aislado MR-2

Las colonias del aislado MR-2 poseen un color verde oscuro, con matices de amarillo en el centro de la colonia. Las colonias tienen un aspecto flocoso, y bajo la lupa estereoscópica se puede observar abundante presencia de conidios, los cuales son de color verde, aunque algunos presentan una coloración con tonos más amarillo. Por el reverso las colonias presentan un color naranja de tono fuerte. La VCR en medio PDA bajo las condiciones de cultivo fue de 1,2 mm/día (Anexo Tabla A2).

Al microscopio se pueden observar conidióforos característicos del género *Aspergillus*, con su ápice vesiculado, que no es tan esférico en comparación al de *A. niger*. La cabeza conidial es radiada y biseriada, ya que las fiálides se encuentran sobre métulas. Los conidios son globosos y con apariencia rugosa (Figura 3).

3.1.1.3. Aislado MR-3

El aislado MR-3 fue asociado al género *Aspergillus*. En sus primeros días de crecimiento las colonias son de color blanco con un aspecto flocoso. Después las colonias adquieren un color amarillo oscuro, similar al dorado y un aspecto de textura polvorienta dado por la abundante conidiación, que se puede observar con una lupa estereoscópica. Este aislado tuvo una VCR en PDA de 1,6 mm/día (Anexo Tabla A2).

Microscópicamente, fue posible observar los típicos conidióforos del género *Aspergillus*, con sus cabezas radiadas, de las cuales nacen las células productoras de conidios (Figura 3).

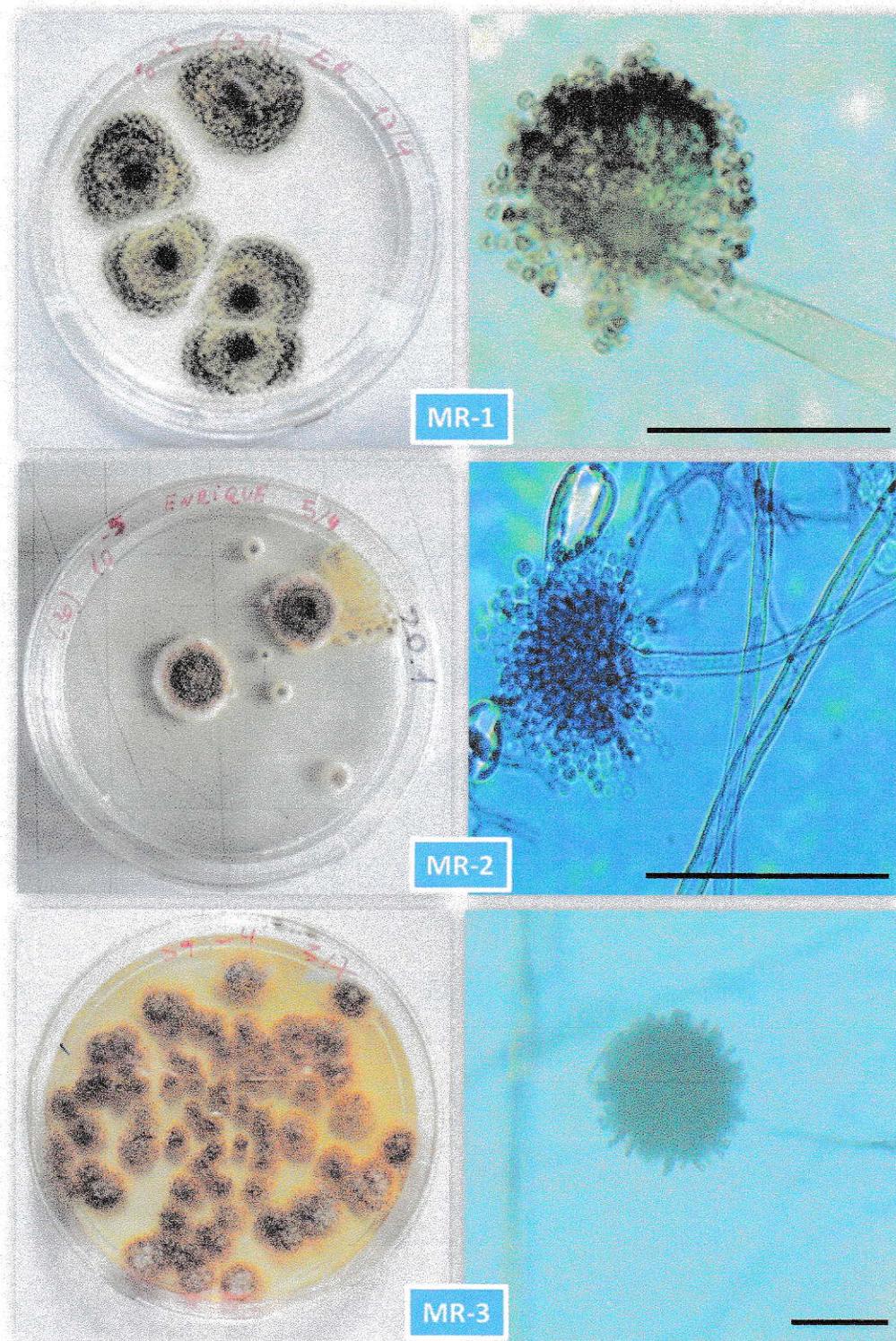


Figura 3. Colonias y conidióforos de los aislados MR-1, MR-2 (ambas en medio PDA) y MR-3 (en medio Sabouraud) del género *Aspergillus*. La barra indica 250 μm.

3.1.2. *Aureobasidium*

3.1.2.1. Aislados MR-4 y MR-5

Los aislados MR-4 y MR-5 poseen similitudes morfológicas. Ambos forman colonias con una textura “cremosa”, similar a las colonias de levadura. De hecho, los hongos de la especie *Aureobasidium pullulans* (la más común del género) a menudo son llamados “levadura negra”, por su forma de crecimiento y su tipo de reproducción que al ser visualizada al microscopio se asemeja a la gemación de levaduras (Gaur y col. 2010). La diferencia entre las dos muestras radica en el color de las colonias. La muestra MR-4 presenta una coloración rosada clara, mientras que la muestra MR-5 forma colonias que al comienzo son blancas, para luego volverse negras. Existen variedades de la especie *A. pullulans*: *A. pullulans* var. *pullulans*, con colonias de color rosado como la muestra MR-4, y *A. pullulans* var. *melanogenum*, con colonias de color negro como la muestra MR-5 (Figura 4). Las VCR de ambas variedades también son distintas, teniendo la muestra MR-4 una VCR de 2,4 mm/día, y la muestra MR-5 una VCR de 0,9 mm/día en medio PDA (Anexo Tabla A2).

El análisis microscópico revela el desarrollo conidial bastante particular de esta especie. *A. pullulans* presenta un tipo de desarrollo llamado conidiogénesis endógena, que consiste en que elementos de la pared interna de las hifas envuelven a los núcleos preexistentes en ellas, para convertirlos en conidios individuales, los cuales luego se liberan al fragmentarse la hifa madre (Figura 4).

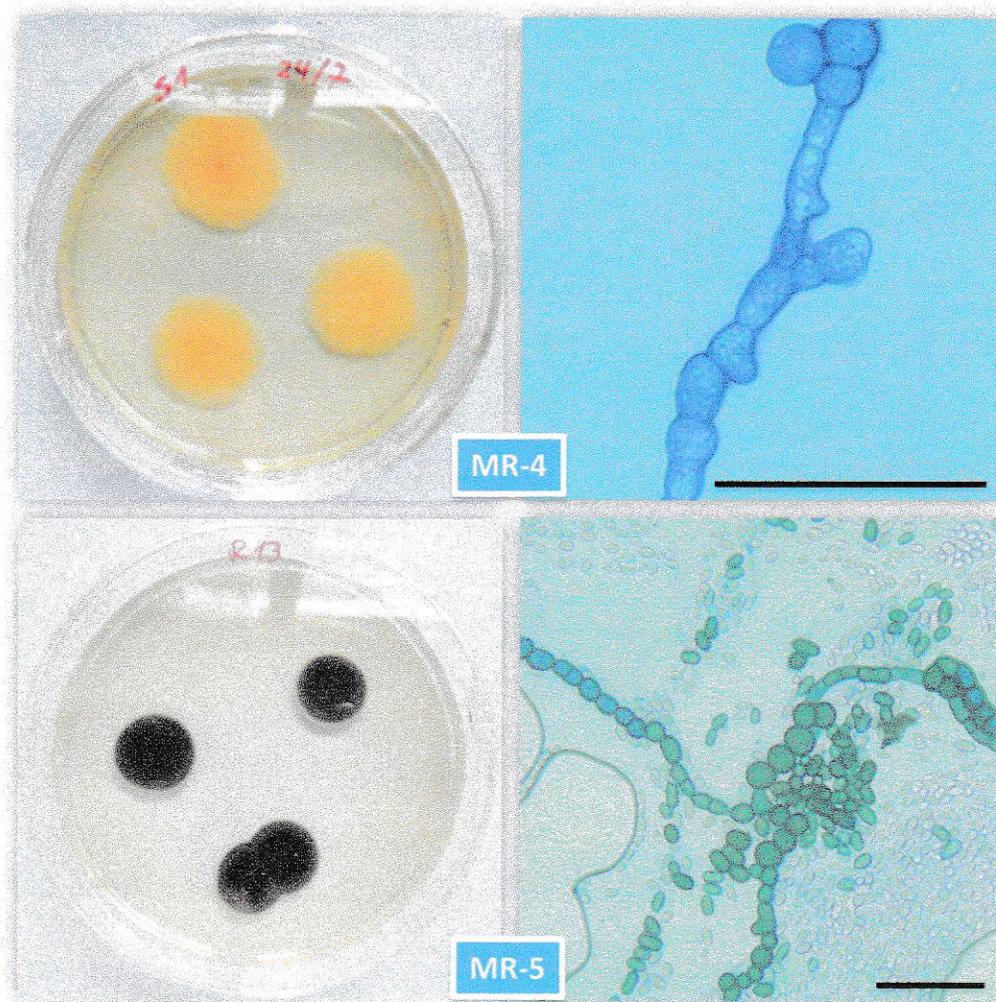


Figura 4. Colonias y desarrollo conidial de *A. pullulans* var. *pullulans* (MR-4) y de *A. pullulans* var. *melanogenum* (MR-5) en medio PDA. La barra indica 250 μ m.

3.1.3. *Purpureocillium*

3.1.3.1. Aislado MR-6

Las colonias poseen un aspecto similar a la gamuza, con un rápido crecimiento. Las colonias de este aislado poseen un color característico violeta pálido (Figura 5), aunque algunas veces también puede observarse con tonos más cercanos al café. Por el reverso, las colonias presentan un color café muy claro, pero siendo muy oscuro en

el centro de la colonia. La VCR de este aislado en PDA fue de 2,4 mm/día (Anexo Tabla A2).

Microscópicamente, se observa la presencia de conidióforos largos y ramificados, con fiálides con una clara forma de botella con largos cuellos que se agrupan generalmente de a tres, sin mostrar el patrón de agrupamiento de penicilios. De estas fiálides nacen los conidios, los cuales crecen en cadenas y poseen una forma semi-elipsoidal (Figura 5). Estas características permiten asociar este aislado a la especie *Purpureocillium lilacinum*. Esta especie era comúnmente conocida como *Paecilomyces lilacinus*, aunque con nuevos análisis filogenéticos, se comprobó que este hongo no se agrupaba con este género, a pesar de poseer estructuras microscópicas características de *Paecilomyces* (Luangsa-Ard y col. 2011).

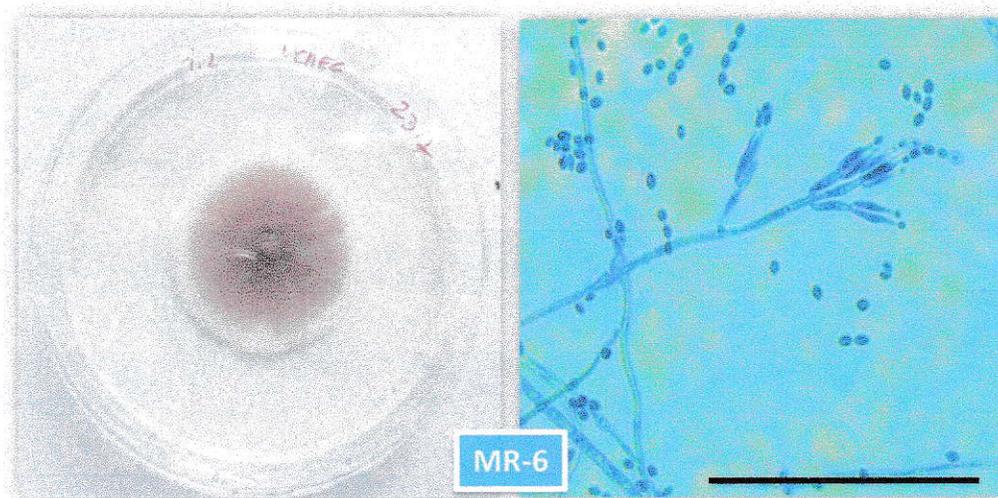


Figura 5. Colonia en PDA, conidióforos con sus fiálides y conidios de *P. lilacinum* (MR-6). La barra indica 250 μ m.

3.1.4. *Ulocladium*

3.1.4.1. Aislados MR-7 y MR-8

Las muestras MR-7 y MR-8 son muy parecidas en su morfología, aunque difieren en el color de sus colonias. La muestra MR-7 presenta un color verde en sus primeros días de crecimiento, dando paso a un color verde muy oscuro con el tiempo (Figura 6). Por otra parte, la muestra MR-8 presenta un color café oscuro en sus primeros días de crecimiento, adquiriendo luego un color negro. Ambas muestras poseen un color café en sus reversos. La textura de las colonias de ambas muestras es de aspecto flocoso, aunque la muestra MR-7 es un poco más aterciopelada. Las VCR de ambas muestras en PDA son similares, 2,9 mm/día para la muestra MR-7 y 2,8 mm/día para la muestra MR-8 (Anexo Tabla A2).

El rasgo microscópico más notorio de estas muestras es la presencia de macroconidios septados multinucleados, que son característicos del género *Ulocladium* (Figura 6). Éstos se denominan conidios tréticos, que son formados por un tipo de conidiogénesis donde cada conidio es delimitado por una extensión de la pared interna de su célula conidiógena, la cual luego lo expulsa por un pequeño orificio o canal. Los conidios observados en las muestras MR-7 y MR-8 se presentan típicamente solitarios y poseen una forma elipsoidal, aunque también se observan varios con formas más irregulares. Además, presentan septos, ya sea transversales, longitudinales u oblicuos, o una combinación de éstos. Esta disposición de los septos de los conidios de *Ulocladium sp.* es un rasgo que permite distinguir a este género de otros similares, como por ejemplo *Curvularia sp.* que solo presenta conidios con septos transversales.

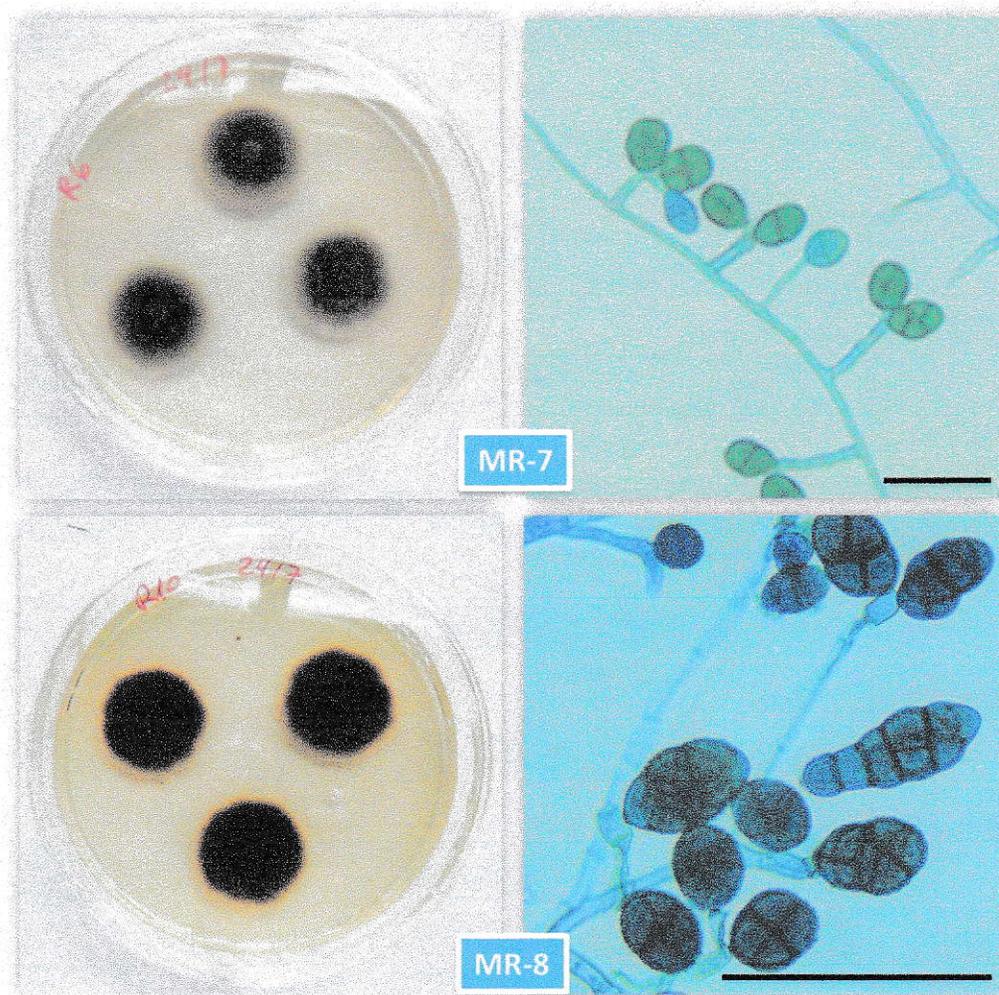


Figura 6. Colonias en medio Sabouraud y conidios trécicos septados de *Ulocladium* sp. (MR-7 y MR-8). La barra indica 250 µm.

3.1.5. *Paecilomyces*

3.1.5.1. Aislado MR-9

Las colonias de la muestra MR-9 se caracterizan por su color amarillo cercano al café, similar al color de la arena (Figura 7). Por el reverso las colonias presentan una coloración un poco más pálida que la observada frontalmente. Las colonias presentan una textura suave con apariencia similar al polvo. Una de las características más

llamativas de esta muestra con respecto a los demás aislados es su rápido crecimiento (VCR en PDA de 7,6 mm/día; Tabla A2), dado que a los pocos días, una sola colonia es capaz de cubrir una placa con medio PDA.

Con respecto a sus características microscópicas, se observa que los conidióforos no poseen célula basal y el ápice de éste no es vesiculado como en el caso de *Aspergillus*. El conidióforo no es tan largo como en *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*). Como es característico de los hongos del género *Paecilomyces*, las fiálides presentan largos y finos cuellos, y se pueden encontrar solitarias o agrupadas (aunque no como penicilios). Los conidios nacen desde estas fiálides y se ramifican en largas cadenas acropétalas. Los conidios poseen una forma elipsoidal y una apariencia lisa (Figura 7). Estas características morfológicas permiten asociar a este aislado a la especie *Paecilomyces variotii*.

