
Identificación y planteamiento de la formulación de biofertilizantes de cepas fúngicas aisladas en suelos de monocultivo de *Saccharum officinarum*

Silvia Paola Vela Torres



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Identificación y planteamiento de la formulación de
biofertilizantes de cepas fúngicas aisladas en suelos
de monocultivo de *Saccharum officinarum***

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Silvia Paola Vela Torres para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala, 5 de diciembre del 2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Identificación y planteamiento de la formulación de
biofertilizantes de cepas fúngicas aisladas en suelos
de monocultivo de *Saccharum officinarum***

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Silvia Paola Vela Torres para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala, 5 de diciembre del 2023

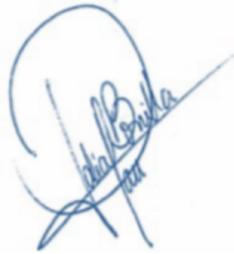
Vo.Bo.:



(f)

PhD. Dalia Lau

Tribunal examinador:



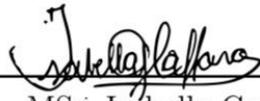
(f)

PhD. Dalia Lau



(f)

PhD. Patrizia Lupo



(f)

MSc. Isabella García

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2023.

Prefacio

Agradezco a las personas e instituciones que estuvieron presentes en la realización de este trabajo de graduación, así como durante toda mi carrera profesional; especialmente:

A Dios y a la Santísima Virgen, por darme la vida y llenarme de sabiduría, inteligencia, salud y entendimiento para poder culminar esta etapa de mi vida.

A mi madre, Silvia Torres, por ser mi mayor inspiración. Tu amor incondicional y sacrificio han sido la luz que ha guiado mi vida. Gracias por tu paciencia infinita, tus palabras de aliento y tu inquebrantable apoyo en cada paso de mi camino. Eres la razón por la que soy quien soy. Tu amor es el regalo más preciado que he recibido, y estoy eternamente agradecida por ello.

A la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por creer en mi potencial y brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. Su apoyo ha sido un factor determinante en mi trayectoria, permitiéndome perseguir mis sueños y contribuir al logro de mis objetivos.

A mi novio, Fernando Caceros, por ser mi apoyo incondicional, mi compañero de risas y lágrimas. Tu amor y paciencia han sido mi refugio en los momentos difíciles y mi compañía en los días felices.

A la doctora Dalia Lau-Bonilla, mi asesora, por su dedicación, conocimiento y orientación, que han sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional. Su pasión por la investigación han sido fuentes de inspiración. Agradezco sinceramente su guía experta, paciencia, apoyo constante y ser una mentora excepcional.

A Msc. Isabella García por su apreciable apoyo, consejos y sugerencias durante el proceso de realización de la metodología que hizo posible la culminación exitosa de este trabajo de graduación. Su experiencia y orientación fueron fundamentales para el desarrollo de un enfoque metodológico sólido y eficaz.

A la Dra. Patrizia Lupo por su invaluable contribución a este proyecto. Su dedicado seguimiento y experto asesoramiento han sido fundamentales para el éxito de este trabajo.

A los financistas, su generosa contribución financiera ha sido fundamental para llevar a cabo esta investigación y alcanzar los objetivos propuestos. Agradezco al Ingenio Magdalena, al Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) y al Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) por proporcionar el espacio físico y equipo e instrumentos de investigación que facilitaron el proceso de investigación.

A mis queridos amigos y compañeros de estudio. Durante nuestro tiempo juntos, su apoyo, colaboración y amistad han sido fundamentales para mi experiencia académica. La carrera fue un

viaje emocionante gracias a cada uno de ustedes.

A la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), mi casa de estudios, por su compromiso inquebrantable con la excelencia académica y el desarrollo integral de sus estudiantes. Gracias por darme las herramientas para ser una profesional ejemplar.

Prefacio	IV
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
1. Introducción	1
2. Definición del problema	3
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
4. Justificación	5
5. Marco contextual	7
6. Marco teórico	8
6.1. Agricultura	8
6.1.1. Agricultura en Guatemala	8
6.1.2. Suelos de Guatemala	9
6.1.3. Monocultivo	9
6.1.4. Fertilidad del suelo	9
6.1.5. Ecología del suelo	10
6.1.6. Rol de los hongos en la ecología del suelo	10
6.2. Fertilizantes	11
6.2.1. Fertilizantes inorgánicos	11
6.2.2. Biofertilizantes	13
6.3. Identificación molecular de hongos	14
6.3.1. Métodos de identificación molecular de hongos para desarrollo de biofertilizantes	15
6.3.2. Reacción en cadena de polimerasa	15
6.3.3. Secuenciación	15

6.4. Desafíos y oportunidades de los enfoques moleculares para la identificación de hongos	16
6.5. Análisis de antagonismo fúngico	16
6.5.1. Mecanismo de acción	17
7. Metodología	18
7.1. Hipótesis	18
7.1.1. Hipótesis de investigación	18
7.1.2. Hipótesis nula	18
7.2. Variables	18
7.3. Diseño experimental	19
7.4. Población y muestra	19
7.4.1. Población	19
7.4.2. Muestra	19
7.5. Recolección de datos y análisis experimental	19
7.5.1. Resiembra de hongos	19
7.5.2. Extracción de ADN de hongos	19
7.5.3. Amplificación del gen ITS	19
7.5.4. Secuenciación del gen ITS	19
7.5.5. Análisis genómico del gen ITS	20
7.5.6. Solución de esporas	20
7.5.7. Antagonismo entre hongos	20
8. Resultados	22
8.1. Identificación de ADN genómico de las cepas fúngicas	22
8.2. Pruebas de antagonismo fúngico	27
8.3. Propuestas de biofertilizante	28
9. Análisis de resultados	32
10. Conclusiones	37
11. Recomendaciones	38
12. Referencias	39
Referencias	39
13. Anexos	50
Anexo A. Identificación de cepas	50
Anexo B. Antagonismo	55
Anexo C. Protocolos	59

Lista de figuras

Figura 1. Amplificación de fragmentos específicos de ITS con ADN genómico de 45 cepas fúngicas.	26
Figura 2. Abundancia de especies en las 45 cepas tomadas de distintas fincas del Ingenio Magdalena. Información adicional sobre especies individuales se encuentra en el Anexo A.	26
Figura 3. Matriz de resultados del antagonismo de las 14 cepas de hongos.	29
Figura 4. Ficha de identificación y características de la cepa perteneciente a la especie <i>Bjerkandera adusta</i>	50
Figura 5. Ficha de identificación y características de la cepa perteneciente a la especie <i>Cladosporium asperulatum</i>	51
Figura 6. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Cladosporium cladosporioides</i>	51
Figura 7. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	52
Figura 8. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Neopyrenochaeta chiangraiensis</i>	52
Figura 9. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	52
Figura 10. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Penicillium pimiteouiense</i>	53
Figura 11. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Pleosporales sp.</i>	53
Figura 12. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	54
Figura 13. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	54
Figura 14. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Setophaeosphaeria sidae</i>	55
Figura 15. Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie <i>Talaromyces funiculosus</i>	55
Figura 16. Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado negativo.	56
Figura 17. Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado negativo.	57
Figura 18. Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado positivo.	58

Lista de tablas

Tabla 1.	Composición de la comunidad fúngica en diferentes ecosistemas del suelo y su función.	11
Tabla 2.	Algunos hongos utilizados como biofertilizantes y su modo de acción.	14
Tabla 3.	VARIABLES DE INVESTIGACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN.	18
Tabla 4.	Receta de master mix de la preparación de PCR para amplificar la región ITS.	20
Tabla 5.	Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS.	20
Tabla 6.	Cepas elegidas para realizar la matriz de antagonismo.	21
Tabla 7.	Cuantificación de ADN genómico de las 45 cepas de hongos del estudio.	22
Tabla 8.	Cuantificación de productos de PCR de la región ITS de las 45 cepas de hongos del estudio.	23
Tabla 9.	Identificación molecular de 45 cepas fúngicas con base a secuenciación de la región ITS amplificada en el ADN genómico.	24
Tabla 10.	Selección de 14 cepas candidatas para la prueba de antagonismo tomando en cuenta la especie y actividades de interés.	27
Tabla 11.	Clasificación de cepas según prueba de antagonismo.	28
Tabla 12.	Propuestas de formulación para biofertilizantes.	28
Tabla 13.	Propuesta de formulación 1 con las habilidades de cada cepa.	30
Tabla 14.	Propuesta de formulación 2 con las habilidades de cada cepa.	30
Tabla 15.	Propuesta de formulación 3 con las habilidades de cada cepa.	30

El 86 % del azúcar a nivel mundial proviene de prácticas agrícolas de monocultivo de la caña de azúcar (FAO, 2019). El azúcar es considerado como un producto de alta importancia económica, debido a que, Guatemala, en los últimos 6 años, ha exportado al mundo más de 14 millones de toneladas métricas de azúcar, ubicándola como el tercer país exportador de azúcar de América Latina y el sexto país a nivel mundial (ISO, 2022). Por otra parte, el uso de agroquímicos también tiene un impacto negativo en la microbiota del suelo y afecta la salud de los cultivos. El uso de este tipo de pesticidas sintéticos ha favorecido el aumento de la productividad de los cultivos y la protección contra plagas herbívoras y fitopatógenas (Udeigwe et al., 2015).

Sin embargo, el uso continuo de agroquímicos ha causado un incremento en problemas, tales como: el deterioro de la salud del suelo, el aumento de la resistencia a los plaguicidas, la creación de fitopatógenos resistentes a los medicamentos, el aumento de riesgos para la salud humana y la destrucción de la flora y la fauna del entorno (Bhushan y Pathma, 2021). De seguir la tendencia del uso de agroquímicos, causará otros problemas asociados con la bioacumulación, biomagnificación, la contaminación ambiental y el cambio climático. Por lo tanto, representan una amenaza grave y alarmante para la vida y la sostenibilidad en la superficie terrestre (Jänsch, Amorim, y Römcke, 2005).

Las serias consecuencias del uso excesivo de este tipo de sustancias hacen necesario determinar nuevas estrategias para abordar el problema de plagas, sin causar efectos negativos en el ecosistema (Devi y Kumar, 2020). Es necesario optimizar los métodos para que sean efectivos para cualquier cultivo, asimismo, mejorar la salud del suelo. El uso de métodos, como biofertilizantes, mejorará la productividad de los cultivos, sin comprometer la salud ambiental. El uso de biopesticidas, la biorremediación de suelos y tierras contaminadas con plaguicidas y la utilización de microorganismos asociados a plantas, son algunas de las estrategias alternativas exitosas al uso de plaguicidas aplicadas hasta la fecha (Bhandari, 2014).

Es por ello que, en este trabajo se pretendió identificar y analizar las cepas de hongos de interés capaces de mejorar la salud del suelo para su uso como biofertilizantes. Asimismo, se analizó el antagonismo fúngico de cepas aisladas de suelo mediante pruebas de antagonismo *in vitro*. Se identificaron 40 cepas a nivel especie, siendo *Setophaeosphaeria hemerocallidis* la más abundante en las fincas del Ingenio Magdalena. También se demostró que las cepas 2AB21, 4AP14, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO20 presentaron una mayor actividad antagonista.

Palabras clave: *antagonismo, caña de azúcar, biofertilizante, hongos, monocultivo*

The 86 % of the world's sugar comes from monoculture sugarcane farming practices (FAO, 2019). Sugar is considered a product of high economic importance, as Guatemala has exported over 14 million metric tons of sugar to the world in the last 6 years, making it the third largest sugar exporter in Latin America and the sixth largest globally (ISO, 2022). However, the use of agrochemicals also has a negative impact on soil microbiota and crop health. While synthetic pesticides have increased crop productivity and protected against herbivorous pests and phytopathogens, their continuous use has led to problems such as soil health deterioration, increased pesticide resistance, and risks to human health and the environment (Udeigwe et al., 2015)(Bhushan y Pathma, 2021).

Continued use of agrochemicals may lead to further problems associated with bioaccumulation, biomagnification, environmental pollution, and climate change, posing a serious threat to terrestrial life and sustainability (Jänsch et al., 2005). Addressing these issues requires the development of new strategies for pest management without causing negative effects on the ecosystem (Devi y Kumar, 2020). Optimizing methods to be effective for any crop and improving soil health is essential. Strategies such as biofertilizers, biopesticides, bioremediation of pesticide-contaminated soils, and the use of plant-associated microorganisms have shown promise as successful alternatives to traditional pesticide use (Bhandari, 2014).

This work aimed to identify and analyze strains of fungi capable of improving soil health for use as biofertilizers. Additionally, the fungal antagonism of soil-isolated strains was analyzed through *in vitro* antagonism tests. Forty species-level strains were identified, with *Setophaeosphaeria hemerocallidis* being the most abundant in the Magdalena Mill farms. It was also demonstrated that strains 2AB21, 4AP14, 3BP25, 1MO28, 1MO32, and 5MO20 exhibited higher antagonistic activity.

Keywords: *antagonism, sugar cane, biofertilizer, fungi, monoculture*

Los biofertilizantes fúngicos están compuestos por varias especies de hongos. Entre estos se incluyen los hongos que estimulan el crecimiento de las plantas, los hongos enzimáticos que producen compost, los hongos solubilizadores de fosfato y los hongos solubilizadores de potasio (Tak, Hamid Dar, y Bhat, 2021). Estos hongos pueden contribuir la mejora de la salud del suelo al ayudar en la solubilización de nutrientes y ponerlos a disposición de las plantas (Frąc, Hannula, Belka, y Jędrzycka, 2018). Los hongos solubilizadores de fosfato, en particular, son cruciales para mejorar la disponibilidad de fosfato en el sistema suelo-planta, lo cual es beneficioso para los cultivos de caña de azúcar (Tian, Ge, Zhang, Deng, y Liu, 2021).

Los métodos genéticos han proporcionado herramientas valiosas para caracterizar hongos y comprender su papel como biofertilizantes. Permiten obtener información sobre su diversidad, abundancia e interacciones con el entorno del suelo circundante (Q. Liu et al., 2021). Las técnicas genéticas se pueden utilizar para seleccionar cepas que muestren características de interés, como mayor movilización de nutrientes, tolerancia a los factores ambientales estresantes y compatibilidad con diferentes especies de plantas (McGale y Sanders, 2022). Estos métodos incluyen técnicas como secuenciación de ADN, metagenómica y metatranscriptómica. Al comprender la composición genética y las capacidades metabólicas de las especies específicas que conforma la formulación de biofertilizantes, se pueden desarrollar estrategias específicas para optimizar su aplicación en el cultivo de caña de azúcar y mejorar la salud del suelo (S. Kumar, Sindhu, y Kumar, 2022).

Además, se han estudiado las características metabólicas de los hongos para comprender sus funciones como biofertilizantes. Los biofertilizantes fúngicos, incluidos los hongos micorrízicos arbusculares (AM) y las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), exhiben características beneficiosas como la solubilización de nutrientes, la colonización de raíces y la mejora del crecimiento de las plantas (Chen et al., 2023). Estos rasgos pueden atribuirse a actividades metabólicas específicas realizadas por los hongos (Malviya et al., 2020).

Los hongos desempeñan un papel vital en la salud del suelo y el crecimiento de las plantas a través de una variedad de actividades bioquímicas. Durante estas actividades, la solubilización del fósforo y el potasio es fundamental para que las plantas obtengan estos importantes nutrientes (Nath, Maurya, y Meena, 2017). La capacidad de los hongos para disolver estos elementos favorece significativamente el desarrollo de las plantas, especialmente en cultivos como la caña de azúcar, que requieren de una gran cantidad de fósforo para su óptimo crecimiento (Wahab et al., 2023). Además, según El-Gendi y otros (2022), las enzimas producidas por hongos, como proteasas, lipasas, glicosidasas y quitinasas, afectan directamente la utilización de nutrientes y la resistencia a las enfermedades de las plantas. Estas enzimas ayudan a descomponer compuestos orgánicos complejos en formas simples que las plantas pueden absorber, mejorando así la nutrición de las plantas y

fortaleciendo su sistema inmunológico contra los patógenos (El-Gendi et al., 2022). En conjunto, estos desarrollos resaltan el papel clave que desempeñan los hongos en la promoción del crecimiento y la salud de las plantas, lo que los convierte en una parte esencial de la permacultura y la producción de alimentos.

Definición del problema

En términos de sostenibilidad agrícola, así como de efectos ambientales y socioeconómicos, el monocultivo, la práctica de cultivar un solo cultivo en una región amplia, puede generar una serie de problemas y preocupaciones (Horrigan, Lawrence, y Walker, 2002). Muchas veces, los sistemas de monocultivo conducen a la erradicación de una variedad de especies nativas de plantas, animales y otros microorganismos (C. Liu, Kuchma, y Krutovsky, 2018). Como resultado, los ecosistemas pueden desequilibrarse y pueden perderse recursos invaluable. Para mantener el rendimiento de los cultivos, los sistemas de monocultivo con frecuencia dependen significativamente de fertilizantes, insecticidas y herbicidas sintéticos (FoodPrint, 2018). Esta dependencia puede tener un efecto adverso sobre el medio ambiente y elevar los costos de producción.

Los fertilizantes, si bien son cruciales para aumentar los niveles de nutrientes y aumentar los rendimientos agrícolas, pueden tener una serie de consecuencias para la calidad del suelo (Krasilnikov, Taboada, y Amanullah, 2022). La dependencia excesiva de los fertilizantes sintéticos puede interrumpir las comunidades microbianas dentro del suelo, alterar la dinámica de los nutrientes y disminuir el contenido de materia orgánica (Tripathi, Srivastava, Devi, y Bhadouria, 2019). Estos cambios pueden socavar la estructura del suelo, la capacidad de retención de agua y los procesos de ciclo de nutrientes y, en última instancia, poner en peligro la salud general y la resiliencia del suelo (Rai et al., 2023). Abordar este problema requiere que se integre el uso de alternativas que promuevan la conservación del suelo, el enriquecimiento de la materia orgánica y la mejora de la biodiversidad, asegurando así la productividad agrícola y salvaguardando la vitalidad duradera de nuestros recursos del suelo.

Debido a los problemas asociados con el uso de fertilizantes, es importante desarrollar nuevas estrategias para aumentar los rendimientos de las siembras sin comprometer la salud del suelo. Uno de los métodos introducidos es el uso de fertilizantes biológicos a base de hongos. En Guatemala, aunque ya se han implementado algunas especies de hongos como biofertilizantes (ASAZGUA, 2020), el uso de este tipo de fertilizantes no es común en el país, por lo que es necesario implementar proyectos de formulación de estos productos. Se propuso en 2020 el proyecto titulado "Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimiento de compostaje y manejo de microbiología de suelos". Este proyecto tiene como objetivo a largo plazo producir bacterias y hongos beneficiosos, para usarlos y sus bioproductos como biofertilizantes, bioinsecticidas, bioestimulantes u otras aplicaciones, cerrando así la brecha entre la investigación y la práctica agrícola en Guatemala.

3.1 Objetivo general

Analizar las 45 especies de hongos de interés capaces de mejorar la salud del suelo para su uso como biofertilizantes en el monocultivo de la caña de azúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas de hongos capaces de mejorar la salud del suelo y la producción del monocultivo utilizando datos obtenidos a partir de secuenciación para la región ITS.
- Analizar el antagonismo fúngico de cepas aisladas de suelo mediante pruebas de antagonismo *in vitro*.
- Sugerir una formulación de biofertilizante que asegure la viabilidad, estabilidad y compatibilidad de los hongos con otros insumos agrícolas.

Guatemala es un país agrícola y aproximadamente el 70 % del área total de la tierra está dedicada a la agricultura y la silvicultura. El sector agrícola es vital para la economía y el desarrollo del país. Según el World Bank, en 2022 la caña de azúcar representó el 9.3 % del producto interno bruto (PIB) y empleó el 29 % de la mano de obra nacional (World Bank, 2022). La agricultura depende de la fertilidad del suelo. El suelo fértil contiene una gran cantidad de nutrientes esenciales para las plantas, como nitrógeno, fósforo y potasio (van Es y Magdoff, 2009). Además, la sinergia entre la fertilidad y la salud general del suelo es crucial para la agricultura sostenible, la conservación del medio ambiente y el mantenimiento de ecosistemas saludables (Cárceles Rodríguez et al., 2022). Las prácticas agrícolas que dan prioridad tanto a la fertilidad como a la salud del suelo pueden conducir a mayores rendimientos de los cultivos, mayor resiliencia del suelo y reducción de los impactos ambientales negativos (Sonja, Johan, Gail, Chuck, y David, 2011).

La salud del suelo depende de muchos factores interrelacionados que influyen en su capacidad para mantener un entorno saludable que propicie el desarrollo de las plantas. La biodiversidad del suelo, uno de estos factores, está compuesta por microorganismos bacterianos, fúngicos y otros organismos importantes para el desarrollo de ciclos biogeoquímicos, el crecimiento y la obtención de nutrientes en la planta (Santos y Olivares, 2021). Los organismos fúngicos ejercen funciones importantes como reguladores del ecosistema, control biológico y descomponedores de materia orgánica (Frac et al., 2018). Además, su rol como secuestradores de nutrientes favorece las relaciones mutualistas con organismos vegetales (Burford, Kierans, y Gadd, 2003).

Asimismo, el uso de agroquímicos, ya sea pesticidas o fertilizantes, también favorece el crecimiento y la obtención de nutrientes de los cultivos. Estos agroquímicos se han utilizado para mitigar plagas y fomentar el desarrollo de los cultivos, como en la caña de azúcar (Udeigwe et al., 2015). Sin embargo, el uso continuo de agroquímicos ha agravado problemas como el deterioro de la salud del suelo, el aumento de la resistencia a los plaguicidas, la creación de fitopatógenos resistentes a los medicamentos, el aumento de riesgos para la salud humana y la destrucción de la flora y la fauna del entorno (Bhushan y Pathma, 2021).

Debido a los problemas que conlleva el uso de fertilizantes, es importante crear nuevas estrategias para mejorar la producción de cultivos sin comprometer la salud del suelo. Uno de los métodos implementados es la aplicación de biofertilizantes. Se ha considerado el uso de hongos como componente de estos biofertilizantes gracias a que presentan relaciones mutualistas con las plantas, regulan el ecosistema y brindan nutrientes esenciales. En Guatemala ya se han implementado algunas especies de hongos como biofertilizantes (ASAZGUA, 2020). Actualmente, empresas como Succeso y Semiagro, han formulado productos herbicidas y estimuladores del crecimiento a base de microorganismos para su comercialización. Asimismo, el uso de organismos endémicos a un suelo

favorece la producción del cultivo debido a que son microorganismos adaptados al ambiente. Por esta razón, se aíslan microorganismos del suelo usado para el cultivo para que estos presenten características y actividades adaptadas a las condiciones de dicho suelo.

No obstante, los biofertilizantes a base de hongos no se utilizan con frecuencia en Guatemala, al menos no en la misma medida que los fertilizantes químicos convencionales. Por lo tanto, para lograr prácticas agrícolas sostenibles y eficaces es necesario la incorporación de biofertilizantes en agricultura de Guatemala. Por consiguiente, para mejorar la salud del suelo del monocultivo de caña de azúcar, se optimizarán inóculos de microorganismos fúngicos mediante técnicas moleculares y microbiológicas. Los análisis genómicos para identificación de cepas de interés se realizarán a partir de secuenciación de la región ITS. Asimismo, se seleccionarán cepas de interés agrícola y se analizará la actividad antagónica entre sí. Se pretende utilizar estos cultivos para su uso como biofertilizantes, reemplazando el uso de agroquímicos, lo que promoverá el crecimiento del cultivo sin comprometer la salud del suelo.

Marco contextual

Dentro del contexto dinámico de la investigación agrícola y ambiental en Centroamérica, emerge una relación que involucra al Ingenio Magdalena, el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEB) y la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). El Ingenio Magdalena es uno de los actores importantes en la industria de la caña de azúcar de la región. Para eso, buscar ser una empresa líder en costos y productividad a través de la innovación, crecimiento y la creación de valor sostenible, diversificando los productos en distintos mercados (Ingenio Magdalena, 2022).

En la búsqueda de soluciones innovadoras, el Centro de Estudios de Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala ofrece su experiencia para desentrañar las complejidades de la salud del suelo, la productividad de los cultivos y la protección del medio ambiente. Este centro tiene como fin catalizar el desarrollo de la biotecnología en el país, vinculando la investigación y educación, para su aplicación en el beneficio de la sociedad y el medio ambiente. Del mismo modo, pretenden integrar, coordinar y facilitar la generación y transferencia de biotecnología para transformar descubrimientos científicos en aplicaciones (Universidad del Valle de Guatemala, 2023).

En medio de este panorama, la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) juega un papel fundamental en el abordaje de los desafíos de la sostenibilidad agrícola y la salud del suelo. La destreza académica y las capacidades de investigación de la universidad brindan una base sólida para los esfuerzos multidisciplinarios destinados a optimizar el uso de fertilizantes, mejorar la microbiota del suelo y promover prácticas agrícolas sostenibles. Al realizar vínculos entre el Ingenio Magdalena y el Centro de Estudios de Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala, se propuso el proyecto titulado "Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimiento de compostaje y manejo de microbiología de suelos". Este proyecto busca producir bacterias y hongos beneficiosos, para usarlos y sus bioproductos como biofertilizantes, bioinsecticidas, bioestimulantes o en otras aplicaciones. Este trabajo es continuación de la tesis titulada "Metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el monocultivo de *Saccharum officinarum*" presentada por Aouda Nicté Sánchez González (Sánchez González, 2023).

