



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MOLECULAR DE HONGOS CON
POTENCIAL ANTAGONISTA DE HUEVOS DE NEMATODOS PATOGENOS DE
GANADO OVINO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2019**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MOLECULAR DE HONGOS CON
POTENCIAL ANTAGONISTA DE HUEVOS DE NEMATODOS PATOGENOS DE
GANADO OVINO**

JUAN FELIPE MARIN GRAJALES

PhD. MARTHA LUCIA POSADA BUITRAGO

Asesora interna

PhD. JIMMY JOLMAN VARGAS DUARTE

Asesor externo

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C. 2019-1**

AGRADECIMIENTOS

Respetuosamente agradezco a mis asesores, a la Doctora Martha Lucia Posada Buitrago y al Doctor Jimmy Jolman Vargas Duarte por su ayuda en cada uno de los pasos que dieron como resultado este trabajo y por la formación que me brindaron, es claro que la sabiduría de ustedes ha sido el modelo a seguir; también gracias por compartir sus consejos y su ayuda para cumplir mis objetivos académicos y personales.

Reitero mi agradecimiento a todas las personas que invirtieron su tiempo, paciencia y amor para que como trabajador de la salud pueda ofrecer mis competencias para ayudar a quienes más lo necesitan.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la fuerza creadora que me ha permitido llegar a este punto de mi carrera, a mis padres Idali y Héctor quienes con amor y templanza han emprendido este camino junto a mí, a mi hermano Hernán que ha sido un motor que me llena de fuerzas para seguir adelante, además de agradecer a la música fuente de gran inspiración.

Esta es una ruta que ha dejado grandes enseñanzas y dedico mi trabajo a todos los profesionales, familiares y amigos que me han apoyado y guiado por la senda de la sabiduría y la ciencia.

– Juan Felipe Marín Grajales.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. OBJETIVOS	4
4. ANTECEDENTES	5
5. MARCO REFERENCIAL	12
5.3 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS POR MEDIO DE SU DNA GENÓMICO.	15
5.4 SUELOS DE PARAMO	17
5.5 NEMATODOS	18
5.6 EL OVINO	19
6. METODOLOGIA	24
6.2 TIPO DE ESTUDIO	25

6.3 HIPÓTESIS	25
3.4. VARIABLES DEL ESTUDIO	26
7. METODOLOGÍA	27
9. RESULTADOS	40
10 DISCUSIÓN:	46
11 CONCLUSIONES:	49
12. RECOMENDACIONES	50
13 REFERENCIAS:	52

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1 Clasificación taxonómica de los ovinos	22
Tabla 2. Variables dependientes e independientes	26
Tabla 3. Procedimientos de fase pre-analitica.....	27
Tabla 4. Hongos recuperados de suelo semi-paramuno, y características macroscópicas.....	29
Tabla 5. Numero de conidias en 50ul, obtenidas por el investigador.	34
Tabla 6. Cantidad necesaria de componentes para la realización de PCR con un volumen final de 50ul.	39
Tabla 7. Condiciones de pcr para la amplificacion de la region ITS1-ITS-4	39
Tabla 8. Escala de daño propuesta por el investigador 15/12/2019	40
Tabla 9. Fotografias tomadas 10 dias después de realizar el enfrentamiento, que evidencian el daño causado a los huevos por parte de las conidias.....	41

INDICE DE FIGURAS :

Fig. 1 Censo ovino en colombia 2017	2
Fig. 2 Descripcion grafica de la region (ITS)	17
Fig. 3 Ciclo de vida de los Helmintos.....	19
Fig. 4 Ciclo evolutivo de los Helmintos.....	21
Fig. 5 Método de filtración de conidias.	32
Fig. 6 Método de lavado de micelios fúngicos (PBS)	33
Fig. 7 Material utilizado para contar y alicuotar las conidias.....	34
Fig. 8 Conidias filtradas para el ensayo.....	35
Fig. 9 Enfrentamiento conidias vs huevos.	38
Fig. 10 Gel de agarosa al 0.5x corrida de muestras y control (<i>P. notatum</i>)	44



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
2019-I

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MOLECULAR DE HONGOS CON
POTENCIAL ANTAGONISTA DE HUEVOS DE NEMATODOS PATOGENOS DE
GANADO OVINO**

1. RESUMEN

La economía de nuestro país esta principalmente integrada por las actividades agrícolas y ganaderas, en este sentido se debe tomar medidas para que mejoren estos sistemas; una de las mayores limitantes para cumplir este objetivo en cuanto a ganadería se refiere, son las parasitosis por helmintos que generan en promedio un 50% de pérdidas en lo que a producción ovina se refiere; Esto se debe a que los tratamientos empleados carecen de efectividad ya que su uso indiscriminado ha generado resistencia a los anti-helmínticos, contaminación, presión de selección desencadenándose un proceso negativo en cadena. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de 6 cepas de hongos aislados de suelo de semi-paramuno (Nemocon) Cundinamarca, frente a un pull de huevos de nematodos parásitos naturales de ovinos. El modelo animal elegido y los ejemplares de los mismos se encuentran ubicados en el Centro de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Extensión Ovina (CIDTEO) que hace parte del centro agropecuario (MARENGO) de la Universidad Nacional De Colombia.

Palabras clave: *Nematodos, Hongos, Antihelmínticos, resistencia.*

Estudiante: Juan Felipe Marín Grajales.

Docentes: Martha Lucia Posada Buitrago; Jimmy Jolman Vargas Duarte.

Fecha: Abril 2019.

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

2. INTRODUCCION

La producción ovina en Colombia ha tenido gran importancia desde que los primeros ejemplares fueron importados de varios lugares del mundo como África y Europa, desde entonces han acompañado al productor agropecuario ofreciendo sustento para las familias y las comunidades en la que este tipo de ganadería tiene influencia; La población más significativa se agrupa en los siguientes departamentos; Guajira que aporta al inventario ovino un (29.5%) Boyacá (11,12%), Norte De Santander (10.8%), Magdalena (9,11%), Sucre (7.5%), Córdoba (7,23%), Cundinamarca (6,54%), Cesar (6,05%), Santander (4,0%), Tolima (3,52%), Casanare (2,38%) y Sucre (2,25%), es clave decir que el inventario ovino se encuentra sub estimado en el país. La explotación ovina en Colombia en últimos años ha venido en aumento gracias al potencial económico que posee esta actividad en comparación con el ganado bovino (el más explotado actualmente) y por el valor nutritivo de los productos secundarios ⁽¹⁾.

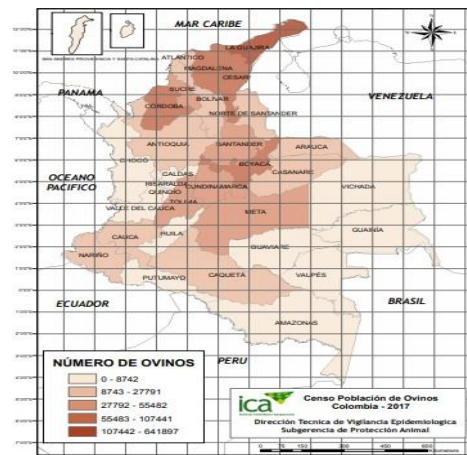


Fig. 1 Censo ovino en Colombia 2017 Elaborado por la dirección técnica vigilancia epidemiológica: población total 1.449.705 ovinos

Los ovinos proporcionan productos de gran importancia como lo es la carne, leche y lana, que son fundamentales para las familias que viven de y para los ovinos, sin olvidar que ayudan a cumplir las necesidades calóricas diarias de los habitantes ⁽²⁾. La materia fecal de estos animales puede aprovecharse para la producción de fertilizantes orgánicos disminuyendo los costos y el desgaste del

suelo, en lugares donde aparte del pastoreo la agricultura juega un papel importante.

En el campo agropecuario los parásitos que afectan al ganado ovino son muy comunes, debido a las condiciones ambientales donde se realiza su crianza. Para contrarrestar estos efectos se utiliza como método de prevención medicamentos antiparasitarios, que por lo general no son dosificados correctamente en los animales, lo cual induce a que los parásitos estimulen el fenómeno de resistencia. A lo anterior se suma que estas sustancias químicas causan problemas en la salud humana y al medio ambiente, generando inconvenientes económicos y de salud para los productores agropecuarios y usuarios directos e indirectos de estos productos ⁽³⁾.

Se ha visto que la productividad de los ovinos no ha llegado al óptimo rendimiento debido a los efectos dañinos que los parásitos gastrointestinales y la generación de resistencia ocasionan en los pequeños rumiantes, los cuales se reflejan en su bajo rendimiento, debido a que las infecciones de manifestación sub-clínica pueden generar pérdidas del orden de 40% en ganancia de peso vivo de los animales, lo cual está asociado con una disminución de ingestión calórica de alimento que va de (6% - 30%) en corderos. La producción de leche se ha reportado que puede disminuir en un 40%, y la lana hasta en 15%. En casos graves de parasitosis la mortalidad llega hasta un 50% del total de la población ⁽⁴⁾.

Para el tratamiento de las parasitosis se han buscado químicos que logren resolver la infección, de esta manera se sabe que los antihelmínticos de uso frecuente en los pequeños rumiantes son los agonistas nicotínicos, benzimidazoles y avermectinas; Comercialmente el tratamiento se distribuye en cinco familias:

(I) Imidazotiazoles

(II) Tetrahidropirimidinas

(III) Benzimidazoles

(IV) Salicilanilidas

(V) Avermectinas

El uso de los antihelmínticos provoca una letalidad en nematodos causantes de la infección. Estudios confirman que estos parásitos evaden y toleran concentraciones de Antihelmínticos, lo que se conoce como resistencia; Este fenómeno afecta el control de los parásitos en las ovejas y por tanto la producción de este ganado, generando grandes pérdidas económicas y convierten a esta situación en un problema ⁽⁵⁾.