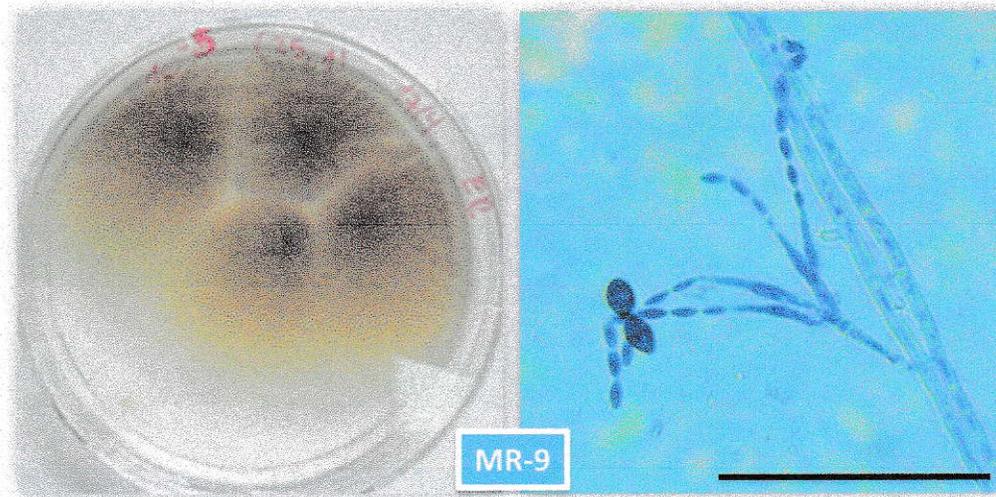


Figura 7. Colonia en medio PDA, conidióforo y conidios en cadenas de *P. variotii* (MR-9). La barra indica 250 μm .

3.1.6. *Cladosporium* / *Davidiella*

3.1.6.1. Aislados MR-10, MR-11 y MR-12

Las colonias de las muestras MR-11 y MR-12 se relacionan con el género *Cladosporium* y poseen un color verde oliva en sus primeros días de crecimiento para dar paso a un color verde más oscuro en las colonias más viejas, con una textura aterciopelada (Figura 8). Por el reverso las colonias muestran un color verde muy oscuro, casi negro. Por otra parte, la muestra MR-10 mostró una alternancia en sus morfologías, teniendo algunas veces la apariencia morfológica del teleomorfo de *Cladosporium* (correspondiente al Género *Davidiella*), manteniendo algunas características similares a su anamorfo, como por ejemplo el color de las colonias, aunque su aspecto aterciopelado es más notorio y su crecimiento radial es más reducido. Otras veces presentó una morfología similar a las de MR-11 y MR-12. La VCR de la muestra MR-10 es de 1,3 mm/día, la de la muestra MR-11 es de 1,8 mm/día y la de la muestra MR-12 es de 1,0 mm/día (todas en medio PDA; anexo Tabla A2).

Al observar las muestras (MR-10, MR-11 y MR-12) al microscopio, se observan conidióforos bien diferenciados con múltiples ramas conidiógenas (Figura 8). Se pueden ver ramoconidios, que son cortas ramas apicales de un conidióforo que se libera del conidióforo inicial y que funciona como un conidio. Estos ramoconidios se caracterizan por poseer su base truncada. También se pueden observar ramoconidios secundarios, que se generan en la misma cadena del ramoconidio primario, y que dan origen a los conidios propiamente tal. Los conidios muestran un desarrollo blástico y crecen ramificados en cadenas acropétalas. Los conidios son alargados (elípticos) y de textura lisa. En cuanto a la muestra MR-10, no fue posible observar estructuras de

reproducción sexual (teleomórficas), aunque sí se lograron observar las anamórficas, lo que podría dar cuenta de una alternancia entre ambos estados reproductivos.

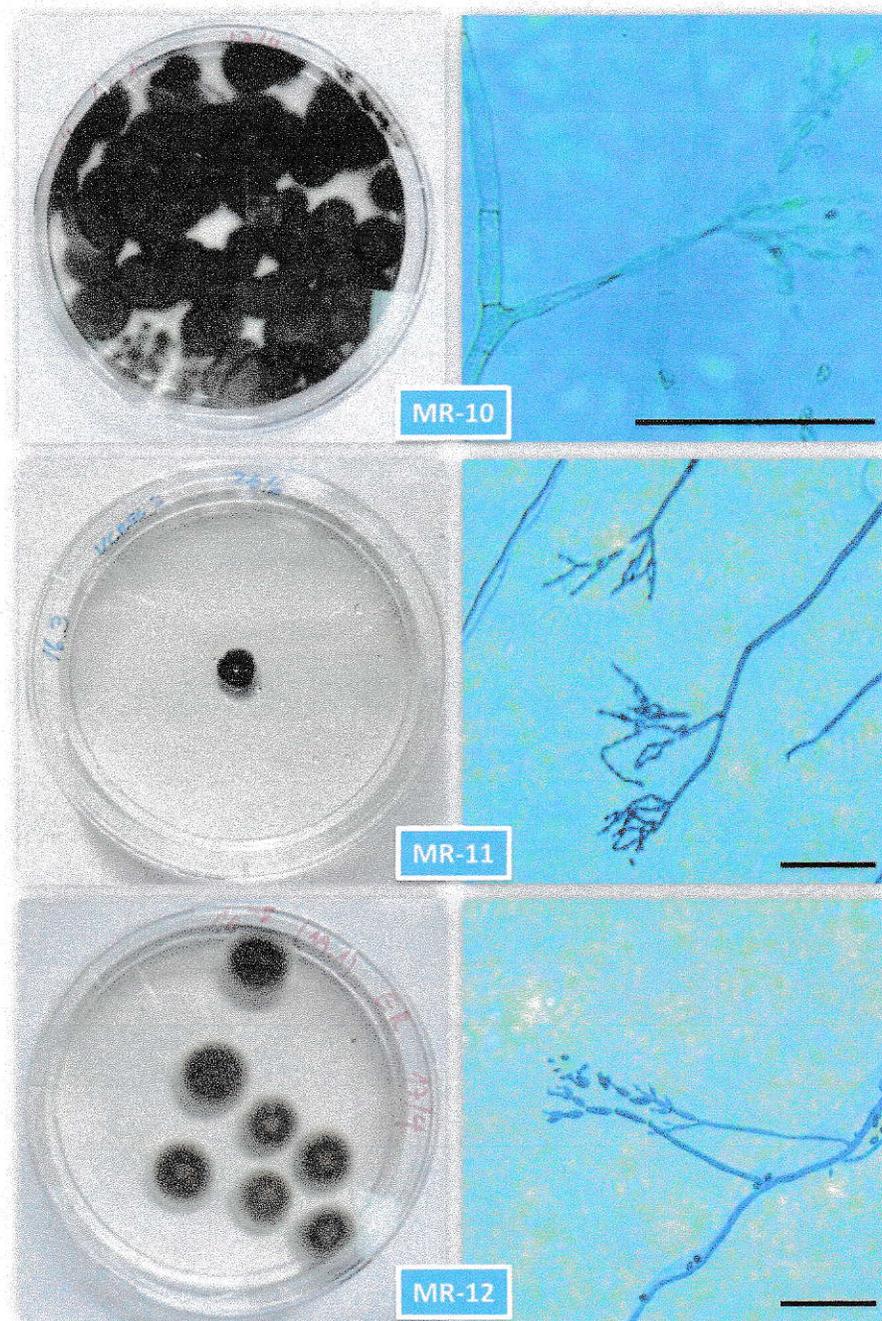


Figura 8. Colonias en medio PDA, conidióforos ramificados y conidios creciendo en cadenas de *Cladosporium/Davidiella* (MR-10) y *Cladosporium* sp. (MR-11 y MR-12). La barra indica 250 μ m.

3.1.7. *Penicillium* / *Talaromyces*

3.1.7.1. Aislado MR-13

Las colonias de la muestra MR-13 (asociadas al género *Penicillium*) creciendo en PDA se caracterizan por su textura flocosa, con un color blanco, aunque también muestra tonos verdes (Figura 9). Por el reverso las colonias son de color café. Con la lupa se puede observar la presencia de gotas de exudado transparentes en la superficie de las colonias. Esta muestra presenta un fuerte y característico olor a tierra mojada, probablemente por la producción de geosmina, ya que se ha visto que otros hongos de este género producen este compuesto (Mattheis & Roberts 1992). Su VCR en PDA es de 0,7 mm/día (Tabla A2).

Al microscopio se observan los conidióforos característicos de los hongos de este género (Figura 9). Éstos presentan las fiálides agrupadas en penicilios, de los que nacen los conidios que crecen en cadenas. A la vez, los conidióforos son biverticilados, ya que presentan métulas bajo las fiálides (no nacen directamente de los conidióforos). Los conidios son globosos y levemente rugosos. Estas características permiten asociar este aislado al género *Penillium* y probablemente a la especie *P. canescens*.

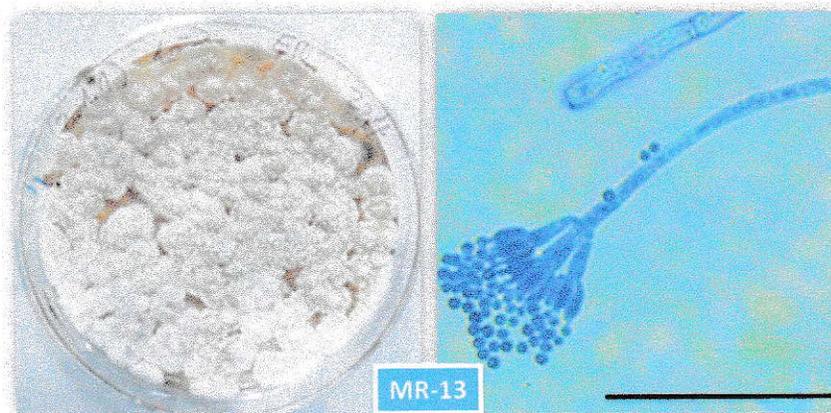


Figura 9. Colonias en medio PDA y conidióforos de *P. canescens* (MR-13). La barra indica 250 μ m.

3.1.7.2. Aislado MR-14

Las colonias del aislado MR-14 (asociado al género *Penicillium*), en medio PDA, son de color verde y muestran una textura suave similar al polvo (Figura 10). Por el reverso las colonias son de un color gris con tonos de color rojo. Una de las características más llamativas de esta muestra es su gran capacidad de esporulación, formando siempre un gran número de colonias en los medios de cultivo. La VCR en medio PDA es de 1,9 mm/día (Anexo Tabla A2).

Al microscopio pueden observarse conidióforos triverticilados, ya que tienen dos estados de ramificación, presentando fiálides con ramas bajo las métulas (Figura 10). Las fiálides tienen forma de botella pero sus cuellos son más cortos en comparación a otras muestras del género. Los conidios son esféricos, lisos y crecen en cadenas. Estas características son similares a las descritas para la especie *Penicillium chrysogenum*.

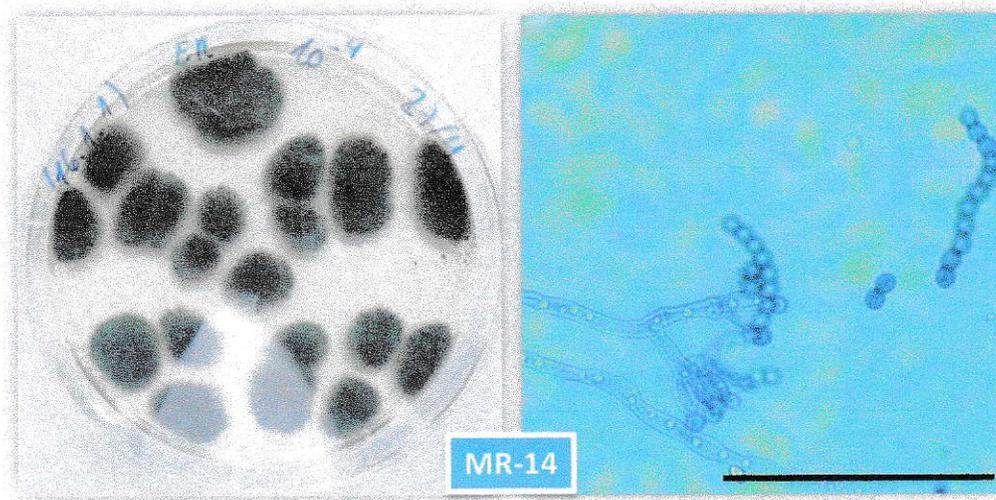


Figura 10. Colonias en medio PDA y conidióforos de *P. chrysogenum* (MR-14). La barra indica 250 μm .

3.1.7.3. Aislado MR-15

Las colonias del aislado MR-15 (asociado al género *Penicillium*) en medio PDA muestran una textura similar a la de *P. chrysogenum*, suave similar al polvo. El color de las colonias es de un verde más claro que *P. chrysogenum* y muestran un característico borde de color amarillo (Figura 11). Por el reverso las colonias son de color amarillo claro. Posee un olor similar al descrito en *P. canescens*. Su VCR en PDA es de 1,8 mm/día (Anexo Tabla A2).

Posee conidióforos biverticilados, con fiálides agrupadas en penicilios (Figura 11). Éstas son más grandes en comparación a las de *P. chrysogenum*, al igual que los cuellos de estas células. Los conidios crecen en cadenas, son esféricos y lisos. Estas características son similares a las descritas para la especie *Penicillium expansum*.

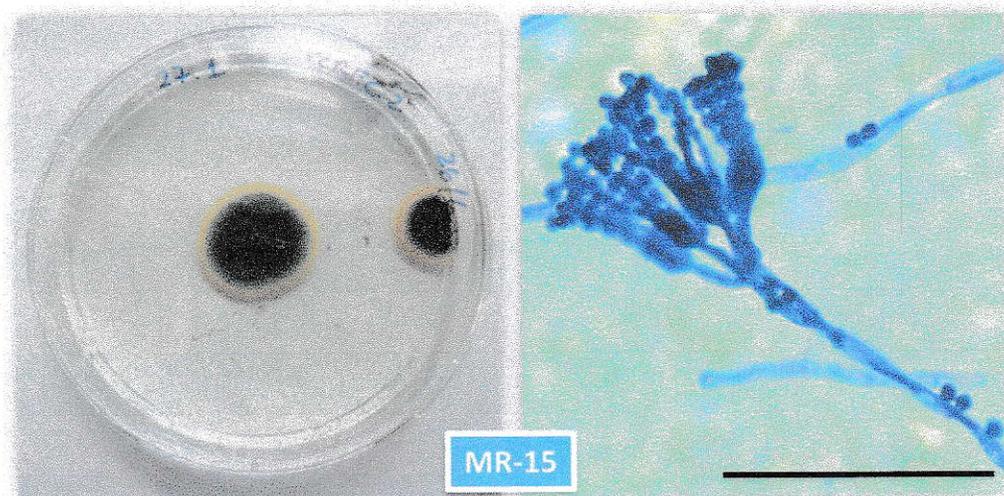


Figura 11. Colonias en medio PDA y conidióforos de *P. expansum* (MR-15). La barra indica 250 μ m.

3.1.7.4. Aislado MR-16

En los primeros días de crecimiento, el aislado MR-16 (asociado al género *Penicillium*) en medio PDA, posee colonias que muestran un color blanco, para volverse de un color verde claro con un marcado borde blanco al pasar los días (dado por la aparición de esporas). Las colonias más viejas toman un color verde oscuro. Por el reverso las colonias son de color blanco con tonos de amarillo. La textura de las colonias es flocosa y bajo la lupa estereoscópica se puede observar la presencia de gotas de exudado transparentes en la superficie de éstas (Figura 12). Posee una VCR en PDA de 0,9 mm/día (Anexo Tabla A2).

Los conidióforos son monoverticilados, ya que las fiálides que están agrupadas en penicilios nacen directamente de éste (Figura 12). A la vez, las fiálides poseen forma de botella, relativamente largas, aunque sus cuellos son más cortos. Los conidios crecen en cadenas, son esféricos, aunque levemente elipsoidales, con textura un tanto rugosa. Sus características morfológicas son similares a las descritas para la especie *Penicillium polonicum*.

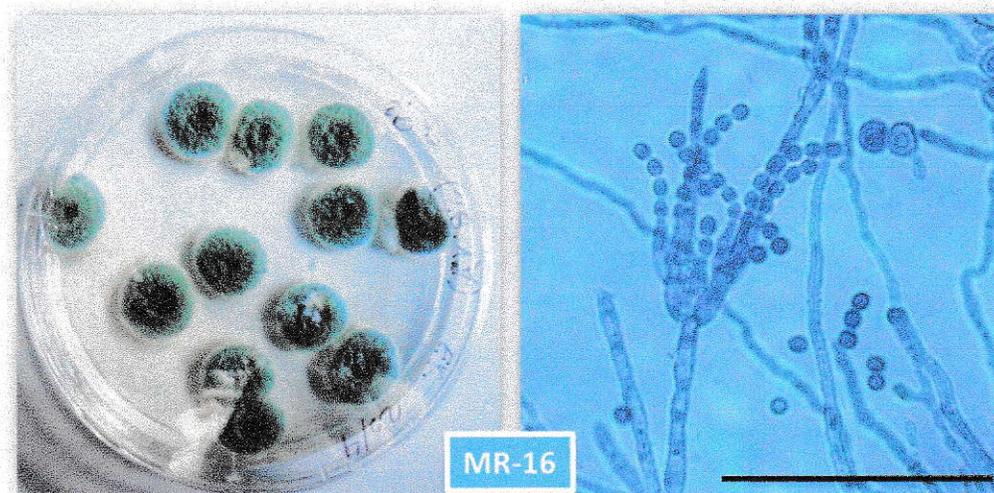


Figura 12. Colonias en medio PDA y conidióforos de *P. polonicum* (MR-16). La barra indica 250 μm .

3.1.7.5. Aislados MR-17, MR-18, MR-19 y MR-20

Estos aislados del género *Penicillium* son diferentes morfológicamente, aunque comparten la característica de producir conidios que con el tiempo hacen que las colonias se pongan de color verde. Las muestras MR-17 y MR-19 poseen una textura flocosa, mientras que la MR-18 y MR-20 presentan una textura polvorienta. En medio Sabouraud la muestra MR-17 produce un compuesto soluble que hace que el medio inicialmente café claro, se vuelva de color amarillo (Figura 13), mientras que las otras tres muestras hacen que el medio se vuelva de color naranja oscuro. Por otra parte, la muestra MR-19 produce gran cantidad de gotas de exudado visibles a simple vista. La VCR de la muestra MR-17 es de 0,9 mm/día, la de MR-18 es de 0,9 mm/día, la de MR-19 es de 0,6 mm/día y la de MR-20 es de 0,5 mm/día (Anexo Tabla A2).

Microscópicamente, se pueden observar los conidióforos característicos de los hongos del género *Penicillium*, con sus fiálides agrupadas en penicilios y sus esporas naciendo de éstas creciendo en largas cadenas (Figura 13).