6.1 Agricultura

La agricultura es el proceso de criar plantas, animales y otros seres vivos con el fin de producir alimentos, fibras, plantas que se usan como medicinas y otros bienes que sustentan y mejoran la vida humana (Harris y Fuller, 2014). La gestión de los recursos naturales, como el suelo, el agua, el aire y la biodiversidad, es un emprendimiento humano fundamental que pretende satisfacer las demandas de las generaciones presentes y futuras (Sinha y Baten, 2021). Una amplia gama de métodos, tecnologías y actividades que forman parte de la agricultura respaldan la sostenibilidad ambiental, el crecimiento económico y la seguridad alimentaria (Minoiu, 1999). Los cultivos que se cultivan en la agricultura incluyen cereales (incluidos el trigo, el arroz y el maíz), frutas, verduras, legumbres, semillas oleaginosas y más (UF/IFAS., s.f.). Con los avances en biotecnología, tecnología y métodos agrícolas respetuosos con el medio ambiente, la agricultura ha experimentado un cambio sustancial (Wieczorek y Wright, 2012). Sigue siendo una industria dinámica e importante que se ocupa del problema de alimentar a una población mundial en crecimiento mientras protege el medio ambiente y los recursos naturales (Viana, Freire, Abrantes, Rocha, y Pereira, 2022).

6.1.1 Agricultura en Guatemala

Guatemala es un país agrícola y aproximadamente el 70% del área total de la tierra está dedicada a la agricultura y la silvicultura (FAPDA, 2014). El sector agrícola es vital para la economía y el desarrollo del país, en 2022, según el World Bank, la agricultura de caña de azúcar constituyó el 9.3% del producto interno bruto (PIB) y empleó el 29% de la mano de obra nacional (World Bank, 2022). Los principales productos agrícolas en Guatemala son el maíz, la caña de azúcar, el banano, el café, el aceite de palma, melón, fresas y otros vegetales (?, ?). En 2023 se pronostica que Guatemala producirá 2,6 millones de toneladas métricas de azúcar a partir de caña de azúcar en un área cosechada de 258 000 hectáreas (USDA, 2022). En el Altiplano Occidental de Guatemala, alrededor del 80% de los agricultores son campesinos típicos que poseen fincas a pequeña escala con menos de 0,7 hectáreas y cultivan maíz para su consumo doméstico (Matsumoto, Cifuentes, y Masunaga, 2013). Como la vida de los agricultores depende principalmente de la producción en fincas (Bellow, Roxanne, Hudson, y Ramachandran, 2008), es muy importante mantener y mejorar la productividad de la tierra.

6.1.2 Suelos de Guatemala

El suelo fértil es un suelo que puede soportar el crecimiento saludable de las plantas y producir altos rendimientos de cultivos (Black, 1993). Guatemala tiene una amplia variedad de suelos y la fertilidad de estos puede variar debido a factores como el clima, la topografía y el uso de la tierra (MARN, 2017). Entre los suelos fértiles de Guatemala se pueden mencionar los suelos aluviales, volcánicos, andosoles y regosoles (MARN, 2017). Por otra parte, la degradación del suelo es un problema importante en el país, en especial en áreas donde la tierra se cultiva intensivamente o se utiliza para el pastoreo de ganado (Breure, 2004). La erosión del suelo, el agotamiento de nutrientes y la compactación del suelo son las principales amenazas para la fertilidad (FAO, 2021). Por lo tanto, las prácticas de manejo sostenible de la tierra son cruciales para mantener suelos fértiles y garantizar la seguridad alimentaria de la población (FAO, 2021).

6.1.3 Monocultivo

Monocultivo se define como la plantación de la misma especie de cultivo a lo largo de los años en el mismo campo agrícola (Nguyen et al., 2020). El monocultivo a menudo se emplea en la agricultura industrial moderna para maximizar la eficiencia, agilizar los procesos de producción y centrarse en el cultivo de siembras de alto rendimiento o económicamente valiosas (Saud, 2021). Sin embargo, los impactos de los cultivos continuos en la salud del suelo dependen del contexto en el sentido de que dependen de los tipos de cultivos, la duración del cultivo, el tipo de suelo y los factores climáticos (Guangzhou, Li, Xi, y Cong, 2022). Asimismo, el cultivo continuo podría conducir a penalizaciones en el rendimiento de los cultivos debido a la alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo y las comunidades microbianas con el tiempo (Pervaiz et al., 2020).

El monocultivo y los cultivos continuos, aunque no son la única causa, pueden afectar negativamente los indicadores abióticos y bióticos del suelo (van Es y Magdoff, 2009). En cuanto a los componentes físicos, puede afectar las propiedades fisicoquímicas del suelo y conducir a la reducción del carbono orgánico, la disponibilidad de nutrientes esenciales, causar una alteración del pH, además de la acumulación de tipos de metabolitos bioquímicamente menos diversos (Udeigwe et al., 2015). También podría tener consecuencias ambientales (Pervaiz et al., 2020). En consecuencia, los suelos degradados con un pH reducido pueden alterar la fertilidad (Kim et al., 2022). Los monocultivos son más susceptibles a los brotes de plagas y enfermedades patógenas porque las plagas pueden propagarse rápidamente entre una población de cultivo uniforme (C. Liu et al., 2018). En general, una reducción en los taxones microbianos beneficiosos y un enriquecimiento de microbios patógenos no solo impactan negativamente en la producción de cultivos, sino que también desmantelan la red alimentaria beneficiosa del suelo y las interacciones del ciclo microbiano, que son esenciales para la salud y la sostenibilidad del suelo (van Es y Magdoff, 2009).

6.1.4 Fertilidad del suelo

El suelo fértil contiene una gran cantidad de nutrientes esenciales para las plantas, como nitrógeno, fósforo y potasio (van Es y Magdoff, 2009). Asimismo, presenta minerales como el calcio, el magnesio y el hierro (Breure, 2004). Otro componente importante es la materia orgánica, esta se compone por los restos descompuestos de plantas y animales, y juega un papel importante en la fertilidad del suelo (Spark y Swift, 2002). Una cantidad adecuada de materia orgánica contribuye a la mejora de la estructura del suelo, la retención de agua y la disponibilidad de nutrientes (Neal, Sposito, Holtzclaw, y Traina, s.f.). Además, una característica del suelo fértil es presentar un movimiento adecuado del agua y el aire, debido a que esto favorece el desarrollo de las raíces y la absorción de nutrientes (Jastrow, Amonette, y Bailey, 2007). Cabe resaltar que un buen drenaje también permite que el exceso de agua se aleje de la zona de la raíz, evitando la pudrición de esta y otras enfermedades de las plantas relacionadas con el agua (van Leeuwen, 2010).

Para cumplir algunos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), planteados por las Naciones Unidas en 2015, es necesario cuidar y mantener la salud del suelo, ya que contienen aspectos económicos, sociales y ambientales. La principal función que cumple un suelo fértil es la provisión de alimentos, cumpliendo con el Hambre Cero, uno de los propósitos de dichos objetivos. Un suelo

fértil también proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, para producir alimentos saludables con todos los nutrientes necesarios para la salud humana (FAO, 2023). Además, la fecundidad del suelo incide en las actividades con impacto económico y, por tanto, está relacionada con el crecimiento económico y la lucha contra la pobreza. Finalmente, una buena gestión de la fertilidad del suelo puede ayudar a reducir la contaminación del suelo, el agua y el aire, regular la disponibilidad de recursos hídricos, apoyar una comunidad biótica diversa y activa, aumentar la cubierta vegetal y permitir una huella de carbono neutral (FAO, 2023).

6.1.5 Ecología del suelo

El suelo es un componente clave del ecosistema que proporciona material de enraizamiento para las plantas y es el hábitat de los organismos saprofitos que reciclan la materia y los nutrientes a través del proceso de descomposición (Jorgensen y Fath, 2008). La ecología del suelo se ocupa de las interacciones entre los organismos del suelo (tanto microorganismos como fauna) y entre los organismos del suelo y sus entornos físicos y químicos (Frąc et al., 2018). Entre ellos se incluyen bacterias, hongos, protozoos, nematodos, artrópodos y otros organismos (Hill et al., 2000).

Estos microorganismos tienen una variedad de capacidades metabólicas que les permiten descomponer y utilizar la materia orgánica y los nutrientes del suelo (Jansson y Hofmockel, 2018). Algunos microorganismos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, mientras que otros son capaces de degradar compuestos orgánicos complejos (O'Callaghan, Ballard, y Wright, 2022). También son importantes para el ciclo de nutrientes en el suelo, ya que descomponen la materia orgánica y liberan nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio que son esenciales para el crecimiento de las plantas (Pavao-Zuckerman, 2008). De la misma manera, ayudan a inmovilizar los nutrientes y evitan que se filtren del suelo (Santos y Olivares, 2021). Además, son capaces de formar relaciones simbióticas con las plantas y ayudar a mejorar la absorción de nutrientes de estas (Santos y Olivares, 2021).

6.1.6 Rol de los hongos en la ecología del suelo

Según Frąc y otros (2018) los hongos son habitantes muy exitosos del suelo, debido a su capacidad de adoptar diversas formas en respuesta a condiciones adversas o desfavorables. Los hongos del suelo son importantes descomponedores de materia orgánica y juegan un papel clave en el ciclo de nutrientes (Frąc et al., 2018). Descomponen moléculas orgánicas complejas en formas más simples que pueden ser absorbidas por otros organismos, liberando nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono que son esenciales para el crecimiento de las plantas (Burford et al., 2003).

Los hongos también tienen la capacidad de formar asociaciones mutualistas con las plantas, conocidas como micorrizas (Rodríguez-Ramos et al., 2021). En estas asociaciones, los hongos colonizan las raíces de las plantas y la ayudan a absorber los nutrientes del suelo, mientras que la planta proporciona carbohidratos al hongo (Tian et al., 2021). Algunos hongos del suelo pueden controlar los patógenos de las plantas, ya sea a través de la competencia directa o mediante la producción de compuestos antifúngicos (Breure, 2004). Cabe mencionar que, son importantes secuestradores de carbono, ya que pueden almacenar grandes cantidades de carbono en su biomasa y en el suelo (Frąc et al., 2018). Hay varias especies de hongos que se encuentran en el suelo, y todas tienen cualidades especiales que afectan la forma en que interactúan y funcionan ecológicamente. En la Tabla 1 se detallan algunos hongos encontrados comúnmente en suelo.

Tabla 1

Composición de la comunidad fúngica en diferentes ecosistemas del suelo y su función.

Ecosistema	Composición fúngica	Función/reacción fúngica	Referencia
Bosque	Basidiomycota Ascomycota	Mutualistas ectomicorrízicos que protegen familias de plantas como Pinaceae, Fabaceae, Betulaceae y Fagaceae	(Rillig y Mummey, 2006)
Agricultura	<i>Capnodiales</i> y <i>Eurotiales</i> <i>Penicillium</i>	Reducción de suelos afectados por sequía Aumento de suelos fertilizados	(Bastida, Torres, Hernández y García, 2017) (Žifčáková, Větrovský, Howe y Baldrian, 2016)
Pastizales	Pleosporales	La mayoría de ellos se conoce como patógenos vegetales.	(Porrás-Alfaro, Herrera, Natvig, Lipinski y Sinsabaugh, 2011)

Nota. Adaptado de Frąc, Hannula, Bełka y Jędrzycka (2018).

6.2 Fertilizantes

Un fertilizante es una sustancia o mezcla que se agrega al suelo o a las plantas para proporcionar los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas (Khan, Mobin, Zahid, y Alamri, 2017). Juegan un papel crucial en la agricultura debido a que complementan el contenido de nutrientes del suelo, asegurando que las plantas reciban los elementos necesarios para un crecimiento óptimo, un mayor rendimiento de los cultivos y una mejor salud en general (Krasilnikov et al., 2022). Los fertilizantes son formulados para proporcionar estos nutrientes esenciales en proporciones específicas, según los requisitos de las plantas que se cultivan (Prasad y Smol, 2023). Además, pueden ser de origen orgánico o inorgánico y se aplican a través de varios métodos, que incluyen la incorporación al suelo, la aplicación superficial, la aplicación foliar y los sistemas de riego (X. Wang et al., 2020). El uso adecuado y responsable de fertilizantes es esencial para mantener prácticas agrícolas sostenibles y minimizar los impactos ambientales negativos (Krasilnikov et al., 2022).

6.2.1 Fertilizantes inorgánicos

Los fertilizantes inorgánicos, comúnmente conocidos como fertilizantes sintéticos o químicos, son sustancias ricas en nutrientes que se crean y se administran al suelo o las plantas para promover el crecimiento y aumentar la productividad agrícola (Lu et al., 2019). Se emplean con frecuencia en la agricultura contemporánea para dar a los cultivos nutrientes particulares en una forma fácilmente asimilable. Estos fertilizantes están formulados para brindar proporciones específicas de nutrientes clave requeridos por las plantas, así como también nutrientes secundarios y micronutrientes (Strong y Holford, 1997). Se pueden aplicar a través de varios métodos, que incluyen difusión, bandas, a través de sistemas de riego y pulverización foliar (Kafkafi y Kant, 2013). En Guatemala, el consumo de fertilizantes se estima que fue de 427.4 kilogramos por hectárea de tierra cultivable en el 2020 (World Bank, 2020). Sin embargo, el uso de fertilizantes varía dependiendo de las prácticas agrícolas, tipo de cultivo y condiciones económicas.

Composición química

Los fertilizantes inorgánicos generalmente se fabrican a partir de compuestos sintéticos y su composición química puede variar según la formulación específica. Sin embargo, generalmente contienen tres macronutrientes primarios: nitrógeno, fósforo y potasio (Zandvakili, Barker, Hashemi,

Etemadi, y Autio, 2019). Además de estos nutrientes primarios, los fertilizantes inorgánicos también pueden contener nutrientes secundarios y micronutrientes, como calcio, magnesio, azufre, hierro y zinc (M. Zhang et al., 2019). La composición química de los fertilizantes depende de las necesidades específicas de la planta. Algunos fertilizantes inorgánicos comunes se componen de: nitrato de amonio, que contiene aproximadamente un 34 % de nitrógeno; urea, la cual contiene aproximadamente un 46 % de nitrógeno; superfosfato triple, que contiene un 46-48 % de fósforo; cloruro de potasio, el cual contiene 60-62 % de potasio; nitrato amónico cálcico, que contiene un 27 % de nitrógeno y un 11 % de calcio; fosfato monoamónico, que contiene un 11 % de nitrógeno y un 52 % de fósforo; y fosfato diamónico, que contiene aproximadamente un 18 % de nitrógeno y un 46 % de fósforo (M. Zhang et al., 2019).

Implicaciones del uso de fertilizantes inorgánicos

El uso excesivo o inapropiado de fertilizantes químicos es una de las principales causas del desequilibrio de nutrientes en el suelo, lo que lleva a grandes pérdidas de cultivo y fertilidad del suelo. El nutriente más afectado por el uso de fertilizantes es el nitrógeno, debido a que se reduce su recuperación en un 30 % y su eficiencia de uso en un 35 % (Zhong y Cai, 2007). Según Khan y otros (2017), los nutrientes suministrados exclusivamente a través de fertilizantes químicos mejoran inicialmente el rendimiento del cultivo, pero los rendimientos no son sostenibles en el tiempo debido a que puede interrumpir el ciclo natural de nutrientes y el equilibrio en el suelo. El uso desequilibrado de estos disminuye la fertilidad del suelo y reduce un 38 % el rendimiento del cultivo debido a que las plantas se vuelven dependientes a fuentes externas (Khan et al., 2017). También se ve afectado debido al cultivo intensivo, debido a que se degrada la estructura natural del suelo a causa del efecto de trituración y cizallamiento de los equipos pesados, así como al agotamiento de la materia orgánica del suelo (Rasool, Kukal, y Hira, 2007).

Impactos a la salud. El uso excesivo de pesticidas ha sido empleado en otras criaturas vivas (p. ej., peces, pájaros y humanos), además de plagas/insectos. La protección de la salud pública se ha convertido en un desafío primordial, en vista que se están observando los efectos nocivos de los agroquímicos en la salud humana y el medio ambiente por su uso durante la agricultura debido a la contaminación de los reservorios de agua por plaguicidas y fertilizantes utilizados en la agricultura, en vista que se están observando los efectos nocivos de los agroquímicos en la salud humana y el medio ambiente por su uso durante la agricultura (Abhilash y Singh, 2009). Se observaron efectos tanto agudos como crónicos en la salud humana debido a la presencia de pesticidas en los sistemas ambientales (Cui, Dou, Chen, Ju, y Zhang, 2014). Los trastornos de salud humana comúnmente informados observados son problemas del sistema inmunológico, problemas hormonales, delirio, problemas reproductivos, intoxicación e incluso cáncer (Gupta, 2004). Además, los metales pesados en el suelo agregados por la aplicación de fertilizantes pueden transportarse a los cuerpos de agua adyacentes y pueden afectar severamente el ecosistema acuático y provocar que el agua sea inapropiada para el consumo humano (Gupta, 2004).

Impactos ecológicos. El uso regular e indiscriminado de fertilizantes químicos puede aumentar los niveles de metales pesados en el suelo, debido a que pueden contener trazas de metales como cadmio, plomo y mercurio (Alengebawy, Abdelkhalek, Qureshi, y Wang, 2021). Los metales pesados presentes en los suelos pueden reducir la producción agrícola, la salud del suelo y la calidad de los alimentos, así como los peligros para la salud de los seres vivos (Yang et al., 2020). El transporte de exceso de nutrientes se lleva a cabo hacia los reservorios de aguas superficiales estancadas a través de las lluvias causando eutrofización en los mismos. Además, se produce un gran crecimiento de algas y otras plantas acuáticas, las cuales consumen la mayor parte del oxígeno disuelto necesario para la vida acuática. Como consecuencia, el agua se vuelve menos útil para actividades como la pesca, la recreación, la industria, entre otras (H. Wang, Xu, Zhou, Ma, y Duan, 2018).

La percolación del agua contaminada con fertilizantes también puede contaminar las aguas subterráneas debido a la mezcla de estos productos químicos y, en última instancia, afecta la salud de los seres vivos después de la ingesta (Rodríguez-Ramos et al., 2021). También se ha demostrado que

la aplicación de fertilizantes químicos tiene un efecto directo sobre la composición de la comunidad microbiana del suelo en monocultivos de plantas (H. Wang et al., 2018). Además, el uso intensivo de fertilizantes puede reducir la diversidad de plantas en los agroecosistemas, afectando negativamente a los polinizadores, los insectos benéficos y otros animales salvajes que dependen de diversos hábitats de plantas (Millard et al., 2021).

6.2.2 Biofertilizantes

Los biofertilizantes pueden procesarse y comercializarse de la misma manera que los fertilizantes químicos (Deravel, Krier, y Jacques, 2014). Estos se derivan de fuentes naturales, como estiércol animal, compost, harina de huesos, emulsión de pescado y otros materiales orgánicos. (Abbey, Abbey, Leke-Aladekoba, Iheshiulo, y Ijenyo, 2019). Estos bioproductos contienen agentes de biocontrol, es decir, organismos naturales o sustancias derivadas de materiales naturales como animales, plantas, bacterias o ciertos minerales, incluidos sus genes o metabolitos, especialmente formulados para su uso como un producto para mejorar la producción de cultivos (Deravel et al., 2014). Los biofertilizantes son, en gran parte, microorganismos vivos que pueden mejorar la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas (Deravel et al., 2014). Los biofertilizantes son, en gran parte, patógenos microbianos de la plaga que necesita control, que pueden procesarse y comercializarse de la misma manera que los plaguicidas químicos, y algunos han tenido un éxito considerable en los sistemas de protección de cultivos (Deravel et al., 2014).

Composición

Los biofertilizantes, por lo general, están compuestos por microorganismos vivos. También pueden contener materia orgánica, como residuos de plantas o compost, que pueden proporcionar nutrientes adicionales y mejorar la estructura del suelo (Daniel et al., 2022). La formulación de biofertilizantes se clasifica en formulación sólida y formulación líquida (Lengai y Muthomi, 2018). La composición de los biofertilizantes puede variar según el tipo de microorganismos utilizados. Sin embargo, normalmente contienen bacterias, hongos o algas beneficiosas, o una combinación de estos microorganismos (Joshi, 2006). Los biofertilizantes también pueden contener materia orgánica, como residuos de plantas o compost, que pueden proporcionar nutrientes adicionales y mejorar la estructura del suelo (Anwer, 2017).

Beneficios ambientales

Entre los beneficios ecológicos de los biofertilizantes se encuentran que son menos tóxicos y dañinos que los fertilizantes convencionales (Devi y Kumar, 2020) (Abbey et al., 2019). Pueden fijar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en formas que las plantas puedan absorber fácilmente, ayudando a aumentar la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas y promoviendo un crecimiento más saludable (Daniel et al., 2022). También son capaces de mejorar la fertilidad del suelo, la capacidad de retención de agua y la capacidad de retención de nutrientes, lo que conduce a suelos más sanos y productivos (Chaudhary, Singh, Chaudhary, Sharma, y Kumar, 2022). Los beneficios adicionales incluyen el hecho que tienen la capacidad de ayudar al mantenimiento de las poblaciones de insectos beneficiosos, debido a que su proceso de aplicación no es peligroso (Copping y Menn, 2000).

Biofertilizantes a base de hongos

Existen biofertilizantes a base de hongos que funcionan colonizando las raíces de la planta y formando una relación simbiótica con la planta, conocida como micorrizas (Srivastava, Johny, y Adholeya, 2021). Los hongos micorrízicos ayudan a las plantas a absorber los nutrientes del suelo, particularmente el fósforo y otros minerales que son difíciles de extraer para las plantas por sí mismos (Madawala, 2021); a cambio, los hongos reciben carbono de la planta, que utilizan como fuente de energía (Madawala, 2021). De igual forma, se pueden utilizar hongos que disuelven formas insolubles

de fósforo, haciéndolo más accesible a las plantas y contribuyendo a mejorar el crecimiento de las plantas (Vassileva et al., 2022).

También pueden mejorar la estructura del suelo, la capacidad de retención de agua y reducir la erosión. Además, favorecen la resistencia a enfermedades y plagas, así como la tolerancia a condiciones de estrés, como la sequía o las temperaturas extremas (Vosatka y Albrechtová, 2009). Algunos hongos comunes utilizados en biofertilizantes incluyen hongos micorrízicos arbusculares (AMF) y hongos ectomicorrízicos (EMF). Los AMF se encuentran en las raíces de la mayoría de las plantas y forman una relación mutualista con la planta, mientras que los EMF colonizan las raíces de los árboles y otras plantas leñosas (P. Kumar y Dubey, 2020). En la Tabla 2 se enlistan algunos hongos utilizados como biofertilizantes (Odoh et al., 2020).

Tabla 2

Algunos hongos utilizados como biofertilizantes y su modo de acción.

Agentes biofertilizantes	Especie	Función/reacción fúngica
<i>Fusarium</i> spp	<i>Fusarium solani</i> y <i>F. Oxysporum</i>	Enriquece el compost con biofertilizantes. Degrada los residuos vegetales y mantiene el equilibrio C:N en el suelo.
<i>Trichoderma</i> spp	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Mejora la degradación del compost.
Hongos micorrízicos	<i>Glomus intraradices</i>	Reduce el impacto del estrés ambiental. Mejora el estado de salud de las plantas mientras mejora los minerales óptimos.
<i>Aspergillus</i> spp	<i>Aspergillus niger</i>	Solubiliza el fosfato no disponible para uso de la planta a través de la secreción de ácido orgánico. Mejora la calidad del suelo con usos posteriores.
<i>Penicillium</i> spp	<i>P. bilaji</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. albidum</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. rubrum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. citrinum</i>	Suministra minerales esenciales (P, Mn, Zn, Fe, Co, Cu y Mo) a las plantas. Induce resistencia al estrés abiótico en siembras jóvenes. Protege a las plantas de patógenos fúngicos.
<i>Chaetomium</i> spp	<i>C. bostrychodes</i> , <i>C. olivaceum</i>	Mejora la degradación del compost.
<i>Gliocladium</i> spp	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Reduce la incidencia de la enfermedad del damping-off.
<i>Tritirachium</i> spp	<i>T. album</i> , <i>T. egenum</i>	Secreta ácidos orgánicos para disolución de minerales.