Con este trabajo se espera tener más claro el papel que juegan los hongos en el suelo y cómo podríamos usarlos para disminuir las parasitosis por helmintos en el pequeño rumiante, junto a la búsqueda de alternativas para devolver el equilibrio que existe entre el huésped y el parásito ya que se conoce que estos helmintos estimulan la inmunidad y resistencia genética de los corderos, por ello es fundamental no intentar eliminarlos por completo como lo que se busca con los controladores químicos que estimulan la presión de selección, sino mantener un equilibrio entre las partes involucradas⁽⁶⁾.

3. OBJETIVOS

I.OBJETIVO GENERAL

- Identificar hongos de suelo semi-paramuno con potencial biocontrolador sobre huevos de helmintos patógenos de ganado ovino.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar hongos filamentosos de suelo semi-paramuno del municipio de Nemocón Cundinamarca.

- Determinar el efecto de los hongos aislados sobre los huevos de helmintos patógenos de ganado ovino mediante el enfrentamiento de los huevos vs conidias obtenidas a partir de filtración.
- Identificar de manera molecular los hongos con mayor potencial biocontrolador.

4. ANTECEDENTES

El uso de microorganismos antagonistas naturales ha sido ampliamente estudiado en una gran cantidad de nichos. En cuanto al modelo animal ovino y los hongos, se ha estudiado cómo actúan algunos de ellos frente a los nematodos parásitos del reino animalia y plantae. Los estudios más relevantes son los siguientes:

Por ejemplo, en este trabajo encontramos que la profilaxis y tratamiento de las enfermedades causadas por los nematodos patógenos del ganado se puede lograr utilizando enemigos naturales, en estudios como los de (Larsen et al. 1994, 1995, Yang et al. 2004 a, b) en los que propone la búsqueda de tratamientos diferentes a los químicos debido a la importancia de desarrollar productos no contaminantes aportando al desarrollo sostenible. Los productos derivados del ganado tienen un significado extremadamente importante y por ello velar por su inocuidad es fundamental para la cadena productiva. Los productos como la carne, leche y lana podrían ofrecer mejor calidad al consumidor si su manejo se hiciera de manera racional⁽⁷⁾.

En el estudio realizado por (Andrade *et al.* en 1992), se efectuó una caracterización de los parásitos que más afectaban a los ovinos en los municipios de Chía, Cajicá y Zipaquirá, en la que se encontró que el género *Haemonchus spp* fue el más común en la búsqueda que fue realizada en los tres municipios del departamento de Cundinamarca, con porcentajes de prevalencia de 51% para Chía, 56,5 para Cajicá y 57% para Zipaquirá. Se observó que de 598 animales muestreados, la susceptibilidad etaria más marcada a los diferentes géneros de

parásitos encontrados, fueron los ovinos de menos de un año y hembras lactantes⁽⁸⁾.

Los hongos no solo pueden ser utilizados como agentes de biocontrol, sino también como bioestimuladores de diferentes procesos biológicos, en el estudio realizado por (Liu et. al 1999 y Morton et al. 2004) describen que los hongos nematofagos favorecen el crecimiento vegetal, en principio compitiendo por nutrientes y por espacio en un biotopo determinado y en segundo lugar tienen un papel importante en la biosíntesis de sustancias estimulantes para las plantas. Esto aporta información de cómo se desarrollan relaciones simbióticas entre ellos y las plantas beneficiando la producción de fito-hormonas que promueven el desarrollo vegetal⁽⁸⁾.

Los hongos siempre han sido utilizados por el ser humano desde el campo industrial, en la medicina entre otros. En el estudio realizado por (Ahman et al 2002) se resalta la actividad nematocida que poseen diferentes tipos de hongos contra diferentes especies de nematodos, lo que sugiere que al compartir espacio en diferentes biotopos se estimula a los hongos para convertirse en depredadores fenómeno natural que puede aprovecharse⁽⁹⁾.

En algunos ensayos en los que se inhibió la función de algunos genes asociados a actividad enzimática de los hongos; Por ejemplo se reseña el estudio realizado por (Ahman et al 2002; Yang et al. 2011) donde se evidencia que después de la delección de el gen de la (serin proteasa) enzima proteolítica importante en el papel enzimático fúngico, no había atrapamiento de nematodos por el hongo *Arthrobotrys oligospora*. Debido a que esta enzima es fundamental para el proceso de predacion y en consecuencia la ausencia de esta no permite que se desencadene el ataque por parte del microorganismo, debido que esta Colagenasa, es crucial en el primer contacto hongo-nematodo⁽¹⁰⁾.

Los hongos pueden ser utilizados en diferentes actividades, un ejemplo se encuentra en el estudio realizado por (J. Walleret et al. en 2006) en el que realizaron pruebas en 3 granjas de ovejas para evaluar el efecto de la

administración de esporas del el hongo, *Duddingtonia flagrans* en preparados alimenticios, junto con la alimentación suplementaria de esporas de este microorganismo a ovejas lactantes durante las primeras 6 semanas de vida, En la que se evidencio que después del tratamiento comparado con el grupo control que no recibió tratamiento, hubo una reducción del 50 % en la infección de estos parásitos ⁽¹¹⁾.

En la literatura se describe la manera en que los hongos utilizan su potencial metabólico para alimentarse de gran número de sustratos incluyendo a los nematodos, y su desempeño para tal fin está limitado por su genotipo. En estudios realizados por (Yang et al. 2007) se efectúan ensayos que concluyen que la expresión de genes para la producción de exoenzimas, metabolitos y hifas especializadas esta estimulado por la presencia, muerte y colonización del sustrato derivado del nematodo. Se calcula que la tasa de síntesis aumenta exponencialmente durante el primer contacto con el mismo, y disminuye cuando finaliza la digestión ⁽¹²⁾.

Las capacidades enzimáticas de los hongos con la finalidad de digerir un sustrato están ampliamente estudiados; En el trabajo realizado por (Llorca L. 2008) describe que los hongos pueden formar redes de micelio similares a trampas, y además de ello secretan una proteína extracelular llamada subtilicina, enzima encargada de la destrucción de la cutícula presente en la estructura de los nematodos que se encuentran en vida libre ⁽¹³⁾.

Esta enzima y muchas otras han sido materia de investigación en diferentes campos de la ciencia, por ejemplo estudios realizados por (kanda et al. 2008) describen que la serin proteasa tiene un rango de 32 a 39 kD esta enzima es capaz de degradar gran cantidad de sustratos, incluyendo la cutícula de los nematodos, las capas internas y externas de sus huevos, además de la caseína y gelatina ⁽¹⁴⁾.

El ataque a nivel molecular de los hongos sobre los nematodos es muy importante ya que en el suelo ayudan a mantener las poblaciones de los mismos en un rango

donde el equilibrio no se ve afectado, de esta forma se presenta una relación equilibrada depredador-presa; En ensayos realizados por (Yang et al. 2009) se demuestra que el incremento de la expresión de genes precursores de proteínas degradadoras de cutícula como la serina proteasa, incrementan en presencia de nematodos y con ellos incrementan las estructuras especializadas en la captura de los mismos. Concluyendo que el hongo tiene una producción activa de enzimas y micelio en los picos donde el contacto con los nematodos aumenta, y es claro, ya que el microorganismo los usa como fuente de carbono ⁽¹⁵⁾.

Por otro lado la actividad física de los hongos es importante ya que diseñan sobre el suelo redes de hifas que pueden capturar a los nematodos. La capacidad de atrapamiento de estas dependen de del movimiento del nematodo, debido a que las redes de micelio de hongos nematofagos se encuentran estimuladas por la locomoción de su presa, siendo más efectivos contra nematodos más móviles como por ejemplo el género *Haemonchus ssp*, genero de nematodos caracterizados por su alta actividad móvil. En estudios como los de (Yang et al. 2011) demostró en sus experimentos que las trampas contra nematodos generados por los hongos nematofagos son una manera efectiva de combatir las parasitosis debido a que estos microorganismos no generan un cambio significativo donde son utilizados ya que suelen ser cosmopolitas, y en comparación con los controladores químicos su beneficio supera al costo ⁽¹⁶⁾.

El control de plagas está destinado a cambiar debido a que el gran impacto ambiental que tienen los controladores químicos está llegando a niveles críticos, en el estudio realizado por (Davies y Spiegel 2011) se evidencio que control biológico es menos usado y su contraparte el control químico resulta en la depleción de la salud humana, además interviene de manera negativa en la salud de los ecosistemas; Se puede decir que gran parte de productos de consumo derivados de la agricultura y la ganadería se encuentran contaminados con altas concentraciones de estas sustancias ⁽¹⁷⁾.

El estudio a profundidad de las características de algunos aislamientos fúngicos demuestra que el papel que juegan los hongos en el ambiente se puede utilizar

para contrarrestar plagas que afectan las actividades económicas en los sistemas de producción. En estudios realizados por (Nordbring Heitz et al. 2011; y yang et al. 2011) los hongos que ponen trampas a los nematodos generalmente son saprofitos pero adoptan un estilo parasitario en la presencia de nematodos, generando trampas a partir de un micelio especializado capaz de atrapar y extraer nutrientes de los nematodos con el siguiente orden lógico: Adhesión, penetración, inmovilización y digestión ⁽¹⁸⁾.

La manera en que los parásitos llegan al huésped es bien conocida, en los estudios realizados por (Yu et al. 1991; Song et al. 1997, 1998; Wu et al. 2005; Xu et al 2010; Li et al. 2011, 2012;). Describen que la propagación de la parasitosis en el ovino se da cuando se alimentan, ya que los pastos se encuentran contaminados con los huevos que luego evolucionan hasta ser larvas infectantes L₃. Los hongos nematofagos pueden matar a las larvas de nematodos y sus huevos, esto dependerá del micro fauna que este biotopo posea, y de los enemigos naturales que cada organismo tenga en la red trófica del mismo ⁽¹⁹⁾.

(Herrera *et al.* 2012) realizaron un estudio epidemiológico de infección por nematodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia, donde se halló una tasa de infección de 86.6%. Los nematodos con mayor prevalencia fueron *Haemonchus contortus* con (66.3%), *Oesophagostomum spp.* (38.9%), *Trichostrongylus spp.* (34.7%) y *Ostertagia spp un* (24.2%). Estos parásitos actúan diferente según el sexo, grupo etario, susceptibilidad genética, entre otros factores intrínsecos y extrínsecos del animal ⁽²⁰⁾.