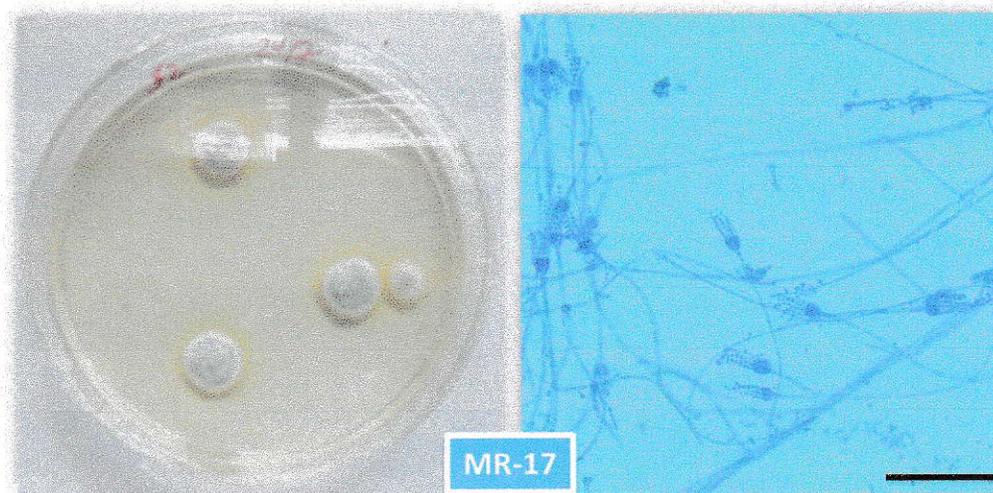


Figura 13. A. Colonias en medio Sabouraud y conidióforos de *Penicillium* sp. (MR-17). La barra indica 250 µm.

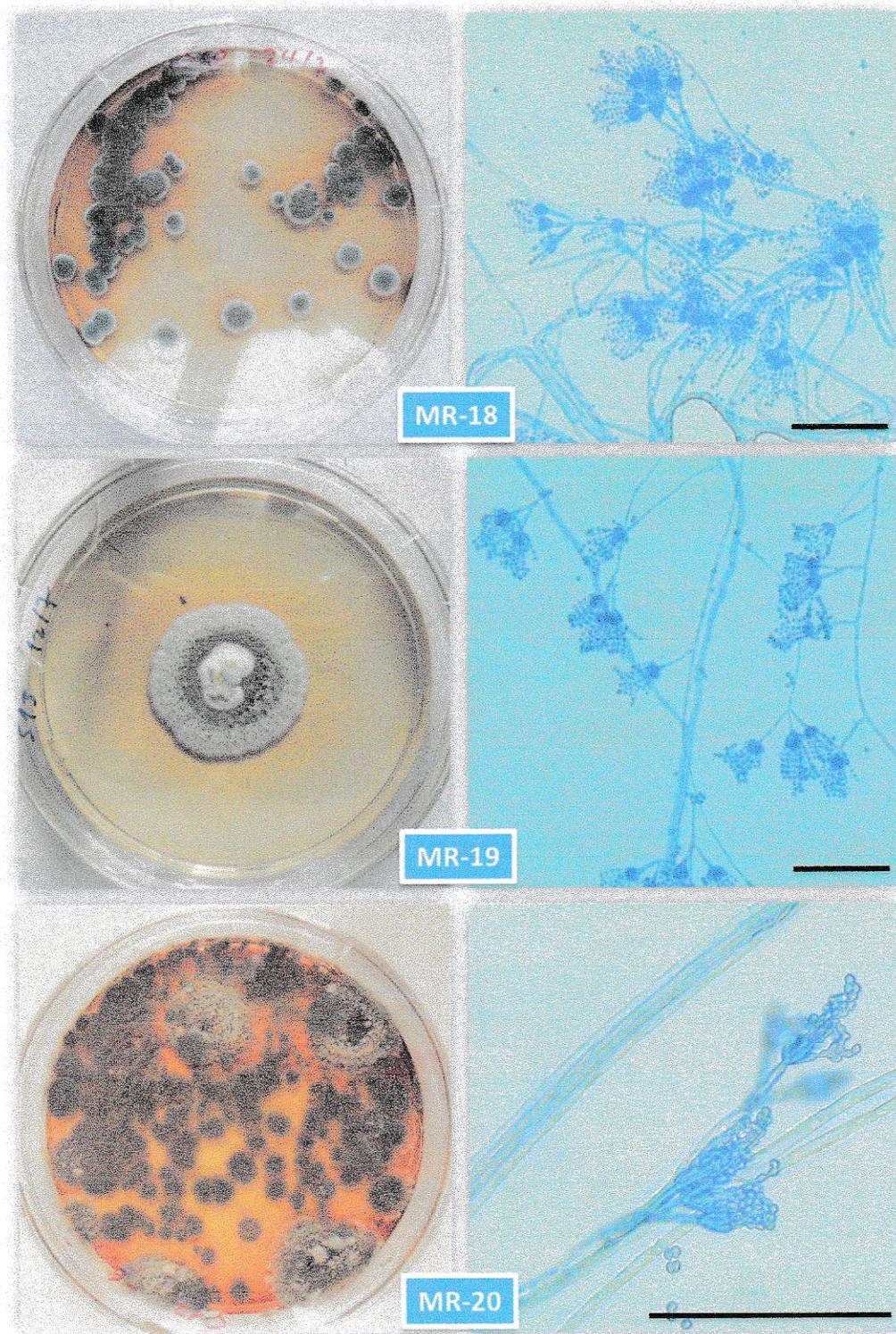


Figura 13. B. Colonias en medio Sabouraud y conidióforos de *Penicillium sp.* (MR-18, MR-19, MR-20). La barra indica 250 µm.

3.1.7.6. Aislado MR-25

Las características morfológicas de este hongo permiten asociarlo a la especie *Talaromyces flavus* (Teleomorfo de *Penicillium*). Las colonias del aislado MR-25 tienen una textura similar al polvo, siendo muy parecidas a las del género *Penicillium* (verdes con un borde blanco). Con más días de crecimiento las colonias adquieren un color verde más oscuro en su centro, presentando una textura particular en esa zona, similar a cabellos, lo cual puede observarse mejor bajo la lupa estereoscópica. Esta apariencia puede deberse a la producción de estructuras de reproducción sexual por parte de este hongo, ya que es un género holomorfo (Piontelli-Laforet 2011). Otra característica particular de esta muestra, es la producción de un compuesto de color rojo, el cual puede observarse de forma abundante por el reverso de las colonias creciendo en medio PDA (Figura 14). La VCR de este aislado es de 4,7 mm/día; Anexo Tabla A2).

Al microscopio sólo se pudo observar las estructuras de reproducción asexual del hongo. Se observan los conidióforos típicos del género *Penicillium*, presentando las fiálides agrupadas en penicilios (Figura 14). Los conidióforos son biverticilados, ya que las fiálides nacen de métulas, las cuales son casi del tamaño de las fiálides. Estas últimas son alargadas y presentan finos cuellos. Los conidios crecen en cadenas, poseen una forma elipsoidal y una textura lisa.

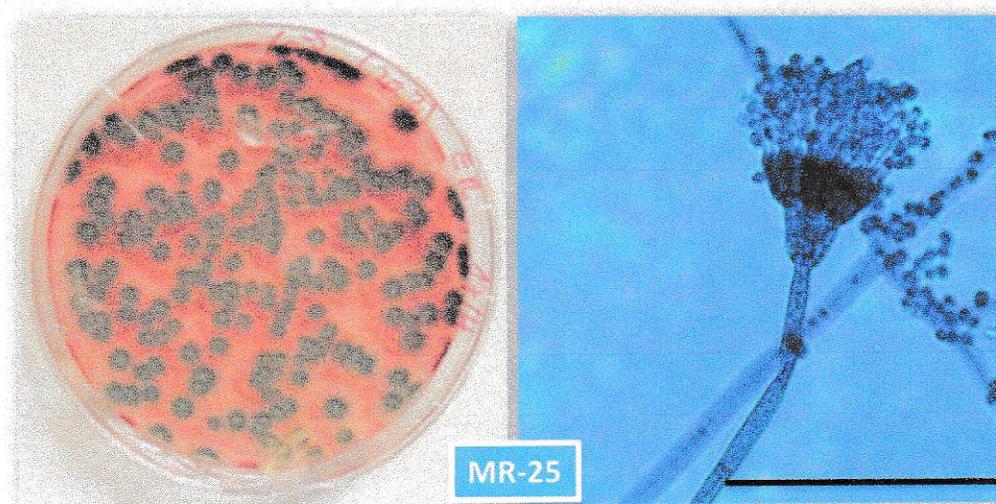


Figura 14. Colonias en medio PDA y conidióforos con conidios de *T. flavus* (MR-25). La barra indica 250 μm .

3.1.8. *Beauveria*

3.1.8.1. Aislados MR-21 y MR-22

Las características morfológicas de estos aislados permiten asociarlos al género *Beauveria*. Los aislados MR-21 y MR-22 comparten muchas características morfológicas. Ambas muestras poseen una textura algodonosa y un característico color blanco en colonias con varios días de crecimiento. La diferencia en ellas radica en el color de sus colonias en los primeros días de crecimiento. Mientras que la muestra MR-21 es de color blanco y amarillo claro por el reverso, la muestra MR-22 es de color rosado por ambas caras (Figura 15). Además, MR-22 produce un compuesto soluble de color rosado en medio Sabouraud y PDA, aunque no en gran cantidad (solo alrededor de la colonia y no en todo el medio). Se ha descrito que *B. bassiana* (uno de los hongos más comunes del género) presenta ambas características morfológicas mencionadas anteriormente (Zimmerman 2007). En el caso de la muestra MR-21, en

algunos casos fue posible observar una característica morfológica distinta a la descrita, la que consiste en un crecimiento radial más reducido, pero junto a un considerable aumento del crecimiento vertical de las colonias. A la vez, la textura de las colonias no era algodonosa, si no que era más bien sólida. Estas características corresponden a las del teleomorfo de *Beauveria*, llamado *Cordyceps*, lo cual da cuenta de la alternancia de ambos estados reproductivos de esta muestra. La VCR en PDA de MR-22 (1,3 mm/día) fue levemente mayor a la de la muestra MR-21 en el mismo medio (1,0 mm/día) (Anexo Tabla A2).

Ambas muestras comparten sus características microscópicas. Las células conidiógenas no están agrupadas, son solitarias y poseen forma de botella. Varios conidios nacen de una misma célula conidiógena, aunque la forma en que éstos se van generando es un rasgo distintivo de este género. Los conidios poseen un desarrollo simpoidal, que implica que los conidios que se van generando se agrupan en repeticiones laterales debajo del conidio inicial, razón por la cual las esporas parecen agruparse en zig-zag a partir de la célula conidiógena. A la vez, los conidios poseen una forma subesférica y de textura lisa (Figura 15).

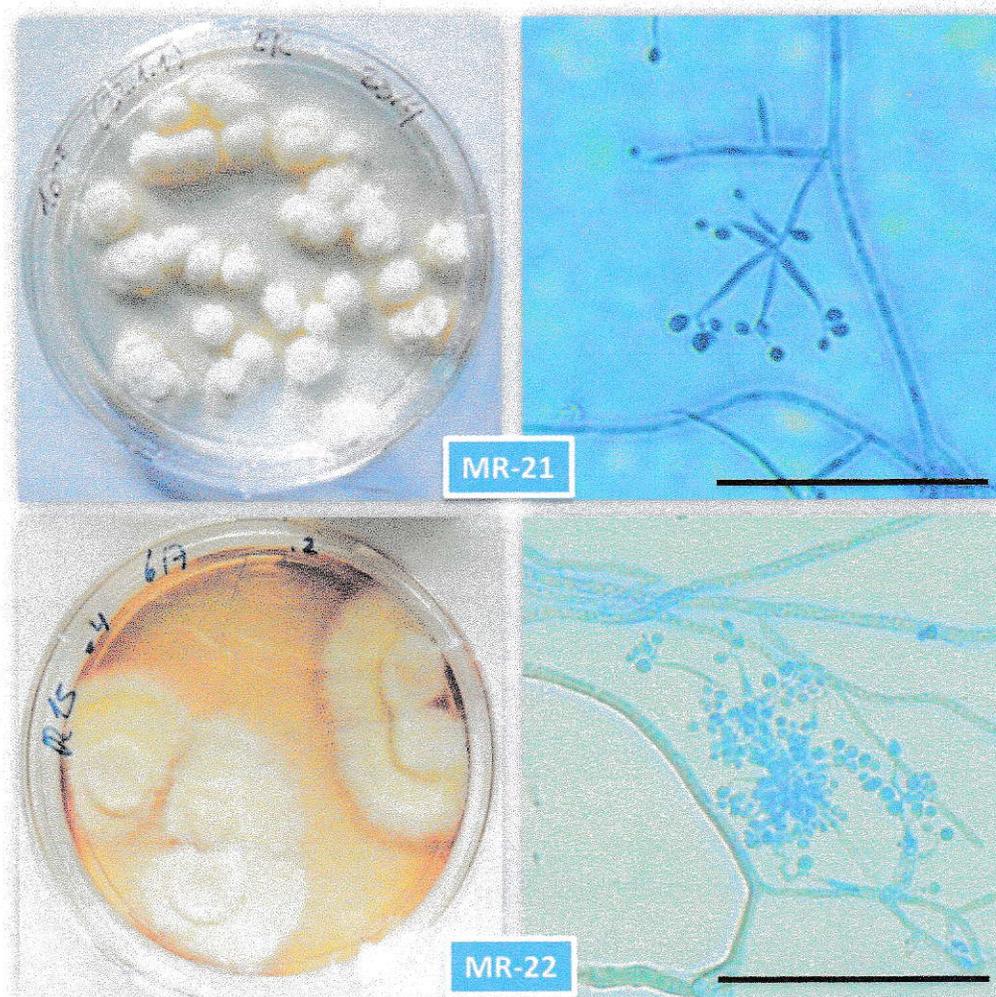


Figura 15. Colonias, conidióforos y conidios de MR-21 en medio PDA y de MR-22 en medio Sabouraud. La barra indica 250 μm .

3.1.9. *Mortierella*

3.1.9.1. Aislado MR-23

Las características morfológicas de este aislado permiten asociarlo al género *Mortierella*. En los primeros días de crecimiento en medio Sabouraud, se caracterizan por crecer ampliamente, pero solo su micelio, sin la aparición de esporas en la superficie. El micelio, a diferencia de otras muestras, es sólido al tacto y tiene una

aparición como si estuviera formado por capas. Las colonias con varios días de crecimiento esporulan, adquiriendo un color blanco en sus superficies y tienen un aspecto algodonoso pero muy sólido (Figura 16). Por el reverso, las colonias muestran su micelio creciendo en capas. Posee una VCR en PDA de 2,7 mm/día (Anexo Tabla A2). Al ser un hongo Zygomycota, *Mortierella* posee esporangióforos en lugar de conidióforos, y esporangioesporas en lugar de conidios. Las cabezas de los esporangióforos son redondas, y apenas puede observarse la presencia de mótulas (Figura 16). Además, se pudo observar un esporangióforo con su pared desintegrada, lo que permitió distinguir las esporangioesporas de *Mortierella*, las cuales poseen una forma elipsoidal (Figura 16).

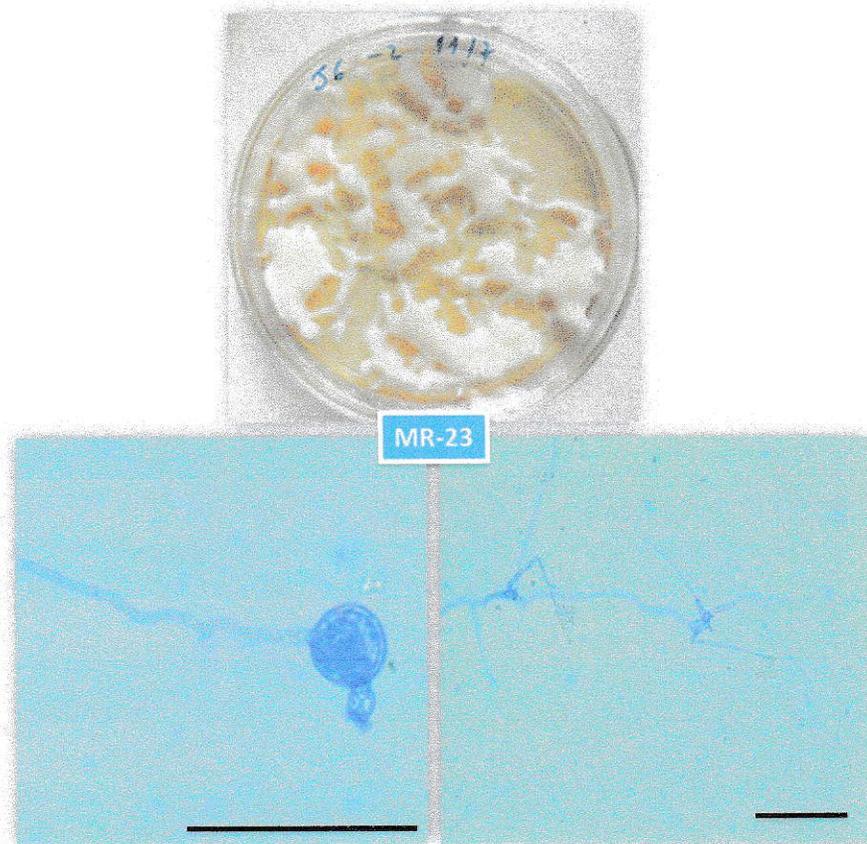


Figura 16. Colonia en medio PDA, esporangióforo y esporas de *Mortierella* (MR-23). La barra indica 250 μ m.

3.1.10. *Absidia*

3.1.10.1. Aislado MR-24

Las colonias de la muestra MR-24 en sus primeros días de crecimiento, presentan un micelio similar al de *Mortierella*, con un aspecto de capas, aunque con una textura más globosa y de un color café. Entre los dos y tres días de crecimiento, comienza a producir una gran cantidad de hifas aéreas creciendo verticalmente a la colonia, que pueden ser observadas a simple vista (Figura 17). Con más días de crecimiento, las colonias se cubren totalmente por hifas aéreas, las cuales llegan a tocar la tapa de la placa donde están creciendo. Estas colonias viejas se observan de color café. La VCR de esta muestra es de 0,3 mm/día (Anexo Tabla A2).

Al microscopio, pueden observarse los esporangióforos característicos del género *Absidia*, que son piriformes. La cabeza globosa del esporangióforo se denomina esporangio, en el cual puede observarse una columela y las esporangioesporas sobre éstas. La estructura con forma de embudo que une el esporangio con el esporangióforo se denomina apófisis, bajo la cual se puede observar la presencia de septos (Figura 17).

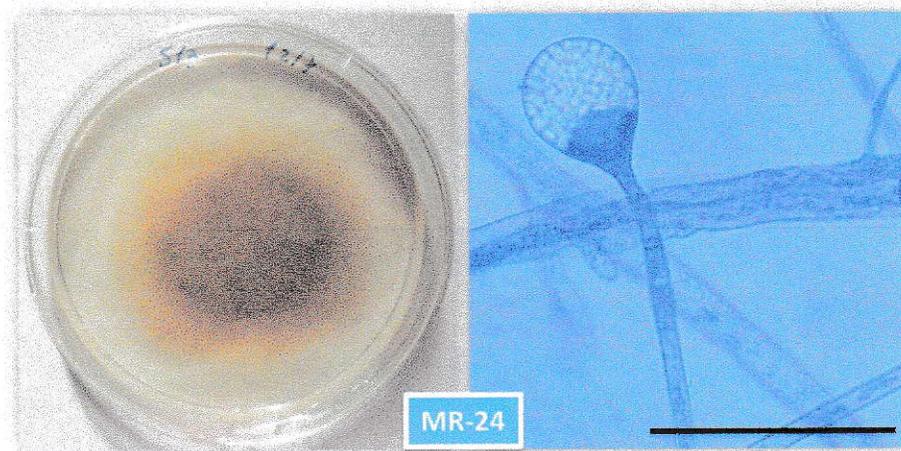


Figura 17. Colonia en medio Sabouraud y esporangióforo con esporas en su cabeza de *Absidia* sp. (MR-24). La barra indica 250 μ m.