Nota. Adaptado de Odoh, et al (2020)

6.3 Identificación molecular de hongos

La identificación molecular de hongos es un proceso que utiliza técnicas de biología molecular para identificar y clasificar hongos en función de su material genético. Este es un método más preciso y confiable en comparación con los métodos de identificación tradicionales que se basan en características físicas y morfológicas (Azuddin, Mohamad Noor Azmy, y Zakaria, 2023). Los métodos de identificación molecular se están volviendo cada vez más importantes para la identificación de

hongos, particularmente en el contexto de muestras ambientales donde los métodos tradicionales pueden no ser tan efectivos. Al caracterizar diferentes cepas de hongos, la identificación molecular puede proporcionar información importante sobre la diversidad y la ecología de los hongos, y puede potenciar el desarrollo de nuevas aplicaciones para los hongos, incluidos los biofertilizantes y los agentes de biocontrol (Bonneville et al., 2020).

6.3.1 Métodos de identificación molecular de hongos para desarrollo de biofertilizantes

Los métodos de identificación molecular de hongos son importantes para el desarrollo de biofertilizantes porque permiten la identificación precisa de hongos específicos que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas y la salud del suelo. Estos métodos de identificación pueden proporcionar información sobre la taxonomía, la diversidad y las características funcionales de los hongos, lo que permite la selección de las cepas más eficaces para su uso en biofertilizantes (Hill et al., 2000). Estos métodos de identificación molecular se pueden utilizar en combinación con métodos tradicionales basados en cultivos para seleccionar y caracterizar cepas de hongos para su uso en biofertilizantes. Al identificar y seleccionar las cepas de hongos más efectivas, se pueden desarrollar biofertilizantes que tienen el potencial de mejorar la fertilidad del suelo y promover la agricultura sostenible (Islam et al., 2019).

6.3.2 Reacción en cadena de polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular utilizada para amplificar secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (El Sheikha, 2019). La PCR es una herramienta poderosa en biología molecular y ha permitido muchos descubrimientos y aplicaciones importantes en diversos campos (Hariharan y Prasannath, 2021). El proceso de PCR implica desnaturalización, la plantilla de ADN de doble cadena se calienta a una temperatura alta (típicamente 95-98°C) para separar las dos cadenas; anillamiento, donde se baja la temperatura para permitir que los *primers* (secuencias de ADN cortas que son complementarias a la secuencia objetivo) se regeneren con la plantilla de ADN monocatenario; y la extensión, donde se eleva la temperatura para permitir que una enzima ADN polimerasa extienda los *primers* a lo largo de las hebras de ADN molde, lo que da como resultado la síntesis de nuevas hebras de ADN complementarias. Estos pasos se repiten durante varios ciclos (típicamente de 20 a 40 ciclos), lo que da como resultado una gran amplificación de la secuencia de ADN objetivo. Posteriormente, el ADN amplificado se puede visualizar utilizando técnicas como la electroforesis en gel o la secuenciación. Estos pasos se repiten durante varios ciclos (típicamente de 20 a 40 ciclos), lo que da como resultado una gran amplificación de la secuencia de ADN objetivo (Hariharan y Prasannath, 2021). Posteriormente, el ADN amplificado se puede visualizar utilizando técnicas como la electroforesis en gel o la secuenciación.

6.3.3 Secuenciación

La secuenciación de Sanger se utiliza para determinar el orden de las bases de nucleótidos en una molécula de ADN (Heather y Chain, 2016). Históricamente, ha sido esencial para comprender el código genético de numerosas criaturas, incluidos los humanos (Adams, 2008). Es una herramienta clave en biología molecular y genómica. La terminación de cadena en la secuenciación de Sanger utiliza nucleótidos modificados que han sido marcados con fluorescencia. Mediante esta técnica se crea un cromatograma que representa la secuencia de la plantilla de ADN (Sanger, Nicklen, y Coulson, 1977). Esta técnica se ha utilizado para fines de diagnóstico, para secuencias genomas de organismos pequeños, determinar variaciones o mutaciones, caracterización de regiones de ADN, entre otros (Gupta, 2004).

La secuenciación de Sanger también se utiliza para analizar la diversidad genética de los hongos presentes en una muestra de suelo, por medio de secuencias de ADN conservadas como es el caso de los espaciadores de transcrito interno (ITS). Comprender la composición genética de estos hongos puede proporcionar información sobre sus interacciones simbióticas con las plantas, sus

adaptaciones ambientales y sus beneficios potenciales como biofertilizantes (Hagh-Doust, Färkkilä, Moghaddam, y Tedersoo, 2022). De la misma manera, puede ayudar a identificar y distinguir con precisión entre las diferentes cepas de hongos presentes en el suelo.

Secuencia ITS

La región del espaciador transcrito interno (ITS) del ARN ribosómico nuclear presenta la mayor probabilidad de identificación correcta para una gran cantidad de linajes fúngicos analizados (Schoch et al., 2012). La secuenciación ITS fúngica puede detectar diversidad de muestras, lo que permite a los investigadores investigar la importancia biológica de estas (Bellemain et al., 2010). Es un marcador viable porque es hipervariable y distintivo entre especies, pero apenas cambia entre individuos de la misma especie (Pereira et al., 2010). GenBank es el repositorio de secuencias más completo y ampliamente utilizado en el campo (Clark, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, y Sayers, 2016). Asimismo, se ha desarrollado una base de datos específica para secuencias fúngicas, UNITE (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database por sus siglas en inglés) (Kõljalg et al., 2013). UNITE tiene como objetivo unificar la identificación taxonómica de hongos y corregir las anotaciones asociadas con los nombres taxonómicos en la mayor medida posible (?, ?).

6.4 Desafíos y oportunidades de los enfoques moleculares para la identificación de hongos

Los enfoques moleculares para la identificación de hongos tienen muchas ventajas sobre los métodos tradicionales basados en la morfología, pero también presentan varios desafíos y oportunidades. Entre los desafíos se encuentra que algunas técnicas moleculares para la identificación de hongos pueden ser costosas, especialmente en comparación con los métodos tradicionales basados en la morfología (Jänsch et al., 2005). Además, algunas técnicas moleculares, como PCR y secuenciación de ADN, requieren conocimientos técnicos especializados que pueden no estar disponibles en todos los laboratorios (Segre, 2020).

A pesar de estos desafíos, los enfoques moleculares para la identificación de hongos son generalmente más precisos que los métodos tradicionales, especialmente para especies estrechamente relacionadas o crípticas (Dizkirici y Kalmer, 2019). Los enfoques moleculares para la identificación de hongos pueden ser mucho más rápidos que los métodos tradicionales, lo que permite una identificación rápida de especies de hongos en muestras clínicas o ambientales (Vázquez, 2016). Además, las técnicas moleculares, como la secuenciación de ADN, pueden procesar un gran número de muestras simultáneamente, lo que permite un análisis de alto rendimiento de las comunidades fúngicas (White, Bruns, Lee, y Taylor, 1990). También se pueden utilizar para identificar especies de hongos nuevas o previamente desconocidas, ampliando nuestra comprensión de la diversidad y la ecología de los hongos (Segre, 2020).

6.5 Análisis de antagonismo fúngico

Los microorganismos con capacidades de biocontrol pueden tener un efecto sinérgico y estimular el antagonismo de otros agentes de biocontrol contra las enfermedades de las plantas (Sharma et al., 2017). Los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR) inductores de resistencia y antagonizantes podrían ser útiles como nuevos inoculantes con combinaciones de diferentes mecanismos de acción, lo que conduciría a un uso más eficiente para estrategias de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal (Glick, 2012). Los experimentos de antagonismo *in vitro* a menudo se utilizan para investigar el efecto de los aislados bacterianos en ciertas enfermedades, antes de los ensayos de invernadero y/o de campo (Bashan, de Bashan, Prabhu, y Hernandez, 2014).

6.5.1 Mecanismo de acción

Los antagonistas fúngicos pueden exhibir varios mecanismos de acción implicados en el control biológico de enfermedades. Algunos antagonistas de hongos actúan como parásitos de otros hongos, interfiriendo con su crecimiento y reproducción, este mecanismo se conoce como micoparasitismo (Ram, Debnath, Negi, y Singh, 2022). Los antagonistas de hongos producen antibióticos, enzimas o toxinas que inhiben el crecimiento y la actividad de los patógenos de las plantas (Mathivanan, Prabavathy, y Vijayanandraj, 2008). También compiten con los patógenos de las plantas por los nutrientes esenciales o el espacio, lo que limita su crecimiento y establecimiento (Thambugala, Daranagama, Phillips, Kannangara, y Promputtha, 2020). Pueden inducir respuestas de defensa en las plantas hospedantes, mejorando su resistencia a los patógenos (Ghannoum y Rice, 1999).

Entre estos mecanismos, la antibiosis se considera el más importante, ya que los antagonistas producen una serie de metabolitos secundarios, como antibióticos y toxinas, que contribuyen a su actividad antagonista contra los patógenos de las plantas (Masi, Nocera, Reveglia, Cimmino, y Evidente, 2018). Estos mecanismos contribuyen colectivamente a la capacidad de los antagonistas fúngicos para restringir el crecimiento de patógenos vegetales y controlar las enfermedades fúngicas (Thambugala et al., 2020).

7.1 Hipótesis

7.1.1 Hipótesis de investigación

Las muestras de hongos poseen el potencial de ser utilizados como biofertilizantes para mejorar la calidad del suelo, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos de caña de azúcar.

7.1.2 Hipótesis nula

Las muestras de hongos no poseen el potencial de ser utilizados como biofertilizantes para mejorar la calidad del suelo, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos de caña de azúcar.

7.2 Variables

Tabla 3

Variables de investigación del trabajo de graduación.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Secuencia de ITS de cepas	Una variante genética, un subtipo o una cultura dentro de una especie de hongo (Dijkshoorn, Ursing, y Ursing, 2000).	Análisis molecular de 45 cepas distintas de hongos.
Biofertilizantes	Sustancia que contiene microorganismos que promueve el crecimiento de la planta al aumentar la disponibilidad de nutrientes (Vessey, 2003).	Formulación de inóculos fúngicos utilizados como biofertilizantes.
Antagonismo fúngico	La acción de cualquier organismo que suprime o interfiere con el crecimiento normal y actividad de un organismo (Gloer, 1995).	Pruebas de antagonismo que demuestren la interacción entre las cepas de hongos seleccionadas.

Nota. Elaboración propia

7.3 Diseño experimental

El diseño que se utilizará será un diseño cuasi experimental debido a que se pretende medir las variables dependientes (actividad antagónica) de manera no aleatorizada. La variable independiente que se modificará serán las cepas de hongos. Se identificarán las especies de hongos capaces de mejorar la salud del suelo y se analizará el anatogonismo fúngico de estos.

7.4 Población y muestra

7.4.1 Población

La población del estudio pertenece a un cepario de hongos obtenido de muestras de suelo del Ingenio Magdalena. Las muestras fueron recolectadas y procesadas por Aouda Sanchez.

7.4.2 Muestra

Se estableció una muestra de 45 cepas de hongos, no identificados genómicamente.

7.5 Recolección de datos y análisis experimental

7.5.1 Resiembra de hongos

Se esterilizó previamente el área antes de empezar el procedimiento. Se tomó un pedazo de algodón con micelio de hongo con pinzas del tubo Falcon que contiene la preservación de cepas de hongos. Posteriormente, se sembró en placas de rosa de Bengala para revivir las cepas de hongos. Finalmente, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 semanas.

7.5.2 Extracción de ADN de hongos

En el SOP 19 se describe la metodología de la extracción de ADN de hongos. El micelio de los hongos se recogió mediante un bisturí en un recipiente de porcelana, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron con un mortero. El ADN genómico total se extrajo con una versión ligeramente modificada del protocolo de Wizard Genómica DNA Purification kit de Promega. No se agregó enzima lítica. Después de la adición de la solución de lisis del núcleo, el protocolo se modificó incubando la muestra a 37 °C durante 1 h. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a velocidad de 13,000 rpm en una microcentrífuga después de la adición de la solución de precipitación de proteínas.

7.5.3 Amplificación del gen ITS

En el SOP 12 se describe la metodología de la amplificación del gen ITS. Previo a la realización del PCR, se estandarizó la concentración de la muestra a 50ng/μL. Se realizaron 46 reacciones por par de *primers*; uno por cada cepa y un blanco con agua libre de nucleasas.

Para el *Master Mix* se utilizó el GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix de Promega. La receta utilizada para las reacciones, con un volumen final de 15μL, fue la siguiente:

El PCR para cada cepa de hongos se realizó en un termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller de MJ Research Inc. con el siguiente programa:

Los productos de ambos PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %.

7.5.4 Secuenciación del gen ITS

La secuenciación para la obtención de datos para el análisis genómico de las 45 cepas fúngicas se realizó mediante el laboratorio externo Macrogen para un amplicón contenido en la región ITS (ITS1). Como resultado, el laboratorio obtuvo un archivo fastq por muestra y amplicón con los datos crudos.

Tabla 4

Receta de master mix de la preparación de PCR para amplificar la región ITS.

Componente	1X (µL)	46X (µL)
Go Taq master mix	7.5 µL	345 µL
Oligo F (10mM)	0.75 µL	34.5 µL
Oligo R (10mM)	0.75 µL	34.5 µL
Agua libre de nucleasas	4 µL	184 µL
ADN	2 µL	-
TOTAL	15 µL	-

Nota. Elaboración propia

Tabla 5

Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2:00	1
Desnaturalización	95°C	0:30	
Alineamiento cebadores	55°C	0:30	35
Extensión Taq	72°C	1:00	
Extensión final	72°C	5:00	1

Nota. Elaboración propia

7.5.5 Análisis genómico del gen ITS

Para el análisis de secuencias, se realizó la identificación a nivel de especies a partir de dos bases de datos: NCBI y MycoBank. Se determinó el género y especie de cada cepa, tomando en cuenta los porcentajes de identidad, el *e-value* y el porcentaje de cobertura como valores determinantes para la identificación.

7.5.6 Solución de esporas

Todas las cepas de hongos seleccionados a partir de la secuenciación se cultivaron en medio PDA a 26 °C durante 7 días. Se realizó un lavado con 5 mL de solución salina 0.9% estéril con la ayuda de una jeringa de 5 mL. El líquido obtenido tras el lavado fue transferido a un tubo Falcon estéril, obteniendo un aproximado de 5 mL de solución de esporas. La solución se preservó a 4°C hasta su uso para la prueba de antagonismo entre hongos.

7.5.7 Antagonismo entre hongos

Con base a la metodología descrita Zhao y otros (2022) se propuso la metodología de pruebas de antagonismo fúngicos. Se realizó una matriz de las 14 cepas para probar la actividad antagónica entre los hongos. Se colocaron 10 µL de solución de esporas simétricamente a cada lado de las placas Petri. Se registró el crecimiento fúngico todos los días, así como la producción de una zona de inhibición. Después de 10 días se tomó como resultado positivo a la actividad antagónica de las cepas probadas en la matriz. La matriz se realizó con las siguientes cepas fúngicas:

Tabla 6*Cepas elegidas para realizar la matriz de antagonismo.*

No.	Cepa	Especie
1	1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>
2	1CA11	<i>Penicillium pimiteouiense</i>
3	1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>
4	2AB21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
5	4AP14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>
6	2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>
7	3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
8	3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>
9	3BP25	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>
10	1MO28	<i>Talaromyces funiculosus</i>
11	1MO32	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>
12	4MO12	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>
13	5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>
14	5MO20	<i>Bjerkandera adusta</i>

Nota. Elaboración propia

8.1 Identificación de ADN genómico de las cepas fúngicas

Se empleó un método de extracción de ADN fúngico, que produjo suficiente ADN para el análisis por PCR. Se verificó el rendimiento y la calidad del ADN para garantizar la confiabilidad de las reacciones de PCR posteriores. La Tabla 7 muestra los resultados de la cuantificación de ADN fúngico presente en la cantidad de material genético extraído de las 45 cepas de hongo. Se visualizan también las razones A260/280 y A260/230, donde la mayoría de las muestras presentan valores aceptables de pureza en la extracción. Esos resultados proporcionan información esencial para el análisis de PCR posterior.

Tabla 7

Cuantificación de ADN genómico de las 45 cepas de hongos del estudio.

Cepa	Concentración [ng/ μ l]	A260/280	A260/230
1CA10	2036.80	1.90	2.19
1CA11	1953.70	1.97	2.18
1CA13	3808.00	2.10	2.34
1CA14	4530.10	2.22	2.37
4AB8	5194.40	2.25	2.43
4AB9	4053.80	2.05	2.29
2AB21	10279.3	1.68	1.96
2AB23	9934.20	1.70	1.98
2AB28	3212.10	2.04	2.13
3AB10	12965.1	1.75	2.02
1AP28	11649.0	1.73	2.01
1AP30	11106.7	1.71	2.00
1AP31	5243.30	2.32	2.41
3AP28	17869.3	1.63	1.89
4AP14	9801.30	1.65	1.95
1BP24	12549.5	1.72	1.98
1BP25	4915.90	2.32	2.38
2BP18	973.700	1.11	1.09
4BP13	4672.70	2.23	2.32
3BP18	1747.50	1.17	1.10

3BP19	20284.3	1.79	2.01
3BP21	11096.6	1.75	1.99
3BP22	4150.50	2.20	2.29
3BP23	21204.9	1.81	2.00
3BP24	13331.9	1.85	2.04
3BP25	4298.30	2.18	2.26
3BP26	4667.10	2.27	2.30
1MO28	11033.1	1.76	1.98
1MO29	9658.20	1.73	1.95
1MO31	13617.7	1.74	2.00
1MO32	655.100	1.03	1.09
1MO34	11610.0	1.66	1.96
1MO36	5490.90	2.38	2.43
4MO12	4369.80	2.23	2.07
4MO13	5129.70	2.36	2.41
4MO14	5004.80	2.28	2.40
4MO17	5118.30	2.28	2.40
5MO16	11927.4	1.68	1.97
5MO17	11598.5	1.70	1.97
5MO18	11772.0	1.74	1.99
5MO19	4832.70	2.24	2.33
5MO20	12466.6	1.75	1.98
6MO10	13485.6	1.72	1.98
6MO11	9302.40	1.73	1.94
6MO12	9427.00	1.78	1.94

Nota. Elaboración propia

Después de la extracción del ADN, se realizó una PCR para amplificar el ADN de las 45 cepas fúngicas. Los productos de PCR resultantes se cuantificaron para determinar el éxito y la eficiencia del proceso de amplificación. La Tabla 8 muestra la cuantificación de ADN fúngico amplificado, donde la mayoría de los valores se encuentran entre 420 [ng/ μ l] y 740 [ng/ μ l]. Asimismo, la razones A260/280 y A260/230 muestran pureza deseable en todos los productos de PCR.

Tabla 8

Cuantificación de productos de PCR de la región ITS de las 45 cepas de hongos del estudio.

Cepa	Concentración [ng/ μ l]	A260/280	A260/230
1CA10	442.3	1.84	2.20
1CA11	467.4	1.85	2.26
1CA13	456.6	1.84	2.24
1CA14	446.4	1.84	2.25
4AB8	447.7	1.84	2.25
4AB9	458.5	1.85	2.20
2AB21	465.9	1.85	2.27
2AB23	461.5	1.85	2.27
2AB28	546.3	1.85	2.26
3AB10	563.5	1.85	2.26
1AP28	423.7	1.85	2.22
1AP30	504.2	1.85	2.26
1AP31	510.8	1.85	2.27
3AP28	454.9	1.84	2.23
4AP14	537.6	1.85	2.26
1BP24	525.8	1.85	2.25

1BP25	475.3	1.85	2.23
2BP18	503.3	1.85	2.26
4BP13	476.1	1.84	2.19
3BP18	565.5	1.84	2.18
3BP19	618.2	1.85	2.29
3BP21	467.5	1.85	2.26
3BP22	446.4	1.84	2.20
3BP23	498.8	1.85	2.23
3BP24	626.0	1.85	2.23
3BP25	732.6	1.81	2.32
3BP26	665.6	1.81	2.33
1MO28	735.5	1.81	2.27
1MO29	602.1	1.86	2.28
1MO31	619.8	1.79	2.29
1MO32	639.7	1.80	2.35
1MO34	546.1	1.85	2.24
1MO36	515.4	1.85	2.26
4MO12	421.5	1.84	2.16
4MO13	667.1	1.82	2.30
4MO14	677.7	1.82	2.36
4MO17	413.3	1.84	2.20
5MO16	523.6	1.85	2.26
5MO17	544.9	1.85	2.30
5MO18	457.9	1.84	2.26
5MO19	408.6	1.84	2.23
5MO20	444.7	1.84	2.23
6MO10	453.8	1.84	2.25
6MO11	497.9	1.84	2.21
6MO12	483.3	1.85	2.25

*Nota. Las cepas marcadas con color azul representan las cepas que no se lograron identificar.
Elaboración propia*

Se realizó una electroforesis de los productos de PCR fúngicos para visualizar los fragmentos de ADN amplificados. La Figura 1 muestra el tamaño y la integridad de los productos de PCR, permitiendo evaluar la calidad de la amplificación y la presencia de artefactos. La figura de electroforesis sirve como representación visual de los resultados de la PCR y proporciona información sobre el éxito del proceso de amplificación. Se obtuvo un fragmento esperado de 610 bp que representa la región ITS. No se observa amplificación en 5 cepas, estas cepas fueron: 3BP26, 1MO32, 4MO14, 6MO11 y 6MO12.

Después de la amplificación por PCR, las cepas de hongos se secuenciaron mediante el laboratorio externo MacroGen Korea para identificarlas a nivel de especie. La Tabla 9 muestra la identificación de 40 cepas de hongos, resultado de la secuenciación. En esta Tabla se incluyen las especies o cepas de hongos específicas identificadas en función de la región genética ITS. Esta Tabla proporciona información crucial para comprender la diversidad y composición de la comunidad de hongos de las fincas del Ingenio Magdalena. No se obtuvieron resultados contundentes de las cepas 3BP26, 1MO32, 4MO14, 6MO11 y 6MO12.

Tabla 9

Identificación molecular de 45 cepas fúngicas con base a secuenciación de la región ITS amplificada en el ADN genómico.

Cepa	Blast match	Accession ID	Porcentaje de identidad
------	-------------	--------------	-------------------------

1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	98,02 %
1CA11	<i>Penicillium pimateouiense</i>	MK956944.1	96,07 %
1CA13	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	ON544079.1	90,00 %
1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>	MK111527.1	98,22 %
4AB8	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	99,01 %
4AB9	<i>Neopyrenochaeta chiangraiensis</i>	NR168875.1	96,60 %
2AB21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KF709213.1	99,21 %
2AB23	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	95,14 %
2AB28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX853766.1	99,60 %
3AB10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	97,35 %
1AP28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KU508795.1	99,22 %
1AP30	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KU508795.1	98,14 %
1AP31	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ON790468.1	75,19 %
3AP28	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	85,74 %
4AP14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	99,00 %
1BP24	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	99,39 %
1BP25	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	99,21 %
2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	MT214376.1	74,85 %
4BP13	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	ON544079.1	98,26 %
3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX853766.1	100 %
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	ON544079.1	93,07 %
3BP21	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	89,84 %
3BP22	<i>Pleosporales sp</i>	HQ649995.1	92,53 %
3BP23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MK722295.1	99,60 %
3BP24	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	87,30 %
3BP25	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	MT582794.1	99,39 %
3BP26	NI	NI	NI
1MO28	<i>Talaromyces funiculosus</i>	MK805484.1	84,62 %
1MO29	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	89,94 %
1MO31	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	86,27 %
1MO32	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	KJ869162.1	80,90 %
1MO34	NI	NI	NI
1MO36	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	88,64 %
4MO12	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>	KY588814.1	95,37 %
4MO13	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	80,83 %
4MO14	NI	NI	NI
4MO17	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	96,28 %
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	89,09 %
5MO17	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	95,56 %
5MO18	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	94,40 %
5MO19	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	MT108978.1	94,11 %
5MO20	<i>Bjerkandera adusta</i>	MK764886.1	98,53 %
6MO10	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	ON544079.1	98,90 %
6MO11	NI	NI	NI
6MO12	NI	NI	NI

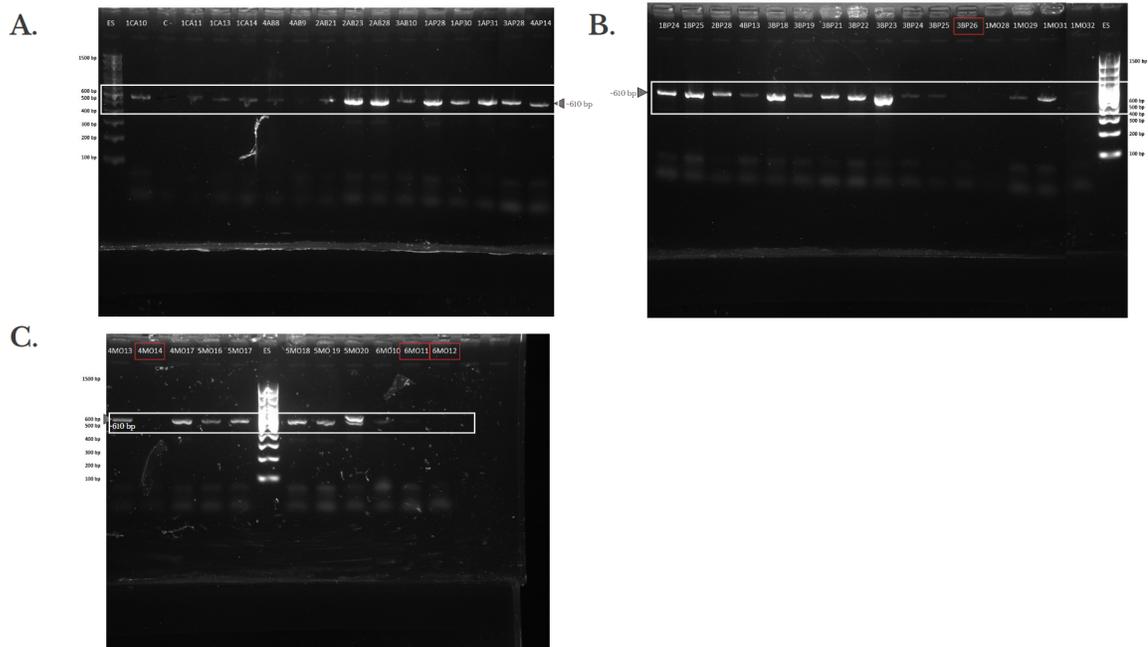
Nota. NI: No identificado

Elaboración propia

Se generó una gráfica de las especies de hongos para ilustrar la abundancia de diferentes especies de hongos dentro de las fincas de Ingenio Magdalena (Figura 2). Esta figura proporciona una representación visual de la composición de la comunidad de hongos, destacando la prevalencia de las especies *Setophaeosphaeria hemerocallidis* y *Cladosporium cladosporioides* y contribuyendo a la comprensión de la dinámica ecológica dentro del hábitat muestreado.