Para ayudar a las actividades humanas se ha intentado promover el uso de alternativas sanas para los ecosistemas y proponiendo alternativas de control de plagas como lo demuestran los estudios realizados por (Stirling 2011 y Ward et al. 2012) en la que los investigadores se han centrado en el uso de hongos que capturan nematodos, para reducir el impacto ambiental gracias a que estos se caracterizan por la capacidad de formar estructuras miceliales que aparte de ser trampas favorecen a la disminución de estadios infectivos de larvas de nematodos que causan enfermedades gastrointestinales y respiratorias en pequeños

rumiantes; para tal fin usan anillos constrictores y no constrictores, además de redes de micelio y enzimas proteolíticas, capaces de ser efectivas controlando poblaciones de parásitos ⁽²¹⁾.

También se evidencia en otros estudios como el realizado por (Andrade 2014), en el municipio de Toca, departamento de Boyacá, Colombia, con una altura de 2810 msnm y una temperatura media de 13°C, en donde se realizó una búsqueda de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas, se encontró que la mayoría de individuos se encontraban infectados con *Coccidia* spp. (94,4%), seguido del suborden *Strongylida* (33,5%); En un total de 90 muestras de materia fecal extraída directamente del recto de los ovinos ⁽²²⁾.

En otros estudios se genotipificaron algunas especies fúngicas con el objetivo de dilucidar su actividad frente a nematodos según (K. Liu et al. en 2014) se dieron cuenta que las trampas constrictoras característica principal que agrupa a algunos organismos que pueden capturar nematodos. Uno de los hongos más estudiados es *Drechlerella stenobrocha* ya que ha sido reportado como un microorganismo capaz de reducir poblaciones de parásitos. Por lo tanto, se ha estudiado su genoma y su actividad como saprofito y como parásito ⁽²³⁾.

Los nematodos como problema de salud pública no solo afectan al reino animalia, también se sabe que estos organismos tienen representantes que también atacan plantas como es el caso de *Meloidogyne* spp. En estudios realizados por (Yuh Tzean et al. 2015) relaciona a los nematodos que parasitan plantas con pérdidas de hasta 80 billones anuales. El control de estas plagas está basado en controladores químicos que tienen una cantidad de acciones desfavorables a quienes están expuestos a él, también es necesario saber que trazas de estos compuestos llegan a productos de consumo al ser recalcitrantes ⁽²⁴⁾.

(L. Liang et al. 2015) describieron que el hongo *Arthrobotrys oligospora* es un gran controlador de nematodos y que posee un biomarcador de parasitismo el (NaNO₃) de actividad crucial, ya que se sintetiza menos en las especies salvajes y saprofitas y se produce más en las especies nematodo dependientes. También

señala que el hongo posee adhesinas de características glicoproteicas las cuales tienen una función importante para la fijación del hongo a cualquier sustrato. (Guo et al. 2000) describen que *A. oligospora* es un modelo fúngico que es capaz de formar estructuras con micelio adhesivo que utiliza para capturar nematodos ⁽²⁵⁾.

Se han intentado calcular las pérdidas anuales en los sistemas de producción a nivel mundial, en estudios realizados por (D. Thomas et al. 2016) donde realizaron una revisión en la que se estima que los nematodos parásitos causan pérdidas anuales globales de más de 100.000 millones de dólares. Además el número de controladores efectivos de esta plaga ha disminuido sustancialmente en los últimos 25 años debido a preocupaciones sobre sus mecanismos de acción no específicos, por su potencial toxicidad y por el impacto ambiental ^(26,27). Otras sustancias, como los son algunos mediadores químicos (poco estudiados), juegan un papel decisivo en el ciclo de vida de los hongos, regulando la formación de órganos reproductores o de captura. Concluyen considerando como importantes y funcionales las aplicaciones potenciales de estos organismos beneficiosos en las estrategias de protección de las plantas y animales susceptibles ⁽²⁸⁾.

A nivel científico se ha valorado y se le ha dado la importancia necesaria al control biológico usando aislamientos fúngicos como los realizados por la universidad de Yunan, ubicada en china (State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming, 650091, Yunnan, China en 2016) en los que evidenciaron inconvenientes entre la variedad de fármacos químicos y los beneficios del control biológico; Los hongos depredadores de nematodos han atraído mucho interés como una alternativa a los métodos químicos de control de nematodos patógenos del ganado ^(29,30).

Los hongos poseen gran variedad genética, por ello también variedad fenotípica y desempeño bioquímico. Uno de los fenómenos más atractivos de su fisiología es la presencia de un orgánulo muy estudiado llamado cuerpo de Woronin; Orgánulo único en las especies de Pezizomycotina. Se describe que tras la lesión de las hifas, este orgánulo puede sellar rápidamente los poros y daño septal para reducir la pérdida de citoplasma y promover Curación hifal. El cuerpo de Woronin también

se considera un factor significativo en muchos patógenos fúngicos pero también es una ventaja a la hora de utilizarlos como la solución problemas de salud pública (29,30).

5. MARCO REFERENCIAL

5.1 Control biológico

Se define control biológico (CB) como un método ecológico diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial gracias a antagonistas vivos naturales⁽³¹⁾.

5.2 Hongos

Son un grupo de microorganismos eucariotas que poseen la capacidad de reducir las poblaciones de nematodos, estos al tener ciclo directo pasan por el suelo donde tienen contacto con ellos. Hay muchas formas en que estos microorganismos actúan, una de ellas y la más estudiada son las trampas constreñibles. Algunos de estos organismos pueden capturar nematodos formando estructuras sofisticadas que funcionan como trampas en forma de anillos, botones adhesivos, hifas adhesivas, anillos simples, redes adhesivas escalariformes, también redes adhesivas de micelio con forma de anillos que poseen sustancias mucilaginosas y pegajosas. Un ejemplo de ello es *D. stenobrocha*⁽³²⁾, esta información es clave ya que podemos clasificar a los hongos según su modo de acción así:

5.2.3 Hongos endoparásitos

Este tipo de hongos se caracteriza por alimentarse luego de haber ingresado al interior del nematodo desarrollando sus hifas vegetativas, luego fuera del

nematodo se lograran evidenciar las hifas fructíferas, las esporas de estos hongos deben ser ingeridas por el nematodo, aunque tienen la capacidad de adherirse y perforar la cutícula del nematodo; Estos hongos pueden presentar zoosporas móviles que tienen un tropismo positivo hacia los parásitos, dos ejemplos de estos Hongos endoparásitos, que en algunos ensayos realizados in vitro lograron reducir las poblaciones de nematodos son:

- *Harposporium anguillulae*.
- *Drechmeria coniospora*.

Sin embargo estos hongos solo pueden atacar en las fases en que el nematodo se alimenta L₁ y L₂ y no en el estadio L₃, que es el estadio infectivo más importante en el ciclo de infección ⁽³³⁾.

5.2.4 Hongos ovicidas

Este tipo de hongos tiene una afinidad por los huevos de nematodos y son utilizados ampliamente en el control biológico de parásitos de plantas, estos son saprofitos alimentándose de materia orgánica y no dependen de una población de huevos en el medio para sobrevivir, cuando encuentran un huevo de nematodo activan su metabolismo. Se han identificado dos maneras en las que actúa, una es la penetración directa del huevo por parte de la hifa, o haciendo uso de un órgano especializado llamado opresorio ^(33,34); Algunos de estos hongos son:

- *Paecilomyces lilacinus*
- *Pochonia chlamydosporia*
- *Verticillium chlamydosporium*

5.2.5 Hongos depredadores

Estos hongos al igual que los ovicidas también son saprofitos pero al entrar en contacto con un nematodo activan toda su maquinaria genética. En estudios se ha demostrado que el contacto con el colágeno del parásito estimula la producción de una sustancia mucilaginosa que promueve el atrapamiento ⁽³⁵⁾, el forcejeo de este es crucial para la producción de esta proteína, luego de ello una serie de

proteasas son las mediadoras del proceso de digestión del nematodo. Los hongos conocidos por este modelo de acción son:

- *Arthrobotrys spp.*
- *Dactylaria spp.*
- *Dactylella spp.*
- *Monacrosporium spp.*

Estos microorganismos son capaces de reducir in vitro al igual que in vivo las poblaciones de parásitos tanto en el suelo como en las heces; Teniendo un mejor desempeño en la materia fecal ya que si son ingeridos y llegan al final del proceso de digestión, se encontraran con las larvas y será mucho más efectiva su reducción ya que en las heces tienen más posibilidades de actuar debido a que no se encuentran en su nicho normal donde los hongos también tienen enemigos naturales ⁽³⁶⁾.

5.2.6 Formas de administración de estos hongos

a) Granos de cereales con los hongos

Los hongos tienen una afinidad para colonizar sustratos derivados del almidón, por ello el uso de cereales para que sean colonizados por estos, son un método sencillo y económico para los sistemas de producción, su aplicación es de relevancia en los grupos etarios de animales más susceptibles como lo son las hembras lactantes, los corderos destetos, y machos a los que se les considera su valor como reproductores.

b) Bloques minerales

Este método tiene varias ventajas ya que es un método sencillo y económico donde se integran clamidioconidias de hongos como por ejemplo *Duddingtonia flagrans* a un sustrato mineral necesario para el manejo del ganado. El proceso de obtener las esporas y combinarlas con los minerales es sensible ya que se debe

mantener una temperatura de 4 a 8 grados ya que una temperatura media más alta podría inviabilizar las conidias, este modelo de aplicación es ampliamente utilizado en sistemas de pastoreo y aplicados en las épocas donde los picos larvarios son más altos, esto para disminuir la incidencia de las parasitosis.

c) Bloques energéticos

En este tipo de sistema también se integran clamidioconidias de los hongos y son mezclados con las siguientes sustancias:

- Melaza.
- Alimentos nitrogenados.
- Minerales.
- Alimentos fibrosos.