3.1.11. *Coniochaeta* / *Lecythophora*

3.1.11.1. Aislados MR-26 y MR-27

Las colonias de estas muestras se caracterizaron por mostrar una variedad de aspectos morfológicos distintos, a pesar de ser crecidas en el mismo medio y a la misma temperatura. Las muestras MR-26 y MR-27 se caracterizaron por presentar una textura sólida y un crecimiento radial más reducido (VCR en PDA de 0,9 y 0,6 mm/día, respectivamente) (Anexo Tabla A2). El color de las colonias de la muestra MR-26 era naranja y el de la MR-27 era similar aunque con un tono más cercano al rosado (Figura 18). No fue posible observar estructuras reproductivas de interés en estos aislados. Esta caracterización fue insuficiente para aproximarse al género de estos aislados, aunque con los resultados del BLAST (como se mostrará más adelante), se determinó que ambas muestras pertenecen al género *Coniochaeta* (teleomorfo).

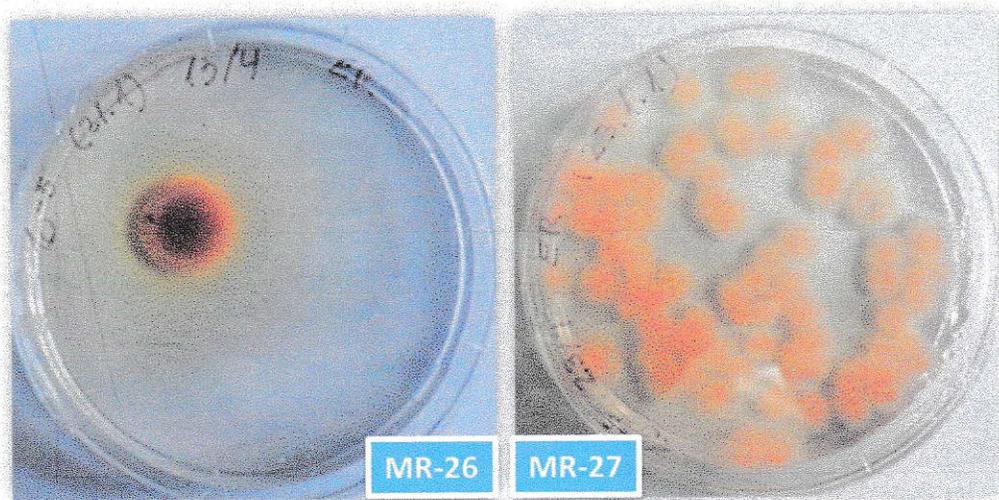


Figura 18. Colonias en medio PDA de los aislados MR-26 y MR-27.

3.1.11.2. Aislados MR-28 y MR-29

Las muestras MR-28 y MR-29 poseen una textura sólida, aunque no tanto como las muestras MR-26 y MR-27. Además, su crecimiento radial es mayor que el de las otras dos muestras, con una VCR en PDA de 1,3 mm/día tanto para la muestra MR-28 como para MR-29 (anexo, Tabla A2). El color de sus colonias es muy particular, ya que se observan anillos en ellas, que van desde el color rosado, al café oscuro (Figura 19). Estas características permiten concluir que estas muestras pertenecen al género *Lecythophora*, que es el anamorfo de *Coniochaeta* (muestras MR-26 y MR-27 como se mostrará más adelante en el análisis molecular). Sin embargo, fue posible observar una alternancia en la morfología de las colonias de MR-28 y MR-29, presentando en algunos casos las mismas características macroscópicas de los aislados MR-26 y MR-27 (*Coniochaeta*), lo que al comienzo dificultó la caracterización de las mismas.

Con respecto a sus características microscópicas, no fue posible observar las estructuras reproductivas sexuales de *Coniochaeta*, aunque sí se pudo observar las asexuales de *Lecythophora* (Figura 19). Se observan fiálides no terminales, es decir, intercalares en las hifas. Estas fiálides son langeniformes (con forma de frasco) y se caracterizan por poseer engrosamientos, lo que les da un aspecto de hinchamiento. Cuando el hongo ya está esporulado es muy difícil observar estas fiálides intercalares, lográndose ver solo los conidios elipsoidales por los costados de las hifas.

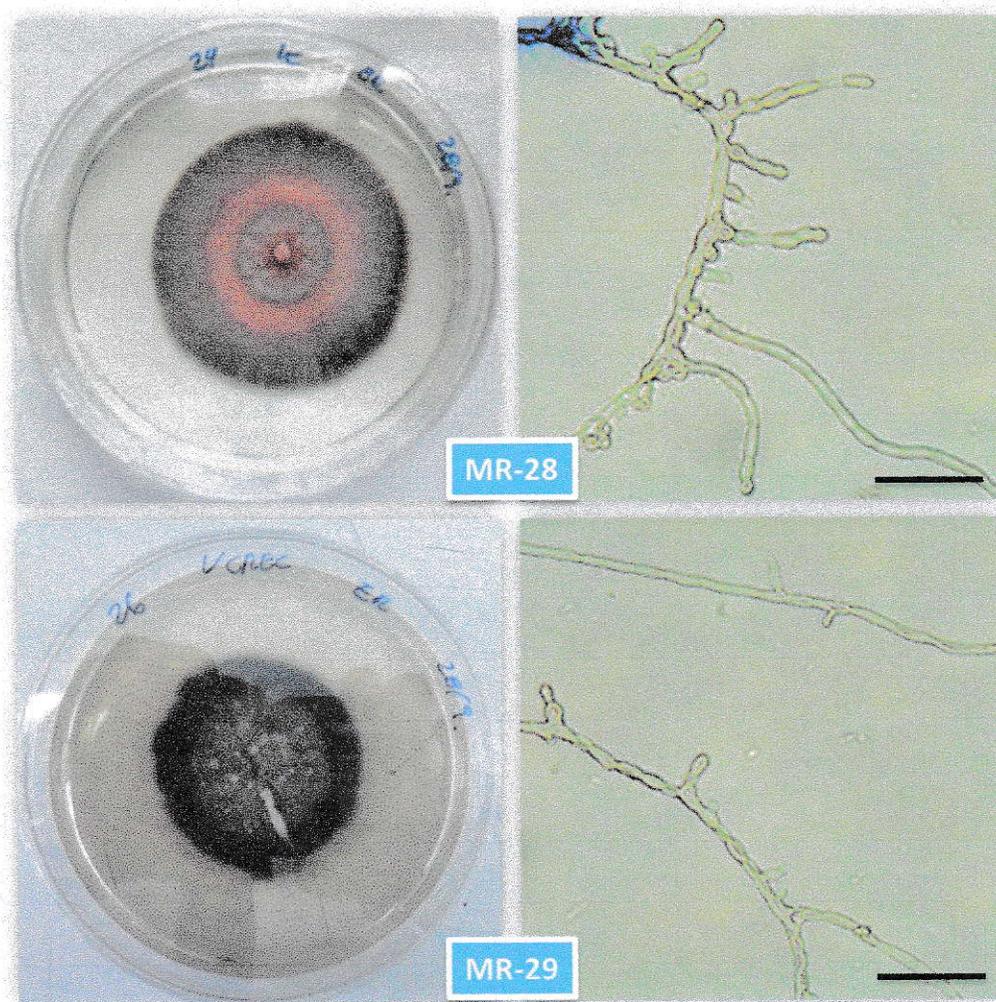


Figura 19. Colonias en medio PDA y fiáldes intercalares de *Lecythophora* (MR-28 y MR-29). La barra indica 250 μm .

3.1.12. *Coniothyrium*

3.1.12.1. Aislado MR-30

En sus primeros días de crecimiento las colonias de la muestra MR-30 presentan una textura flocosa muy compacta y de color café. Con varios días de crecimiento, las colonias adquieren una textura más sólida, aunque aún conservan su textura flocosa compacta en el centro. La coloración de estas colonias es llamativa, ya

que se observan colores en anillos, que van desde un color verde en el centro de las colonias, siguiendo por un verde más oscuro, para luego observar un color café en el borde de las colonias (Figura 20). También se pueden observar puntos negros que cubren la superficie de ellas. Estos puntos negros se observan mejor con la lupa estereoscópica, los cuales corresponden a sus estructuras reproductivas. Su VCR es de 3,2 mm/día (Anexo Tabla A2). Con respecto a estas estructuras reproductivas, se observaron con más detalle en el microscopio y reciben el nombre de picnidios. Éstos son cuerpos fructíferos asexuales, con una forma de pera o también subesférica (Figura 20). En la cavidad interna del picnidio se encuentran las células conidiógenas en sus paredes, de las cuales nacen los conidios que llenan la cavidad y que son liberados por un orificio apical del picnidio. En este caso no pudo verse el picnidio con mucho detalle, aunque si se lograron observar entrelazados a las hifas, y con una forma subesférica y llenos de conidios. También fue posible observar los conidios liberados de los picnidios, los cuales son elipsoidales y de textura lisa. Estas características son similares a las descritas para los hongos del género *Coniothyrium*.

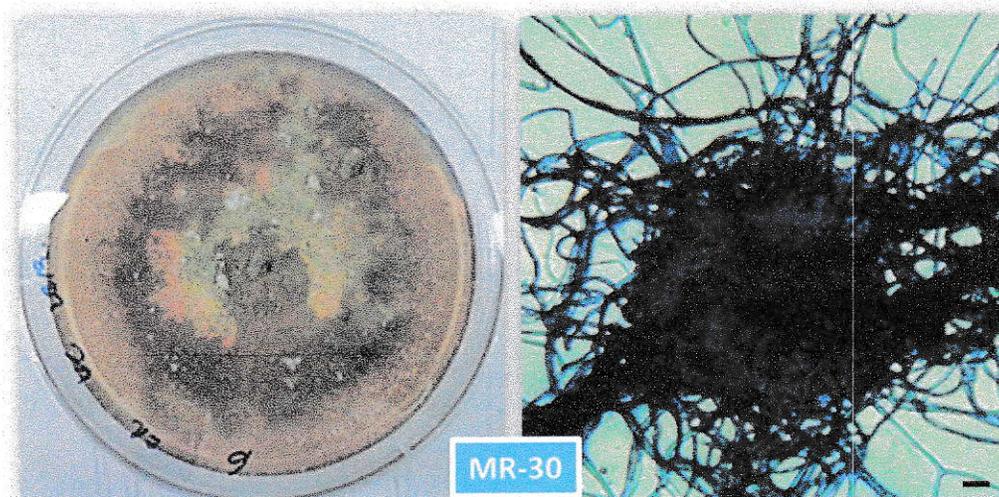


Figura 20. Colonia de *Coniothyrium sp.* en medio PDA y un picnidio entre sus hifas (MR-30). La barra indica 250 μm .

3.1.13. *Phoma*

3.1.13.1. Aislado MR-31

En sus primeros días de crecimiento, las colonias de la muestra MR-31 tienen una textura flocosa y un color entre café y verde. Se observa producción de pigmento café claro en el medio Sabouraud. Con más días de crecimiento, las colonias poseen un color café, con manchas negras, y con una textura aterciopelada (Figura 21). La presencia de pigmento en el medio ya no es tan clara. Posee una VCR de 0,7 mm/día (Anexo Tabla A2).

Microscópicamente fue posible observar picnidios al igual que en la muestra MR-30, aunque en este caso fue posible observarlos longitudinalmente. Aunque el ostiolo (orificio por donde se liberan los conidios) se observa muy abierto, se infiere de todas formas que el picnidio posee forma de pera. También se puede ver que los conidios nacen a partir de las paredes del picnidio, y poseen una forma muy alargada (Figura 21). Estas características han sido descritas para los hongos del género *Phoma*.

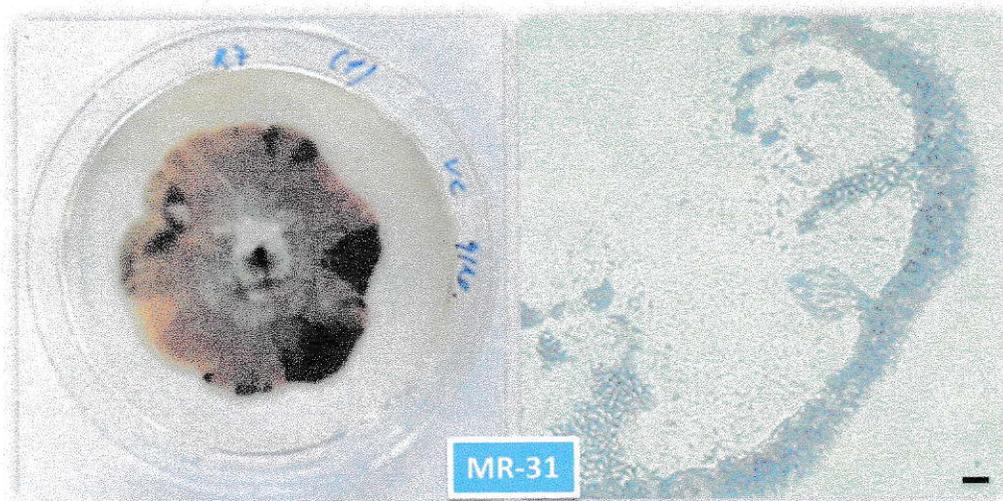


Figura 21. Colonia en medio PDA y sección longitudinal del picnidio de *Phoma* sp. (MR-31). La barra indica 250 μ m.

3.1.14. Aislado MR-32

Las colonias del aislado MR-32, se caracterizan por su alta velocidad de crecimiento (VCR de 12,2 mm/día; Anexo Tabla A2), que le permite cubrir totalmente la placa en poco tiempo. Las colonias son de color amarillo, muy planas y con una textura sólida, lo que le da una apariencia de corteza que cubre el medio de cultivo (Figura 22).

Microscópicamente, se observaron estructuras reproductivas que se encuentran terminales a las hifas septadas, sin embargo, se observó que a partir de esa estructura crece otra hifa, quedando intercaladas entre ellas. Con estas características no se pudo asociar este aislado a ningún género en particular.

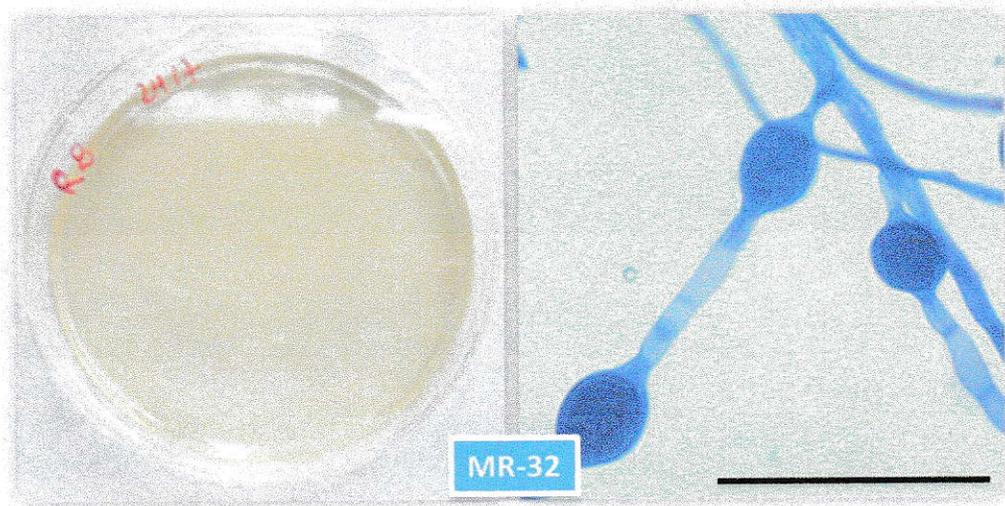


Figura 22. Colonia en medio PDA y conidióforo de *MR-32*. La barra indica 250 μm .

3.1.15. Aislado MR-33

Al igual que la muestra MR-32, la muestra MR-33 se caracteriza por ser muy plana y por poseer una textura sólida, aunque en las colonias más viejas se aprecia una textura levemente similar a la gamuza (Figura 23). También posee una velocidad

de crecimiento alta, con una VCR de 6,1 mm/día (Anexo Tabla A2). No fue posible observar sus estructuras reproductivas en el microscopio.

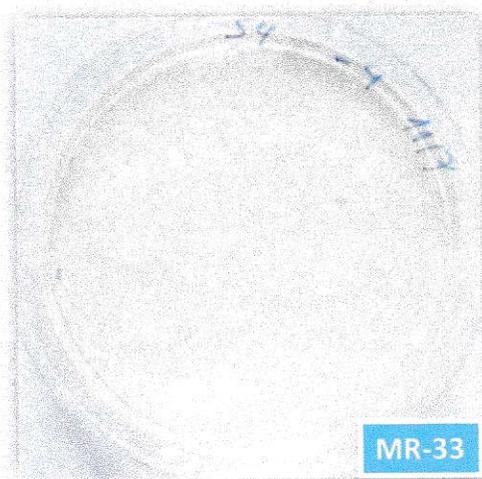


Figura 23. Colonias en medio PDA del aislado MR-33.

3.1.16. Aislado MR-34

Las colonias son de color rojo, con una textura levemente flocosa y sólida en el centro. Con más días de crecimiento, las colonias adquieren un color negro, aterciopeladas en los bordes y con una marcada estructura sólida en el centro (Figura 24). Su VCR en PDA es baja, con 0,6 mm/día (Anexo Tabla A2). Fue posible observar las esporas de este hongo, las que poseen una forma subglobosa (Figura 24). Sin embargo, no fueron suficientemente particulares para asociarlas a ningún género.

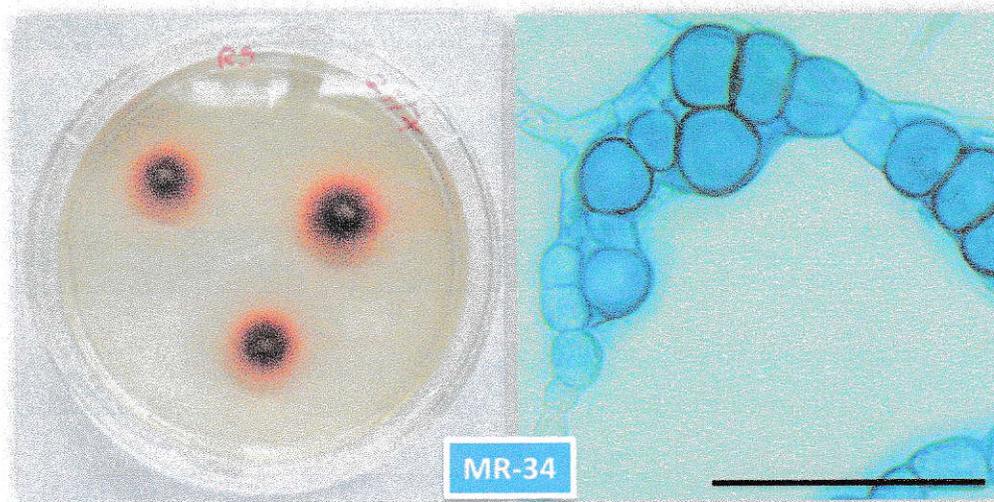


Figura 24. Colonias en medio Sabouraud del aislado MR-34 y sus esporas. La barra indica 250 μm .