Figura 1

Amplificación de fragmentos específicos de ITS con ADN genómico de 45 cepas fúngicas.

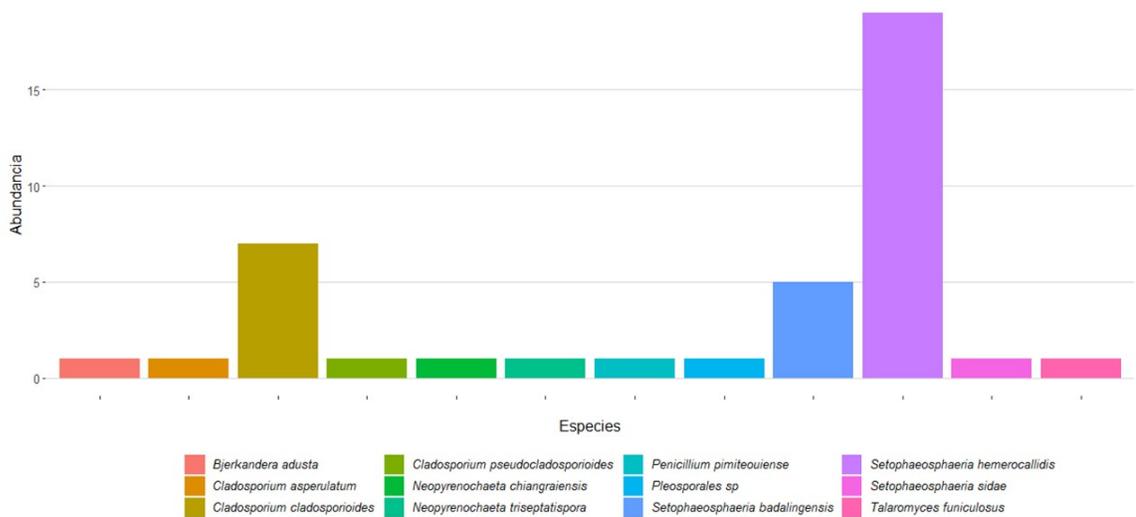


Nota. A. Cepas de la 1CA10 a la 4AP14 usando una escalera de 100 bp en el primer pozo. B. Cepas de la 1MO34 a la 1MO32 usando una escalera de 100 bp en el último pozo. C. Cepas de la 1CA10 a la 6MO12 usando una escalera de 100 bp en el pozo 9.

Elaboración propia

Figura 2

Abundancia de especies en las 45 cepas tomadas de distintas fincas del Ingenio Magdalena. Información adicional sobre especies individuales se encuentra en el Anexo A.



Nota. Elaboración propia

Asimismo, se realizó un fichero que presenta las actividades de interés de cada cepa, junto con su identificación. Estas fichas también contienen información importante acerca de la especie de hongo identificado. Los Tablas se pueden encontrar en la sección de anexos (Anexo A) de este mismo trabajo.

8.2 Pruebas de antagonismo fúngico

Se construyó un Tabla de selección para dilucidar las 14 cepas de hongos candidatas para la prueba de antagonismo. La Tabla 10 incluye especie y características relevantes de cada cepa (Sánchez González, 2023), atributos específicos que las hizo adecuadas para la prueba de antagonismo. La selección de estas cepas es crucial para evaluar sus posibles interacciones antagónicas.

Tabla 10

Selección de 14 cepas candidatas para la prueba de antagonismo tomando en cuenta la especie y actividades de interés.

Cepa	Especie	Características importantes
1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
1CA11	<i>Penicillium pimiteouiense</i>	Producción de proteasas, producción de lipasas y producción de quitinasas.
1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>	Solubilización de fósforo, producción de proteasas, producción de lipasas y producción de gluconasas.
2AB21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de lipasas y producción de gluconasas.
4AP14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de lipasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	Solubilización de fósforo, producción de lipasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas y producción de gluconasas.
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de lipasas y producción de gluconasas.
3BP25	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	Solubilización de fósforo, producción de proteasas, producción de lipasas y producción de gluconasas.
1MO28	<i>Talaromyces funiculosus</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de lipasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
1MO32	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas y producción de gluconasas.
4MO12	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.
5MO20	<i>Bjerkandera adusta</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas y producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

La Figura 3 muestra la matriz de la prueba de antagonismo realizada con las 14 cepas de hongos seleccionadas. Esta matriz detalla las interacciones entre las cepas de hongos, proporcionando una descripción completa de su comportamiento antagónico. Las cepas 2AB21, 4AP14, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO20 presentaron una mayor actividad antagónica, mientras que las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 4MO12 y 5MO16 resultaron no antagónicas al realizar la prueba. Los resultados de la prueba de antagonismo ofrecen información valiosa sobre las posibles capacidades de biocontrol y las interacciones entre las cepas de hongos, lo que contribuye a la comprensión de sus funciones y aplicaciones ecológicas.

La Tabla 11 muestra la clasificación de las 14 cepas seleccionadas, junto con su especie, para la prueba de antagonismo. Se identificaron 9 cepas fúngicas no antagónicas candidatas para su uso como biofertilizantes y 5 cepas antagónicas. Este Tabla facilita la visualización de los resultados de la matriz mostrada en la figura anterior. Asimismo, favorece la realización de propuestas de formulación de biofertilizantes.

Tabla 11

Clasificación de cepas según prueba de antagonismo.

No antagónicas		Antagónicas	
Cepa	Especie	Cepa	Especie
1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	2AB21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
1CA11	<i>Penicillium pimiteouiense</i>	3BP25	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>
1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>	1MO28	<i>Talaromyces funiculosus</i>
4AP14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	1MO32	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>
2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	5MO20	<i>Bjerkandera adusta</i>
3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>		
4MO12	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>		
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>		

Nota. Elaboración propia

8.3 Propuestas de biofertilizante

En la Tabla 12 se muestran las propuestas de formulación de biofertilizantes. Se realizaron 3 propuestas con las cepas que menor comportamiento antagónico presentaron. Las primeras dos propuestas contienen 3 especies distintas de hongos, mientras que la tercera propuesta contiene 5 especies diferentes de hongos. Además, se muestran Tablas 13, 14, 15 de las formulaciones junto con las habilidades y datos importantes de cada cepa.

Tabla 12

Propuestas de formulación para biofertilizantes.

No.	Cepas	Especies
1	1CA10, 1CA11, 4MO12	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i> , <i>Penicillium pimiteouiense</i> , <i>Setophaeosphaeria sidae</i>
2	3BP18, 3BP19, 5MO16	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Setophaeosphaeria badalingensis</i> , <i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>
3	1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP19, 5MO16	<i>Penicillium pimiteouiense</i> , <i>Cladosporium asperulatum</i> , <i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i> , <i>Setophaeosphaeria badalingensis</i> , <i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>

Nota. Elaboración propia

Tabla 13

Propuesta de formulación 1 con las habilidades de cada cepa.

Cepa	Especie	Actividades	Datos importantes
1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.	Residen dentro de los tejidos vegetales, han demostrado beneficios en la agricultura, incluido el desarrollo de la planta.
1CA11	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>	Producción de proteasas, producción de lipasas y producción de quitinasas.	Se asocia con hojas de ciertas especies de plantas.
4MO12	<i>Penicillium pimateouiense</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.	Son abundantes en diversos ambientes de suelo, como suelos cultivados, suelos de bosques, suelos desérticos y también suelos de playas.

Nota. Elaboración propia

Tabla 14

Propuesta de formulación 2 con las habilidades de cada cepa.

Cepa	Especie	Actividades	Datos importantes
3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas y producción de gluconasas.	Son insecticidas biológicos eficientes, particularmente contra insectos que han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos.
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de lipasas y producción de gluconasas.	Es filogenéticamente distinta de <i>S. setosa</i> y <i>S. hemerocallidis</i> , y también tiene conidios más pequeños que los observados en <i>S. hemerocallidis</i>
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.	Residen dentro de los tejidos vegetales, han demostrado beneficios en la agricultura, incluido el desarrollo de la planta.

Nota. Elaboración propia

Tabla 15

Propuesta de formulación 3 con las habilidades de cada cepa.

Cepa	Especie	Actividades	Datos importantes
------	---------	-------------	-------------------

1CA11	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>	Producción de proteasas, producción de lipasas y producción de quitinasas.	Se asocia con hojas de ciertas especies de plantas.
1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>	Solubilización de fósforo, producción de proteasas, producción de lipasas y producción de gluconasas.	Residen dentro de los tejidos vegetales, han demostrado beneficios en la agricultura, incluido el desarrollo de la planta.
2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	Solubilización de fósforo, producción de lipasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.	Muestra actividad antimicrobiana contra <i>B. subtilis</i> y contra <i>M. plumbeus</i> .
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de lipasas y producción de gluconasas.	Es filogenéticamente distinta de <i>S. setosa</i> y <i>S. hemerocallidis</i> , y también tiene conidios más pequeños que los observados en <i>S. hemerocallidis</i> .
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de potasio, producción de proteasas, producción de quitinasas y producción de gluconasas.	Residen dentro de los tejidos vegetales, han demostrado beneficios en la agricultura, incluido el desarrollo de la planta.

Nota. Elaboración propia

Análisis de resultados

El presente estudio tenía como objetivo analizar las especies de hongos de interés capaces de mejorar la salud del suelo para su uso como biofertilizantes en el monocultivo de la caña de azúcar, mediante identificación molecular de las diferentes cepas obtenidas y pruebas de antagonismo realizadas a las cepas candidatas. Para esto, se obtuvieron datos a partir de la secuenciación de la región ITS de ADN genómico, lo que permitió obtener la abundancia de especies presentes en las distintas fincas del Ingenio Magdalena. Además, se seleccionaron 14 cepas candidatas de 45 para la prueba de antagonismo, donde, a partir de una matriz, se obtuvieron las interacciones entre ellas.

Para la identificación molecular de las 45 cepas fúngicas se inició con una extracción de ADN genómico de cada una. Se destacó el uso de nitrógeno líquido para romper la pared celular en lugar de la enzima liticasa durante el proceso de extracción del ADN genómico. El uso de nitrógeno líquido para la lisis celular ofrece una alteración de las células rápida, eficiente y rentable, al tiempo que preserva la integridad del material biológico y produce ADN de alta calidad (Phillips, Giovinazzi, Menz, Son, y Gunjan, 2021). Se empleó el kit de purificación de ADN genómico Wizard® y, a pesar de la desviación del método convencional, el aislamiento de ADN genómico resultó con concentraciones superiores a 1000 ng/ul y una pureza aceptable para la extracción expresada en los valores de las razones A260/A280 y A260/A230 (Tabla 7). El rendimiento total promedio de ADN de 1 ml de cultivo líquido utilizando el kit es de 3 a 4 ug (Promega Corporation, 2021). Este alto rendimiento de ADN sugiere la eficacia del kit de purificación de ADN genómico Wizard® para aislar ADN genómico de alto peso molecular de las muestras, incluso cuando se utiliza un método alternativo para la lisis celular. Además, la lisis celular basada en nitrógeno líquido se ha asociado con altos rendimientos de ADN, como se ha demostrado en diversos estudios donde se obtuvieron concentraciones superiores a 1000 ng/ul (Abdel-Latif y Osman, 2017). Las altas concentraciones de ADN obtenidas fueron adecuadas para la secuenciación posterior de las 45 cepas fúngicas.

La Tabla 8 de cuantificación del producto de PCR de la región ITS de 45 cepas reveló la amplificación exitosa de la región ITS para la mayoría de las cepas (Tabla 8). Sin embargo, la figura que muestra el gel de electroforesis de los productos de PCR indicó que cinco cepas (3BP26, 1MO34, 4MO14, 6MO11 y 6MO12) no amplificaron ningún gen (Figura 1). Esta discrepancia entre la Tabla de cuantificación y la cifra de electroforesis resalta la variabilidad en el éxito de la amplificación entre las cepas probadas. El sedimento de ADN se pudo haber perdido durante la precipitación con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se debe tener cuidado al retirar este reactivo para evitar perder el pellet. Una incorrecta dilución en el ADN puede aportar a esta discrepancia debido a que, antes de realizar una nueva PCR, las diluciones pueden ayudar a recrear la banda original y potencialmente mejorar la amplificación (Sack, Davoli, Xu, Li, y Elledge, 2016). Por otra parte, la degradación del ADN pudo haber afectado, ya que la contaminación por nucleasa, enzima que rompe la columna

vertebral del ARN o del ADN, puede disminuir considerablemente la cantidad de ADN cargado en el gel (Schoch et al., 2012). Asimismo, la mala integridad, la baja pureza y la cantidad insuficiente de plantilla de ADN pueden afectar la amplificación de fragmentos de ADN (D.-X. Zhang y Hewitt, 2003). Al abordar estos desafíos comunes, se puede mejorar la amplificación de la región ITS en PCR y mejorar la precisión de la identificación a nivel de especie en cepas de hongos.

La región ITS se usa comúnmente para la identificación de hongos debido a que es una región altamente conservada en el ADN de los hongos que exhibe suficiente variabilidad para distinguir entre diferentes especies (Turenne, Sanche, Hoban, Karlowsky, y Kabani, 1999). La región ITS está ubicada entre la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) del grupo de genes del ARN ribosómico y está presente en múltiples copias en el genoma del hongo (Turenne et al., 1999). La amplificación por PCR de la región ITS seguida de secuenciación se puede utilizar para identificar diferentes especies de hongos (Ferrer et al., 2001). Es reconocida por su utilidad en sistemática, filogenética e identificación a nivel de especie en varios linajes de hongos (?). La región ITS es ampliamente aceptada como el estándar de oro por los taxónomos de hongos y está reconocida para fines de identificación por varias bases de datos y autoridades taxonómicas (Iquebal et al., 2021). Sin embargo, estudios recientes han cuestionado la utilidad de la región ITS para delimitar, reconocer e identificar especies de hongos en ciertos linajes, destacando la necesidad de enfoques de identificación alternativos en algunos casos (Lücking et al., 2020). A pesar de estas consideraciones, la región ITS sigue siendo una herramienta valiosa para la identificación de hongos y es el marcador genético secuenciado con mayor frecuencia en la investigación de hongos (Nilsson et al., 2015).

La Tabla 9, que contiene la identificación a nivel de especie de 40 cepas de hongos, proporcionó información valiosa sobre la diversidad de la comunidad de hongos en las fincas del Ingenio Magdalena. Cabe mencionar que esta diversidad no es real debido a que no se realizó un proceso de tamizaje de toda la dilución. Este Tabla muestra la cepa, el lugar de origen de la muestra, la especie identificada, el código de acceso de NCBI y el porcentaje de identidad (Tabla 9). El porcentaje de identidad varía entre 74,85 % (2BP18) y 100 % (3BP18). Este porcentaje se utiliza comúnmente para comparar las secuencias ITS de diferentes cepas de hongos (Lücking et al., 2020). El porcentaje de límites de identidad para la identificación de hongos puede variar según el grupo de hongos y el marcador genético utilizado. Por ejemplo, un valor umbral del 99 % es adecuado para distinguir especies en la mayoría de los linajes del género *Cortinarius* utilizando toda la región ITS, pero sólo el 90 % es adecuado para distinguir especies en otros linajes (Garnica et al., 2016). Comúnmente se aplica un límite porcentual de similitud del 98,5 % según el consenso internacional para la secuenciación ITS para la identificación de especies de hongos (Salem-Bango et al., 2023). Es posible que el porcentaje de identidad en la identificación molecular de hongos no siempre sea ideal. La identificación molecular de los hongos a menudo se basa en códigos de barras de ADN, que implican comparar las secuencias genéticas de regiones específicas, como la región ITS en este caso (Hoang et al., 2019). Los hongos exhiben variabilidad genética y el umbral de identidad porcentual para la delimitación de especies puede variar entre diferentes niveles taxonómicos (Vu et al., 2019). Además, la variación genética entre cepas de hongos puede verse influenciada por la ubicación geográfica. Estas variaciones se pueden deber a distintos factores como la distancia geográfica, las interacciones huésped-patógeno, las condiciones ambientales y el intercambio genético (Freese y Beyhan, 2023).

Sin embargo, se evidencia la ausencia de información sobre las cepas 3BP26, 1MO32, 4MO14, 6MO11 y 6MO12 (Tabla 9). Esta ausencia de información se atribuyó a la falta de amplificación de la región ITS en la PCR para estas cepas específicas. La incapacidad de amplificar la región ITS resalta los desafíos asociados con los métodos de identificación basados en PCR y la variabilidad en el éxito de la amplificación entre diferentes cepas de hongos. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar enfoques de identificación alternativos y la necesidad de una interpretación cuidadosa de los resultados basados en PCR, especialmente cuando se trata de muestras de hongos ambientales (Turenne et al., 1999).

La abundancia de especies de hongos en fincas del Ingenio Magdalena reveló que *Setophaeosphaeria hemerocallidis* y *Cladosporium cladosporioides* fueron las especies más abundantes (Figura 2). Este hallazgo es consistente con estudios previos que han informado la presencia de estas especies de hongos en plantas de caña de azúcar (Peng et al., 2021). Los endófitos

(categoría que puede incluir a *Setophaeosphaeria hemerocallidis*), como los hongos que residen dentro de los tejidos vegetales, han demostrado beneficios en la agricultura, incluida la mejora del rendimiento y el crecimiento de las plantas (Watts, Palombo, Jaimes Castillo, y Zaferanloo, 2023). Estos microorganismos pueden actuar como defensores de las plantas, promotores del crecimiento y competidores contra microbios dañinos (Karunarathna, Ashwath, y Jeewon, 2021).

Del mismo modo, *Cladosporium cladosporioides* ha mostrado beneficios potenciales en la agricultura y campos relacionados. Este hongo es eficaz como agente de biocontrol contra plagas de insectos como *Bemisia tabaci*, comúnmente conocida como mosca blanca (Islam et al., 2019). Se ha demostrado que exhibe propiedades que promueven el crecimiento de las plantas, incluida la producción de compuestos volátiles que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas (Răut et al., 2021). Se han asociado con la producción de metabolitos secundarios con relevancia biotecnológica y actividades biológicas. Estos metabolitos pueden tener aplicaciones en diversos contextos agrícolas y biotecnológicos (Mohamed y Ibrahim, 2021).

La presencia de especies como *Bjerkandera adusta*, *Neopyrenochaeta chiangraiensis*, *Neopyrenochaeta triseptatispora*, *Penicillium pimiteouiense*, *Pleosporales sp.*, *Talaromyces funiculosus*, el género *Cladosporium* y el género *Setophaeosphaeria* resalta la rica comunidad de hongos presentes en los cultivos de caña de azúcar en diferentes sitios de plantación. Algunos de estos hongos pueden desempeñar funciones beneficiosas en el ciclo de nutrientes, la promoción del crecimiento de las plantas y la supresión de enfermedades, mientras que otros pueden tener potencial patógeno o contribuir a la descomposición del material vegetal (Shrestha, Szaro, Bruns, y Taylor, 2011). Información detallada de cada especie, junto con sus actividades se puede evidenciar en la sección de anexos (Anexo A) a partir de la Figura 4. Asimismo, las actividades tomadas por Sánchez (2022), como solubilización de fósforo y potasio y producción de quitinasas, proteasas, gluconasas y lipasas, se relacionan con el crecimiento de las plantas. La presencia de estas actividades en las cepas de hongos fomenta la captación de nutrientes de parte de las plantas, promoviendo el crecimiento y rendimiento de estas. Por el contraste, la prevalencia de muchas especies de hongos en las plantaciones de caña de azúcar puede tener implicaciones para la salud y la productividad de las plantas, ya que algunas especies de hongos pueden causar enfermedades y reducir el rendimiento de los cultivos (Van Bael, 2020).

La identificación de estas especies de hongos subraya la importancia de comprender la dinámica ecológica dentro de los ecosistemas de caña de azúcar. También destaca el potencial de realizar más investigaciones para dilucidar las funciones importantes de estos hongos y sus interacciones con las plantas de caña de azúcar. Además, la presencia de estas especies de hongos en los cultivos de caña de azúcar puede tener implicaciones para el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles y estrategias de manejo de enfermedades en el cultivo de caña de azúcar (Costa et al., 2023). El uso de herramientas y técnicas moleculares, como los códigos de barras de ADN y la secuenciación del genoma completo, pueden ayudar a identificar con precisión especies de hongos y proporcionar información sobre sus relaciones evolutivas y sus funciones funcionales en el ecosistema (Vu et al., 2019). Se necesitan más investigaciones para analizar los impactos potenciales de la diversidad de hongos en la producción de caña de azúcar y desarrollar estrategias efectivas para el manejo de enfermedades fúngicas en las granjas de caña de azúcar.

La cuidadosa elección de cepas de hongos es esencial en las pruebas de antagonismo para evaluar su capacidad de crecer en conjunto y recomendar una posible formulación de biofertilizante con varios microorganismos. La Tabla de selección destaca 14 cepas seleccionadas de un grupo de 45 candidatas, brindando una base sólida para la evaluación de sus actividades antagónicas y especies de interés (Tabla 10). El proceso de selección tomó en cuenta las especies y actividades de interés, con el objetivo de identificar cepas con posibles propiedades antagónicas que podrían ser valiosas para su uso como biofertilizante. Se tomó en cuenta la presencia de solubilización de fósforo y de potasio en la mayoría de las cepas seleccionadas. La solubilización de fósforo es muy importante para la salud del suelo de la caña de azúcar, ya que es un elemento crítico requerido por esta en cantidades significativas (Rosa et al., 2020). La solubilización del potasio también es beneficiosa, especialmente en condiciones afectadas por la sal, pero el fósforo juega un papel más crucial en el crecimiento y desarrollo de la caña de azúcar (Olaniyan et al., 2022). Las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2AB21, 4AP14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 3BP25, 1MO28, 1MO32, 4MO12, 5MO16 y 5MO20

fueron seleccionadas con base a sus actividades previamente descritas por Sánchez (2022). Se tomó en cuenta la presentación de al menos 3 de las 6 actividades siguientes: solubilización de fósforo y potasio y producción de proteasas, lipasas, gluconasas y quitinasas; y la representación de cada especie identificada. Además, la prueba de antagonismo de estas cepas de hongos seleccionadas es un paso fundamental en la evaluación de sus posibles propiedades bioactivas, incluidas las actividades antagonistas contra otros hongos. El resultado de lo anterior proporciona información valiosa sobre las funciones ecológicas de estos hongos y sus posibles aplicaciones en la agricultura, la biotecnología y la investigación de productos naturales (Roth, Westrick, y Baldwin, 2023).

Los resultados de esta prueba de antagonismos demostraron que las cepas 2AB21, 4AP14, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO20 (*Cladosporium cladosporioides*, *Setophaeosphaeria hemerocallidis*, *Cladosporium pseudocladosporioides*, *Talaromyces funiculosus*, *Setophaeosphaeria badalingensis* y *Bjerkandera adusta*, respectivamente) presentaron una mayor actividad antagónica (Figura 3). La cepa 2AB21 presentó actividad antagónica contra las cepas: 3BP18, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO16. La cepa 4AP14 presentó actividad antagónica contra: 3BP25, 4MO12 y 5MO20. La cepa 3BP25 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21 y 4AP14. La cepa 1MO28 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21 y 3BP25. La cepa 1MO32 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21, 3BP25 y 1MO28. La cepa 5MO20 presentó actividad antagónica contra: 1CA14, 4AP14 y 4MO12.