Estos son implementados cuando el ganado se encuentra en una etapa susceptible para ser invadido o en épocas donde ya se conoce que el pico de parasitosis es alto, puede ser usado como tratamiento estratégico y táctico de las helmintiasis.

e) Bolos de liberación controlada

Este método siendo un poco más invasivo trata de integrar dispositivos intraruminales que poseen en su interior paquetes de conidias, en ensayos in vitro la humedad y temperatura del rumen hace que el mecanismo deje de funcionar pero si se mantiene viable es capaz de liberar 5×10^6 clamidiosporas por día; El sistema está planeado para funcionar por 90 días pero aún se encuentra en fase experimental ^(38, 39,40).

5.3 Identificación de hongos por medio de su DNA genómico.

Los hongos se clasifican comúnmente según sus características fenotípicas y bioquímicas, en la actualidad el uso de técnicas moleculares ha permitido una reorganización de la taxonomía por características más confiables, ya que fenotípicamente los hongos pueden llegar a tener mucha homología dado a que

estos comparten nichos y ecosistemas, lo que se convierte en una dificultad para identificarlos.

Debido a que todo el tiempo se descubren nuevos microorganismos era necesario hacer un acercamiento a su identificación haciendo uso de la biología molecular y la búsqueda de similitudes en las secuencias ITS (Internal transcribed spacer) también denominados (barcode), marcadores de preferencia para identificación molecular de hongos que luego son comparadas con secuencias en bases de datos internacionales de nucleótidos INSD (*International Nucleotide Sequence Databases*).

En estudios realizados en 2011, (Conrad L. Schoch) y colaboradores compararon 6 regiones del ADN fúngico, para saber cuál era el más adecuado y sensible para la identificación de los hongos

1. subunidad de la citocromo-oxidasa
2. subunidad RBP1 de la RNA polimerasa II
3. Sub unidad Grande (LSU)
4. Sub unidad Pequeña (SSU)

Los resultados de esta investigación mostraron que las regiones más confiables para la amplificación e identificación de los mismos fueron la región (ITS-SSU). La región más utilizada en la contemporaneidad es la ITS debido a la facilidad de amplificarlo y de obtener un producto de calidad, que posteriormente podrá ser secuenciado.

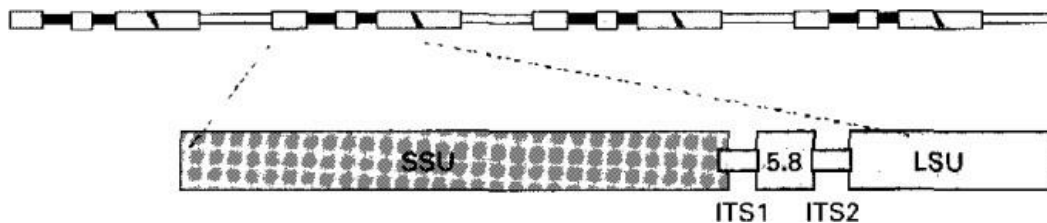


Fig. 2 Descripción grafica de la Región (ITS)
 Localización de los cebadores ITS1 e ITS2 (flechas).
 ITS: espaciadores transcritos internos,
 ETS: espaciadores transcritos externos
 , IGS: espaciadores intergénicos no transcritos.

5.4 SUELOS DE PARAMO

Los páramos son ecosistemas ricos y diversos albergan gran cantidad de especies vegetales, de insectos, aves, mamíferos y ni que decir de gran volumen de flora microbiana que excede por múltiples a las anteriores; Sus características fisicoquímicas hacen de este tipo de ecosistema uno de los más complejos y de gran importancia para la vida en el planeta, por debajo de este se encuentran redes extensas de aguas subterráneas, cuerpos de agua como lagunas y grandes charcos que albergan gran número de especies que poseen gran endemismo.

Según (cuesta et al. 2008) Colombia posee más de 1.443.425 hectáreas de territorio paramuno que representa el 47.65 % de paramos a nivel Suramérica. En este trabajo se hizo un muestreo de suelo proveniente de sub paramo ubicado en (longitud 73° 52 min 51 segundos / latitud 53°20min 24 segundos) a 2725 msnm con una temperatura media de 12.5 °C, un PH que oscila entre los 5.4 y 6.6 en el territorio muestreado, compuesto en su mayor parte por limo 22% y arena 78%, con un porcentaje de materia orgánica en descomposición lenta del 67% características que lo hacen interesante para el aislamiento de cepas fúngicas a las que este ambiente les es propicio para su crecimiento y proliferación; Por ello fue el lugar elegido para realizar el muestreo, para el aislamiento de los ejemplares de interés⁽⁴¹⁾.

5.5 NEMATODOS

Los Nematodos, son un filo de animales muy conocidos como parásitos del reino plantae, animalia. Como característica relevante se puede decir que son ubicuos y se pueden encontrar en vida libre y como parásitos en muchas partes del cuerpo de los organismos susceptibles a su infección, sus características fundamentales es que poseen un cuerpo alargado, cilíndrico, de simetría bilateral, de los cuales se conocen más de 25.000 especies y se calcula que podría haber más de un millón; De estos organismos se calcula que representan un 80 % de la vida animal en la tierra ⁽⁴²⁾.

5.5.1 Características de los nematodos

En cuanto a su tamaño varía entre los 0,1 mm a 2,5 mm de longitud y entre 5 y 100 micrómetros de ancho, pero debido a la gran variedad y a su adaptabilidad a diferentes biotopos y animales hay ejemplares que pueden ser mucho más grandes. La superficie exterior de estos organismos es bastante resistente y se conoce como cutícula que está compuesta principalmente de colágeno; El interior del animal está compuesto por un líquido que sirve como sostén hidrostático y permite la distribución de nutrientes, y órganos dentro del mismo.

Su sistema digestivo y nervioso es relativamente completo, mientras que no presenta órganos especializados en la respiración ni en la circulación. Su tubo digestivo está formado por su parte anterior, una faringe rodeada de varios músculos y un intestino que desemboca en la parte posterior. Su sistema nervioso consiste en una red de ganglios situados circularmente alrededor del esófago y de donde surgen varios nervios que recorren todo su cuerpo, encargados de responder a estímulos ⁽⁴³⁾.

La parte externa de los huevos está constituida por tres capas:

- Interna lipídica compuesta por ascarósidos y proteínas

- Media quitinosa
- Externa o vitelina constituida por proteínas.

5.5.2 Ciclo de vida y alimentación

El ciclo de vida que tienen los nematodos depende de su hábitat y de si son formas libres o parásitas. En las formas libres, normalmente efectúan unas cuatro mudas de piel a lo largo de su vida. Su alimentación incluye algas, hongos, animales pequeños, además de materia en descomposición, por esta razón tienen un papel importante en el reciclaje de material orgánico, su presencia en el suelo y en gran cantidad de ecosistemas hace que los nematodos tengan también muchas formas de alimentarse, una de las cuales es colonizar un individuo susceptible y lograr perpetuar la especie. Teniendo dentro de ellos diferentes estadios evolutivos⁽⁴⁴⁾.

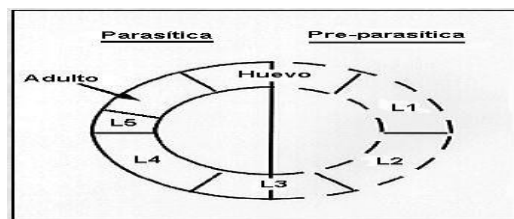


Fig. 3 Estadios evolutivos de los Helmintos.
Tomado de <http://cal.vet.upenn.edu>

El estadio (L1) se desarrolla en el interior de un huevo, crece rápidamente y luego muda a L2. Esta segunda etapa larvaria también muestra un aumento rápido de crecimiento seguido por una segunda muda y dando origen a tercera etapa larvaria (L3), que es la forma infectiva de la mayoría de la especie de nematodos. Esta (L3) crece y luego mudando origen al adulto (L5) inmaduro. Estas L5 pasan por una etapa final de crecimiento para convertirse en hembras o machos adultos sexualmente maduros⁽⁴⁵⁾.

5.6 EL OVINO

La ovino cultura es una buena alternativa de producción agropecuaria en el país debido a la suma de cualidades que tiene la especie y las posibilidades geográficas colombianas que la hacen viable, además de las condiciones que presenta el mercado debido a su creciente demanda; esta situación convierten a los ovinos en una de las especies con más perspectiva de desarrollo en el área pecuaria en Colombia ⁽⁴⁶⁾||

—Desde entonces ha sido muy bien acogida en el sector agropecuario, generando progreso e integrando nuevos modelos económicos en el país; La información sobre el sector ovino y caprino en particular, es escasa, cargada de imprecisiones, desactualizada y fuera de contexto estratégico, generalmente los anuarios estadísticos agropecuarios disponibles se centran en las especies tradicionales, careciendo de información de especies y sistemas de producción marginal como la ovina y caprina|| ⁽⁴⁷⁾.

De los principales problemas que afectan a los ovinos son las parasitosis por nematodos, seguidos por bacterias, hongos y por ultimo virus; en cuanto a parásitos es común encontrar infecciones en distintas partes del sistema digestivo, y también en el sistema respiratorio: en el abomaso se localiza principalmente *Haemonchus contortus*, en el intestino delgado se identifica *Bunostomum trigonocephalum*, *Cooperia curticele*, *Cooperia mcmasteri*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus spathinger*, *Trichostrongylus columbriformes*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Strongyloides papillosus*, y en el intestino grueso a *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis* y *Chabertia ovina*; en estos casos se hace uso de controladores químicos que poseen varios problemas entre los más importantes los siguientes:

- Personal poco capacitado y tratamientos empíricos poco racionales en volumen, concentración y frecuencia.
- Contaminación del espacio donde son manipulados y suministrados.
- Contaminación de sub-productos.
- Resistencia de los parásitos.

- Efectos adversos en quien suministra los tratamientos.