3.1.17. Aislado MR-35

Las colonias poseen una textura flocosa. Al comienzo son de color rosado, y con más días de crecimiento poseen tonos más oscuros en su centro. Se caracterizan por la abundante producción de un compuesto que tiñe el medio Sabouraud a un color café muy oscuro (Figura 25). Su VCR en medio PDA es de 1,6 mm/día (Anexo Tabla A2). No se logró observar sus estructuras reproductivas al microscopio



Figura 25. Colonias en medio Sabouraud del aislado MR-35.

3.1.18. Aislado MR-36

Las colonias de la muestra MR-36 poseen una textura flocosa y un color café, aunque con tonos que se acercan al gris y al verde (Figura 26). Su apariencia es muy similar al de las muestras MR-7 y MR-8 (*Ulocladium sp.*). No se logró observar sus estructuras reproductivas al microscopio. La VCR de este aislado en PDA es de 2,8 mm/día (Anexo Tabla A2).

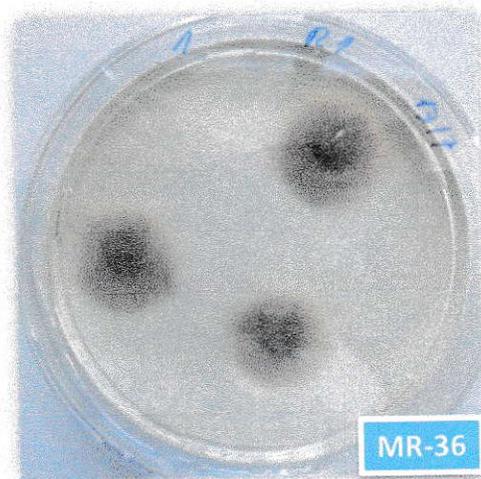


Figura 26. Colonias del aislado MR-36.

3.2. Identificación molecular de los aislados fúngicos

Para confirmar la identificación de los aislados fúngicos realizada mediante la caracterización morfológica, se analizaron las secuencias de los marcadores moleculares correspondientes a los genes que codifican los RNAs ribosomales 18S y 28S y la región intergénica (ITS).

3.2.1. Obtención del DNA y amplificación de los marcadores moleculares

Para la caracterización molecular de los aislados se realizó una extracción de DNA total de cada uno de los aislados fúngicos, la calidad e integridad del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Luego se amplificaron los marcadores moleculares y los amplicones obtenidos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, obteniendo amplicones de un tamaño de aproximadamente 1500 pb para el rDNA 28S, de 1500 pb para el rDNA 18S y 600 pb para el marcador ITS (Figura 27).

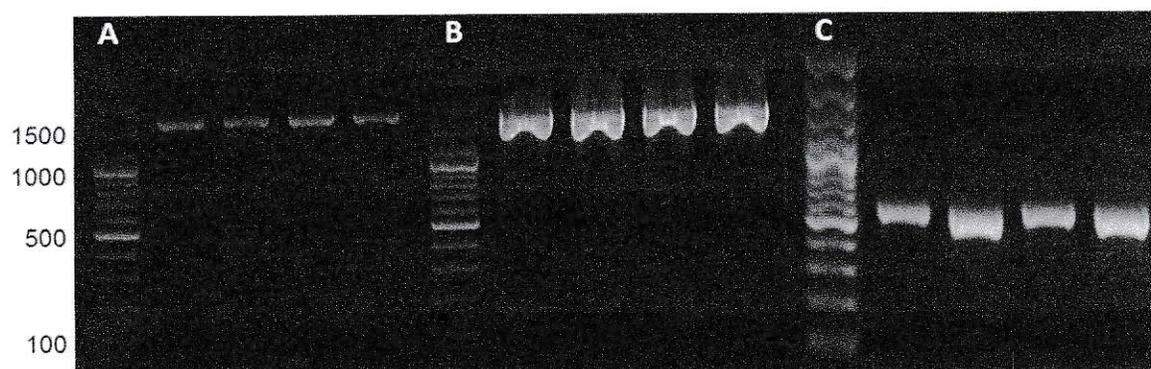


Figura 27. Electroforesis en gel de los marcadores rDNA 28S (A), 18S (B) e ITS (C), usando el marcador de peso molecular 100bp (100-3000).

3.2.2. Secuenciación de los marcadores moleculares y análisis de las secuencias.

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los amplicones de los diferentes marcadores para cada aislado, las cuales se obtuvieron por medio de una secuenciación en un solo sentido. Las secuencias se revisaron para eliminar sus extremos, de manera de utilizar sólo la zona del electroferograma que presentó una adecuada calidad para los análisis posteriores. Las secuencias nucleotídicas de los aislados obtenidas se asociaron a las secuencias de la base de datos del NCBI,

escogiendo aquellas secuencias que presentaban un mayor porcentaje de cobertura e identidad con la secuencia de las muestras analizadas. Los resultados detallados del análisis del BLAST para las secuencias de los marcadores rDNA 28S, rDNA 18S e ITS se muestran en los anexos en las Tablas A3, A4 y A5, respectivamente; un resumen se muestra en la Tabla 3. Este análisis permitió asociar molecularmente a que género o especie pertenece cada uno de los aislados. Existieron casos en los que no fue posible analizar las secuencias de alguno de los tres marcadores moleculares mediante BLAST, ya que se encontraban defectuosas o eran muy cortas para ser alineadas. La clasificación taxonómica de los aislados con respecto al marcador molecular rDNA 28S, indica que éstos se agrupan en 1 división, 3 clases, 6 órdenes, 8 familias y 12 géneros. Con respecto al marcador molecular rDNA 18S los aislados se agrupan en 3 divisiones, 5 clases, 8 órdenes, 12 familias y 17 géneros. Según el marcador molecular ITS los aislados se agruparon en 3 divisiones, 5 clases, 8 órdenes, 15 familias y 20 géneros (Tabla A7). Los datos de agrupamiento taxonómico indican que el marcador ITS es el más resolutivo a nivel de familia, género y especie.

Tabla 3. Resultados de la identificación de los aislados basada en los marcadores moleculares.

Aislado	rDNA 28S	rDNA 18S	ITS
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
MR-2	-	-	<i>Aspergillus versicolor</i>
MR-3	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus wentii</i>
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Dothideomycetes sp.</i>
MR-6	-	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MR-7	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>

Continuación Tabla 3.

MR-8	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
MR-10	-	-	<i>Davidiella tassiana</i>
MR-11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Davidiellaceae sp.</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
MR-12	<i>Cladosporium bruhnei</i>	<i>Cladosporium bruhnei</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
MR-13	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>
MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
MR-15	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium expansum</i>
MR-16	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
MR-17	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium roseopurpureum</i>
MR-18	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>
MR-19	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	-
MR-20	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>
MR-21	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria brogniartii</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-22	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-23	-	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i>
MR-24	-	-	<i>Absidia sp.</i>
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>
MR-26	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-27	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>
MR-28	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-29	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-30	<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Paraconiothyrium sp.</i>
MR-31	<i>Phoma sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>	-
MR-32	-	<i>Phanerochaete sp.</i>	<i>Phanerochaete sordida</i>
MR-33	-	<i>Trametes sp.</i>	<i>Trametes versicolor</i>
MR-34	<i>Preussia sp.</i>	<i>Preussia lignicola.</i>	<i>Preussia sp.</i>
MR-35	<i>Phoma sp.</i>	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	<i>Stagonospora sp.</i>
MR-36	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Embellisia sp.</i>

Al complementar los resultados de BLAST de los diferentes marcadores moleculares, y a la vez, con ayuda de la caracterización morfológica, se logró llegar a una identificación consenso más probable para cada aislado (Tabla 4), para lo cual se le asignó mayor importancia al resultado obtenido con el marcador ITS (más resolutivo) y a lo observado con la morfología (Tabla A6).

Tabla 4. Identificación de los aislados propuesta de acuerdo a la caracterización morfológica y molecular.

Aislado	Identificación más probable	Aislado	Identificación más probable
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	MR-19	<i>Penicillium sp.</i>
MR-2	<i>Aspergillus versicolor</i>	MR-20	<i>Penicillium sp.</i>
MR-3	<i>Aspergillus wentii</i>	MR-21	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans var. pullulans</i>	MR-22	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans var. melanogenum</i>	MR-23	<i>Mortierella alpina</i>
MR-6	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	MR-24	<i>Absidia sp.</i>
MR-7	<i>Ulocladium sp.</i>	MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>
MR-8	<i>Ulocladium sp.</i>	MR-26	<i>Coniochaeta sp.</i>
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	MR-27	<i>Coniochaeta sp.</i>
MR-10	<i>Davidiella tassiana</i>	MR-28	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MR-29	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-12	<i>Cladosporium bruhnei</i>	MR-30	<i>Coniothyrium sp.</i>
MR-13	<i>Penicillium canescens</i>	MR-31	<i>Phoma sp.</i>
MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	MR-32	<i>Phanerochaete sp.</i>
MR-15	<i>Penicillium expansum</i>	MR-33	<i>Trametes versicolor</i>
MR-16	<i>Penicillium polonicum</i>	MR-34	<i>Preussia sp.</i>
MR-17	<i>Penicillium sp.</i>	MR-35	<i>Stagonospora sp.</i>
MR-18	<i>Penicillium sp.</i>	MR-36	<i>Embellisia sp.</i>

Al comparar los resultados de la caracterización morfológica y molecular con respecto a la identificación más probable de los 36 aislados (Figura 28), se puede observar que la caracterización con el marcador ITS fue la que mejores resultados entregó (86,1% de coincidencia). Los resultados de la caracterización morfológica coincidieron en un 77,8% con la identificación más probable, lo cual indica además que esta caracterización se ajusta mejor con los resultados del marcador ITS. Los marcadores rDNA 18S y 28S obtuvieron menores porcentajes de coincidencia con la identificación más probable (75,0% y 63,9% respectivamente).

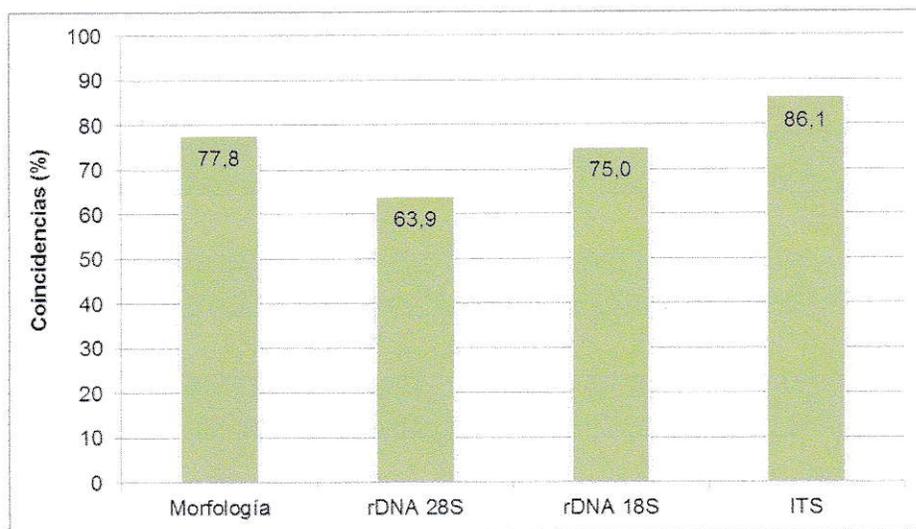


Figura 28. Coincidencias entre las diferentes herramientas usadas en la identificación de los aislados fúngicos y la identificación consenso.

Al analizar esta comparación a nivel de los géneros fúngicos obtenidos por cada una de las caracterizaciones (Figura 29), se puede ver que el marcador rDNA 28S fue el menos resolutivo, ya que no fue capaz de detectar a los géneros fúngicos *Mortierella* y *Absidia* (Zygomycota), *Phanerochaete* y *Trametes* (Basidiomycota), incluyendo a

algunos Ascomycotas como *Ulocladium*. Por otra parte, existieron algunos géneros que sólo fueron identificados por el marcador ITS, como por ejemplo *Embellisia* o *Stagonospora*. Además, el marcador ITS fue capaz de identificar el género de los 7 hongos no identificados en la caracterización morfológica. Algunos géneros como *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Talaromyces*, *Cladosporium* y *Beauveria* fueron identificados en cada una de las caracterizaciones.

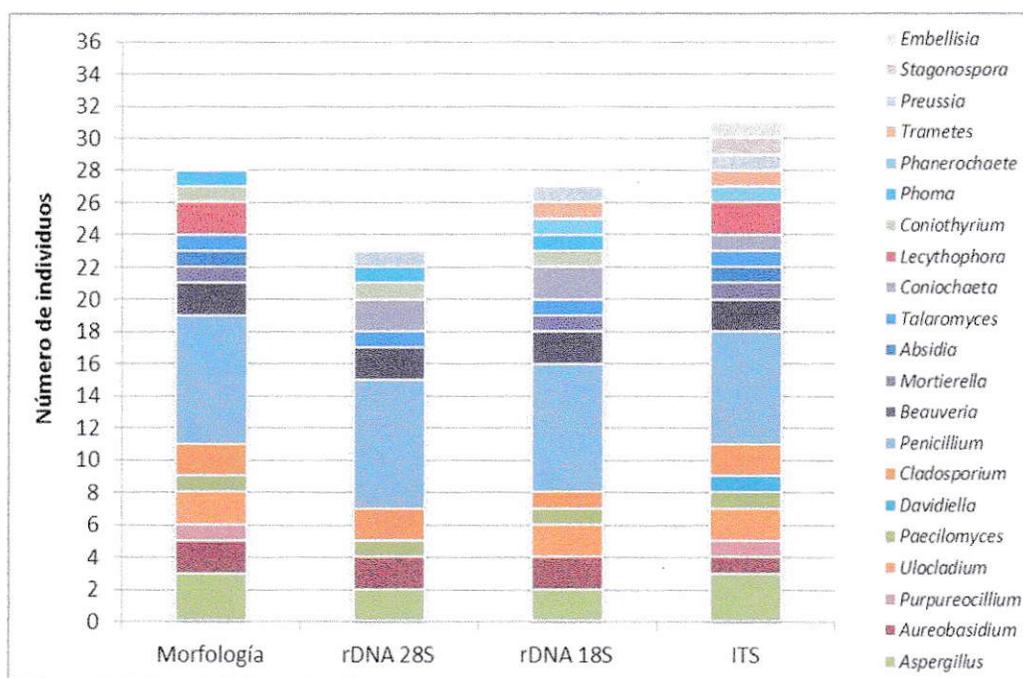


Figura 29. Coincidencias entre las diferentes herramientas usadas en la identificación de los aislados fúngicos y la identificación consenso a nivel de género.

Con respecto a la identificación más probable, los 36 aislados se agruparon en 3 divisiones, 6 clases, 8 órdenes, 15 familias y 21 géneros (Tabla 5). La división más abundante fue la Ascomycota (88,8%), la clase más abundante fue Dothideomycetes (36,1%), el orden más abundante fue Eurotiales (33,3%), la familia más representada

fue Trichocomaceae (36,1%) y el género más abundante fue *Penicillium* (22,2%) (Figura 30).

Tabla 5. Distribución en los diferentes niveles taxonómicos de los aislados fúngicos identificados.

Divisiones	Clases	Órdenes	Familias	Géneros	n	
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	3	
				<i>Paecilomyces</i>	1	
				<i>Penicillium</i>	8	
				<i>Talaromyces</i>	1	
	Dothideomycetes	Dothideales	Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>	2	
				<i>Ulocladium</i>	2	
				Pleosporaceae	<i>Phoma</i>	1
					<i>Embellisia</i>	1
					<i>Coniothyrium</i>	1
		Pleosporales	Leptosphaeriaceae	<i>Sporormiaceae</i>	1	
				<i>Preussia</i>	1	
				<i>Phaeosphaeriaceae</i>	<i>Stagonospora</i>	1
			Capnodiales	<i>Davidiellaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	2
				<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Davidiella</i>	1
Hypocreales	Hypocreales	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	<i>Purpureocillium</i>	1		
		<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Beauveria</i>	2		
Sordariomycetes	Sordariales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta</i>	2		
			<i>Lecytophora</i>	2		
Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	<i>Phanerochaetaceae</i>	<i>Phanerochaete</i>	1	
			<i>Polyporaceae</i>	<i>Trametes</i>	1	
Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales	<i>Mortierellaceae</i>	<i>Mortierella</i>	1	
			<i>Mucoraceae</i>	<i>Absidia</i>	1	

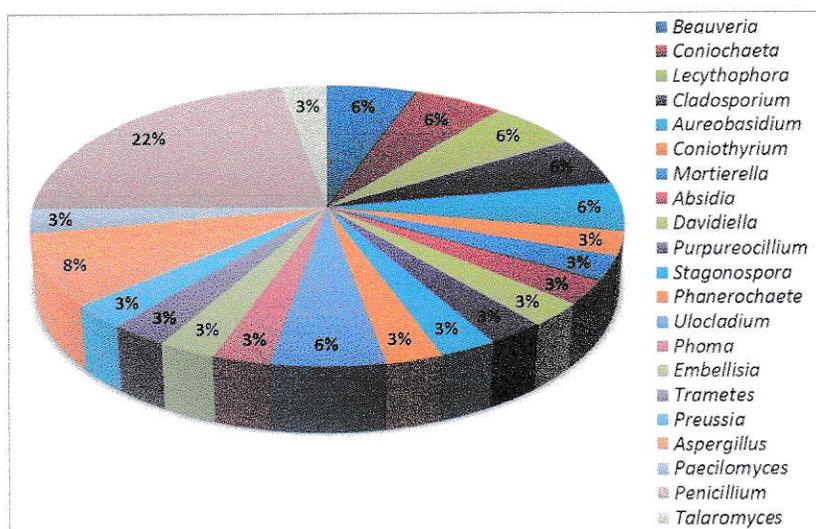


Figura 30. Distribución de los aislados fúngicos identificados a nivel de género.

3.2.3. Comparación de los resultados de la caracterización de la fracción cultivable con los de una caracterización independiente de cultivo.

Considerando que los aislados obtenidos representan la fracción cultivable de la comunidad fúngica del suelo semiárido analizado, se compararon los datos obtenidos en este trabajo con las secuencias de los clones del marcador rDNA 18S obtenidas por Farías (2011), para esta misma localidad y que corresponde a la fracción fúngica obtenida mediante un análisis independiente de cultivo. En la genoteca, se obtuvieron 114 clones, que se distribuyeron en 5 divisiones, 11 clases, 19 órdenes, 24 familias y 38 géneros. La mayoría de las secuencias de la genoteca se relacionaron con hongos de la división Ascomycota (61%).

Los resultados de la genoteca se compararon con los datos obtenidos en este trabajo con los aislados fúngicos, para lo cual se construyó un dendrograma con el algoritmo Neighbor-joining siguiendo el modelo Kimura 2-parámetros, usando las secuencias del marcador rDNA 18S obtenidas en la genoteca y en la fracción cultivable (Figura 31). Los datos obtenidos del análisis independiente de cultivo, indican un mayor número de divisiones (5) en comparación a la fracción cultivable (3). En cuanto al número de familias obtenidas en la fracción cultivable (12), ésta fue duplicada en el análisis independiente de cultivo (24). La familia más abundante entre los clones fue Sporomniaceae con 12 representantes, en el caso de la fracción cultivada la familia más abundante fue Trichomniaceae con un 36% de representación.