Esta interacción antagónica sugiere el potencial de estas cepas de hongos para inhibir el crecimiento o las actividades de otras cepas, destacando sus propiedades bioactivas y sus posibles funciones en el control biológico o la investigación de productos naturales (Kaewchai, Soyong, y Hyde, 2009). Las interacciones antagónicas entre cepas de hongos pueden ocurrir mediante competencia por recursos, antibiosis, micoparasitismo y otros mecanismos (Mathivanan et al., 2008). Se ha identificado la producción de metabolitos secundarios a muchas de estas especies. Estos metabolitos han demostrado que presentan actividad antifúngica y antibacteriana, lo que soporta estos resultados de antagonismo (Figuras 4-15). Asimismo, especies como *Talaromyces funiculosus*, han demostrado presentar diversas implicaciones ecológicas y científicas (Figura 15).

Es posible que el uso de cepas de hongos antagonistas en biofertilizantes pueda conducir a la supresión de hongos beneficiosos, lo que puede afectar negativamente la salud del suelo y el crecimiento de las plantas (Thambugala et al., 2020). Esto ocurre debido a que las cepas de hongos antagonistas inhiben el crecimiento de las cepas beneficiosas utilizadas en la formulación de biofertilizantes. Además, el uso de cepas de hongos antagonistas en biofertilizantes conduce al desarrollo de resistencia en el patógeno objetivo, lo que puede reducir la eficacia del biofertilizante con el tiempo (Sornakili, Thankappan, Sridharan, Nithya, y Uthandi, 2020). A pesar que estas cepas coexisten en el suelo, la presencia de cepas de hongos antagonistas puede verse influenciada por el pH del suelo y los niveles de nutrientes (Köhl, Kolnaar, y Ravensberg, 2019). Algunas pueden prosperar en condiciones específicas de pH o nutrientes, lo que lleva a interacciones antagónicas con otros habitantes del suelo (Köhl et al., 2019). También puede variar espacial y temporalmente (Li et al., 2019). Esta variación puede verse influenciada por factores como la textura del suelo, la humedad y la presencia de otros microorganismos (Li et al., 2019).

Se hace mención a las cepas 1CA10 y 3BP25 (*Setophaeosphaeria hemerocallidis* y *Cladosporium pseudocladosporioides*) debido a que presentaron actividad antagónica a partir de sus metabolitos secretados (Figura 15). Las interacciones antagónicas entre los metabolitos de los hongos ocurren a través de varios mecanismos, que incluyen antibiosis, competencia y parasitismo (Mathivanan et al., 2008). En la placa se muestra una competencia entre los metabolitos producidos por ambas cepas, que logró inhibir el crecimiento de los hongos. Los agentes de biocontrol de hongos producen una variedad de metabolitos secundarios, como antibióticos y toxinas, que contribuyen a su actividad antagonista contra otros microorganismos (Masi et al., 2018). Estos metabolitos son capaces de inhibir el crecimiento de otros hongos y microorganismo (Masi et al., 2018).

Por el contrario, la ausencia de interacciones antagónicas, como lo indican los signos negativos, proporciona información sobre las relaciones no antagónicas entre cepas de hongos específicas (Figura 3). Las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 4MO12 y 5MO16 (*Setophaeosphaeria hemerocallidis*, *Penicillium pimiteouiense*, *Cladosporium asperulatum*,

Neopyrenochaeta triseptatispora, *Cladosporium cladosporioides*, *Setophaeosphaeria badalingensis*, *Setophaeosphaeria sidae* y *Setophaeosphaeria hemerocallidis*, respectivamente) resultaron no antagónicas al realizar la prueba. Estas cepas no presentaron actividad antagónica entre ellas, por lo que son capaces de crecer conjuntamente. Pueden ser cepas candidatas como uso para biofertilizantes, debido a que presentan desarrollo y crecimiento normal en ambientes compartidos y poseen buenas características promotoras del crecimiento. Comprender estas interacciones no antagónicas también es valioso, ya que contribuye a la caracterización de la dinámica ecológica y los patrones de coexistencia dentro de la comunidad de hongos. Tomando en cuenta que todas estas cepas son pertenecientes a distintas especies, se recomienda seleccionarlas como posibles formulaciones para biofertilizantes con base a las actividades intrínsecas.

En la Figura 3 se muestran recuadros sin color. Estas pruebas no se lograron determinar debido a contaminación de las placas, sin embargo, son resultados relevantes para seguir el estudio debido a que podrían ampliar en los resultados presentados. Se recomienda realizarlas para determinar otras posibles cepas antagónicas y sugerir posibles formulaciones con los datos completos. Para futuras pruebas, se recomienda utilizar una cantidad menor de solución de esporas para que la gota se logre absorber en el agar. De esta manera, se evitaría contaminación por condensación de la placa.

Se sugiere emplear una formulación con 1CA11, 4MO12 y 2BP18 (*Setophaeosphaeria hemerocallidis*, *Penicillium pimiteouiense* y *Setophaeosphaeria sidae*) debido a que, juntas presentan todas las actividades de interés (solubilización de fósforo y potasio y producción de proteasas, lipasas, gluconasas y quitinasas) y son capaces de crecer en conjunto. Otra posible formulación debe contener las cepas 3BP18, 3BP19, 5MO16 (*Cladosporium cladosporioides*, *Setophaeosphaeria badalingensis* y *Setophaeosphaeria hemerocallidis*) ya que, juntas, también presentan todas las actividades de interés y son capaces de coexistir. Se sugiere una última formulación para un fertilizante que contenga las cepas 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP19, 5MO16 (*Penicillium pimiteouiense*, *Cladosporium asperulatum*, *Neopyrenochaeta triseptatispora*, *Setophaeosphaeria badalingensis* y *Setophaeosphaeria hemerocallidis*) por tener una mayor diversidad de especies y por presentar todas las actividades de interés. Estas actividades de interés fomentan el crecimiento y desarrollo de las plantas y la salud en general del suelo. Asimismo, se sugiere analizar individualmente estas cepas para evaluar sus rasgos combinados de promoción del crecimiento de las plantas (PGP) y evaluar su capacidad de mejorar la fertilidad del suelo.

La cantidad de especies de hongos presentes en la formulación de un biofertilizante puede variar según la formulación específica y el uso previsto. En general, los biofertilizantes fúngicos pueden contener una variedad de especies de hongos, incluidas aquellas con actividad antagonista contra patógenos vegetales (Hernández-Álvarez, Peimbert, Rodríguez-Martin, Trejo-Aguilar, y Alcaraz, 2023). Los biofertilizantes deben diseñarse de tal manera que garanticen la viabilidad, estabilidad y compatibilidad de los hongos con otras materias primas agrícolas (Pirttilä, Mohammad Parast Tabas, Baruah, y Koskimäki, 2021). Esto implica identificar y desarrollar cepas y rasgos fúngicos capaces de contribuir a la salud del suelo y al crecimiento de las plantas (Agbodjato et al., 2022).

- A partir de la secuenciación se lograron identificar a nivel de especie las 40 cepas de hongos capaces de mejorar la salud del suelo y el desarrollo del monocultivo.
- Se demostró que el género de hongos más abundante en las fincas del Ingenio Magdalena es *Setophaeosphaeria*, siendo la especie *Setophaeosphaeria hemerocallidis* la que más predomina en las fincas.
- Se encontró que, de las 14 cepas, las cepas 2AB21, 4AP14, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO20 presentaron una mayor actividad antagónica. La cepa 2AB21 presentó actividad antagónica contra las cepas: 3BP18, 3BP25, 1MO28, 1MO32 y 5MO16. Por otra parte, la cepa 4AP14 presentó actividad antagónica contra: 3BP25, 4MO12 y 5MO20. Asimismo, la cepa 3BP25 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21 y 4AP14. Igualmente, la cepa 1MO28 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21 y 3BP25. De la misma manera, la cepa 1MO32 presentó actividad antagónica contra: 1CA10, 1CA14, 2AB21, 3BP25 y 1MO28. Por último, la cepa 5MO20 presentó actividad antagónica contra: 1CA14, 4AP14 y 4MO12.
- Las cepas propuestas para la primera formulación de un biofertilizante a base de hongos fueron 1CA11, 4MO12 y 2BP18 por sus actividades de interés y su capacidad de crecer en conjunto. Entre sus actividades de interés se pueden mencionar la solubilización de fósforo y potasio y la producción de proteasas, lipasas, gluconasas y quitinasas.
- Otra posible formulación debe contener las cepas 3BP18, 3BP19, 5MO16 ya que, juntas, también presentan todas las actividades de interés y son capaces de coexistir.
- Se sugiere una última formulación para un fertilizante que contenga las cepas 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP19, 5MO16 por tener una mayor diversidad de especies y por presentar las actividades solubilización de fósforo y potasio y producción de proteasas, lipasas, gluconasas y quitinasas.
- Estas propuestas de formulaciones son capaces de asegurar la viabilidad, estabilidad y compatibilidad de los hongos con otros insumos agrícolas.

CAPÍTULO 11

Recomendaciones

- Se sugiere identificar a nivel de especie las cepas 3BP26, 1MO34, 4MO14, 6MO11 y 6MO12 debido a la ausencia de información obtenida en la secuenciación. Se recomienda realizar de nuevo una extracción de ADN y secuenciar las cepas fúngicas para obtener información de estas.
- Determinar el antagonismo de las cepas faltantes para sugerir una posible formulación de un biofertilizante de manera más contundente.
- Analizar las cepas propuestas para realizar la formulación de un biofertilizante, tomando en cuenta su eficacia para mejorar la composición del suelo, la obtención de nutrientes y la salud del monocultivo.
- Identificar los metabolitos secundarios de las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 4MO12 y 5MO16 para obtener una mayor información acerca de las actividades de los hongos y su capacidad como posibles biofertilizantes.
- Preservar las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 4MO12 y 5MO16 seleccionadas como candidatas para uso como biofertilizante para asegurar de conservar su viabilidad.
- Formular un biofertilizante con las cepas 1CA10, 1CA11, 1CA14, 2BP18, 3BP18, 3BP19, 4MO12 y 5MO16 y monitorear con métodos de ingeniería genética estas cepas para evaluar su viabilidad.

Referencias

- Abbey, L., Abbey, J., Leke-Aladekoba, A., Iheshiulo, E. M.-A., y Ijenyo, M. (2019). Biopesticides and biofertilizers: types, production, benefits, and utilization. [Biopesticidas y biofertilizantes: tipos, producción, beneficios y utilización]. *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels*, 479–500.
- Abdel-Latif, A., y Osman, G. (2017). Comparison of three genomic dna extraction methods to obtain high dna quality from maize. [Comparación de tres métodos de extracción de adn genómico para obtener adn de alta calidad a partir de maíz]. *Plant methods*, 13, 1–9.
- Abhilash, P., y Singh, N. (2009). Pesticide use and application: An indian scenario. [Uso y aplicación de pesticidas: un escenario indio]. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1), 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.061>
- Adams, J. U. (2008). Dna sequencing technologies. [Tecnologías de secuenciación de adn]. *Nature Education*, 1, 193.
- Agbodjato, N. A., Assogba, S. A., Babalola, O. O., Koda, A. D., Aguégué, R. M., Sina, H., ... Baba-Moussa, L. (2022). Formulation of biostimulants based on arbuscular mycorrhizal fungi for maize growth and yield. [Formulación de bioestimulantes a base de hongos micorrízicos arbusculares para el crecimiento y rendimiento del maíz]. *Frontiers in Agronomy*, 4. doi: [10.3389/fagro.2022.894489](https://doi.org/10.3389/fagro.2022.894489)
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., y Wang, M.-Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. [Toxicidad de metales pesados y pesticidas en suelos y plantas agrícolas: riesgos ecológicos e implicaciones para la salud humana]. *Toxics*, 9(3), 42.
- Anwer, M. A. (2017). *Biopesticides and bioagents: novel tools for pest management*. [Biopesticidas y bioagentes: nuevas herramientas para el manejo de plagas]. CRC Press.
- ASAZGUA. (2020). *Evolución de la agroindustria azucarera de guatemala*. <https://www.azucar.com.gt/historia/>.
- Azuddin, N. F., Mohamad Noor Azmy, M. S., y Zakaria, L. (2023). Molecular identification of endophytic fungi in lawn grass (*axonopus compressus*) and their pathogenic ability. [Identificación molecular de hongos endófitos en césped (*axonopus compressus*) y su capacidad patógena]. *Scientific Reports*, 13(1), 4239.
- Bashan, Y., de Bashan, L. E., Prabhu, S., y Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). [Avances en la tecnología de inoculantes bacterianos promotores del crecimiento vegetal: formulaciones y perspectivas prácticas (1998-2013)]. *Plant and soil*, 378, 1–33.

- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., y Kausserud, H. (2010). Its as an environmental dna barcode for fungi: an in silico approach reveals potential pcr biases. [ITS como código de barras de adn ambiental para hongos: un enfoque in silico revela posibles sesgos de la pcr]. *BMC microbiology*, 10, 1–9.
- Bellow, J. G., Roxanne, F., Hudson, y Ramachandran, N. (2008). Adoption potential of fruit-tree-based agroforestry on small farms in the subtropical highlands. [Potencial de adopción de la agrosilvicultura basada en árboles frutales en pequeñas explotaciones agrícolas de las tierras altas subtropicales]. *Agroforestry Systems*, 23-36.
- Bhandari, G. (2014). An overview of agrochemicals and their effects on environment in nepal. [Una visión general de los agroquímicos y sus efectos sobre el medio ambiente en nepal]. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), 66–73.
- Bhushan, L., y Pathma, J. (2021). Impact of agro-chemicals on environment: A global perspective. [Impacto de los agroquímicos en el medio ambiente: una perspectiva global]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 1–14.
- Black, C. (1993). *Soil fertility evaluation and control (1st ed.)*. [Evaluación y control de la fertilidad del suelo (1ª ed.)]. CRC Press.
- Bonneville, S., Delpomdor, F., Préat, A., Chevalier, C., Araki, T., Kazemian, M., ... Benning, L. G. (2020). Molecular identification of fungi microfossils in a neoproterozoic shale rock. [Identificación molecular de microfósiles de hongos en una roca de esquisto neoproterozoica]. *Science advances*, 6(4), eaax7599.
- Breure, A. M. (2004). Soil biodiversity: measurements, indicators, threats and soil functions. [Biodiversidad del suelo: mediciones, indicadores, amenazas y funciones del suelo]. En *International conference soil and compost eco-biology. spain*.
- Burford, E. P., Kierans, M., y Gadd, G. M. (2003). Geomycology: fungi in mineral substrata. [Geomicrología: hongos en sustratos minerales]. *Mycologist*, 17(3), 98–107.
- Cárceles Rodríguez, B., Durán-Zuazo, V. H., Soriano Rodríguez, M., García-Tejero, I. F., Gálvez Ruiz, B., y Cuadros Tavira, S. (2022). Conservation agriculture as a sustainable system for soil health: A review. [La agricultura de conservación como sistema sostenible para la salud del suelo: una revisión]. *Soil Systems*, 6(4), 87.
- Chaudhary, P., Singh, S., Chaudhary, A., Sharma, A., y Kumar, G. (2022). Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture. [Descripción general de los biofertilizantes en la producción de cultivos y el manejo del estrés para una agricultura sostenible]. *Frontiers in Plant Science*, 13, 930340.
- Chen, D., Saeed, M., Ali, M. N. H. A., Raheel, M., Ashraf, W., Hassan, Z., ... others (2023). Plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and arbuscular mycorrhizal fungi combined application reveals enhanced soil fertility and rice production. [La aplicación combinada de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (pgpr) y hongos micorrízicos arbusculares revela una mayor fertilidad del suelo y producción de arroz]. *Agronomy*, 13(2), 550.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2016). Genbank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67–D72.
- Copping, L. G., y Menn, J. J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. [Bioplaguicidas: una revisión de su acción, aplicaciones y eficacia]. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(8), 651–676.
- Costa, F. d. F., Souza, R. S. C. d., Voidaleski, M. F., Gomes, R. R., Reis, G. F., Lima, B. J. F. d. S., ... Vicente, V. A. (2023, 04 de Oct). Sugarcane: an unexpected habitat for black yeasts in chaetothyriales. [Caña de azúcar: un hábitat inesperado para las levaduras negras en chaetothyriales]. *IMA Fungus*, 14(1), 20. doi: 10.1186/s43008-023-00124-7
- Cui, Z., Dou, Z., Chen, X., Ju, X., y Zhang, F. (2014, 01 de Jan). Managing agricultural nutrients for food security in china: Past, present, and future. [Gestión de nutrientes agrícolas para la seguridad alimentaria en china: pasado, presente y futuro]. *Agronomy Journal*, 106(1), 191-198. doi: 10.2134/agronj2013.0381
- Daniel, A. I., Fadaka, A. O., Gokul, A., Bakare, O. O., Aina, O., Fisher, S., ... Klein, A. (2022). Biofertilizer: the future of food security and food safety. [Biofertilizantes: el futuro de la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos]. *Microorganisms*, 10(6), 1220.

- Deravel, J., Krier, F., y Jacques, P. (2014, 01). Biopesticides, a complementary and alternative approach to the use of agrochemicals. a review. [Bioplaguicidas, un enfoque complementario y alternativo al uso de agroquímicos. una revisión]. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 18, 220-232.
- Devi, P., y Kumar, P. (2020). Enhancement effect of biofertilizers on germination percentage and plant height in maize grown under chromium toxic soil. [Efecto potenciador de los biofertilizantes sobre el porcentaje de germinación y la altura de las plantas en maíz cultivado en suelos tóxicos con cromo.]. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 702–707.
- Dijkshoorn, L., Ursing, B., y Ursing, J. (2000). Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. [Cepa, clon y especie: comentarios sobre tres conceptos básicos de bacteriología]. *Journal of medical microbiology*, 49(5), 397–401.
- Dizkirici, A., y Kalmer, A. (2019, 03). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. [Utilidad de varios marcadores moleculares en la identificación y filogenia de hongos]. *Nova Hedwigia*, 109, 187-224. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2019/0528
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., y El-Fakharany, E. M. (2022). A comprehensive insight into fungal enzymes: Structure, classification, and their role in mankind's challenges. [Una visión completa de las enzimas fúngicas: estructura, clasificación y su papel en los desafíos de la humanidad]. *Journal of Fungi*, 8(1). doi: 10.3390/jof8010023
- El Sheikha, A. F. (2019). Molecular detection of mycotoxigenic fungi in foods: The case for using pcr-dgge. [Detección molecular de hongos micotoxigénicos en alimentos: el caso del uso de pcr-dgge]. *Food Biotechnology*, 33(1), 54–108.
- FAO. (2019). *Sugar. oecd-fao agricultural outlook 2019-2028, 155-165. [Azúcar. perspectivas agrícolas ocde-fao 2019-2028, 155-165].* <https://www.fao.org/3/ca4076en/ca4076en.pdf?eloutlink=imf2fao>.
- FAO. (2021). *¿qué es el suelo?* <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>.
- FAO. (2023). *Soil fertility. [Fertilidad del suelo].* <https://bit.ly/3Wn0rrU>.
- FAPDA. (2014). *Socio-economic context and role of agriculture - guatemala. country fact sheet on food and agriculture policy trends. [Contexto socioeconómico y papel de la agricultura - guatemala. ficha informativa por país sobre las tendencias en materia de políticas alimentarias y agrícolas].* <https://www.fao.org/3/i4124e/i4124e.pdf>.
- Ferrer, C., Colom, F., Frasés, S., Mulet, E., Abad, J. L., y Alió, J. L. (2001). Detection and identification of fungal pathogens by pcr and by its2 and 5.8s ribosomal dna typing in ocular infections. [Detección e identificación de patógenos fúngicos mediante pcr y tipificación de adn ribosómico its2 y 5.8s en infecciones oculares]. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2873-2879. doi: 10.1128/jcm.39.8.2873-2879.2001
- FoodPrint. (2018). *Soil health is affected by industrial agriculture. [La salud del suelo se ve afectada por la agricultura industrial].* <https://foodprint.org/issues/how-industrial-agriculture-affects-our-soil/>.
- Fraç, M., Hannula, S. E., Bełka, M., y Jędrzycka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. [Biodiversidad fúngica y su papel en la salud del suelo]. *Frontiers in microbiology*, 9, 707.
- Freese, J., y Beyhan, S. (2023). Genetic diversity of human fungal pathogens. [Diversidad genética de hongos patógenos humanos]. *Current Clinical Microbiology Reports*, 10(2), 17–28.
- Garnica, S., Schön, M. E., Abarenkov, K., Riess, K., Liimatainen, K., Niskanen, T., ... Ammirati, J. F. (2016, 02). Determining threshold values for barcoding fungi: lessons from Cortinarius (Basidiomycota), a highly diverse and widespread ectomycorrhizal genus. [Determinación de valores umbral para hongos con códigos de barras: lecciones de Cortinarius (Basidiomycota), un género de ectomicorrizas muy diverso y extendido]. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw045. doi: 10.1093/femsec/fiw045
- Ghannoum, M. A., y Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. [Agentes antifúngicos: modo de acción, mecanismos de resistencia y correlación de estos mecanismos con la resistencia bacteriana]. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501-517. doi: 10.1128/cmr.12.4.501

- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. [Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: mecanismos y aplicaciones.]. *Scientifica*, 2012.
- Gloer, J. B. (1995). The chemistry of fungal antagonism and defense. [La química del antagonismo y la defensa de los hongos]. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1265–1274.
- Guangzhou, W., Li, X., Xi, X., y Cong, W.-F. (2022, 05). Crop diversification reinforces soil microbiome functions and soil health. [La diversificación de cultivos refuerza las funciones del microbioma del suelo y la salud del suelo.]. *Plant and Soil*, 476. doi: 10.1007/s11104-022-05436-y
- Gupta, P. K. (2004). Pesticide exposure—indian scene. [Exposición a pesticidas: escena india]. *Toxicology*, 198(1-3), 83–90.
- Hagh-Doust, N., Färkkilä, S. M., Moghaddam, M. S. H., y Tedersoo, L. (2022). Symbiotic fungi as biotechnological tools: methodological challenges and relative benefits in agriculture and forestry. [Hongos simbióticos como herramientas biotecnológicas: desafíos metodológicos y beneficios relativos en agricultura y silvicultura]. *Fungal Biology Reviews*, 42, 34–55.
- Hariharan, G., y Prasannath, K. (2021). Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. [Avances recientes en el diagnóstico molecular de patógenos fúngicos de plantas: una mini revisión]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 600234.
- Harris, D. R., y Fuller, D. Q. (2014). Agriculture: definition and overview. [Agricultura: definición y descripción general]. *Encyclopedia of global archaeology*, 104–113.
- Heather, J. M., y Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing dna. [La secuencia de secuenciadores: La historia de la secuenciación del adn]. *Genomics*, 107(1), 1–8.
- Hernández-Álvarez, C., Peimbert, M., Rodríguez-Martin, P., Trejo-Aguilar, D., y Alcaraz, L. D. (2023). A study of microbial diversity in a biofertilizer consortium. [Un estudio de diversidad microbiana en un consorcio de biofertilizantes]. *Plos one*, 18(8), e0286285.
- Hill, G., Mitkowski, N., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L., Jurkonie, D., Ficke, A., . . . Nelson, E. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. [Métodos para evaluar la composición y diversidad de las comunidades microbianas del suelo]. *Applied soil ecology*, 15(1), 25–36.
- Hoang, M. T. V., Irinyi, L., Chen, S. C. A., Sorrell, T. C., T. I. B. o. M. F. W. G., Meyer, W., . . . Maria Zancopé-Oliveira, R. (2019). Dual dna barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections. [Código de barras de adn dual para la identificación molecular de los agentes de infecciones fúngicas invasivas]. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01647
- Horrigan, L., Lawrence, R. S., y Walker, P. (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. [Cómo la agricultura sostenible puede abordar los daños ambientales y a la salud humana de la agricultura industrial]. *Environmental health perspectives*, 110(5), 445–456.
- Ingenio Magdalena. (2022). *Estrategia - ingenio magdalena*. <https://www.imsa.com.gt/estrategia/>.
- Iqbal, M. A., Jaiswal, S., Mishra, V. K., Jasrotia, R. S., Angadi, U. B., Singh, B. P., . . . Kumar, D. (2021). Fungal genomic resources for strain identification and diversity analysis of 1900 fungal species. [Recursos genómicos de hongos para la identificación de cepas y el análisis de la diversidad de 1900 especies de hongos]. *Journal of Fungi*, 7(4). doi: 10.3390/jof7040288
- Islam, T., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Mahmud, N. U., Mazlan, N., y Islam, T. (2019). Identification and application of a fungal biocontrol agent cladosporium cladosporioides against bemisia tabaci. [Identificación y aplicación de un agente de biocontrol fúngico cladosporium cladosporioides contra bemisia tabaci]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1698-1705. doi: 10.1080/13102818.2019.1695541
- ISO. (2022). *Iso sugar yearbook 2022*. <https://www.isosugar.org/publication/296/iso-sugar-yearbook-2022>.
- Jänsch, S., Amorim, M., y Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. [Identificación de los requisitos ecológicos de importantes especies de prueba ecotoxicológicas terrestres]. *Environmental Reviews*, 13(2), 51–83.