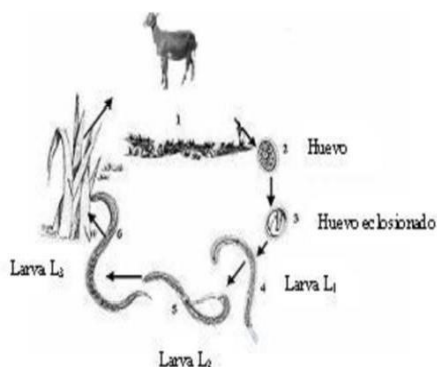


Fig. 4 Ciclo evolutivo de los Helmintos
Tomado de www.researchgate.net

Estos son los principales problemas además la falta de agremiación hacen que el productor ovino no prospere como debería.

Las enfermedades parasitarias ocasionan alta morbi-mortalidad, los animales en que más se encuentran estos hallazgos son corderos y hembras en preñez por sus condiciones inmunológicas. En Colombia son muy frecuentes las adversidades por estos parásitos y son los responsables entre otras causas del retroceso de la industria ovina, ya que genera un aproximado de (50%) en pérdidas de la producción y en el futuro es un panorama que puede empeorar. Las diversas prácticas de manejo favorecen la infección por nematodos gastrointestinales en ovinos, lo que limita el desarrollo de la industria, debido a bajas en la productividad. La mayoría de los ovinos, son propensos a infecciones parasitarias, debido a que su reproducción y cría que hasta poco antes del faenado se hace de forma colectiva por ser de naturaleza gregaria y porque las pasturas donde se pastorean están cargadas de parásitos⁽⁴⁸⁾.

Con respecto al objetivo del milenio de consumir alimentos más saludables, se ha estudiado la posibilidad de desarrollar otros métodos de control para las

parasitosis gastrointestinales, tales como el control biológico, por ejemplo se han realizado experimentos en los que se ha demostrado que los hongos poseen potencial para combatirlos. Estos hongos actúan de diferentes maneras por ejemplo *Duddingtonia flagrans* secreta una proteína extracelular con capacidad enzimática, ella es capaz de degradar gran cantidad de sustratos incluyendo la cutícula de los nematodos; En pruebas in vitro han reducido en (82.8%) la población de parásitos; La expresión del gen (AmpS1) de 386 codones individuales ocurre en presencia de los parásitos y causan la muerte, resultando en la colonización de sustrato derivado del parasito ^(49,50).

Se ha demostrado actividad larvicida y ovicida contra diferentes especies de nematodos lo que sugiere que la presencia del parasito es fundamental para que el potencial metabólico del hongo se active. Experimentos demuestran que la expresión de genes para el ataque físico, químico y mecánico incrementa en presencia de nematodos y con ellos incrementan las estructuras especializadas en la captura de los mismos. Gracias a estos hallazgos podemos pensar en enemigos naturales de los parásitos presentes en diferentes biotopos, teniendo en cuenta esta información podremos encontrar una relación entre el medio, hongos y los parásitos que nos darán la claridad para entender su comportamiento y combatirlos ⁽⁵¹⁾.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de los Ovinos

Reino	Animal
Filum	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Ungulado
Suborden	Artiodáctyla
Familia	Bovidae
Tribu	Caprini
Género	<i>Ovis</i>
Especie	<i>Ovisaries</i>

5.6.1 Fisiología digestiva del ovino

El follaje de que se alimentan estos animales ingresa por la parte anterior de los mismos, el cual está formado por la boca, la cual contiene lengua y dientes. De allí pasa a la faringe y junto con las enzimas digestivas y de la saliva baja por medio del esófago al estómago, el cual contiene cuatro compartimentos: el retículo, rumen, el omaso y el abomaso, siendo el rumen el compartimiento más grande. El rumen es un gran compartimento de fermentación que cuenta con más de 350 tipos de bacterias y más de 40 tipos de protozoos además de poseer gran cantidad de hongos que ayudan al rumiante a degradar y utilizar alimento fibrosos compuesto por azúcares complejos. La presencia de microorganismos en el sistema digestivo le permite al pequeño rumiante utilizar nutrientes presentes en los alimentos que no pueden ser degradados por enzimas producidas por mamíferos ya que proceden de polisacáridos de celulosa, hemicelulosa y pectinas derivadas de su alimento. En el retículo se moverá el bolo por contracciones de las capas musculares que rodean el rumen. En el omaso se absorbe agua, sodio y potasio y el abomaso se encarga de segregar ácido clorhídrico y pepsina para la degradación de proteínas. Por último, el intestino delgado se lleva a cabo la absorción de ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos y agua a través de las vellosidades intestinales. Mientras que el intestino grueso reabsorbe, recircula y conserva el agua, además de la absorción de minerales⁽⁵²⁾.

5.6.2 Fisiopatología del ovino

La estrongilosis gastrointestinal o gastroenteritis parasitaria de los rumiantes es debida a la presencia en el abomaso, intestino delgado e intestino grueso de nematodos pertenecientes al orden Strongylida y, que pese a estar ubicados en varias familias, se agrupan bajo la denominación de estrongílos. La estrongilosis gastrointestinal es considerada una parasitosis cosmopolita⁽⁵³⁾.

Los géneros más comunes pertenecen a las familias Trichostrongylidae (*Haemonchus*, *Mecistocirrus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*); Ancylostomatidae (*Bunostomum*, *Agriostomum*) y Strongylidae (*Oesophagostomum*). Los ciclos biológicos de estos parásitos son bastante similares, ya que son directos ⁽⁵⁴⁾; Es decir, no requieren de hospederos intermediarios para completar sus ciclos de vida.

Los niveles de infestación parasitaria se asocian con manifestaciones clínicas, tales como anorexia, anemia, diarrea y caquexia. Los signos clínicos pueden pasar desapercibidos en casos de infestaciones leves o medias o ser confundidos con problemas nutricionales o de manejo; sin embargo, podrían servir como criterio de apoyo para el tratamiento antihelmíntico selectivo en fincas con antecedentes de problemas parasitarios⁽⁵⁵⁾. Se dispone de evidencias que la distribución de las cargas parasitarias al interior del rebaño no es uniforme y que aunque pastoreen los mismos potreros y pertenezcan a grupos de edad similares, sólo un pequeño porcentaje de hospedadores alberga el mayor número de especies y cargas parasitarias; de allí que el tratamiento selectivo de la fracción de animales que lo amerite debería constituir una acertada estrategia de control ⁽⁵³⁾.

5. METODOLOGIA

6.1 Universo, población, muestra.

- Universo: Seis cepas de hongos aisladas en cultivo puro, que luego de filtrar sus conidias se utilizaran para realizar pruebas de enfrentamiento con huevos de nematodos para determinar su capacidad de biocontrol in vitro.
- Población Y muestra: cepas fúngicas a las cuales se le evaluara su capacidad de realizar control biológico de huevos de nematodos patógenos de ovinos in vitro, obtenidos por la técnica de flotación de McMaster y suspendidos en solución buffer (PBS).

6.2 Tipo de estudio

- Este trabajo corresponde a una investigación de tipo cualitativo con un diseño de tipo descriptivo, experimental.
- cualitativo: El trabajo tiene este modelo ya que pretende evaluar las características morfológicas de los huevos de nematodos enfrentados a conidias y sustancias derivadas del micelio in vitro, por medio de una representación cualitativa en escala de daño el cual se le evaluara a seis cepas fúngicas aisladas de suelo sub-paramuno.
- Descriptiva: debido a que detalla la actividad antagonista frente a huevos de nematodos de seis cepas fúngicas aisladas de suelo sub-paramuno
- Experimental: debido a que se llevó a cabo un ensayo in vitro donde se enfrentan cuatro diluciones de conidias de seis cepas de hongos aisladas de suelos semi-paramuno vs huevos de nematodos.

6.3 Hipótesis

Existe capacidad por parte de los hongos presentes en este suelo para generar daño en los huevos de estrongídeos.

3.4. Variables del estudio

Tabla 2 Variables dependientes e independientes.

TIPO DE VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN TEÓRICA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIABLE
Independiente	Cepas Fúngicas	El uso de especímenes fúngicos para determinar el porcentaje de reducción. Este se basa en su potencial para degradar diferentes tipos de sustratos , que se encontró en una revisión de bibliografía que habla sobre el metabolismo de los mismos y estudios previos que usan hongos como insumo principal para ejercer biocontrol de otros organismos.	Cualitativa
dependiente		Escala de daño en los huevos de nematodos	Cualitativa
Independiente		Concentración de conidias de las seis cepas fúngicas evaluadas.	Cuantitativa


7. METODOLOGÍA


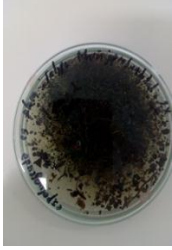
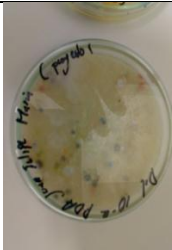
7.1 Fase 1: Aislamiento primario de los especímenes fúngicos y determinación de características fenotípicas macroscópicas de cada uno de ellos.

Se realizó la recolección de suelo en Nemocón que es un municipio del departamento de Cundinamarca, el cual es un terreno no modificado por el ser humano. En el laboratorio se homogenizó el suelo y se tomaron cinco gramos del mismo para realizar:

- Espolvoreado en placa por triplicado en (AGAR-AGAR)
- Dilución en base diez hasta 10^{-12} sembrado en profundidad para observar colonias aisladas para luego obtener cultivo puro en agar (PDA) al cual se le realizaron tres repiques.
- Se observó el espolvoreado en placa luego de incubarlo a 20°C durante siete días.
- Se evaluaron las características fisicoquímicas del suelo.

Tabla 3. Procedimientos de fase pre-analítica.