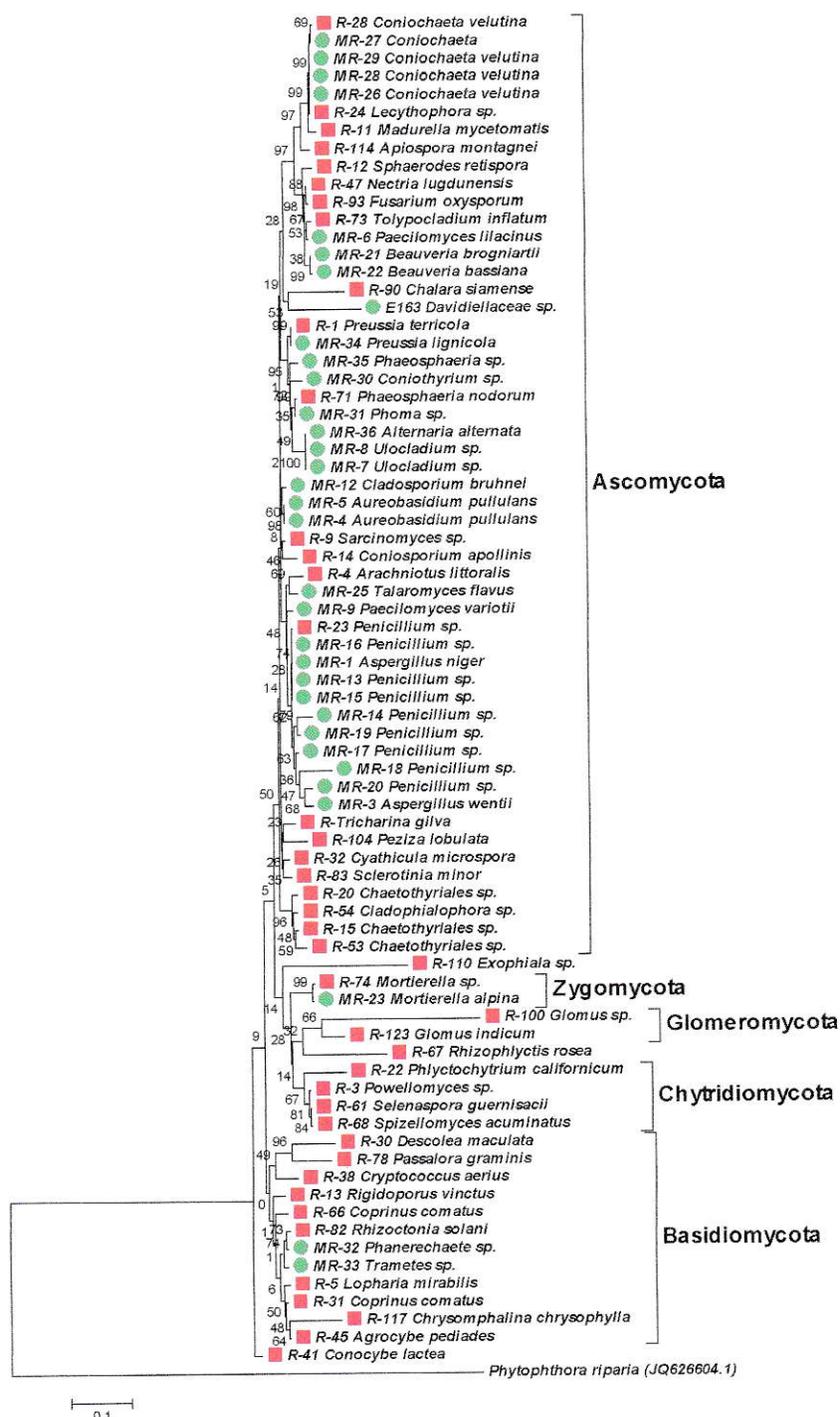


Figura 31. Análisis de agrupamiento de las secuencias obtenidas del marcador molecular rDNA 18S de la fracción cultivable (círculos verdes) y de la genoteca (independiente de cultivo; cuadrados rojos). La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 500 iteraciones de bootstrap y siguiendo el modelo Kimura 2- parámetros. La secuencia de *Phytophthora riparia* (JQ626604.1) se utilizó como raíz del árbol.

A pesar de que la diversidad taxonómica obtenida en el análisis independiente de cultivo fue claramente mayor a la obtenida en la fracción cultivable, se obtuvieron aislados de 6 familias de esta última que no fueron obtenidos en la genoteca lo que indica que a pesar de que la caracterización fúngica mediante técnicas independientes de cultivo cubren un gran espectro, es necesario una análisis dependiente de cultivo para complementar los datos de composición de la comunidad fúngica del suelo. Esta diferencia fue aún más clara cuando la comparación se realizó a nivel de género. Del total de 17 géneros identificados en la fracción cultivable, 12 (13,8% del total de secuencias analizadas) no se visualizaron en el análisis independiente de cultivo, mientras que los otros 5 (30,8% del total de secuencias analizadas) fueron identificados en los dos métodos (Figura 32).

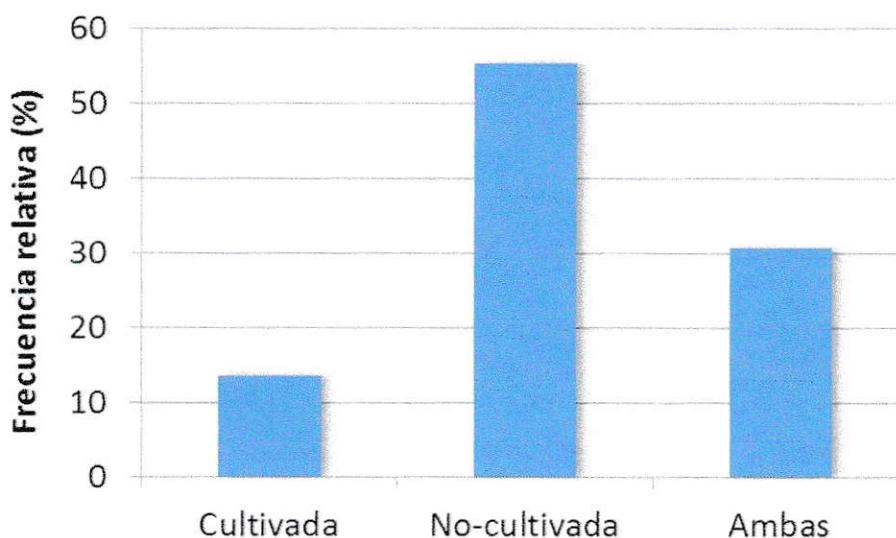


Figura 32. Frecuencia relativa de secuencias presentes exclusivamente en la fracción cultivada, exclusivas de la fracción no cultivada, y comunes a ambas fracciones.

3.3. Comunidad fúngica experimental

Las comunidades microbianas experimentales son modelos novedosos para el estudio de la Ecología Microbiana a partir del cual se pueden estudiar diversos procesos ecológicos. En este trabajo se construyó una comunidad fúngica experimental, para lo cual se seleccionaron 5 especies fúngicas que se indican en la Tabla 6 y se estudiaron los cambios en estructura genética y actividad metabólica mediante T-RFLP y el test "FF Microplate" de BIOLOG, respectivamente. Los aislados seleccionados se eligieron por pertenecer a los géneros de la familia fúngica más abundante (Trichocomaceae), según lo determinado mediante la aproximación dependiente de cultivo. Además se eligió al azar un quinto miembro de la comunidad, identificado como del género *Cladosporium cladosporioides*, un componente común de suelos áridos en general.

Tabla 6. Hongos utilizados para la construcción de la comunidad experimental

Aislado	Género o Especie	Familia	Orden	Clase
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes
MR-12	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	Dothideomycetes
MR-13	<i>Penicillium canescens</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes

3.3.1. Perfiles genéticos

Para estudiar la estructura genética comunitaria mediante patrones de T-RFLP de un marcador molecular, se determinó previamente el fragmento terminal específico

de cada aislado (T-RF) y se comparó con el esperado a partir de la digestión *in silico* de la secuencia. Los patrones de T-RFLP se realizaron con el marcador molecular ITS digerido con la enzima de restricción *Bst*UI. Los T-RFs esperados y experimentales obtenidos para cada aislado se muestran en la Tabla 6. En el caso del T-RFLP, además de los peaks de fluorescencia esperados, también se observan otros de fluorescencia parecida a éstos, aunque con longitudes de pares de bases que no son los esperados, por lo cual son descartados (T-RFs falsos). Éstos se compararon con los obtenidos en el T-RFLP de los hongos creciendo en comunidad, en el cual también se obtuvieron 4 T-RFs falsos de fluorescencia menor a la de los T-RFs esperados (Tabla 7).

Tabla 7. T-RFs (pb) obtenidos experimentalmente por T-RFLP y los esperados por análisis *in silico*.

Muestra	T-RF esperado	Hongos individuales		Comunidad Experimental	
		T-RF experimental	T-RF falso	T-RF experimental	T-RF falso
MR-1	453	446	-	448	
MR-9	148	144	447	145	
MR-12	377	376	-	375	101/401 591/603
MR-13	136	131	100/435/587	132	
MR-25	142	137	-	138	

El perfil de T-RFLP de los hongos creciendo en comunidad se muestra en el electroferograma de la Figura 33. En el perfil de T-RFLP de la comunidad experimental de los hongos seleccionados fue posible observar todos los T-RFs esperados en el análisis *in silico* y en el T-RFLP de los mismos hongos realizado individualmente. La

fluorescencia obtenida para el aislado MR-1 fue considerablemente mayor que la del resto de los hongos, razón por la cual la fluorescencia relativa de los T-RFs de las demás muestras se ven tan bajas. También se observan los 4 T-RFs falsos, aunque son claramente identificables de los T-RFs esperados.

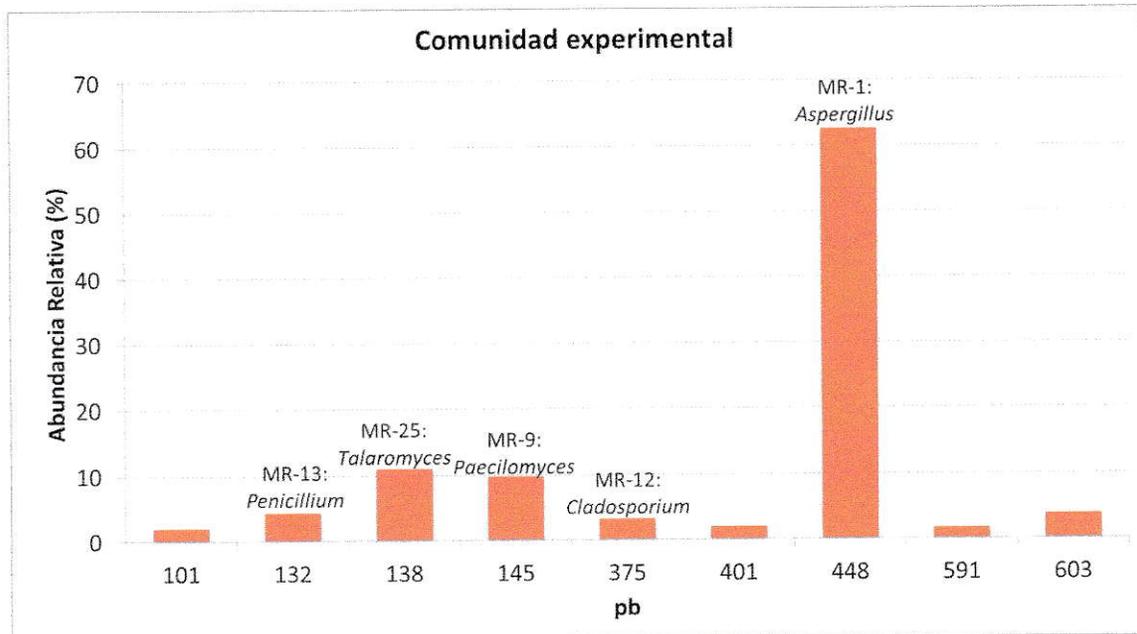


Figura 33. Perfil de T-RFLP del marcador molecular ITS de la comunidad de los aislados seleccionados para el montaje de la comunidad fúngica experimental.

3.3.2. Perfiles metabólicos

Para la caracterización metabólica, las placas FF-Microplate del test metabólico de BIOLOG se inocularon con una suspensión de esporas, para evaluar el uso de los distintos nutrientes. Los nutrientes ensayados se agruparon en 6 categorías como se muestra en la Tabla 8, y en esta misma se indican cuantas fuentes de cada categoría fue capaz de consumir cada aislado fúngico analizado, lo cual refleja los patrones de

riqueza de utilización de los sustratos del test. Estos datos permiten distinguir distintos patrones metabólicos para cada aislado.

Tabla 8. Categorías de fuentes de carbono de la placa FF-Microplate (BIOLOG) y el número de fuentes utilizadas por cada muestra.

Aislado	Ácidos carboxílicos (17)	Aminas/amidas (6)	Aminoácidos (13)	Carbohidratos (44)	Misceláneos (10)	Polímeros (5)
MR-1	5/17	0/6	3/13	17/44	2/10	3/5
MR-9	11/17	1/6	8/13	36/44	6/10	5/5
MR-12	0/17	0/6	1/13	2/44	0/10	1/5
MR-13	2/17	2/6	2/13	14/44	2/10	4/5
MR-25	1/17	0/6	0/13	16/44	2/10	4/5

Para el análisis metabólico de la comunidad, se construyó un microcosmos con los 5 hongos seleccionados, del cual, luego de 3 días de incubación a 24°C, se obtuvo un sobrenadante que fue utilizado para inocular las placas del test FF-Microplate (BIOLOG).

Los valores de absorbancia obtenidos del test metabólico individual de los 5 hongos de la comunidad, se sumaron para crear una matriz única de absorbancias, con el fin de simular el test metabólico de una comunidad teórica. Éstos se compararon con los resultados obtenidos del test realizado a la comunidad experimental al mismo tiempo de incubación (Tabla 9).

Se observan diferencias entre el patrón metabólico de los hongos creciendo en comunidad y los mismos creciendo individualmente. Esta diferencia se observa tanto en la utilización o no de ciertas fuentes de carbono, ya que, en la comunidad

experimental el número de resultados de absorbancia positivos es considerablemente mayor que la de los hongos individuales. Sin embargo, existen dos fuentes de carbono que no son utilizadas por la comunidad (β -Ciclodextrina y D-Arabinosa) pero que sí se esperan en la comunidad teórica ya que los perfiles individuales muestran que algunos de los componentes fúngicos de la comunidad son capaces de utilizar estos nutrientes.

Tabla 9. Perfil metabólico de la comunidad experimental y de la comunidad teórica

Comunidad experimental ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	0,78	0,78	2,16	0,18	1,54	0,68	0,09	0,79	0,88	1,28	1,20
B	0,32	0,01	1,39	0,55	1,92	0,10	0,29	0,56	1,25	1,35	1,50	2,13
C	0,17	0,00	1,33	0,44	1,62	0,76	1,42	0,37	0,31	0,06	1,75	1,90
D	0,63	2,38	2,10	1,25	0,52	0,19	0,50	2,13	0,76	0,34	1,54	0,52
E	0,81	0,52	1,58	1,74	1,28	1,14	2,47	0,22	1,39	0,27	0,56	1,18
F	0,48	0,16	0,60	0,30	0,19	0,53	0,46	0,02	0,20	0,38	0,80	1,43
G	1,00	0,09	0,04	0,60	0,58	0,07	0,13	1,15	0,90	1,15	0,49	1,24
H	0,19	1,10	0,26	0,84	1,19	0,85	0,29	0,04	0,46	0,81	0,00	0,35
Comunidad teórica ²	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	0,84	0,01	0,97	0,10	0,02	0,50	0,29	0,53	0,13	0,10	0,12
B	1,95	0,14	2,25	0,26	1,30	0,26	0,24	0,15	0,14	0,11	0,00	0,77
C	0,03	0,01	0,05	0,0	0,57	0,41	0,60	0,00	0,01	0,02	0,1	0,22
D	0,05	0,90	2,20	0,38	0,05	0,11	0,06	0,57	0,18	0,34	0,92	0,18
E	0,63	0,50	0,26	0,52	0,01	0,06	0,57	0,08	0,33	0,01	0,30	0,40
F	0,33	0,02	0,03	0,00	0,00	0,04	0,48	0,07	0,00	0,14	0,00	0,28
G	0,00	0,07	0,03	0,02	0,13	0,02	0,00	0,07	0,13	0,76	0,06	0,06
H	0,01	0,00	0,15	0,07	0,02	0,01	0,1	0,02	0,02	1,48	0,00	0,03

¹Valores de absorbancia obtenidas en los 96 pocillos del test metabólico "FF-Microplate" (BIOLOG) luego de 72 h de incubación de los hongos creciendo en comunidad y ²de la suma de los mismos creciendo individualmente (comunidad teórica). En gris se muestran los pocillos que resultaron positivos (absorbancia mayor o igual a 0,1).

Además, las fuentes de carbono que son consumidas en ambos casos, no son utilizadas en igual magnitud, siendo mayor este consumo en la comunidad experimental en la mayoría de los casos. Esto se logra observar con más detalle en el gráfico de la Figura 34, en el cual se puede ver que el consumo en la comunidad experimental es notoriamente mayor en fuentes de carbono como la D-manosa, la sacarosa, la maltotriosa y la maltosa, entre otras. Por otra parte, también se puede observar que el consumo es mayor en la comunidad teórica para fuentes de carbono como la adenosina y la α -ciclodextrina. Esta última fuente de carbono representa la mayor diferencia en consumo entre ambas comunidades, y se correlaciona además con el hecho de que la β -ciclodextrina es una de las fuentes no utilizadas por la comunidad experimental y que sí es esperable en la comunidad teórica, ya que hay componentes fúngicos que la utilizan, pero que no expresan esta propiedad cuando crece en la comunidad experimental.

De este modo, se obtuvo que la comunidad experimental tiene una mayor versatilidad metabólica que la esperable a partir de sus componentes individuales (comunidad teórica), lo que sugiere una interacción entre los hongos que podría favorecer la utilización de las fuentes de carbono.