- Jansson, J. K., y Hofmockel, K. S. (2018). The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. [El microbioma del suelo: de la metagenómica a la metafenómica]. *Current opinion in microbiology*, 43, 162–168.
- Jastrow, J., Amonette, J., y Bailey, V. (2007, 01). Mechanisms controlling soil carbon turnover and their potential application for enhancing carbon sequestration. [Mecanismos que controlan la rotación de carbono en el suelo y su posible aplicación para mejorar el secuestro de carbono]. *Climatic Change*, 80, 5-23. doi: 10.1007/s10584-006-9178-3
- Jorgensen, S. E., y Fath, B. D. (2008). *Encyclopedia of ecology*. [Enciclopedia de ecología]. Elsevier.
- Joshi, S. (2006). *Biopesticides: a biotechnological approach*. [Biopesticidas: un enfoque biotecnológico]. New Age International.
- Kaewchai, S., Soyong, K., y Hyde, K. (2009, 11). Mycofungicides and fungal biofertilizers. [Micofungicidas y biofertilizantes fúngicos]. *Reviews, Critiques and New Ideas, Fungal Diversity*, 38, 25-50.
- Kafkafi, U., y Kant, S. (2013, 12). Fertigation. [Fertirrigación]. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 1-9. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.05161-7
- Karunaratna, S. C., Ashwath, N., y Jeewon, R. (2021). Editorial: The potential of fungi for enhancing crops and forestry systems. [Editorial: El potencial de los hongos para mejorar los cultivos y los sistemas forestales]. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.813051
- Khan, M., Mobin, M., Zahid, A., y Alamri, S. (2017, 12). Fertilizers and their contaminants in soils, surface and groundwater. [Fertilizantes y sus contaminantes en suelos, aguas superficiales y subterráneas]. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09888-2
- Kim, N., Riggins, C., Zabaloy, M., Allegrini, M., Rodriguez-Zas, S., y Villamil, M. (2022, 04). High-resolution indicators of soil microbial responses to n fertilization and cover cropping in corn monoculture. [Indicadores de alta resolución de las respuestas microbianas del suelo a la fertilización nitrogenada y los cultivos de cobertura en el monocultivo de maíz]. *Agronomy*, 12, 954. doi: 10.3390/agronomy12040954
- Köljal, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., ... others (2013). *Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi*. [Hacia un paradigma unificado para la identificación de hongos basada en secuencias]. Wiley Online Library.
- Krasilnikov, P., Taboada, M., y Amanullah, P. (2022, 03). Fertilizer use, soil health and agricultural sustainability. [Uso de fertilizantes, salud del suelo y sostenibilidad agrícola]. *Agriculture*, 12, 462. doi: 10.3390/agriculture12040462
- Kumar, P., y Dubey, K. (2020, 10). Biotechnological interventions for arbuscular mycorrhiza fungi (amf) based biofertilizer: Technological perspectives. [Intervenciones biotecnológicas para biofertilizantes basados en hongos micorrizas arbusculares (hma): perspectivas tecnológicas]. En (p. 161-191). doi: 10.1007/978-981-15-6895-4_9
- Kumar, S., Sindhu, S. S., y Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. [Biofertilizantes: una tecnología ecoamigable para el reciclaje de nutrientes y la sostenibilidad ambiental]. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100094.
- Köhl, J., Kolnaar, R., y Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. [Modo de acción de los agentes de control biológico microbiano contra las enfermedades de las plantas: relevancia más allá de la eficacia]. *Frontiers in Plant Science*, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00845
- Lengai, G., y Muthomi, J. (2018, 01). Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. [Bioplaguicidas y su papel en la producción agrícola sostenible]. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06, 7-41. doi: 10.4236/jbm.2018.66002
- Li, X., Garbeva, P., Liu, X., Gunnewiek, P., Clocchiatti, A., Hundscheid, M., ... de Boer, W. (2019, 10). Volatile-mediated antagonism of soil bacterial communities against fungi. [Antagonismo mediado por volátiles de las comunidades bacterianas del suelo contra los hongos]. *Environmental Microbiology*, 22. doi: 10.1111/1462-2920.14808
- Liu, C., Kuchma, O., y Krutovsky, K. (2018, 07). Mixed-species versus monocultures in

- plantation forestry: Development, benefits, ecosystem services and perspectives for the future. [Especies mixtas versus monocultivos en plantaciones forestales: desarrollo, beneficios, servicios ecosistémicos y perspectivas para el futuro]. *Global Ecology and Conservation*, *15*, e00419. doi: 10.1016/j.gecco.2018.e00419
- Liu, Q., Pang, Z., Yang, Z., Fallah, N., Hu, C., Lin, W., y Yuan, Z. (2021, 11). Bio-fertilizer affects structural dynamics, function, and network patterns of the sugarcane rhizospheric microbiota. [El biofertilizante afecta la dinámica estructural, la función y los patrones de red de la microbiota rizosférica de la caña de azúcar]. *Microbial Ecology*, *84*, 1-17. doi: 10.1007/s00248-021-01932-3
- Lu, J., Bai, Z., Chadwick, D., Velthof, G., Zhao, H., Li, X., ... Ma, L. (2019, 1 de octubre). Mitigation options to reduce nitrogen losses to water from crop and livestock production in china. [Opciones de mitigación para reducir las pérdidas de nitrógeno al agua procedentes de la producción agrícola y ganadera en china]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *40*, 95-107. doi: 10.1016/j.cosust.2019.10.002
- Lücking, R., Aime, M., Robbertse, B., Miller, A., Ariyawansa, H., Aoki, T., ... Schoch, C. (2020, 07). Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal dna barcoding?. [Identificación inequívoca de hongos: ¿dónde nos encontramos y qué tan exactos y precisos son los códigos de barras del adn de los hongos?]. *IMA Fungus*, *11*, 14. doi: 10.1186/s43008-020-00033-z
- Madawala, H. (2021, 01). Arbuscular mycorrhizal fungi as biofertilizers: Current trends, challenges, and future prospects. [Hongos micorrízicos arbusculares como biofertilizantes: tendencias actuales, desafíos y perspectivas futuras]. En (p. 83-93). doi: 10.1016/B978-0-12-821667-5.00029-4
- Malviya, M., Solanki, M., Li, C., Htun, R., Singh, R., Singh, P., y Li, Y. (2020, 09). Sugarcane microbiome: role in sustainable production. [Microbioma de la caña de azúcar: papel en la producción sostenible]. doi: 10.1016/B978-0-12-819715-8.00007-0
- MARN. (2017). *Informe ambiental del estado de guatemala. ciudad de guateamala: Ministerio de ambiente y recursos naturales*. [https://www.marn.gob.gt/wpfd_file/informe – ambiental – del – estado – de – guatemala/](https://www.marn.gob.gt/wpfd_file/informe%20-%20ambiental%20-%20estado%20-%20de%20-%20guatemala/).
- Masi, M., Nocera, P., Reveglia, P., Cimmino, A., y Evidente, A. (2018, 04). Fungal metabolite antagonists of plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. [Antagonistas de metabolitos fúngicos de plagas de plantas y patógenos humanos: estudios de relación estructura-actividad]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*. doi: 10.3390/molecules23040834
- Mathivanan, N., Prabavathy, V., y Vijayanandraj, R. (2008, 01). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens. [El efecto de los metabolitos secundarios de los hongos sobre los patógenos bacterianos y fúngicos]. En (Vol. 14, p. 129-140). doi: 10.1007/978-3-540-74543-3_7
- Matsumoto, T., Cifuentes, O., y Masunaga, T. (2013, 04). Characterization of soil properties in relation to maize productivity in andosols of the western highland of guatemala. [Caracterización de las propiedades del suelo en relación con la productividad del maíz en andosoles del altiplano occidental de guatemala]. *Soil Science and Plant Nutrition*, *59*. doi: 10.1080/00380768.2012.760430
- McGale, E., y Sanders, I. R. (2022). Integrating plant and fungal quantitative genetics to improve the ecological and agricultural applications of mycorrhizal symbioses. [Integración de genética cuantitativa de plantas y hongos para mejorar las aplicaciones ecológicas y agrícolas de las simbiosis de micorrizas]. *Current Opinion in Microbiology*, *70*, 102205.
- Millard, J., Outhwaite, C., Kinnersley, R., Freeman, R., Gregory, R., Adedoja, O., ... Newbold, T. (2021, 05). Global effects of land-use intensity on local pollinator biodiversity. [Efectos globales de la intensidad del uso de la tierra en la biodiversidad de los polinizadores locales]. *Nature Communications*, *12*. doi: 10.1038/s41467-021-23228-3
- Minoiu, D. (1999). *Fao experience, activities and views in the area of policies for sustainable agricultural development: conceptual and practical approach. reu technical series (fao)*. [Experiencia, actividades y opiniones de la fao en el ámbito de las políticas para el

- desarrollo agrícola sostenible: enfoque conceptual y práctico. serie técnica reu (fao)*.
<https://www.fao.org/3/AD238E/ad238e09.htm>.
- Mohamed, G. A., y Ibrahim, S. R. M. (2021). Untapped potential of marine-associated cladosporium species: An overview on secondary metabolites, biotechnological relevance, and biological activities. [Potencial sin explotar de las especies de cladosporium asociadas al medio marino: una descripción general de los metabolitos secundarios, la relevancia biotecnológica y las actividades biológicas]. *Marine Drugs*, 19(11). doi: 10.3390/md19110645
- Nath, D., Maurya, B. R., y Meena, V. S. (2017). Documentation of five potassium- and phosphorus-solubilizing bacteria for their k and p-solubilization ability from various minerals. [Documentación de cinco bacterias solubilizadoras de potasio y fósforo por su capacidad de solubilización de k y p a partir de varios minerales]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 174-181. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.007>
- Neal, R. H., Sposito, G., Holtzclaw, K. M., y Traina, S. J. (s.f.). Selenite adsorption on alluvial soils: I. soil compaction and ph effects. [Adsorción de selenita en suelos aluviales: I. compactación del suelo y efectos del ph]. , 51, 1161–1165.
- Nguyen, T. T., Do, T., Harper, R., Pham, T. T., Vũ, T., Linh, T., ... Giap, N. (2020, 08). Soil health impacts of rubber farming: The implication of conversion of degraded natural forests into monoculture plantations. [Impactos del cultivo de caucho en la salud del suelo: las implicaciones de la conversión de bosques naturales degradados en plantaciones de monocultivos]. *Agriculture*, 10, 357. doi: 10.3390/agriculture10080357
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., ... others (2015). A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. [Un conjunto de datos de secuencia ITS de hongos completo y actualizado automáticamente para el control de quimeras basado en referencias en esfuerzos de secuenciación ambiental]. *Microbes and environments*, 30(2), 145–150.
- O’Callaghan, M., Ballard, R., y Wright, D. (2022, 04). Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. [Inoculantes microbianos del suelo para la agricultura sostenible: limitaciones y oportunidades]. *Soil Use and Management*, 38. doi: 10.1111/sum.12811
- Odoh, C., Eze, C., Obi, C., Francis, A., Kingsley, E., Unah, U., ... Adobu, U. (2020, 06). Fungal biofertilizers for sustainable agricultural productivity. [Biofertilizantes fúngicos para una productividad agrícola sostenible]. En (p. 199-225). doi: 10.1007/978-3-030-45971-0_9
- Olaniyan, F. T., Alori, E. T., Adekiya, A. O., Ayorinde, B. B., Daramola, F. Y., Osemwegie, O. O., y Babalola, O. O. (2022). The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. [El uso de solubilizantes microbianos de potasio en el suelo en la disponibilidad de nutrientes de potasio en el suelo y su dinámica]. *Annals of Microbiology*, 72(1), 45.
- Pavao-Zuckerman, M. (2008). Soil ecology. [Ecología del suelo].
- Peng, N., Yao, Z., Wang, Z., Huang, J., Khan, T., Chen, B., y Zhang, M.-q. (2021). *Fungal deterioration of the bagasse storage from the harvested sugarcane. [Deterioro fúngico del almacenamiento de bagazo de caña cosechada]*. doi: 10.21203/rs.3.rs-392960/v1
- Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmão, L., y Amorim, A. (2010, 10). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. [Identificación de especies mediante análisis multiplex de secuencias de longitud variable]. *Nucleic acids research*, 38, e203. doi: 10.1093/nar/gkq865
- Pervaiz, Z., Iqbal, J., Zhang, Q., Chen, D., Wei, H., y Saleem, M. (2020, 09). Continuous cropping alters multiple biotic and abiotic indicators of soil health. [El cultivo continuo altera múltiples indicadores bióticos y abióticos de la salud del suelo]. *Soil Systems*, 4. doi: 10.3390/soilsystems4040059
- Phillips, E., Giovinazzi, S., Menz, S., Son, Y., y Gunjan, A. (2021, 01). Preparation of cell extracts by cryogrinding in an automated freezer mill. [Preparación de extractos celulares mediante criomolienda en un molino congelador automatizado]. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/61164

- Pirttilä, A. M., Mohammad Parast Tabas, H., Baruah, N., y Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. [Biofertilizantes y agentes de biocontrol para la agricultura: cómo identificar y desarrollar nuevas cepas y rasgos microbianos potentes]. *Microorganisms*, 9(4), 817.
- Prasad, M. N. V., y Smol, M. (2023). *Sustainable and circular management of resources and waste towards a green deal. [Gestión sostenible y circular de recursos y residuos hacia un acuerdo verde]*. Elsevier.
- Promega Corporation. (2021). *Wizard genomic dna purification kit. [Kit de purificación de adn genómico wizard]*. <https://bit.ly/4dgiA0N>.
- Rai, M., Pant, G., Pant, K., Aloo, B. N., Kumar, G., Singh, H. B., y Tripathi, V. (2023). Microplastic pollution in terrestrial ecosystems and its interaction with other soil pollutants: A potential threat to soil ecosystem sustainability. [Contaminación por microplásticos en ecosistemas terrestres y su interacción con otros contaminantes del suelo: una amenaza potencial para la sostenibilidad de los ecosistemas del suelo]. *Resources*, 12(6), 67.
- Ram, R. M., Debnath, A., Negi, S., y Singh, H. (2022). Chapter 22 - use of microbial consortia for broad spectrum protection of plant pathogens: regulatory hurdles, present status and future prospects. [Capítulo 22 - uso de consorcios microbianos para la protección de amplio espectro de patógenos vegetales: obstáculos regulatorios, estado actual y perspectivas futuras]. En *Biopesticides* (p. 319-335). Woodhead Publishing. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00017-1>
- Rasool, R., Kukal, S., y Hira, G. (2007). Soil physical fertility and crop performance as affected by long term application of fym and inorganic fertilizers in rice-wheat system. [La fertilidad física del suelo y el rendimiento de los cultivos se ven afectados por la aplicación a largo plazo de fym y fertilizantes inorgánicos en el sistema arroz-trigo]. *Soil and Tillage research*, 96(1-2), 64-72.
- Rodriguez-Ramos, J. C., Cale, J. A., Cahill Jr, J. F., Simard, S. W., Karst, J., y Erbilgin, N. (2021). Changes in soil fungal community composition depend on functional group and forest disturbance type. [Los cambios en la composición de la comunidad de hongos del suelo dependen del grupo funcional y del tipo de perturbación forestal]. *New Phytologist*, 229(2), 1105-1117.
- Rosa, P. A. L., Mortinho, E. S., Jalal, A., Galindo, F. S., Buzetti, S., Fernandes, G. C., ... Teixeira Filho, M. C. M. (2020). Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. [Inoculación con bacterias promotoras del crecimiento asociada a la reducción de la fertilización con fosfato en la caña de azúcar]. *Frontiers in Environmental Science*, 8. doi: 10.3389/fenvs.2020.00032
- Roth, M. G., Westrick, N. M., y Baldwin, T. T. (2023). Fungal biotechnology: From yesterday to tomorrow. [Biotecnología fúngica: del ayer al mañana]. *Frontiers in Fungal Biology*, 4. doi: 10.3389/ffunb.2023.1135263
- Răut, I., Călin, M., Capră, L., Gurban, A.-M., Doni, M., Radu, N., y Jecu, L. (2021). Cladosporium sp. isolate as fungal plant growth promoting agent. [Cladosporium sp. aislar como agente promotor del crecimiento de plantas fúngicas]. *Agronomy*, 11(2). doi: 10.3390/agronomy11020392
- Sack, L. M., Davoli, T., Xu, Q., Li, M. Z., y Elledge, S. J. (2016). Sources of error in mammalian genetic screens. [Fuentes de error en las pruebas genéticas de mamíferos]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(9), 2781-2790.
- Salem-Bango, Z., Price, T. K., Chan, J. L., Chandrasekaran, S., Garner, O. B., y Yang, S. (2023). Fungal whole-genome sequencing for species identification: From test development to clinical utilization. [Secuenciación del genoma completo de hongos para la identificación de especies: desde el desarrollo de pruebas hasta la utilización clínica]. *Journal of Fungi*, 9(2), 183.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. [Secuenciación de adn con inhibidores de terminación de cadena]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santos, L. F., y Olivares, F. L. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. [Estructura del microbioma vegetal y beneficios para la agricultura sostenible]. *Current Plant Biology*, 26, 100198.

- Saud, D. (2021). *Monoculture farming: pros and cons explained*. [Monocultivos: explicación de los pros y los contras]. <https://dynamics.folio3.com/blog/monoculture-farming/>.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (its) region as a universal dna barcode marker for fungi. [Región espaciadora transcrita interna (its) del ribosoma nuclear como marcador de código de barras de adn universal para hongos]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Segre, J. (2020). *Metagenomics*. [Metagenómica]. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Metagenomics>.
- Sharma, P., Bora, L., Puzari, K., Baruah, A., Baruah, R., Talukdar, K., ... Phukan, A. (2017). Review on bacterial blight of rice caused by xanthomonas oryzae pv. oryzae: different management approaches and role of pseudomonas fluorescens as a potential biocontrol agent. [Revisión sobre la plaga bacteriana del arroz causada por xanthomonas oryzae pv. oryzae: diferentes enfoques de manejo y papel de pseudomonas fluorescens como potencial agente de biocontrol]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 982-1005.
- Shrestha, P., Szaro, T., Bruns, T., y Taylor, J. (2011, 06). Systematic search for cultivable fungi that best deconstruct cell walls of miscanthus and sugarcane in the field. [Búsqueda sistemática de hongos cultivables que deconstruyan mejor las paredes celulares de miscanthus y caña de azúcar en el campo]. *Applied and environmental microbiology*, 77, 5490-504. doi: 10.1128/AEM.02996-10
- Sinha, K., y Baten, M. (2021, 01). Regulating ecosystem services: Enhancements through sustainable management. [Regulación de los servicios ecosistémicos: mejoras mediante la gestión sostenible]. En (p. 817-829). doi: 10.1007/978-3-319-95981-8_32
- Sonja, B., Johan, S., Gail, F., Chuck, I., y David, C. (2011). Sustainable agriculture. [Agricultura sostenible]. *Nature Education Knowledge*, 1.
- Sornakili, A., Thankappan, S., Sridharan, A., Nithya, P., y Uthandi, S. (2020). Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. [Endófitos de hongos antagonistas y sus interacciones mediadas por metabolitos contra fitopatógenos en el arroz]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101525.
- Spark, K., y Swift, R. (2002). Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. [Efecto de la composición del suelo y la materia orgánica disuelta sobre la sorción de pesticidas]. *Science of the Total Environment*, 298(1-3), 147-161.
- Srivastava, S., Johny, L., y Adholeya, A. (2021, 03). Review of patents for agricultural use of arbuscular mycorrhizal fungi. [Revisión de patentes para uso agrícola de hongos micorrízicos arbusculares]. *Mycorrhiza*, 31. doi: 10.1007/s00572-021-01020-x
- Strong, W., y Holford, I. (1997). Fertilisers and manures. [Fertilizantes y abonos]. *Sustainable crop production in the sub-tropics: an Australian perspective.*, 214-234.
- Sánchez González, A. N. (2023). *Metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el monocultivo de saccharum officinarum*. <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/4845>.
- Tak, I.-u.-R., Hamid Dar, G., y Bhat, R. (2021, 04). Fungi and their potential as biofertilizers. [Los hongos y su potencial como biofertilizantes]. En (p. 233-250). doi: 10.1007/978-3-030-61010-4_11
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannagara, S. D., y Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. [Hongos versus hongos en el biocontrol: una descripción general de los antagonistas de hongos aplicados contra los hongos patógenos de las plantas]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fcimb.2020.604923
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., y Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical p cycle. [Funciones de los microorganismos solubilizadores de fosfato, desde el manejo de la deficiencia de fósforo del suelo hasta la mediación del ciclo biogeoquímico del p]. *Biology*, 10(2), 158.
- Tripathi, S., Srivastava, P., Devi, R., y Bhadouria, R. (2019, 07). Influence of synthetic fertilizers and

- pesticides on soil health and soil microbiology. [Influencia de fertilizantes y pesticidas sintéticos en la salud y la microbiología del suelo]. En (p. 00). doi: 10.1016/B978-0-08-103017-2.00002-7
- Turenne, C. Y., Sanche, S. E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. A., y Kabani, A. M. (1999). Rapid identification of fungi by using the *its2* genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. [Identificación rápida de hongos mediante el uso de la región genética *its2* y un sistema automatizado de electroforesis capilar fluorescente]. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1846–1851.
- Udeigwe, T. K., Teboh, J. M., Eze, P. N., Stietiya, M. H., Kumar, V., Hendrix, J., ... Kandakji, T. (2015). Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. [Implicaciones de las principales prácticas de producción agrícola sobre la calidad ambiental y la salud humana]. *Journal of environmental management*, 151, 267–279.
- UF/IFAS. (s.f.). *Agronomic crops - plant pathology*. [Cultivos agronómicos - fitopatología]. <https://plantpath.ifas.ufl.edu/extension/solutions-for-your-plants/agronomic-crops/>.
- Universidad del Valle de Guatemala. (2023). *Centro de estudios en biotecnología (ceb) - uvg*. <https://www.uvg.edu.gt/investigacion/ceb/>.
- USDA. (2022). *Guatemala: Sugar annual*. <https://www.fas.usda.gov/data/guatemala-sugar-annual-7>.
- Van Bael, S. A. (2020). *Fungal diversity*. [Diversidad de hongos] (Vol. 12) (n.º 11). MDPI.
- van Es, H., y Magdoff, F. (2009). *Building soils for better crops*. [Construyendo suelos para mejores cultivos].
- van Leeuwen, C. (2010, 04). Terroir: The effect of the physical environment on vine growth, grape ripening and wine sensory attributes. [Terroir: El efecto del entorno físico sobre el crecimiento de la vid, la maduración de la uva y los atributos sensoriales del vino]. *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality*, 273-315. doi: 10.1533/9781845699284.3.273
- Vassileva, M., Mendes, G. d. O., Deriu, M. A., Benedetto, G. d., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., ... Vassilev, N. (2022). Fungi, p-solubilization, and plant nutrition. [Hongos, solubilización de p y nutrición vegetal]. *Microorganisms*, 10(9), 1716.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. [Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes]. *Plant and soil*, 255, 571–586.
- Viana, C. M., Freire, D., Abrantes, P., Rocha, J., y Pereira, P. (2022). Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. [Importancia de los sistemas de tierras agrícolas para apoyar la seguridad alimentaria y los objetivos de desarrollo sostenible: una revisión sistemática]. *Science of the total environment*, 806, 150718.
- Vosatka, M., y Albrechtová, J. (2009, 08). Benefits of arbuscular mycorrhizal fungi to sustainable crop production. [Beneficios de los hongos micorrízicos arbusculares para la producción agrícola sostenible]. En (p. 205-225). doi: 10.1007/978-3-642-01979-1_10
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., ... others (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal dna barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. [La generación y el análisis a gran escala de códigos de barras de adn de hongos filamentosos aumentan la cobertura del reino de los hongos y revela umbrales para especies de hongos y una mayor delimitación de taxones]. *Studies in mycology*, 92(1), 135–154.
- Vázquez, A. (2016). *Técnicas de secuenciación de nueva generación*. facultad de farmacia. <https://docta.ucm.es/entities/publication/706c68ec-24d1-4b67-b6a4-bd17955c0e8f>.
- Wahab, A., Muhammad, M., Munir, A., Abdi, G., Zaman, W., Ayaz, A., ... Reddy, S. P. P. (2023). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in regulating growth, enhancing productivity, and potentially influencing ecosystems under abiotic and biotic stresses. [Papel de los hongos micorrízicos arbusculares en la regulación del crecimiento, la mejora de la productividad y la posible influencia en los ecosistemas bajo estrés abiótico y biótico]. *Plants*, 12(17). doi: 10.3390/plants12173102
- Wang, H., Xu, M., Zhou, B., Ma, X., y Duan, Y. (2018). Response and driving factors of bacterial and fungal community to long-term fertilization in black soil. [Respuesta y factores impulsores

- de la comunidad bacteriana y fúngica a la fertilización a largo plazo en suelo negro]. *Scientia Agricultura Sinica*, 51(5), 914–925.
- Wang, X., Whalley, W. R., Miller, A. J., White, P. J., Zhang, F., y Shen, J. (2020). Sustainable cropping requires adaptation to a heterogeneous rhizosphere. [El cultivo sostenible requiere adaptación a una rizosfera heterogénea]. *Trends in plant science*, 25(12), 1194–1202.
- Watts, D., Palombo, E. A., Jaimes Castillo, A., y Zaferanloo, B. (2023). Endophytes in agriculture: Potential to improve yields and tolerances of agricultural crops. [Endófitos en la agricultura: potencial para mejorar los rendimientos y la tolerancia de los cultivos agrícolas]. *Microorganisms*, 11(5). doi: 10.3390/microorganisms11051276
- White, Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990, 01). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. [Amplificación y secuenciación directa de genes de arn ribosomal de hongos para filogenética]. En (p. 315-322).
- Wieczorek, A. M., y Wright, M. G. (2012). History of agricultural biotechnology: How crop development has evolved. [Historia de la biotecnología agrícola: cómo ha evolucionado el desarrollo de cultivos]. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 9.
- World Bank. (2020). *Fertilizer consumption (kilograms per hectare of arable land) - guatemala*. [Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierra cultivable) - guatemala]. <https://data.worldbank.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS?locations=GT>.
- World Bank. (2022). *World development indicator 2008*. [Indicador de desarrollo mundial 2008]. <https://data.worldbank.org/indicador/SL.AGR.EMPL.ZS?locations=GT>.
- Yang, Q., Zheng, F., Jia, X., Liu, P., Dong, S., Zhang, J., y Zhao, B. (2020, 05). The combined application of organic and inorganic fertilizers increases soil organic matter and improves soil microenvironment in wheat-maize field. [La aplicación combinada de fertilizantes orgánicos e inorgánicos aumenta la materia orgánica del suelo y mejora el microambiente del suelo en el campo de trigo-maíz]. *Journal of Soils and Sediments*, 20. doi: 10.1007/s11368-020-02606-2
- Zandvakili, O., Barker, A., Hashemi, M., Etemadi, F., y Autio, W. (2019, 04). Comparisons of commercial organic and chemical fertilizer solutions on growth and composition of lettuce. [Comparaciones de soluciones comerciales de fertilizantes orgánicos y químicos sobre el crecimiento y composición de la lechuga]. *Journal of Plant Nutrition*, 42, 1-11. doi: 10.1080/01904167.2019.1589505
- Zhang, D.-X., y Hewitt, G. M. (2003). Nuclear dna analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. [Análisis de adn nuclear en estudios genéticos de poblaciones: práctica, problemas y perspectivas.]. *Molecular Ecology*, 12(3), 563-584. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x>
- Zhang, M., Muhammad, R., Zhang, L., Xia, H., Cong, M., y Jiang, C. (2019). Investigating the effect of biochar and fertilizer on the composition and function of bacteria in red soil. [Investigando el efecto del biocarbón y los fertilizantes sobre la composición y función de las bacterias en el suelo rojo]. *Applied Soil Ecology*, 139, 107–116.
- Zhong, W., y Cai, Z. (2007). Long-term effects of inorganic fertilizers on microbial biomass and community functional diversity in a paddy soil derived from quaternary red clay. [Efectos a largo plazo de los fertilizantes inorgánicos sobre la biomasa microbiana y la diversidad funcional de la comunidad en un suelo de arrozal derivado de arcilla roja cuaternaria]. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 84–91.