Procedimiento	Espacio físico	Equipo utilizado	resultado	Determinante	evidencia
Muestreo	Nemocón	Barreno	Muestra de suelo	Esterilidad del material, y procesamiento inmediato	

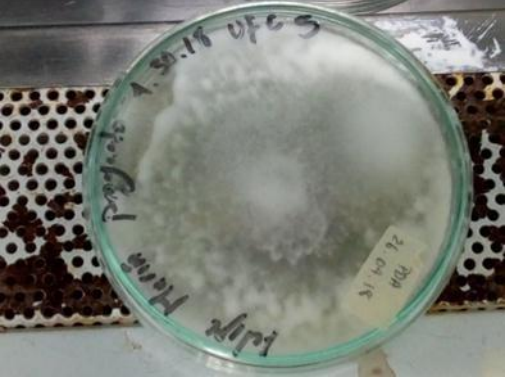
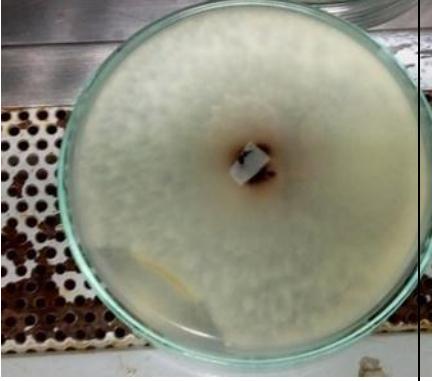
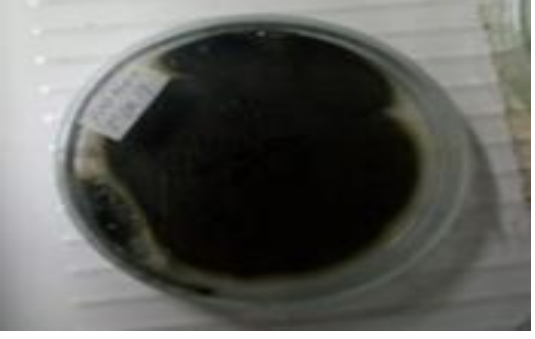

Preparación de medios y esterilización de material.	Central Laboratorio	Autoclave	Medios (PDA) Y (AGAR-AGAR)	Esterilidad y concentración adecuada de componentes	
Espolvoreado en placa	Laboratorio	Incubadora memmerth	Crecimiento de micelios fúngicos	Mantener la humedad temperatura y oscuridad.	
Diluciones y Siembra en profundidad. incubación de (20-22°C)	Laboratorio uno	Pipeta 1000 μ L (CSB)		Esterilidad y manejo de volúmenes adecuados.	


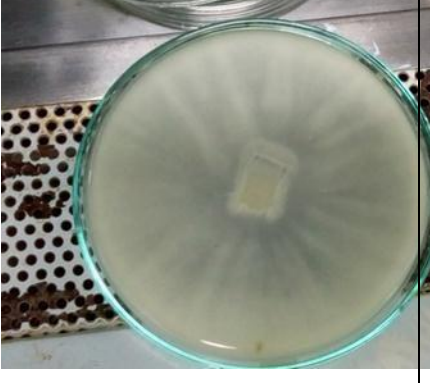
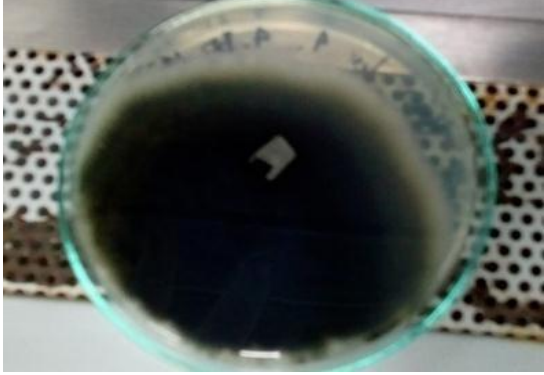
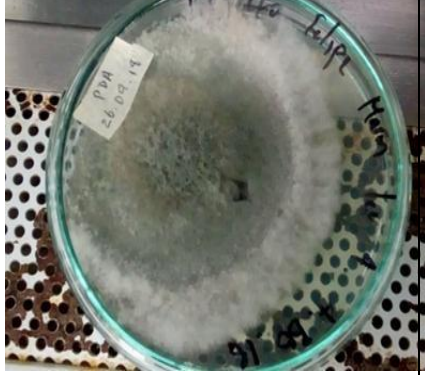
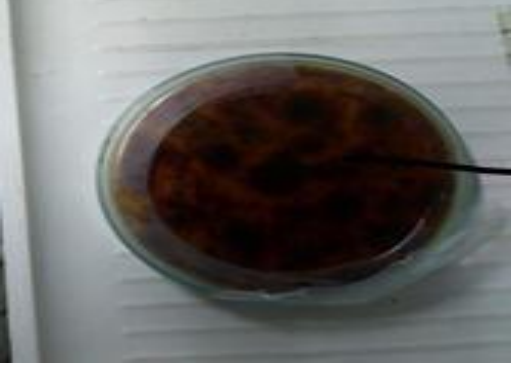

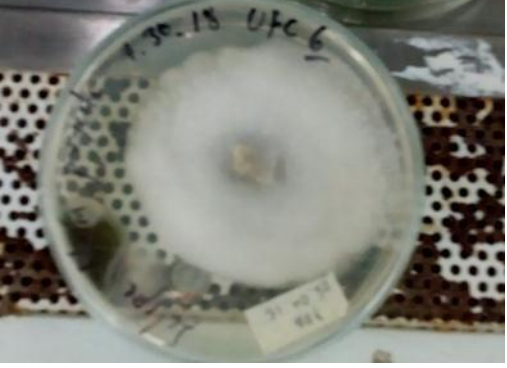

7.2 Fase 2: purificación de los aislamientos de hongos en medio (PDA).

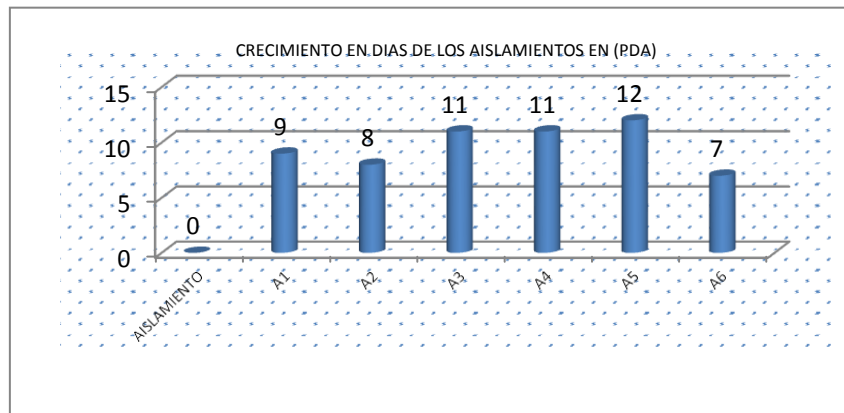
Se tomaron directamente de los medios de aislamiento primario con ayuda de una asa de micología estéril, secciones miceliales que a consideración del investigador fueron las apropiadas para hacer el repique se distribuyeron en agar (PDA) estéril, que después de elaborado se dejó una caja de Petri con el medio sin sembrar para usarlo como control de calidad y darnos cuenta de que lo que crecía en los medios era contaminación o realmente los hongos de interés.

Para el repique se usó el mechero Bunsen y un asa micológica que después de cada uso era esterilizada; Los medios fueron puestos en incubadora a 20°C durante diez días, el crecimiento de los medios era evaluado cada día para garantizar las variables, como lo son temperatura y evaluación macroscópica de crecimiento y colonización de sustrato, obteniendo de esta manera los hongos que se utilizaron en el estudio.

Tabla 4. Hongos recuperados de suelo semi-paramuno, y características macroscópicas.

	Foto anverso	Foto reverso	comentario
Hongo A1			Colonias algodonosa, De color blanco luego color blanco a café. Crecimiento rápido.
Hongo A2			Colonias negras, polvorientas De aspecto convexo. Crecimiento rápido.

<p>Hongo A3</p>			<p>Colonias blancas, de aspecto algodonoso, crecimiento rápido.</p>
<p>Hongo A4</p>			<p>Colonia gris a negro, de aspecto algodonoso y polvoriento, crecimiento rápido.</p>
<p>Hongo A5</p>			<p>Colonias algodonosas de color blanco a marrón, algodonoso.</p>
<p>Hongo A6</p>			<p>Colonias blancas, algodonosas que llegan hasta la tapa de la caja de Petri.</p>



7.3 Fase 3: obtención de pull de huevos por medio de la técnica de flotación McMaster.

En la población de ovinos de CIDTEO (ANEXO 3) se tomó una muestra de materia fecal de 6 gramos directamente del ano del animal y se manejó la muestra según los protocolos de la Universidad Nacional De Colombia (ANEXO 2) luego se realizó la técnica de flotación de huevos de lo obtenido por medio de esta técnica se realizó un pull con todas las muestras analizadas que tenían alta concentración de huevos por gramo (HPG), que se ven en color rojo en el (ANEXO 3) luego se suspendieron los huevos en agua destilada estéril, y se procedió a contar 2 ml del pull para calcular huevos por mililitro almacenar de 4-8°C durante dos días tiempo en el que se preparó los hongos para las pruebas de enfrentamiento , los huevos por ml se calcularon de la siguiente forma:

$$(\text{Huevos contados} \times 100/2)$$

Se contaron 50 huevos por ul y se calculó un aproximado de 3100 huevos en total.

7.4 Fase4: preparación de filtrado de micelio para limpiar conidias de los hongos en buffer (PBS) desde un medio (PDA).

Se tomó 1x1 cm de Agar (PDA) cortada con asa micológica estéril a 70°C y se cortó el micelio de los seis especímenes fúngicos, luego cada uno fue dispuesto en un frasco estéril que contenía 10ml de solución buffer (PBS) en donde los fragmentos de micelio se lavaron durante 20 minutos en un agitador marca TALBOYS. Fig. (6)

Se prepararon frascos estériles, que fueron modificados poniendo sobre ellos una tela filtro de 20um por la que se hicieron pasar los 10ml de buffer (PBS) que se encontraban en agitación previa. Con ayuda de jeringa de 10ml estéril, una por cada ejemplar fúngico, se pasó a cámara de Neubauer usando 50ul, luego de establecer el número de en el volumen total, las alícuotas se pusieron en tubos eppendorf de 2ml y se almacenaron 5 tubos por espécimen fúngico (4-8°C) fig. (8)



Fig. 5 Método de filtración de conidias.
Recipientes estériles con la tela filtro.
Foto tomada por el investigador.