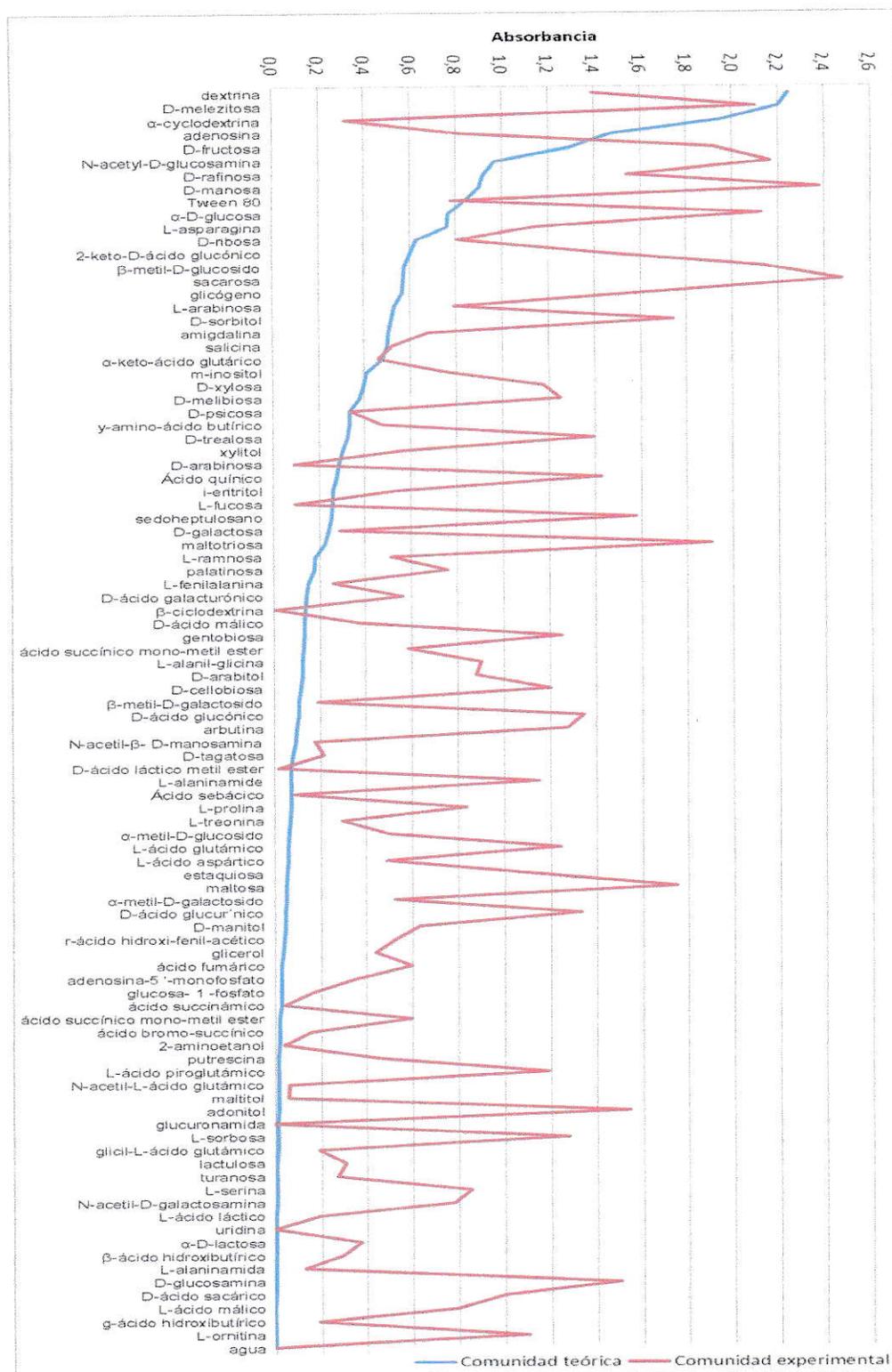


Figura 34. Utilización de las diferentes fuentes de carbono en la comunidad teórica (azul) y la comunidad experimental (rojo).

4. DISCUSIÓN

4.1. Identificación morfológica versus identificación molecular de los aislados

La identificación de los hongos es un componente fundamental de las investigaciones de diversas áreas, como por ejemplo en los estudios de diversidad en varios ambientes, así como en estudios de hongos patógenos de plantas y causantes de enfermedades en humanos (Begerow y col. 2010).

La caracterización morfológica de los aislados de este trabajo, permitió aproximarse en la mayoría de los casos a una identificación a nivel de género, aunque la identificación a nivel de especie se hizo más difícil. Esta aproximación resultó de mejor forma en aquellos hongos más conocidos, sin embargo en aquellos hongos menos comunes, para los cuales la información morfológica es más escasa, se requirió del complemento previo de la identificación molecular para aproximarse mejor a las características microscópicas de esos aislados.

Por esta razón, a pesar de su importancia, la caracterización morfológica de los aislados frecuentemente es problemática, debido a que muchas veces existe escasa información de caracteres, y también debido a la plasticidad morfológica que presentan muchos hongos (Slepecky & Staremer 2009). Además, la aproximación morfológica muchas veces es criticada por ser considerada subjetiva (Marinach-Patrice y col 2009), ya que el método se complica sobre todo a nivel de especie, en el cual las diferencias morfológicas, sobretodo de sus estructuras microscópicas, se hacen muy poco notorias, quedando a criterio y experiencia del observador la discriminación de la especie.

Por esta razón, los marcadores moleculares se han utilizado ampliamente en investigaciones asociadas a la taxonomía fúngica, ya que proveen varias ventajas que permiten complementar las falencias de la caracterización morfológica (Hawksworth 2012). Los resultados del análisis molecular se correlacionaron en la mayoría de los casos con los de la morfología. Sin embargo, el marcador rDNA 28S fue menos resolutivo, sobretodo en la identificación de hongos de las divisiones Basidiomycota y Zygomycota. El marcador molecular rDNA 18S fue más resolutivo que el rDNA 28S, sin embargo fue el ITS el marcador que entregó mayor información a nivel de especie, y el que mejor se correlacionó con la caracterización morfológica. El mayor poder resolutivo del marcador ITS era esperado, ya que junto a otros marcadores como los genes codificantes de la subunidad RPB2 de la polimerasa, de la β -tubulina y de la calmodulina, entre otros, han demostrado ser una gran herramienta para la identificación de especies fúngicas (Seifert 2009).

Ante esto, en los últimos años, el concepto de un código de barras mediante el uso de marcadores moleculares que permita el reconocimiento de especies entre los distintos reinos eucariotas, ha adquirido gran importancia. Idealmente, este código de barras, debiese consistir del mismo marcador para todos los reinos. De este modo, el "Consortium for the Barcode of Life" (CBOL) postuló el gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (CO1) para este objetivo (Schindel & Miller 2005). Sin embargo su uso en hongos no ha dado muy buenos resultados, por lo que se han propuesto varios de los marcadores moleculares mencionados, dentro de los cuales, el ITS entregó los mejores resultados en la identificación de un amplio rango de especies fúngicas, de modo que este marcador será propuesto como el código de barras fúngico primario (Schoch y col. 2012).

Sin embargo, a pesar de que la identificación molecular de los hongos actualmente es ampliamente usada en comparación a la identificación morfológica, la descripción válida de una especie fúngica, aún requiere del complemento de la caracterización morfológica, de acuerdo al código internacional de nomenclatura botánica (McNeill y col. 2006).

4.2. Comparación de la caracterización de la fracción fúngica cultivable con la caracterización independiente de cultivo

El desarrollo de las técnicas moleculares relacionadas al análisis de las secuencias de los marcadores ribosomales significó un gran avance para la Ecología Microbiana y sus estudios asociados a la diversidad y filogenia (Woese & Fox 1977). Varios trabajos asociados a este tipo de estudios se han basado exclusivamente en este método, principalmente por su capacidad de detectar numerosos microorganismos que no pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Ward y col. 1990). El hecho de que las técnicas independientes de cultivo no están limitadas a las especies microbianas cultivables, permite suponer que este método sería capaz de identificar todas las especies microbianas de cierto ambiente, tanto las cultivables, como las no cultivables.

En este trabajo se observó que estos supuestos no se confirman, ya que a pesar de que con la genoteca se obtuvo una mayor diversidad de hongos en comparación al método cultivable, se obtuvieron aislados que solo fueron identificados con éste último método y que podrían representar especies poco abundantes. En conjunto, ambos métodos permitieron identificar un total de 50 géneros fúngicos, de los cuales 12 solo lograron ser identificados en la fracción cultivable. De este modo, no se

puede afirmar que el método independiente de cultivo captura el espectro total de la diversidad microbiana, en este caso, de la diversidad fúngica.

El hecho de que se hayan obtenido varios hongos, en el análisis de la fracción cultivable, los cuales no se detectaron en la genoteca, puede ser debido a sesgos involucrados en la metodología asociada a esta aproximación molecular. Se ha visto que la extracción de DNA a partir de una muestra de suelo, puede representar un sesgo, ya que existen especies microbianas que poseen una morfología que hace difícil esta extracción, por lo cual las concentraciones de DNA obtenidas son menores, o incluso, puede no ser obtenido. La concentración de DNA obtenida, también puede verse afectada por la abundancia relativa en la que se encuentra alguna de las especies microbianas al momento de realizar la extracción. Por lo tanto, el cultivo podría revelar la presencia de especies abundantes y cultivables, pero también podría revelar la presencia de especies poco abundantes de la comunidad que son capaces de crecer bajo las condiciones de cultivo proporcionadas (Pedrós-Alió 2006). Las dificultades en la cantidad de DNA molde obtenido, se traduce en problemas al momento de amplificar el marcador molecular por PCR. Además de la proporción de molde, se ha visto que los números de ciclos de un PCR también afectan la composición de la genoteca obtenida (Bonnet y col. 2002). Sin embargo, se ha visto que es poco probable que los sesgos que se deban a una pérdida de especificidad de los partidores utilizados en el PCR, ya que los mismos partidores utilizados para la genoteca son usados para la amplificación de marcadores moleculares en los cultivos puros (Donachie y col. 2007).

Por otra parte, que se hayan identificado hongos en la genoteca, no encontrados en el análisis de la fracción cultivable, era más esperable, ya que el

aislamiento se realizó solamente en dos tipos de medio de cultivo, bajo condiciones de temperatura estandarizada, por lo cual muchos de esos hongos no detectados, pueden no ser cultivables en esas condiciones. Ampliando las condiciones de cultivo, es de esperar que se obtenga una mayor diversidad de hongos.

Los métodos basados en cultivo además de permitir la identificación de organismos no detectables por la aproximación independiente de cultivo, tienen la ventaja de permitir la verificación y prueba de hipótesis metabólicas determinadas por los datos de la metagenómica, proveen nuevas secuencias de genomas que permiten el diseño de mejores partidores para el refinamiento de los métodos moleculares y provee de cepas de referencia que permiten estudios de fisiología, genética y patogenicidad, entre otros. De este modo, cualquier investigación en la que se discuta la diversidad microbiana de algún ambiente solamente basada en una aproximación molecular sin tomar en cuenta la fracción cultivable, puede ser considerada incompleta (Prakash y col. 2013).

La razón de la comparación de la fracción cultivable de este trabajo con la independiente de cultivo del mismo suelo, es conocer de forma más completa la diversidad del suelo semiárido estudiado, para realizar una mejor selección de los hongos constituyentes de la comunidad experimental, y así intentar construir una comunidad que represente mejor a este suelo. Esto debido a que una de las críticas que generalmente se hacen de las comunidades microbianas experimentales, es su pérdida de realismo con respecto a un sistema natural (Jessup y col. 2005).

Cuatro de los hongos seleccionados pertenecen a la familia *Trichocomaceae*, la que fue la más abundante en la fracción cultivable, y también una de las más abundantes identificadas en la genoteca. Sin embargo, de los hongos seleccionados

para la comunidad, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus niger* no fueron identificados en la genoteca pero sí en la fracción cultivable, en la cual, fueron de los géneros fúngicos con más representantes, y de los más habituales en los pasos de aislamiento desde la muestra de suelo. Sin embargo resulta extraño que no hayan sido identificados en la genoteca, ya que es sabido que los hongos de estos géneros poseen amplia distribución cosmopolita y representan unos de los hongos más comúnmente aislados (Accensi y col. 1999; Crouss y col. 2007).

Se ha descrito que en suelos del tipo semiárido, la mayoría de la diversidad fúngica pertenece a la división Ascomycota. Órdenes como Pleosporales, Hypocreales, Pezizales y Dothiedales, son muy comunes en estos suelos. Los géneros más comunes dentro de los Pleosporales son *Alternaria*, *Bipolaris*, *Phaesophaeria*, *Leptosphaeria*, *Preussia* y *Phoma* (Porras-Alfaro y col. 2011). Estos datos se correlacionan con los obtenidos en la fracción cultivable y con los de la genoteca. Por otra parte, también se ha descrito que en estos suelos semiáridos, también existen varios hongos saprótrofos, y dentro de los principales géneros se encontraron a *Cladosporium* y *Aspergillus*, entre otros (States & Christensen 2001). De este modo, se ve que los hongos seleccionados para la construcción de la comunidad, son representantes válidos para su elaboración.

4.3. Comunidad experimental y detección de sus componentes

Las comunidades microbianas experimentales han representado modelos novedosos que permiten abordar distintas temáticas de la Ecología Microbiana. La principal ventaja de estos ensambles es permitir reducir la complejidad asociada a los sistemas naturales y aportar como una nueva herramienta al conjunto de

aproximaciones clásicas utilizadas en la Ecología Microbiana. Por otra parte, para el manejo de las comunidades experimentales, es importante contar con metodologías que permitan abordar estos sistemas, y que logren identificar a los componentes constituyentes o que permitan monitorear cambios a niveles comunitarios. Para ese objetivo, técnicas moleculares como el T-RFLP y otras metabólicas como el test “FF MicroPlate” han sido utilizadas para el estudio de comunidades fúngicas (Verbruggen y col. 2012; Albrecht y col. 2010).

Los datos obtenidos en este trabajo con la técnica del T-RFLP permiten estudiar la composición de una comunidad fúngica experimental, y reconocer a sus componentes. El poder contar con los perfiles individuales de cada hongo es importante al momento de montar una comunidad experimental, ya que facilita el reconocimiento de sus componentes y permite identificar los fragmentos esperados, de aquellos falsos, que representan un ruido en el análisis. La técnica del T-RFLP, además, permite conocer la abundancia en la que se encuentra cada componente de la comunidad en el tiempo (Liu y col. 1997). El microcosmos, que consistió en una matriz de lana de roca suplementado con nutrientes, fue incubado durante 72 h hasta el momento del análisis. Sin embargo, fue llamativo el hecho de que la abundancia de la muestra MR-1 (*Aspergillus niger*) alcanzara un valor de abundancia tan alto en un periodo corto de tiempo, en comparación al resto de los hongos de la comunidad. Además, cuando se realizó el T-RFLP a los hongos individualmente, los valores de fluorescencia obtenidos para los T-RFs esperados fueron similares. Esto podría indicar que el crecimiento de *A. niger* se ve favorecido cuando crece en comunidad con el resto de los hongos seleccionados. Por otra parte, la alta fluorescencia obtenida para este hongo podría ser explicada por un aspecto metodológico del T-RFLP. Como la

extracción de DNA se realizó a partir de una re-suspensión del contenido del microcosmos, existe la posibilidad de que una fracción de la cantidad total de los hongos de la comunidad, permanezca adherida a la lana de roca. De este modo, la abundancia real de cada muestra no estaría realmente representada al momento de realizar el T-RFLP. Por otra parte, se ha reportado que la capacidad del T-RFLP para representar la abundancia de cada componente de una comunidad no sería tan precisa debido a los sesgos involucrados en el proceso de extracción de DNA y asociados a la reacción de PCR, el cual se ve directamente influenciado cuando se amplifica una mezcla de organismos (Dickie & Fitz 2007). Estos antecedentes deben ser tomados en cuenta al momento de diseñar y montar una comunidad experimental, pudiendo utilizar el T-RFLP como una técnica de análisis de estructura comparativo entre diferentes tratamientos, pero utilizando una herramienta más precisa, como el PCR en tiempo real, para cuantificar las abundancias de los miembros de la comunidad.

En cuanto al análisis metabólico de la comunidad, se puede observar que el comportamiento fisiológico de los hongos constituyentes de ésta, es diferente al de los aislados creciendo en forma individual. Esto queda reflejado en los datos de absorbancia obtenidos del test metabólico, donde se comparó el perfil de la comunidad experimental con el de la suma de los mismos hongos de ésta creciendo de forma individual. De las 95 fuentes de carbono del test, 35 no lograron ser metabolizadas por la comunidad teórica, pero sí por la comunidad experimental. Esto indica que los hongos creciendo en la comunidad experimental, son capaces de establecer interacciones que les permiten metabolizar compuestos del test, que no pueden consumir si crecen de forma individual. Además de las fuentes de carbono que eran consumidas en ambas comunidades, en la mayoría de los casos ese consumo fue

mayor en la comunidad experimental, lo que indica que esta interacción también estaría aumentando la tasa de consumo de las fuentes de carbono, posiblemente por un aumento en la afinidad por esa fuente. El hecho de que un hongo no sea capaz de metabolizar cierta fuente de carbono, pero que si pueda hacerlo al crecer en comunidad, da cuenta de posibles interacciones que estos organismos pueden tener al crecer juntos. Entre estas interacciones el sinergismo, también conocido como sintrofia, es una relación no obligatoria que se da entre poblaciones microbianas, en la cual ambas se ven beneficiadas, ya que les permite realizar actividades metabólicas como la síntesis o el consumo de cierto producto, que no podrían llevar a cabo por separado. De este modo, la sintrofia le permite a una población microbiana concluir una vía metabólica que de otra manera no se completaría (Atlas & Bartha 2001). Uno de los ejemplos clásicos de sintrofia fue descrito en las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Ninguno de los dos organismos por separado puede convertir la arginina en putrescina. *E. faecalis* es capaz de transformar la arginina en ornitina, la cual puede ser usada por *E. coli* para producir la putrescina (Gale 1940). Además, se ha reportado que la sintrofia se basa muchas veces en la capacidad de una población de suministrar factores de crecimiento a otra, como en el caso de *Lactobacillus arabinosus* y *E. faecalis* (Nurmikko 1956). En otros casos esta relación se basa en la capacidad de una población de acelerar la tasa de crecimiento de otra, como por ejemplo algunas especies de *Pseudomonas*, que en presencia de otras poblaciones bacterianas es capaz de aumentar la afinidad por el orcinol. A la vez, las poblaciones secundarias, que no pueden usar el orcinol, se benefician de la mayor producción de compuestos orgánicos producidos y excretados por *Pseudomonas*, la que también se beneficia, ya que una gran cantidad de estos productos de excreción actúan en

retroalimentación negativa a la capacidad catabólica de esta bacteria (Slater 1978). Las relaciones sinérgicas también se han descrito bastante en hongos. Por ejemplo, dos hongos de suelo, *Penicillium piscarium* y *Geotrichum candidum*, pueden degradar y detoxificar sinérgicamente el herbicida agrícola propanil. *P. piscarium* es capaz de descomponer el propanil en ácido propiónico y 3,4-dicloroanilina. A la vez, utiliza el ácido propiónico como fuente de carbono y energía, pero no puede procesar el 3,4-dicloroanilina que es un compuesto tóxico. Sin embargo *G. candidum*, aunque no puede descomponer el propanil, detoxifica el 3,4-dicloroanilina a otros productos menos tóxicos, que permiten en presencia de fuentes de carbono adicionales, aumentar la tasa de crecimiento de las dos poblaciones de hongos (Bordelau & Bartha 1971). Esta relación sinérgica también se puede dar entre diferentes dominios, como en el caso de hongos y bacterias, la cual permite por ejemplo la degradación de contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Kim & Lee 2007).

Algunas investigaciones que han utilizado las comunidades microbianas experimentales como modelo han sido un gran aporte a la teoría ecológica, como por ejemplo los clásicos estudios con paramecios de Gause (1934), que permitieron generar modelos predictivos depredador-presa; o los experimentos con diatomeas de Tilman (1977), que permitieron generar modelos de competencia relacionados con la dinámica de recursos de la comunidad. A la vez, estos sistemas han sido de gran ayuda en estudios más aplicados, como por ejemplo los relacionados al biocontrol de patógenos fúngicos (Elad y col. 1980), además de ensayos preliminares relacionados a bioprocesos microbianos de interés en biorreactores (Papavizas y col. 1984). De este modo las comunidades microbianas experimentales representan una herramienta de gran utilidad en diversas áreas de la microbiología.