Anexo A Identificación de cepas

La sección de Anexos A proporciona información detallada sobre la identificación y características generales de las especies de hongos identificadas en el estudio. Esta información incluye aspectos como la clasificación taxonómica, la morfología macroscópica y microscópica, así como datos relevantes sobre el hábitat y la distribución de cada especie. Esta sección complementa y enriquece los hallazgos presentados en el cuerpo principal del trabajo, ofreciendo un recurso adicional para aquellos interesados en profundizar en el conocimiento de las especies estudiadas.

Figura 4

Ficha de identificación y características de la cepa perteneciente a la especie Bjerkandera adusta.

<i>Bjerkandera adusta</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
5MO20	+	+	+	-	-	+
Descripción						
<p><i>Bjerkandera adusta</i> es un basidiomiceto que pudre la madera y pertenece a los hongos de la pudrición blanca (Heinfling, <i>et al</i>, 1998). Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más eficientes en la naturaleza y también pueden oxidar compuestos xenobióticos, incluidos algunos contaminantes ambientales (Heinfling, <i>et al</i>, 1998). Se ha informado que muchos ascomicetos y basidiomicetos producen compuestos antibacterianos, antifúngicos e insecticidas, que utilizan para protegerse contra microorganismos e insectos no deseados en sus entornos naturales (Elkhateeb, 2021). La actividad antifúngica de los extractos de <i>Bjerkandera adusta</i> es mayor en <i>Fusarium inflexum</i> (Elkhateeb, 2021). Algunos extractos solventes de <i>Bjerkandera adusta</i> son efectivos contra tres bacterias Gram negativas (<i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) y tres bacterias Gram positivas (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Bacillus cereus</i>) (Elkhateeb, 2021).</p>						
Referencia						
<p>Castellari, C. C., Marcos Valle, F. J., & Pacin, A. M. (2021). Interactions between fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, aspergillus flavus link and talaromyces funiculosus thom in hermetic environments. <i>Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences</i>, 37(1), 11–20. https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-2IFCC30002</p> <p>Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus <i>Bjerkandera adusta</i>. <i>FEMS Microbiology Letters</i>, 165(1), 43-50.</p> <p>Elkhateeb, W. A. (2021). Highlights on the Golden Mushroom <i>Cantharellus cibarius</i> and unique Shaggy ink cap Mushroom <i>Coprinus comatus</i> and Smoky Bracket Mushroom <i>Bjerkandera adusta</i> Ecology and Biological Activities. <i>Open Access Journal of Mycology & Mycological Sciences</i>, 4(2). https://doi.org/10.23880/oajmms-16000143</p> <p>ŞahimerdanTürkölmez GökselÖzer SibelDerviş, A. (2022). The Effect of Talaromyces funiculosus ST976 Isolated from Pistacia vera Rhizosphere on Phosphorus Solubility in Soil Samples with Different Physicochemical Properties. <i>Journal</i>, 25(5), 1077–1085.</p>						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 5

Ficha de identificación y características de la cepa perteneciente a la especie *Cladosporium asperulatum*.

<i>Cladosporium asperulatum</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1CA14	+	-	+	+	-	+
Descripción						
<p><i>Cladosporium asperulatum</i> se puede encontrar en una variedad de hábitats, incluido el suelo, material vegetal en descomposición y en diversos sustratos (Alghuthaymi, 2017). También se puede encontrar como moho interior en edificios y hogares, particularmente en condiciones húmedas o húmedas (Alghuthaymi, 2017). <i>Cladosporium asperulatum</i> está filogenéticamente cerca de <i>C. myrtacearum</i> formando un clado hermano distinto (Bensch, Braun, Groenewald & Crous, 2012). Como otras especies de <i>Cladosporium</i>, es un hongo saprofito, lo que significa que obtiene nutrientes descomponiendo material orgánico muerto o en descomposición (Köhl, Kolnaar & Ravensberg, 2019). Su presencia en el suelo es una parte natural del ecosistema y, en general, no se considera perjudicial para las plantas ni para los seres humanos (Köhl, Kolnaar & Ravensberg, 2019).</p>						
Referencia						
<p>Alghuthaymi, M. A. (2017). Nanotools for molecular identification two novels <i>Cladosporium</i> cladosporioides species (Cladosporiaceae) collected from tomato phyloplane. <i>Journal of Yeast and Fungal Research</i>, 8(2), 11-18.</p> <p>Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus <i>cladosporium</i>. <i>Studies in mycology</i>, 72, 1-401.</p> <p>Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. <i>Frontiers in plant science</i>, 845.</p>						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 6

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Cladosporium cladosporioides*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
2AB21	+	+	+	+	-	+
2AB28	+	-	-	-	+	+
1AP28	+	-	+	-	-	+
1AP30	-	-	-	+	-	-
1AP31	+	-	-	-	-	+
3BP18	+	+	+	-	-	+
3BP23	+	-	-	-	-	+
Descripción						
<p>En <i>Cladosporium</i>, las especies se encuentran con mayor frecuencia en ambientes exteriores e interiores, materia orgánica en mal estado y se consideran contaminantes importantes para los alimentos (AlMatar & Makky, 2016). Son insecticidas biológicos eficientes, particularmente contra insectos que han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos (Dixon & Polak-Wyss, 1991). Muchas especies de <i>Cladosporium</i> también pueden producir algunos metabolitos secundarios, como antibióticos que son inhibidores de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> (Gallo, Seldes & Cabrera, 2004). <i>Cladosporium cladosporioides</i> normalmente crece en medio de papa-dextrosa agar (PDA) y genera conidios unicelulares (esporas). Se reconoce por la formación de colonias de 3 cm de diámetro, que son (las colonias son) de color verde oliva o marrón en el lado basal (AlMatar & Makky, 2016).</p>						
Referencia						
<p>AlMatar, M., & Makky, E. A. (2016). <i>Cladosporium cladosporioides</i> from the perspectives of medical and biotechnological approaches. 3 <i>Biotech</i>, 6, 1-8.</p> <p>Dixon, D. M., & Polak-Wyss, A. (1991). The medically important dematiaceous fungi and their identification: Medizinisch wichtige Schwärzepilze und ihre Identifizierung. <i>Mycoses</i>, 34(1-2), 1-18.</p> <p>Gallo, M. L., Seldes, A. M., & Cabrera, G. M. (2004). Antibiotic long-chain and α, β-unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus <i>Cladosporium</i> sp. <i>Biochemical systematics and ecology</i>, 32(6), 545-551.</p>						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 7

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Cladosporium pseudocladosporioides*.

<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
3BP25	+	-	+	+	-	+
Descripción						
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> es un hifomiceto saprobio común y extendido filogenética y morfológicamente muy cercano a <i>C. cladosporioides</i> (Bensch, <i>et al</i> , 2006). Se diferencian al formar un linaje separado en los análisis filogenéticos y por tener ramoconidios secundarios septados, más cortos y algo más estrechos, loci e hilios conidiogénicos más estrechos e hifas que a veces forman cuerdas (Bensch, <i>et al</i> , 2006). Sin embargo, la distinción entre las dos especies basándose únicamente en la morfología es difícil y no siempre es posible con certeza, lo que se complica además por la estructura genética interna del clado <i>C. pseudocladosporioides</i> (Rosado, <i>et al</i> , 2019).						
Referencia						
Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemsse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., ... & Crous, P. W. (2006). Species and ecological diversity within the <i>Cladosporium cladosporioides</i> complex (Davidiellaceae, Capnariales). <i>Studies in Mycology</i> , 55(1), 299-305. Rosado, A. W., Custodio, F. A., Pinho, D. B., Ferreira, A. P. S., & Pereira, O. L. (2019). <i>Cladosporium</i> species associated with disease symptoms on <i>Passiflora edulis</i> and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. <i>Phytotaxa</i> , 409(5), 239-260.						
P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.						

Nota. Elaboración propia

Figura 8

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Neopyrenochaeta changraiensis*.

<i>Neopyrenochaeta changraiensis</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
4AB9	+	-	-	-	-	+
Descripción						
<i>Neopyrenochaeta changraiensis</i> muestra una estrecha afinidad con el tipo genérico <i>N. acicola</i> , pero forma una rama separada (Li, <i>et al</i> , 2020). <i>Neopyrenochaeta changraiensis</i> comparte caracteres similares con <i>N. acicola</i> al tener conidiomas de globosos a subglobosos con setas y conidios de subglobosos a elipsoidales con varias guttulas pequeñas o grandes (conidios: 3,5–5(–6) × 1,5–3 µm), pero es distinto en dimensiones de setas (Li, <i>et al</i> , 2020). <i>Neopyrenochaeta changraiensis</i> tiene setas más cortas que <i>N. acicola</i> (hasta 200 µm) (Mapook, <i>et al</i> , 2020). Es un saprobio sobre madera en descomposición sumergida en hábitat de agua dulce (Mapook, <i>et al</i> , 2020).						
Referencia						
Li, W. J., McKenzie, E. H., Liu, J. K., Bhat, D. J., Dai, D. Q., Camporesi, E., ... & Hyde, K. D. (2020). Taxonomy and phylogeny of hyaline-spored coelomycetes. <i>Fungal Diversity</i> , 100, 279-801. Mapook, A., Hyde, K. D., McKenzie, E. H., Jones, E. G., Bhat, D. J., Jeewon, R., ... & Purahong, W. (2020). Taxonomic and phylogenetic contributions to fungi associated with the invasive weed <i>Chromolaena odorata</i> (Siam weed). <i>Fungal Diversity</i> , 101, 1-175.						
P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.						

Nota. Elaboración propia

Figura 9

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Neopyrenochaeta triseptatispora*.

<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
2BP18	+	-	-	+	+	+
Descripción						
El epíteto "triseptatispora" se refiere a las ascosporas de 3 septadas. Saprobio sobre tallos muertos de <i>Chromolaena odorata</i> (Mapook, <i>et al</i> , 2020). <i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i> muestra actividad antimicrobiana contra <i>B. subtilis</i> con una zona de inhibición de 16 mm y contra <i>M. plumbeus</i> con una zona de inhibición de 24 mm, observable como inhibición parcial, en comparación con el control positivo (25 mm y 17 mm respectivamente), pero ninguna inhibición de <i>E. coli</i> (Mapook, <i>et al</i> , 2020).						
Referencia						
Mapook, A., Hyde, K. D., McKenzie, E. H., Jones, E. G., Bhat, D. J., Jeewon, R., ... & Purahong, W. (2020). Taxonomic and phylogenetic contributions to fungi associated with the invasive weed <i>Chromolaena odorata</i> (Siam weed). <i>Fungal Diversity</i> , 101, 1-175.						
P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.						

Nota. Elaboración propia

Figura 10

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Penicillium pimateouiense*.

<i>Penicillium pimateouiense</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1CA11	-	-	+	+	+	-
Descripción						
Las especies de <i>Penicillium</i> son abundantes en diversos ambientes de suelo, como suelos cultivados, suelos de bosques, suelos desérticos y también suelos de playas (Teh & Latiffah, 2013). <i>Penicillium pimateouiense</i> es fenotípicamente más similar a <i>P. restrictum</i> . Ambas especies tienen un crecimiento restringido en todos los medios y penicilos monoverticilados y no vesiculados (Peterson, <i>et al</i> , 1999). <i>P. pimateouiense</i> fue aislado por primera vez de cultivos de células de riñón poliquistico, lo que sugiere que la especie puede desempeñar un papel en la enfermedad renal poliquistica (Peterson, <i>et al</i> , 1999). <i>Penicillium pimateouiense</i> también ha sido aislado de muestras de excrementos de pollo y del campo agrícola en la India (Wadud, <i>et al</i> , 2012).						
Referencia						
Peterson, S. W., Corneli, S., Hjelle, J. T., Miller-Hjelle, M. A., Nowak, D. M., & Bonneau, P. A. (1999). <i>Penicillium pimateouiense</i> : a new species isolated from polycystic kidney cell cultures. <i>Mycologia</i> , 91(2), 269-277.						
Teh, L. Y., & Latiffah, Z. (2013). A new record of <i>Penicillium pimateouiense</i> from beach soil in Malaysia. <i>Mycobiology</i> , 41(4), 256-259.						
Wadud, S., Michaelsen, A., Gallagher, E., Parcsi, G., Zemb, O., Stuetz, R., & Manefield, M. (2012). Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content. <i>British poultry science</i> , 53(5), 561-569.						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 11

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Pleosporales sp.*

<i>Pleosporales sp</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
3PB22	+	+	-	-	-	+
Descripción						
<i>Pleosporales</i> es el orden más grande de los <i>Dothideomycetes</i> y comprende una cuarta parte de todas las especies de <i>Dothideomycetes</i> (Zhang, <i>et al</i> , 2012). La mayoría de las especies son saprobios que se encuentran en material vegetal en descomposición en ambientes de agua dulce, marinos, o terrestres, pero varias especies también están asociadas con plantas vivas como parásitos, epífitas o endófitas (Zhang, <i>et al</i> , 2009). Algunas especies de <i>Pleosporales</i> se encuentran en el estiércol de los animales y un pequeño número se encuentran como líquenes y hongos que habitan en las rocas (Zhang, <i>et al</i> , 2009).						
Referencia						
Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., & Hyde, K. D. (2012). <i>Pleosporales</i> . <i>Fungal diversity</i> , 53, 1-221.						
Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., ... & Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of <i>Pleosporales</i> : a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. <i>Studies in Mycology</i> , 64(1), 85-102.						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 12

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Setophaeosphaeria badalingensis*.

<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1CA13	+	-	-	-	-	+
4BP13	+	-	-	-	+	-
3BP19	+	+	-	+	-	+
1MO32	+	+	+	-	-	+
6MO10	+	+	-	-	+	+
Descripción						
<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i> es filogenéticamente distinta de <i>S. setosa</i> y <i>S. hemerocallidis</i> , y también tiene conidios más pequeños que los observados en <i>S. hemerocallidis</i> (Crous, et al, 2014). Las colonias alcanzan 25 mm de diámetro después de 2 semanas a 22 °C (Crous, et al, 2014). En MEA extendido, se presenta con micelio aéreo escaso, superficie plegada, márgenes uniformes, lobulados, superficie gris humo, reverso gris oliváceo (Crous, et al, 2014). En superficie OA se observa gris oliváceo y en superficie PDA y reverso gris oliváceo (Crous, et al, 2014).						
Referencia						
Crous, P. W., Shivas, R. G., Quaedvlieg, W. V., Van der Bank, M., Zhang, Y., Summerell, B. A., ... & Groenewald, J. Z. (2014). Fungal Planet description sheets: 214–280. <i>Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi</i> , 32(1), 184-306.						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 13

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Setophaeosphaeria hemerocallidis*.

<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1CA10	+	+	+	-	+	+
4AB8	-	-	-	+	-	+
2AB23	+	-	-	-	+	+
3AB10	+	-	-	-	+	+
3AP28	+	+	-	-	+	-
4AP14	+	+	+	+	+	+
1BP24	+	-	-	-	+	+
1BP25	+	-	-	-	+	+
3BP21	+	+	+	-	-	-
3BP24	+	-	-	-	-	-
1MO29	+	-	-	-	+	+
1MO31	+	-	-	-	-	+
1MO36	-	+	-	-	+	-
4MO13	+	+	+	-	+	+
4MO17	+	+	+	-	-	-
5MO16	+	+	+	-	+	+
5MO17	+	+	+	-	+	+
5MO18	+	-	+	-	+	+
5MO19	+	-	+	-	+	+
Descripción						
<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i> es una especie de hongo de la familia Phaeosphaeriaceae (Crous, et al, 2014). Las colonias alcanzan 20 mm de diámetro después de 2 semanas a 22 °C (Crous, et al, 2014). En MEA, las colonias son plegadas, con escaso micelio aéreo y margen liso y uniforme; superficie gris oliva pálido, reverso gris oliva (Crous, et al, 2014). En OA son de color oliváceo-gris y en PDA gris oliváceo pálido, con manchas de gris oliváceo, reverso gris oliváceo (Crous, et al, 2014). <i>S. hemerocallidis</i> está estrechamente relacionada con <i>Phaeosphaeria setosa</i> , que tiene una forma asexual similar a un foma. Las dos especies se pueden distinguir según las dimensiones de sus ascosporas, siendo las de <i>P. setosa</i> más pequeñas (Crous, et al, 2014).						
Referencia						
Crous, P. W., Shivas, R. G., Quaedvlieg, W. V., Van der Bank, M., Zhang, Y., Summerell, B. A., ... & Groenewald, J. Z. (2014). Fungal Planet description sheets: 214–280. <i>Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi</i> , 32(1), 184-306						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 14

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Setophaeosphaeria sidae*.

<i>Setophaeosphaeria sidae</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
4MO12	+	+	+	-	+	+
Descripción						
<i>Setophaeosphaeria sidae</i> es una especie de hongo documentada en bases de datos taxonómicas. Parece estar asociado con hojas de <i>Sida sp.</i> , una especie de planta que se encuentra en Brasil (Quaedvlieg, <i>et al.</i> , 2013). Conidiomas picnidiales, globosos, sumergidos y tornándose erumpentes, de hasta 200 µm de diámetro; pared que consta de 3 a 4 capas de textura angularis subhialina a marrón pálida (Quaedvlieg, <i>et al.</i> , 2013). Colonias erumpentes, extendidas, micelio aéreo moderado uniforme, márgenes lobulados (Quaedvlieg, <i>et al.</i> , 2013). En superficie MEA gris oliváceo, sombra inversa, en OA gris oliváceo con pigmento ámbar difuso en agar y en PDA y reverso gris oliva (Quaedvlieg, <i>et al.</i> , 2013).						
Referencia						
Quaedvlieg, W. G. J. M., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, A. C., Swart, W. J., ... & Crous, P. W. (2013). Sizing up septoria. <i>Studies in mycology</i> , 75(1), 307-390.						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

Nota. Elaboración propia

Figura 15

Ficha de identificación y características de las cepas pertenecientes a la especie *Talaromyces funiculosus*.

<i>Talaromyces funiculosus</i>						
Código	Capacidades					
	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1MO28	+	+	+	-	-	-
Descripción						
<i>Talaromyces funiculosus</i> , también conocido como <i>Penicillium funiculosum</i> , es un microorganismo fúngico con diversas implicaciones ecológicas y científicas. Ha sido objeto de investigaciones biotecnológicas, como su efecto sobre la solubilidad del fósforo en muestras de suelo con diferentes propiedades fisicoquímicas (ŞahimerdanTürkölmez GökselÖzer SibelDerviş, 2022). <i>T. funiculosus</i> inhibe el crecimiento de las especies micotoxigénicas, <i>F. verticillioides</i> y <i>A. flavu</i> , a través de una esporulación rápida de sus colonias (Castellari <i>et al.</i> , 2021).						
Referencia						
Castellari, C. C., Marcos Valle, F. J., & Pacin, A. M. (2021). Interactions between fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, aspergillus flavus link and talaromyces funiculosus thom in hermetic environments. <i>Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences</i> , 37(1), 11–20. https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-2IFCC30002						
ŞahimerdanTürkölmez GökselÖzer SibelDerviş, A. (2022). The Effect of <i>Talaromyces funiculosus</i> ST976 Isolated from <i>Pistacia vera</i> Rhizosphere on Phosphorus Solubility in Soil Samples with Different Physicochemical Properties. <i>Journal</i> , 25(5), 1077–1085.						

P: solubilización de fósforo, K: solubilización de potasio, Prot: producción de proteasas, Lip: producción de lipasas, Qui: producción de quitinasas, Glu: producción de gluconasas.

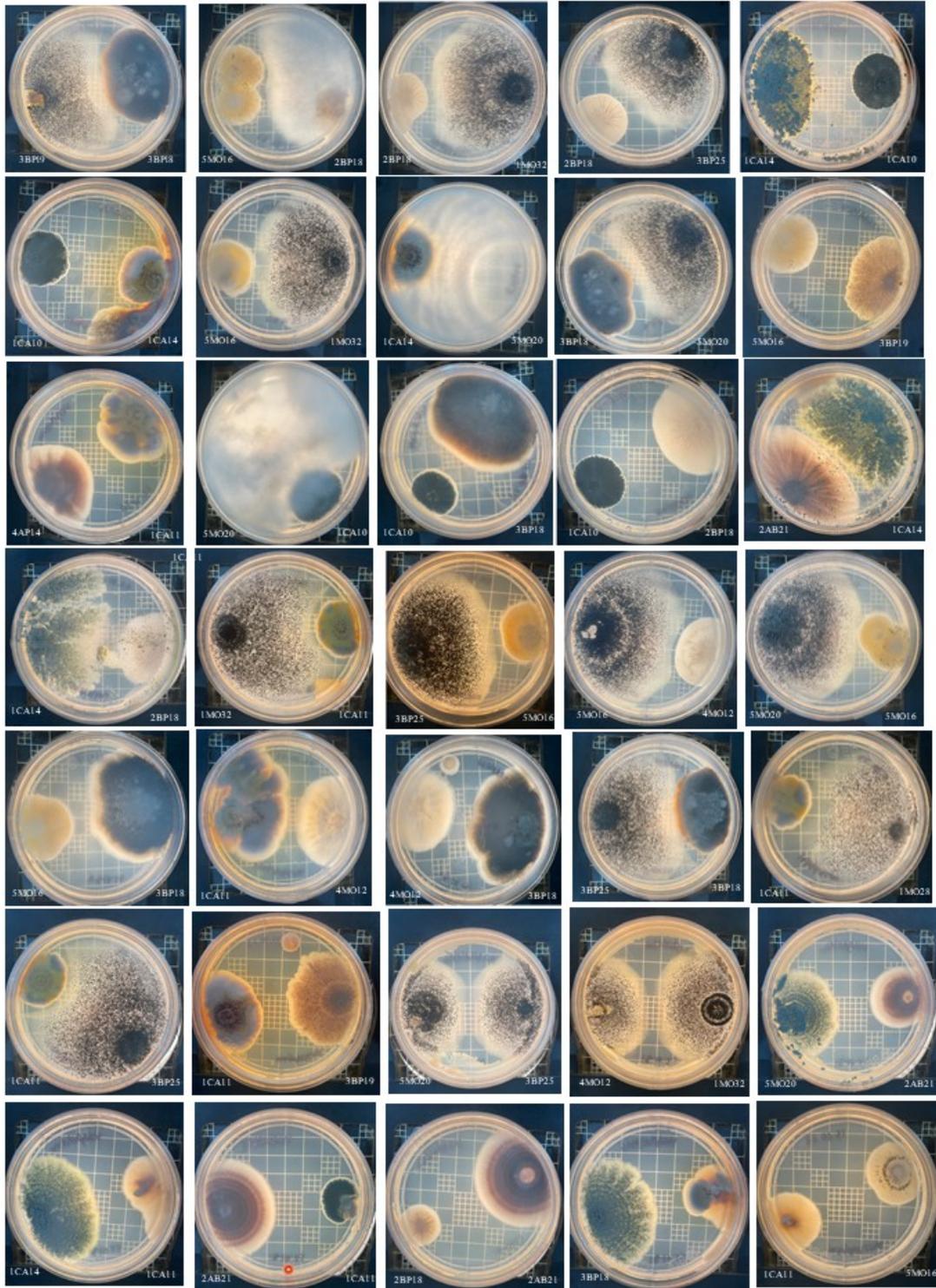
Nota. Elaboración propia

Anexo B Antagonismo

La sección de Anexis B presenta las imágenes obtenidas durante la prueba de antagonismo fúngico, las cuales proporcionan una representación visual de las interacciones entre las diferentes cepas de hongos. Estas imágenes muestran claramente la actividad antagonista observada, incluyendo la inhibición del crecimiento de ciertas cepas por parte de otras, así como la formación de zonas de inhibición y otras características relevantes. Estas imágenes complementan los datos y resultados presentados en el cuerpo principal del trabajo, ofreciendo una perspectiva visual que ayuda a entender mejor la dinámica de las interacciones fúngicas estudiadas.