Fig. 6 Método de lavado de micelios fúngicos
Agitador TALBOYS con los frascos agitando los micelios,
Foto tomada por el investigador.

Luego de agitarlos se procedió a tomar 20 μ l con una pipeta Acumax luego la suspensión de conidias se conto usando la suspensión del micelio filtrado en camara de Newbauer con laminila de cuarzo; Usando un microscopio OLIMPUS X300, se monto la camara y se observaron con el objetivo de (10-40x) y se contaron las conidias de cada hongo multiplicando las conidias contadas en la camara por 40 para obtener el numero aproximado del total de conidias en la solucion de 50 μ l; se uso una micropipeta Acummax de 50-100 μ l tomando micelio filtrado. Contando en cada division de la camara L1, L2, L3, L4, L5, observando que no hubiese burbujas se realizo el recuento en la cuadrícula de conteo para tener el volumen adecuado en la camara, para realizar el conteo de manera mas sencilla se aplico colorante azul de algodón para tener mas claridad a la hora de observar las conidias, las condiciones para ser contables consistia en la homogeneidad y regularidad de las paredes de las conidias esto con el fin de saber si las conidias estaban viables a la hora de hacer el ensayo.

Tabla 5. Numero de conidias en 50ul obtenidas por el investigador.

Hongo	conteo	formula	Total en 50 μ L
A1	19	19.40	760
A2	22	22.40	880
A3	25	25.40	1000
A4	19	19.40	760
A5	18	18.40	720
A6	27	27.40	1.080

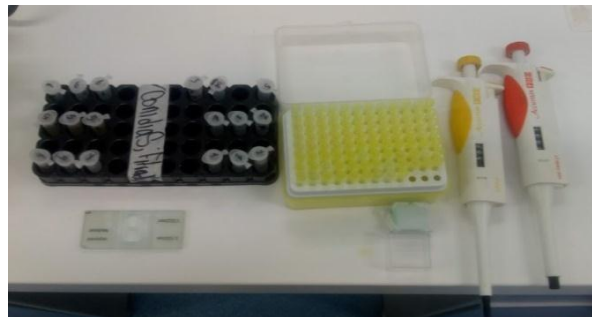
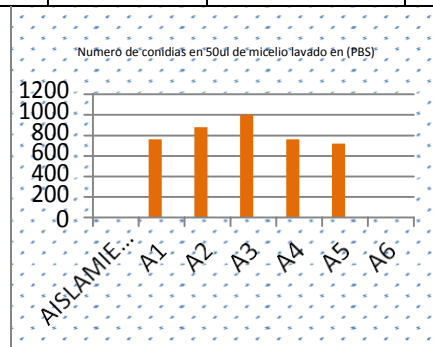


Fig. 7 Material utilizado para contar y alicuotar las conidias

Para el conteo realizado

Foto tomada por el investigador.



Fig. 8 Conidias filtradas y alicuotadas para el ensayo.

7.5 Fase 4: preparación de pruebas de enfrentamiento hongo vs huevo de *Strongylus* in vitro.

En Luego de obtener las conidias y los huevos se procedió a realizar las pruebas cruzadas donde se enfrentó un número aproximado de 1000-2000 conidias con aproximadamente 100 huevos; En ellos se evaluó la capacidad de los hongos y sustancias preformadas para generar algún daño en las estructuras de los huevos; los parámetros para analizar en los huevos fueron:

1. homogeneidad.
2. color.
3. integridad de las membranas.

Se compararon los resultados de cada hongo con respecto al control, y se dio un valor de daño en los huevos según las características encontradas en cada uno de ellos, teniendo como criterio principal evaluar el daño en el huevo y el porcentaje de daño de los mismos según cada entidad fúngica, las conidias de cada hongo se diluyeron en la solución buffer (PBS) para determinar si el daño era concentración dependiente o si por el contrario no estaba ligada a esa variable.

La cubierta de los huevos está constituida por tres capas:

- a. Interna: lipídica compuesta por ascarósidos y proteínas
- b. Media: quitinosa

c. Externa: o vitelina constituida por proteínas mucopolisacáridos.

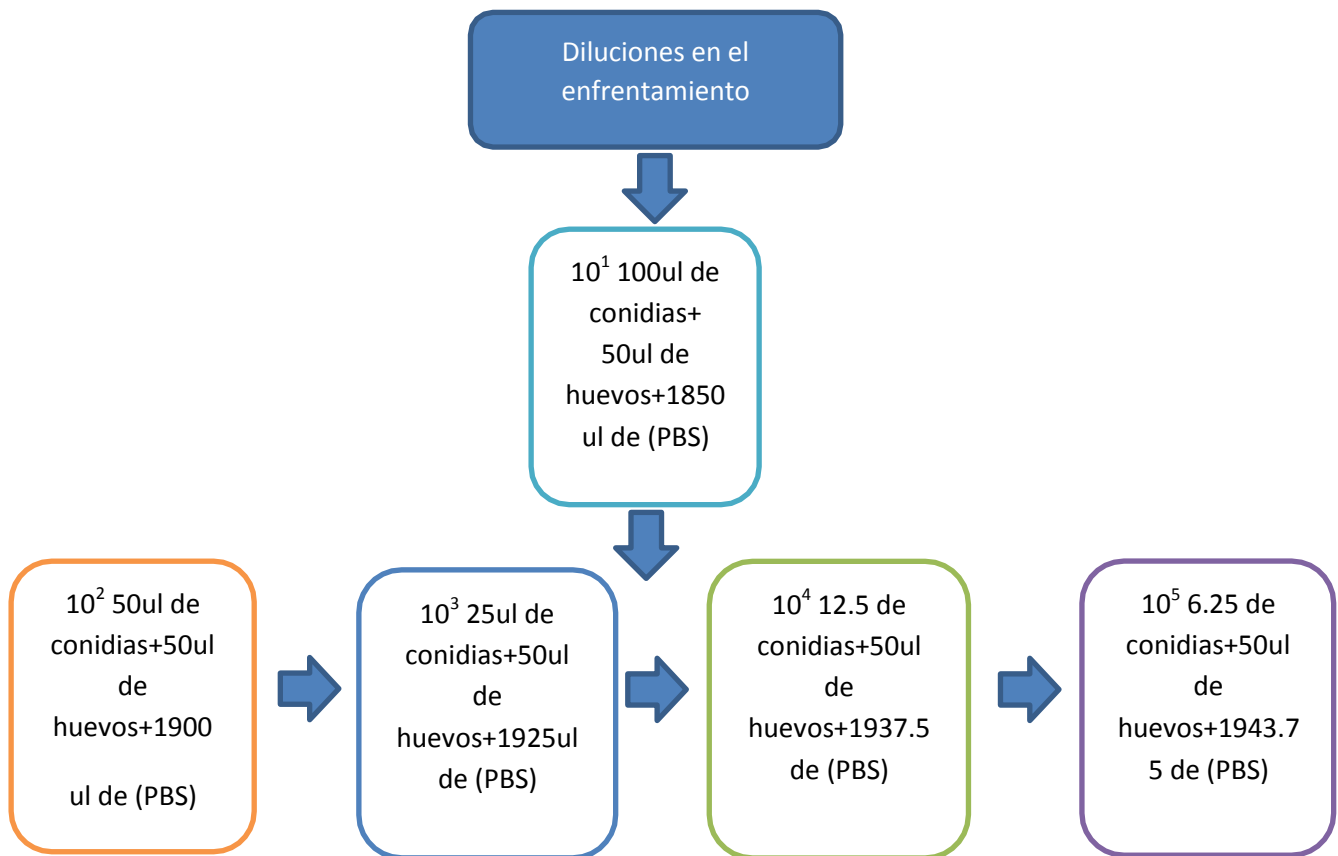
La capacidad de supervivencia de los huevos depende principalmente del grosor de su cubierta, y de las características del medio en el que se encuentran, por ello se empleó un medio donde se mantuviesen viables tanto las estructuras fúngicas filtradas como los huevos.

8. Realización de bioensayos

Los bioensayos fueron realizados en la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca y la Universidad Nacional De Colombia en donde se dispuso del laboratorio número 1 y 7 respectivamente además del laboratorio de (CIDTEO) en el centro agropecuario Marengo; Además con el objetivo de encontrar actividad ovicida por parte de los especímenes fúngicos. Esta actividad fue evaluada a seis cepas de hongos a los cuales se obtuvo biomasa y se filtraron para luego enfrentarlos con huevos de nematodos que parasitan al ganado ovino obtenidos por la técnica de flotación de McMaster ANEXO (2), para estos se realizaron diferentes ensayos en los que se hicieron diluciones seriadas y se pudo analizar si esa variable afectaba el ensayo.

- Control positivo: Huevos de estrogilidos frente un antihelmíntico comercial (Tubos eppendorf de concentrado de huevos 3 con albendazol y 3 con levamisol)
(Figura 9)
- Control negativo: Huevos de estrogilidos sin ninguna adición disueltos en (PBS) 3 tubos con el concentrado de huevos disueltos en buffer (PBS)
(Figura 10)
- Tratamiento con las cepas de hongos (5 tubos de concentrado de huevos con cada cepa de Hongo a cinco diferentes concentraciones 10^{-1} - 10^{-5} además se montaron control positivo con un antihelmíntico comercial

(levamisol y albendazol) y un control negativo que fue una suspensión de huevos en (PBS) (tabla 7).