5. CONCLUSIONES

La caracterización morfológica complementada con la molecular, en especial del marcador ITS, permitió la identificación de 36 aislados fúngicos del suelo semiárido, los que se agruparon mayoritariamente en la división Ascomycota, la familia Trichocomaceae y el género *Penicillium*.

El análisis de la fracción cultivable del suelo semiárido permitió identificar algunos géneros fúngicos que no fueron detectados en la caracterización molecular independiente de cultivo, lo que da cuenta de que ambos enfoques son complementarios para describir la diversidad fúngica de estos suelos.

La técnica del T-RFLP permitió detectar todos los componentes de la comunidad experimental, sin embargo la determinación de la abundancia de cada uno de los constituyentes debe interpretarse cuidadosamente debido a los sesgos inherentes a la metodología utilizada.

La mayor versatilidad metabólica de la comunidad experimental comparada con el potencial metabólico esperable a partir de sus componentes fúngicos por separado, sería consecuencia de interacciones positivas que favorecen el consumo de distintas fuentes de carbono.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Accensi., Cano J., Figuera L., Abarca M., Cabañes F. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. FEMS Microbiology Letters 180: 191-196.
- Albrecht R., Périssol C., Ruaudel F., Le Petit J., Terrom G. (2010). Functional changes in culturable microbial communities during a co-composting process: Carbon source utilization and co-metabolism. Waste Management 30: 764-770.
- Anderson I., Cairney J. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental Microbiology 6: 769-779.
- Atkins S., Clark I. (2004). Fungal molecular diagnostic: a mini review. Journal of Applied Genetics 45: 3-15.
- Atlas R., Bartha R. (2001). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid.
- Bardgett R., Freeman C., Ostle N. (2008). Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. The International Society for Microbial Ecology Journal 2: 805-814.
- Begerow D., Nilsson H., Unterseher M., Maier W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Applied Microbiology and Biotechnology 87: 99-108.
- Berbee M., Taylor W. (1992). Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. Molecular Biology and Evolution 9: 278-284.
- Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. American Journal of Botany 98: 426-438.
- Bonnet R., Suau A., Doré J., Gibson G., Collins M. (2002). Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 757-763.
- Bordelau M., Bartha R. (1971). Ecology of a pesticide transformation: Synergism of two soil fungi. Soil Biology and Biochemistry 3: 281-284.
- Burnett J. (2003). Fungal populations and species. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Buyer J., Roberts D., Millner P., Russek-Cohen E. (2001). Analysis of fungal communities by sole carbon source profiles. Journal of Microbiological Methods 45: 53-60.

- Carpenter S. (1996) Microcosm experiments have limited relevance for community ecosystem ecology. *Ecology* 77: 677-680.
- Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Capítulo 4. Editado por Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina.
- Castañeda R. (2001). Parámetros empleados para la identificación de los hongos conidiales. Pasado y presente en la taxonomía de los Hifomicetes. *Revista de protección vegetal* 16: 92-101.
- Collins S., Sinsabaugh R., Crenshaw C., Green L., Porrás-Alfaro A., Stursova M., Zeglin L. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology* 96: 413-420.
- Cross P., Braun U., Schubert K., & Groenewald J. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33-56.
- Currah R. (2005). Profiles from Biolog FF plates and morphological characteristics support the recognition of *Oidiodendrum fimicola* sp. *Studies in Mycology* 53: 75-82.
- Deacon J. W. (2006). *Fungal Biology*. 4th edition Blackwell Sci. Publication. Oxford. Inglaterra.
- Dickie I., FitzJohn G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza* 17:259-270.
- Dobranic J., Zak J. (1999). A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Microbiology Ecology* 42: 1-14.
- Donachie S., Foster J., Brown M. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 1: 97-99.
- Elad Y., Chet I., Katan J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121.
- Farías F. (2011). Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad fúngica de suelos áridos. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Gajardo, R. (1994). *La Vegetación Natural de Chile. Clasificación y Distribución Geográfica*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Gaur R., Singh R., Gupta M., Gaur M. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology* 9: 7989-7997.
- Gale E. (1940). The production of amines by bacteria. III. The production of putrescine from arginine by *Bacterium coli* in symbiosis with *Streptococcus faecalis*. *Journal of Biochemistry* 34: 853-857.
- Gardes M., Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

- Gause G. (1934). *The Struggle for Existence*. Dover, New York, NY.
- Govindarajulu M., Pfeffer P., Jin H., Abubaker J., Douds D., Allen J., Bücking H., Lammers P. Shachar-Hill (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823.
- Green L., Porras-Alfaro A., Sinsabaugh R. (2008). Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *Journal of Ecology* 96: 1076-1085.
- Gregory R., Nicol J., Tamm H., Kullman B., Kullman K., Leitch I., Murray B., Kapraun D., Greilhuber J., Bennett M. (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research* 37: D332-D338.
- Guarro J., Gené J., Stchigel A. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiological Review* 3: 454-500.
- Guarro. J (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 30: 33-39.
- Harrison M., Van Buuren M. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*. 378: 626-629.
- Hawksworth D. (2012). Integrating morphological and molecular data in fungal systematics. En: *Systematics and evolution of fungi* (Misra J., Tewari J., Deshmukh S.). Science Publishers. USA.
- Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Hill D., Dixon M. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Jessup C., Forde S., Bohannan B. (2005). Microbial experimental systems in Ecology. *Advances in Ecological Research* 37: 273-300.
- Jessup C., Kassen R., Forde S., Kerr B., Buckling A., Rainey P., Bohannan J. (2004). Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 189-197.
- Kauff F., Lutzoni F. (2002). Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 138-156.
- Kim J., Lee C. (2007). Microbial degradation of polycyclic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12: 410-416.
- Kubicek C., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G (2002). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian. *Fungal Genetics and Biology* 38: 310-319.

- Kües U., Fischer R. (2006). *The Mycota vol.1: Growth, Differentiation and Sexuality*. 2nd edition. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Lawton J.H. (1995). Ecological experiments with model systems. *Science* 269: 328-331.
- Liu W., Marsh T., Cheng H., Fomey L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Luangsa-ard J., Jos Houbraken J., van Doorn T., Hong S., Borman A., Hywel-Jones N., Samson R. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 131: 141-149.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox S., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R., Hosaka K, Lim Y., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446-1480.
- Marinach-Patrice C., Lethuillier A., Marly A., Brossas J., Gené J., Symoens F., Datry A., Guarro J., Mazier D., Hennequin C. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 634-642.
- Mattheis J., Roberts R. (1992). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3170-3172.
- McLaughlin D., Hibbett D., Lutzoni F., Spatafora J., Vilgalys R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 17: 488-497.
- McNeill J., Barrie F, Burdet H., Demoulin V., Hawksworth D., Marhold K., Nicolson D., Prado J., Silva P., Skog J., Wiersema J., Turland N. (2006). *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code)*. *Regnum Vegetabile* 146. A.R.G. Gantner Verlag KG.
- Moore, D. (1998). *Fungal morphogenesis*. Cambridge, University Press. Cambridge. Inglaterra.
- Ninet B., Jan I., Bontems O., Léchenne B., Jousson., Panizzon R., Monod M. (2003). Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 826-830.
- Nurmikko V. (1956). Biochemical factors affecting symbiosis among bacteria. *Experientia* 12. 245-249.
- Olsen G. J.; Lane D. J.; Giovannoni S. J.; Pace N. R. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* 40: 337-365.

- Papavizas G., Dunn M., Lewis J., Beagle-Ristaino J. (1984). Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74: 1171-1175.
- Pedro's-Alió C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14: 257-263.
- Pemán J., Martín-Mazuelos E., Rubio M. (2007). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Segunda edición. Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao, España.
- Piontelli-Laforet, E. (2011). Manual de microhongos filamentosos comunes I. Editado por El autor. Valparaíso, Chile.
- Porras-Alfaro A., Herrera J., Natvig D., Lipinski K., Sinsabaugh R. (2011). Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 103: 10-21.
- Prakash O., Shouche Y., Jangid K., Kostka J. (2013). Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 97: 51-62.
- Preston J., Boddy L., Randerson (2002). Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *Microbiology Ecology* 42: 1-14.
- Riddell R. W. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265-270.
- Savada D., Heller H., Orians H. (2008). *Life: The science of biology*. 8th edition. Chapter 30. Sinauer associates. Sunderland, USA.
- Schoch C., Seifert K., Huhndorf S., Robert V., Spouge J., Levesque C., Chen W. 2002. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 6241-6246.
- Schubler A., Schwarzott D., Walker C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Seifert K. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9: 83-89.
- Seifert K., Samuels G. (2000) How should we look at anamorphs?. *Studies in Mycology* 45: 5-18.
- Schindel D., Miller S. (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435: 17.
- Shenoy B., Jeewon R., Hyde K. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26: 1-54.

- Singh M. (2009). Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *Journal of Microbiological Methods* 77: 102-108.
- Singh P., Raghukumar C., Meena R., Verma P., Shouche Y. (2012). Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology* 5: 548-553.
- Slater J. (1978). Microbial communities in the natural environment, en: *The oil industry and microbial ecosystems* (Charter K. & Somerville H., eds.), pp. 136-154, Heyden and son Ltd., Londres.
- Slepecky R., Starmer W. (2009). Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 6: 823-832.
- Smit E.; Leeflang P.; Glandorf B.; Van Elsas J. D.; Wernars K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614-2621.
- Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter R. (1992). *Microbiología*. Segunda edición. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- States J., Christensen M. (2001). Fungi associated with biological soil crusts in desert grasslands of Utah and Wyoming. *Mycologia* 93: 432-439.
- Tilman D. (1977). Resource competition between planktonic algae: Experimental and Theoretical Approach. *Ecology* 58: 338-348.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Unda F., Agüero J., Fariñas M., Martínez L. (2011). Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 29: 282-285.
- Verbruggen E., Van Der Heijden M., Weedon J., Kowalchuk G., Röhling W. (2012). Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology* 21: 2341-2353.
- Ward D., Weller R., Bateson M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345: 63-65.
- Woese C, Fox G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5088-5090.
- Zimmerman G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 553-596.

ANEXO

Tabla A1. Composición del medio Vogel.

Compuesto	Concentración (mg/ml)	Compuesto	Concentración (mg/ml)
Citrato de sodio pentahidratado	150	Acido bórico	0,00015
Fosfato monopotásico	250	Sulfato de cobre pentahidratado	0,00098
Nitrato de amonio	100	Yoduro de potasio	0,00003
Sulfato de magnesio heptahidratado	10	Molibdato de amonio	0,00008
Cloruro de calcio dihidratado	5	Sulfato de zinc monohidratado	0,01370
Biotina	0,00003	Cloruro férrico hexahidratado	0,00230
		Sulfato de manganeso monohidratado	0,00015

Tabla A2. Velocidad de crecimiento radial de los aislados en medio PDA a 24°C.

Aislado	Velocidad de crecimiento radial (mm/día)	Aislado	Velocidad de crecimiento radial (mm/día)
MR-1	2,3	MR-19	0,6
MR-2	1,2	MR-20	0,5
MR-3	1,6	MR-21	1,0
MR-4	2,4	MR-22	1,3
MR-5	0,9	MR-23	2,7
MR-6	2,4	MR-24	0,3
MR-7	2,9	MR-25	4,7
MR-8	2,8	MR-26	0,9
MR-9	7,6	MR-27	0,6
MR-10	1,3	MR-28	1,3
MR-11	1,8	MR-29	1,3
MR-12	1,0	MR-30	3,2
MR-13	0,7	MR-31	0,7
MR-14	1,9	MR-32	12,2
MR-15	1,8	MR-33	6,1
MR-16	0,9	MR-34	0,6
MR-17	0,9	MR-35	1,6
MR-18	0,9	MR-36	2,8

Tabla A3. Resultados del BLAST de las secuencias del marcador rDNA 28S.

Aislado	Género o Especie	Familia	Orden	Cob.	Id.
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	97
MR-3	<i>Aspergillus sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	97	95
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales	99	93
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales	99	99
MR-7	<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	99	99
MR-8	<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	99	99
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	Trichocomaceae	Dothideales	97	95
MR-11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	99	98
MR-12	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	99	96
MR-13	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	95	94
MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	97
MR-15	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	98	98
MR-16	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	97
MR-17	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	95
MR-18	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	98
MR-19	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	99
MR-20	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	98
MR-21	<i>Beauveria bassiana</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	100	99
MR-22	<i>Beauveria sp.</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	99	97
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	100	98
MR-26	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	99
MR-27	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	95	97
MR-28	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	99	99
MR-29	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	99	99
MR-30	<i>Coniothyrium sp.</i>	Leptosphaeriaceae	Pleosporales	99	99
MR-31	<i>Phoma sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	100	98
MR-34	<i>Preussia sp.</i>	Sporormiaceae	Pleosporales	85	99
MR-35	<i>Phoma sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	99	99
MR-36	<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	97	97

Tabla A4. Resultados del BLAST de las secuencias del marcador rDNA 18S.

Aislado	Género o Especie	Familia	Orden	Cob.	Id.
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	100	98
MR-3	<i>Aspergillus wentii</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	95
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales	83	97
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales	83	95
MR-6	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	79	98
MR-7	<i>Ulocladium sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	68	97
MR-8	<i>Ulocladium sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	95	98
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	Trichocomaceae	Dothideales	80	97
MR-11		Davidiellaceae	Capnodiales	72	86
MR-12	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	99	98
MR-13	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	71	98
MR-14	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	69	98
MR-15	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	46	97
MR-16	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	71	98
MR-17	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	98	97
MR-18	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	77	99
MR-19	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	68	97
MR-20	<i>Penicillium sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	100
MR-21	<i>Beauveria brogniartii</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	100	99
MR-22	<i>Beauveria bassiana</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	99	99
MR-23	<i>Mortierella alpina</i>	Mortierellaceae	Mucorales	100	99
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	100	99
MR-26	<i>Coniochaeta velutina</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	99
MR-27	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	99
MR-28	<i>Coniochaeta velutina</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	99	99
MR-29	<i>Coniochaeta velutina</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	99
MR-30	<i>Coniothyrium</i>	Leptosphaeriaceae	Pleosporales	100	99
MR-31	<i>Phoma sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	100	99
MR-32	<i>Phanerochaete sp.</i>	Phanerochaetaceae	Polyporales	100	99
MR-33	<i>Trametes sp.</i>	Polyporaceae	Polyporales	72	86
MR-34	<i>Preussia lignicola</i>	Sporormiaceae	Pleosporales	99	96
MR-35	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	Phaeosphaeriaceae	Pleosporales	99	99
MR-36	<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	80	91

Tabla A5. Resultados del BLAST del marcador molecular ITS.

Aislado	Género o Especie	Familia	Orden	Cob.	Id.
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	99
MR-2	<i>Aspergillus versicolor</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	99
MR-3	<i>Aspergillus wentii</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	98	92
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales	99	99
MR-6	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Ophiocordycipitaceae	Hypocreales	99	99
MR-7	<i>Ulocladium sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	99	99
MR-8	<i>Ulocladium sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	98	96
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	Trichocomaceae	Dothideales	100	99
MR-10	<i>Davidiella tassiana</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	100	100
MR-11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	42	90
MR-12	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	78	92
MR-13	<i>Penicillium canescens</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	87	96
MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	100
MR-15	<i>Penicillium expansum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	100	99
MR-16	<i>Penicillium polonicum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	99
MR-17	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	100	99
MR-18	<i>Penicillium canescens</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	61	80
MR-20	<i>Penicillium canescens</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	99	98
MR-21	<i>Beauveria bassiana</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	98	94
MR-22	<i>Beauveria bassiana</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	100	98
MR-23	<i>Mortierella alpina</i>	Mortierellaceae	Mucorales	100	98
MR-24	<i>Absidia sp.</i>	Mucoraceae	Mucorales	98	87
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	66	99
MR-26	<i>Lecythophora sp</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	99
MR-27	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	100	96
MR-28	<i>Lecythophora sp</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	99	96
MR-29	<i>Lecythophora sp</i>	Coniochaetaceae	Sordariales	99	99
MR-30	<i>Paraconiothyrium sp</i>	Montagnulaceae	Pleosporales	45	86
MR-32	<i>Phanerochaete sordida</i>	Phanerochaetaceae	Polyporales	100	99
MR-33	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Polyporales	99	99
MR-34	<i>Preussia sp.</i>	Sporormiaceae	Pleosporales	99	99
MR-35	<i>Stagonospora sp.</i>	Phaeosphaeriaceae	Pleosporales	99	99
MR-36	<i>Embellisia sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	99	98

Tabla A6. Resumen de la identificación de los aislados según las diferentes aproximaciones utilizadas.

Aislado	Morfología	rDNA 28S	rDNA 18S	ITS	Identificación más probable
MR-1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
MR-2	<i>Aspergillus sp.</i>	NI	NI	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
MR-3	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus wentii</i>
MR-4	<i>Aureobasidium pullulans var. pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans var. pullulans</i>
MR-5	<i>Aureobasidium pullulans var. melanogenum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	NI	<i>Aureobasidium pullulans var. melanogenum</i>
MR-6	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	NI	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
MR-7	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
MR-8	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
MR-9	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
MR-10	<i>Cladosporium sp.</i>	NI	NI	<i>Davidiella tassiana</i>	<i>Davidiella tassiana</i>
MR-11	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	NI	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
MR-12	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium bruhnei</i>	<i>Cladosporium bruhnei</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium bruhnei</i>
MR-13	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium canescens</i>
MR-14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
MR-15	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium expansum</i>
MR-16	<i>Penicillium polonicum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
MR-17	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	<i>Penicillium sp.</i>
MR-18	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium sp.</i>
MR-19	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	NI	<i>Penicillium sp.</i>
MR-20	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium sp.</i>
MR-21	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria brogniartii</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-22	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
MR-23	<i>Mortierella sp.</i>	NI	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i>
MR-24	<i>Absidia sp.</i>	NI	NI	<i>Absidia sp.</i>	<i>Absidia sp.</i>
MR-25	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces flavus</i>
MR-26	NI	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecytophora sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>

Continuación Tabla A6

MR-27	NI	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>
MR-28	<i>Lecythophora sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecythophora sp.</i>	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-29	<i>Lecythophora sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Lecythophora sp.</i>	<i>Lecythophora sp.</i>
MR-30	<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Paraconiothyrium sp.</i>	<i>Coniothyrium sp.</i>
MR-31	<i>Phoma sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>	NI	<i>Phoma sp.</i>
MR-32	NI	NI	<i>Phanerochaete sp.</i>	<i>Phanerochaete sordida</i>	<i>Phanerochaete sp.</i>
MR-33	NI	NI	<i>Trametes sp.</i>	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
MR-34	NI	<i>Preussia sp.</i>	<i>Preussia lignicola</i>	<i>Preussia sp.</i>	<i>Preussia sp.</i>
MR-35	NI	<i>Phoma sp.</i>	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	<i>Stagonospora sp.</i>	<i>Stagonospora sp.</i>
MR-36	NI	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Embellisia sp.</i>	<i>Embellisia sp.</i>

Tabla A7. Distribución en los diferentes niveles taxonómicos de los aislados fúngicos identificados mediante las diferentes aproximaciones utilizadas.

	Morfología	rDNA 28S	rDNA 18S	ITS	Identificación final
División	2	1	3	3	3
Clase	4	3	5	5	5
Orden	7	6	8	8	8
Familia	10	8	12	15	15
Género	14	12	17	20	21