Figura 16

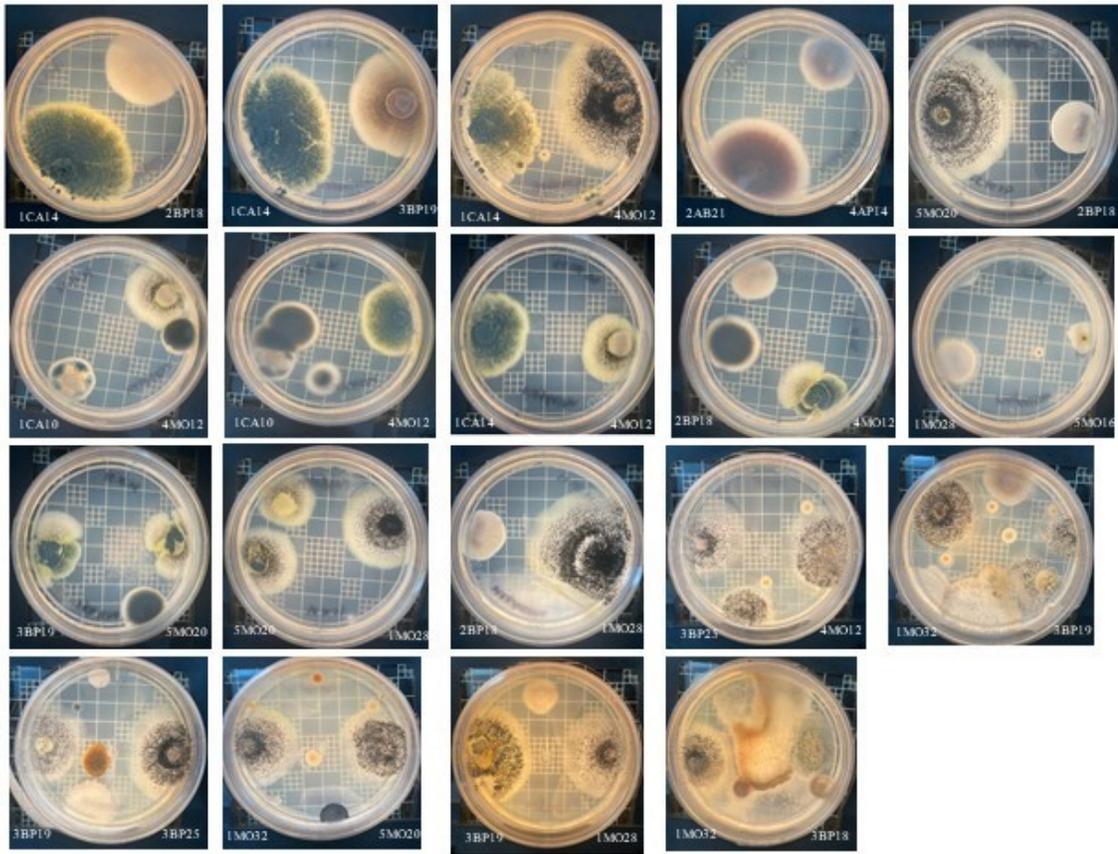
Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado negativo.



Nota. Elaboración propia

Figura 17

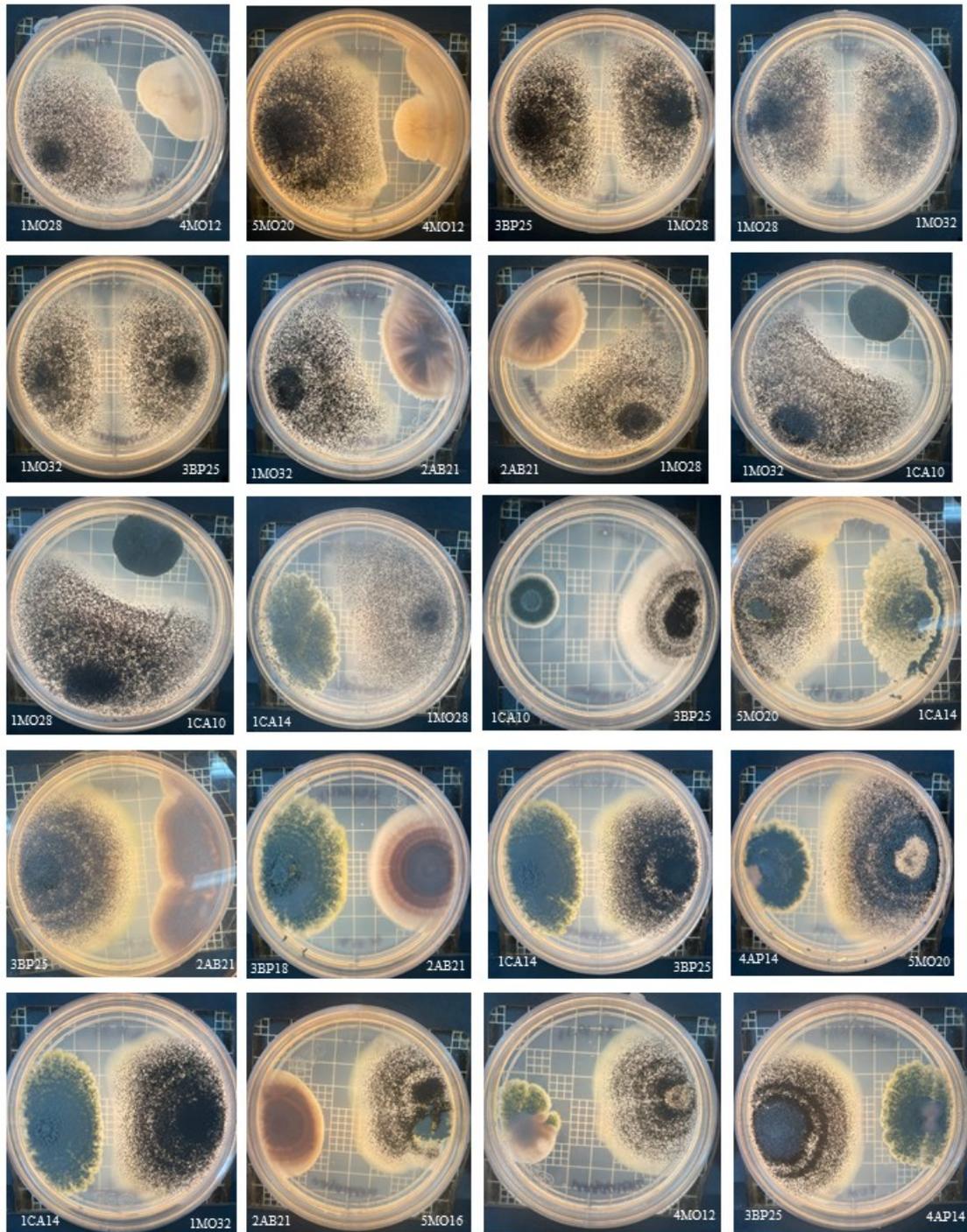
Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado negativo.



Nota. Elaboración propia

Figura 18

Imágenes de la prueba de antagonismo fúngico con resultado positivo.



Nota. Elaboración propia

Anexo C Protocolos

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
Selección de hongos antagonistas	Autores: Isabella García Caffaro, Silvia Vela

1. Propósito

Realizar una extracción de ADN genómico de hongos.

2. Aplicación

El impacto económico de los hongos patógenos en el rendimiento de los cultivos y el peligro para la salud humana y animal causado por las micotoxinas fúngicas hace que la detección de patógenos fúngicos sea una prioridad máxima. Los estudios basados en el ADN, incluida la clonación y el genotipado, se han convertido en una rutina en los laboratorios de investigación de hongos. Sin embargo, la preparación de ADN de alta calidad a partir de tejido fúngico requiere mucho tiempo y trabajo y, a menudo, es un paso limitante para los experimentos de alto rendimiento.

Los métodos basados en el ADN se pueden utilizar para detectar y diagnosticar la presencia de patógenos fúngicos. Sin embargo, las paredes celulares de los hongos son estructuras fuertes, compuestas principalmente de quitina y glucanos que mejoran su dureza. Estas estructuras generalmente requieren una combinación de congelación en nitrógeno líquido con molienda y tampones fuertes para que las paredes celulares se rompan y el ADN se extraiga con éxito.

3. Referencias

- 3.1. Pilo, P., Tiley, A. M., Lawless, C., Karki, S. J., Burke, J., & Feechan, A. (2022). A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101758.
- 3.2. Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. (2005). Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*, 43(10), 5122-5128.
- 3.3. Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., ... & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature communications*, 9(1), 2747.

4. Terminología

- 4.1. ADN: ácido desoxirribonucleico. Molécula transportadora de información genética para el funcionamiento.
- 4.2. EDTA: ácido etilendiaminetetraacético. Elimina o reduce la cantidad de calcio mediante la eliminación de iones de doble capacidad.

5. Documentos asociados

- 5.1. Promega Corporation, (2021). Wizard Genomic DNA Purification Kit [Internet]. <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/?catNum=A1120>.
- 5.2. Burghoorn, H. P., Soteropoulos, P., Paderu, P., Kashiwazaki, R., & Perlin, D. S. (2002). Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(3), 615-624.

6. Seguridad**6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**

- 6.1.1. Formación de aerosoles.

6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).

6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.

6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

7.1.1. Centrífuga

7.1.2. Micropipetas de 1000 μ L

7.1.3. Micropipetas de 100 μ L

7.2. Materiales/ Cristalería

7.2.1. Mortero

7.2.2. Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL

7.2.3. Baño maría a 37°C

7.2.4. Puntas de micropipeta de 1000 μ L

7.2.5. Puntas de micropipeta de 100 μ L

7.2.6. Hoja de bisturí

7.3. Reactivos

7.3.1. Nitrógeno líquido

7.3.2. 50mM EDTA (pH 8.0)

7.3.3. Kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega)

7.3.4. Cloroformo a temperatura ambiente

7.3.5. Etanol 70% a temperatura ambiente

7.4. Medicamentos

7.4.1. N/A

7.5. Material biológico

7.5.1. Cepas de hongos

8. Procedimiento

8.1. Recoger el micelio en un recipiente de porcelana con un bisturí, congelar con nitrógeno líquido y moler con mortero.

8.2. Resuspender en 293 μ L de EDTA de 50 mM.

8.3. Incubar la muestra a 37 °C durante 45 minutos para digerir la pared celular. Enfriar a temperatura ambiente.

8.4. Centrifugar la muestra a 13.000 \times g durante 2 minutos y luego retirar el sobrenadante.

8.5. Agregar 300 μ L de solución de Nuclei Lysis al gránulo celular y pipetear suavemente para mezclar.

8.6. Incubar la muestra a 37 °C durante 1 h.

8.7. Agregar 100 μ L de solución de precipitación de proteínas y vortex a alta velocidad durante 20 segundos.

8.8. Centrifugar durante 20 minutos a velocidad máxima (13.000 rpm) en una microcentrífuga.

8.9. Dejar que la muestra repose sobre hielo durante 5 minutos.

8.10. Centrifugar a 13.000 \times g durante 3 minutos.

8.11. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL que contenga 300 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico a temperatura ambiente.

8.12. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN en forma de hilo formen una masa visible.

- 8.13. Centrifugar a $13.000 \times g$ durante 2 minutos.
- 8.14. Decantar con cuidado el sobrenadante y escurrir el tubo en papel absorbente limpio.
- 8.15. Agregar 300 μL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar la pastilla de ADN.
- 8.16. Centrifugar a $13.000 \times g$ durante 2 minutos. Aspirar con cuidado todo el etanol.
- 8.17. Escurrir el tubo en papel absorbente limpio y dejar que el pellet se seque al aire durante 10-15 minutos.
- 8.18. Añadir 50 μL de solución de rehidratación de ADN.
- 8.19. Agregar 1,5 μL de solución de RNasa a la muestra de ADN purificada. Vortex a la muestra durante 1 segundo.
- 8.20. Centrifugar brevemente en una microcentrifuga durante 5 segundos para recoger el líquido e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- 8.21. Rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a 4 °C.
- 8.22. Almacenar el ADN a -80°C.

9. Esterilización de material

Esterilizar área de trabajo, puntas de micropipeta, Micropipetas y tubos de 1.5 mL

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1.

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
PCR y gel de electroforesis	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. Propósito

Realizar PCR de para identificar bacterias (16S) y hongos (ITS) utilizando el ADN genómico.

2. Aplicación

La cadena en reacción de la polimerasa (PCR) es una tecnología que se utiliza para amplificar una secuencia específica de ADN permitiendo el aislamiento, secuenciación o clonación de la secuencia amplificada. Esta técnica fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis quien recibió el premio nobel en 1993.

El PCR se utiliza en una amplia gama de estudios, en el área de microbiología para realizar técnicas de clonación con ADN, southern smudging, secuenciación de ADN, innovación en ADN recombinante, entre otras aplicaciones. También se utiliza en microbiología clínica como una herramienta para identificación de bacterias patógenas y en estudios forenses para identificación de criminales.

Es posible identificar bacterias al utilizar un PCR que amplifica la región de 16S y/o 18S y hongos filamentosos y levaduras por medio de la región ITS. Esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de cepas como mínimo a nivel de género. La identificación se basa fundamentalmente en el análisis de una o dos regiones del DNA ribosómico. En el caso del 16S se secuencian aproximadamente los primeros 1,000 nucleótidos del gen, que incluyen zonas hipervariables donde se acumulan la mayoría de diferencias nucleotídicas entre especies. Para la identificación de hongos filamentosos y levaduras se secuencian de los dominios D1/D2 del gen 28S rRNA y/o de la región ITS (espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye el gen 5,8S rRNA). La comparación de las secuencias obtenidas en ambos casos con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas permite asignar las cepas a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% .

3. Terminología

- 3.1. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, reacción en la que se amplifica una secuencia específica de ADN
- 3.2. Primer / cebador/ oligo: Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde
- 3.3. ADN polimerasa: Enzima principal del proceso de replicación que parte de una cadena inicial o primer.
- 3.4. Buffer TBE: Tris, ácido bórico y EDTA, buffer de corrida para electroforesis

4. Principio

La cadena en reacción de la polimerasa PCR es una reacción de tres pasos (desnaturalización, anillamiento, extensión), la muestra que contiene una concentración específica de muestra de ADN con una enzima ADN polimerasa estable al calor (taq polimerasa), oligos (específicos para la amplificación del gen específico), bases nitrogenadas (dNTP's) y el cofactor magnesio; a esta mezcla se le llama master mix.

La primera etapa de PCR (desnaturalización) la muestra se calienta a 95-98°C, esta temperatura causa la desnaturalización de la doble hebra de ADN convirtiéndola en ssADN. La segunda etapa (anillamiento) la temperatura disminuye a 55-65°C permitiendo que los oligos se unan a la ssADN en el área deseada formando puentes de hidrógeno. El tercer paso (extensión) la temperatura aumenta a 72°C permitiendo la extensión de la hebra utilizando los dNTP's formando una nueva hebra de ADN de doble hebra. Los tres pasos descritos anteriormente se repiten varias veces lo cual lleva a la amplificación exponencial del gen de interés a partir del ADN. Esta reacción llega a su fin o plateau cuando la ADN polimerasa pierde actividad y los dNTP's y oligos son consumidos.

5. Documentos asociados

- 5.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 5.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 5.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratorio.pdf
- 5.4. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-ma-isolation.html>
- 5.5. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.
- 5.6. PROMEGA. (2007). GoTaq® DNA Polymerase. *Promega*, (6), 7–8. <http://doi.org/M3178>
- 5.7. Sambrook, J. y Russell, D. (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.

6. Seguridad

- 6.1. Realice el master mix de preferencia en campana de extracción para evitar contaminación
- 6.2. **Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 6.2.1. Formación de aerosoles.
 - 6.2.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Con concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.2.3. Exceso de material o personal.
- 6.3. **Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.3.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.3.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.3.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.3.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.3.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
 - 6.3.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.3.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.3.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.3.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.3.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.3.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos**7.1. Equipo**

- 7.1.1. Campana de flujo laminar
- 7.1.2. Centrifuga
- 7.1.3. Termociclador
- 7.1.4. Cámara de electroforesis

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos eppendorf 0.2ml
- 7.2.2. Puntas de micropipeta
- 7.2.3. Micropipetas

7.3. Reactivos

- 7.3.1. ADN
- 7.3.2. Gotaq Mastermix
- 7.3.3. hot start Colorless master mix
- 7.3.4. oligo Forward
 - 7.3.4.1. ITS1 (Secuencia 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3')
- 7.3.5. oligo Reverse
 - 7.3.5.1. ITS4 (Secuencia 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3')
- 7.3.6. Agua libre de nucleasas
- 7.3.7. Agarosa

- 7.3.8. Escalera 100pb
- 7.3.9. Gel red
- 7.3.10. Loading dye
- 7.3.11. Buffer TBE

7.4. Medicamentos

No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Cultivo puro de microorganismos de interés obtenidos de muestreo de suelos

8. Procedimiento**8.1. PCR para ADN**

- 8.1.1. Colocar en un tubo ependorff libre de nucleasas:

Reactivo	Volumen final lrxn
Go Taq master mix	7.5µl
oligo F (10mM)	0.75µl
oligo R (10mM)	0.75µl
ADN	2µl
Agua libre de nucleasas	4µl
TOTAL	15µl

- 8.1.2. Realizar un control negativo sin ADN templete en el inicio de las muestras y al final de las muestras

- 8.1.3. Utilizar el siguiente programa

ITS

Paso	Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
Iniciación de desnaturalización	95	2min.	1
Desnaturalización	95	30seg	35
Anillamiento	55	30seg	
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	5min.	1

	4	Indefinido	1
--	---	------------	---

8.2 Electroforesis

- 8.2.1 Preparar buffer TBE 1x
- 8.2.2 Para visualizar el resultado del PCR realice una electroforesis
- 8.2.3 Realizar un gel de agarosa de 1.5% con 0.45g de agarosa y 30ml de buffer TBE 1X, luego que se haya disuelto la agarosa en microondas (30 seg * 30 seg y agitar)
- 8.2.3.1 Agregar bromuro de etidio 100X (15 ml de gel 1ul de bromuro de etidio y 30ml de gel 2ul de bromuro de etidio)
- 8.2.4 Dejar que el gel se solidifique
- 8.2.5 Cargar el gel (pozos más cerca del lado negativo)
- 8.2.6 Llenar la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X
- 8.2.7 Cargar el gel (7ul de muestra con loading dye y escalera)
- 8.2.8 Correr el gel por (30min-60min) a 100voltios.
- 8.2.9 Visualizar utilizando transiluminador

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Se verificó que el agua libre de nucleasas se encontrara en buen estado y guardada adecuadamente.
- 11.2. Se verificó se le diera el tratado con NaOH a los tubos utilizados
- 11.3. Se verifico que el equipo utilizara funcionara correctamente.
- 11.4. Se trabajó para campana para evitar contaminación

11.5. Conflict solution policy

- 11.5.1. Se obtiene poco producto
 - 11.5.1.1. Ajuste la temperatura de anillamiento
 - 11.5.1.2. Minimice el efecto de los inhibidores de amplificación
 - 11.5.1.2.1. Diluya la muestra de ADN
 - 11.5.1.3. Aumente la pureza de la muestra de ADN
 - 11.5.1.4. Agregue aditivos al PCR como DMSO o BSA
 - 11.5.1.4.1. Prepare otra muestra de ARN teniendo cuidado con la ARNasas
 - 11.5.1.5. Asegúrese que no existan inhibidores de la transcriptasa inversa: SDS, EDTA, entre otros.
 - 11.5.1.6. La temperatura de anillamiento es muy alta
 - 11.5.1.7. La secuencia target de ARN contiene pausas transcripciones fuertes
 - 11.5.1.8. Verificar la especificidad del oligo
 - 11.5.1.9. Concentración de dNTP's muy alta
 - 11.5.1.10. No se utilizó la concentración de magnesio optima
 - 11.5.1.11. Se inactivo la transcriptasa reversa antes que se sintetizara ADNc
- 11.5.2. No se obtiene producto o se obtiene poco producto ADNc doble hebra por PCR
 - 11.5.2.1. Coloque mayor cantidad de ADNc de una hebra
 - 11.5.2.2. Optimice las condiciones del QPCR
 - 11.5.2.3. Re examine el diseño de los oligos
 - 11.5.2.4. Aumente el número de ciclos
- 11.5.3. El tamaño del producto es mayor del esperado
 - 11.5.3.1. El ARN se encuentra contaminado de ADN
 - 11.5.3.2. Diseño de oligos con span de intrones convirtiendo en unión de exon-exon
- 11.5.4. Si no se observa nada en la electroforesis

- 11.5.4.1. El buffer con el que se corrió puede no estar fresco
- 11.5.4.2. No se cargó suficiente GelRed o similar

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
Selección de hongos antagonistas	Autores: Isabella García Caffaro, Silvia Vela

1. Propósito

Realizar prueba de antagonismo en las cepas fúngicas.

2. Aplicación

Las pruebas de antagonistas de hongos se utilizan para identificar y evaluar antagonistas de hongos para el control biológico de patógenos de plantas. Estos antagonistas desempeñan un papel importante en el control de enfermedades de las plantas y se utilizan como BCA. Las pruebas ayudan a identificar posibles antagonistas de hongos y a evaluar su eficacia en diferentes condiciones ambientales.

Se utilizan para evaluar las actividades antifúngicas de los metabolitos fúngicos y las levaduras antagonistas contra patógenos fúngicos específicos. Estas pruebas ayudan a identificar metabolitos y levaduras con efectos inhibidores sobre el crecimiento de patógenos, contribuyendo al biomanejo sostenible de enfermedades fúngicas.

3. Referencias

- 3.1. Liu, R., Chen, M., Gao, J., Luo, M., & Wang, G. (2023). Identification of antagonistic fungi and their antifungal activities against aconite root rot pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1), 2211852.
- 3.2. Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 604923.

4. Terminología

- 4.1. PDA: agar papa dextrosa.

5. Documentos asociados

- 5.1. Zhao, X., Hou, D., Xu, J., Wang, K., & Hu, Z. (2022). Antagonistic activity of fungal strains against *Fusarium crown rot*. *Plants*, 11(3), 255.

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 1.1.1. Micropipetas de 10 μ L
- 1.1.2. Mechero

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Jeringa de 5 mL
- 7.2.2. Puntas de 10 μ L
- 7.2.3. Placas de PDA
- 7.2.4. Tubos Falcon estériles.

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Solución salina 0.9%

7.4. Medicamentos

N/A

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Cepas de hongos

8. Procedimiento

- 8.1. Sembrar hongos en medio PDA durante 10 días.
- 8.2. Agregar 5 mL de solución salina 0.9% estéril a la placa con las esporas con la ayuda de una jeringa.
- 8.3. Realizar un lavado con la solución y traspasarlo a un tubo Falcon estéril.
- 8.4. Preservar la solución de esporas a 4°C.
- 8.5. En placas con medio PDA, sembrar 10 μ L de solución de esporas de una cepa en un extremo de la placa.
- 8.6. Sembrar 10 μ L de una solución de esporas diferente en el otro extremo de la placa.
- 8.7. Incubar a 26°C por 10 días.
- 8.8. Monitorear la forma de crecimiento de los hongos.
- 8.9. Resultado positivo a antagonismo se toma si uno de los hongos cambió la forma de crecimiento.

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.