Diluciones de las conidias y volumen de cada uno de los enfrentamientos y aforo de (PBS)

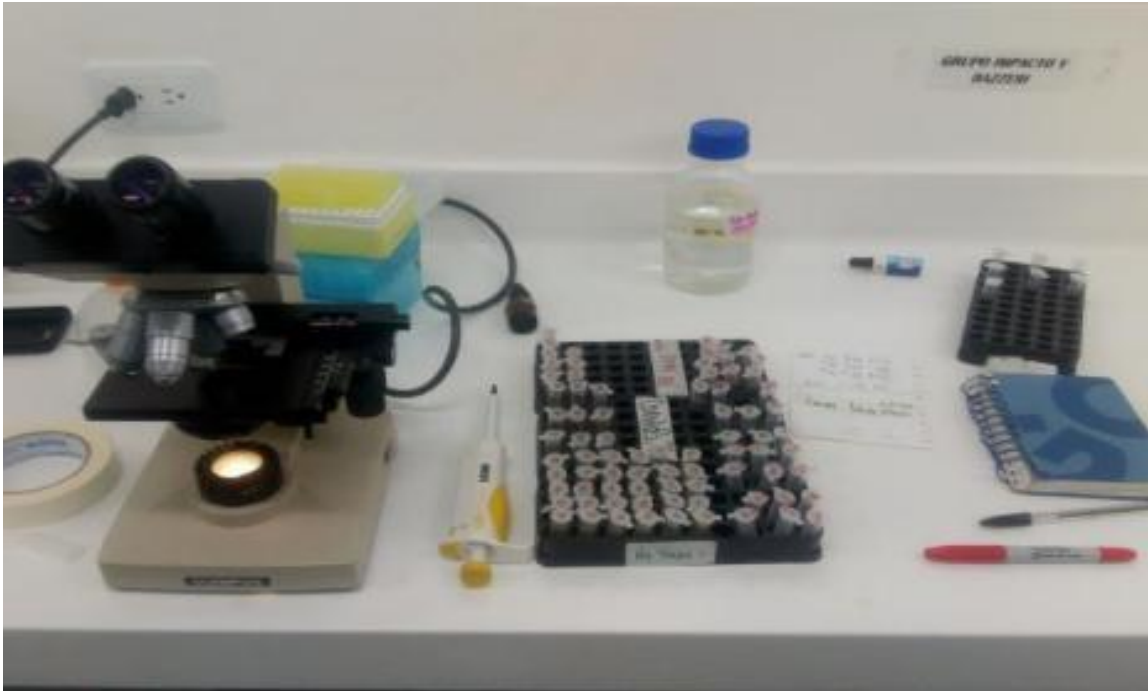


Fig. 9 Enfrentamiento Conidias VS Huevos.
Diluciones de conidias enfrentadas en el experimento,
Diseño de los ensayos realizado por el investigador.

8.1 Fase 5.1: digestión de las muestras y extracción de DNA genómico por medio de kit comercial.

A los tres hongos en los cuales se evidencio actividad dañina sobre los huevos, se procedió a cortar 1cm^2 de micelio del repique de cada uno, luego el micelio se realizó disrupción utilizando nitrógeno líquido que se encarga de congelar para luego con ayuda de un mortero estéril fragmentar el micelio.

Luego las muestras se dispusieron en un eppendorf de 2ml a los cuales se realizó la extracción del ADN genómico con el Quick-DNA™ Kit de ZYMO RESEARCH® (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de DNA a partir del micelio de los 3 hongos que efectuaron algún tipo de daño sobre los huevos. El DNA se cuantificó con ayuda de un NanoDrop® ND-2000 el cual nos permitió analizar la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos.

8.2 Fase 5.2 Amplificación de la región ITS por medio de PCR

La amplificación de la región ITS por PCR se realizó utilizando los *primers* ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' sintetizados por Invitrogen (USA) y la enzima OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix. Como control positivo se utilizó DNA genómico de (*Penicillium notatum*).

Tabla 6. Cantidad necesaria de componentes para la realización de PCR con un volumen final de 50ul.

Componente	Concentración para volumen final de 50ul para seis muestras
OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix	150.0µL
Primer ITS1	6.0µL
Primer ITS4	6.0µL
Agua up	126µL
DNA (8ng/ul)	12µL

Las condiciones de PCR se presentan en la tabla 4 según lo descrito por el protocolo del grupo (CEPARIUM). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Multi Gene Optimax (Labnet International, Inc.USA) en el laboratorio central.

Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS-1ITS-4

Desnaturalización	94°C, 30seg	
Desnaturalización	94°C, 15 seg	x35
Anillamiento	55.5°C,30seg	
Extensión	68°C, 45seg	
Extensión final	72°C, 5 min	

El producto de PCR fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 0.5X, teñido con SyBRsafe en la relación recomendada con respecto a los ml de gel a preparar. Se usó como marcador de masa molecular

GENLOADER (100pb) de MACROGEN (USA) un volumen de 5ul. Se aplicó un voltaje de 80V 400mA y 45 minutos. El gel se observó en el trans-iluminador con la protección necesaria y luego con el sistema de foto documentador, usando el software del equipo y los protocolos establecidos por el mismo.

8.2 FASE 5.2 Secuenciación y análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen situado en la ciudad de EEUU. Allí fueron purificados y posteriormente secuenciados por el método Sanger. La edición de las secuencias se realizó con el software Chromas Lite 2.0 de Technelysium (Australia) y la comparación de las secuencias con las presentes en BLASTn ⁽⁵⁶⁾ (BLAST[®], National Library of Medicine, USA).

9. RESULTADOS

De los seis hongos que se cruzaron con los huevos, tres demostraron tener una actividad deletérea sobre la estructura del huevo esta actividad fue mediada por metabolitos de los mismos y no por acción física los aislamientos (A2, A3, A5), fueron quienes dañaron de alguna manera la estructura, se observa que los huevos pierden homogeneidad, claridad de sus mórulas, también se encuentra disminución del grosor de su cutícula, y eyección del contenido del mismo; El daño se calcula de 1-5 siendo uno el menor daño y 5 el mayor según la tabla 7.

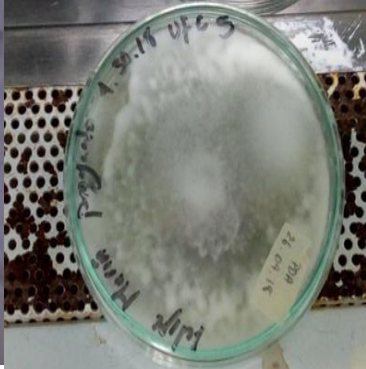





La totalidad del daño se determinó como la suma de uno o más ítems que se relacionan en la siguiente tabla:

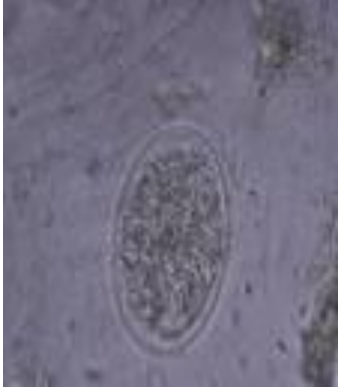








Tabla 8. Escala de daño propuesta por el investigador 15/12/2019.


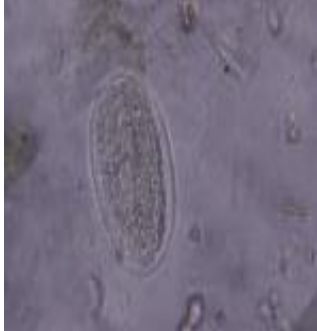



Nivel de daño	Característica morfológica
1	Alteración en la membrana externa del huevo
2	Alteración en la membrana interna del

	huevo
3	Alteración en la morfología de las mórulas
4	Eyección del contenido del huevo
5	Tres o más ítems de escala de daño

Tabla 9. Fotografías tomadas 10 días después de realizar el enfrentamiento, que evidencian el daño causado a los huevos por parte de las conidias.

Hongo y controles	Fotografía micelio	Estructura en azul de algodón.
A1 (1)		
A2 (3)		
A3 (3)		

<p>A4 (0)</p>			
<p>A5 (5)</p>			
<p>A6 (1)</p>			

Control negativo (PBS) (0)			
Control positivo (5)		<p>Antihelmíntico comercial: Se observa un aclaramiento de la morfología del huevo evidenciando un daño sobre toda su estructura</p>	(Levamisol)
Control Positivo (3)		<p>Antihelmíntico comercial: Se observa que la morfología del huevo está siendo afectada en la parte superior donde se observa una compresión de la parte superior del mismo.</p>	(Albendazol)

Se determinó por el aspecto de los huevos la actividad elicitora frente a los huevos con ayuda de una cámara (Canon EOS SD Mark) con lente para microscopio; Se observaron campos microscópicos hasta analizar 20 huevos por tipo de aislamiento y dilución, se observaron varios campos microscópicos en 10x y se analizaron 10-20 huevos para determinar el daño del hongo sobre ellos.

9.1 Extracción de ADN genómico, PCR y electroforesis en gel de agarosa

El producto de PCR fue sometido corrido en gel de agarosa, como se evidencia en la figura (9)

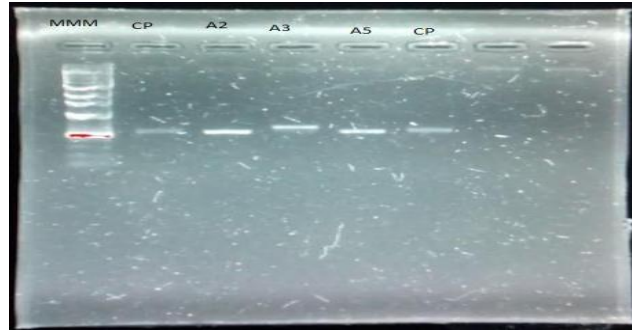


Fig. 10 Electroforesis en gel de agarosa 1,5% y TBE 0.5x carril 1 marcador de masa molecular GENELADER 100 Pb, carril 2 control positivo, Carril 3 A2, carril 4 A5, carril 6 A5, carril 7 control positivo *P. notatum*.

9.2 Resultados; Edición y análisis de secuencias:

El servicio de secuenciación de MacroGen envió los datos correspondientes a los 3 productos de PCR secuenciados. Las 3 secuencias fueron editadas con el programa Chromas Lite (Technelysium) para descartar regiones de baja calidad de lectura ⁽⁵⁸⁾. Las secuencias editadas fueron comparadas con el GenBank del NCBI (USA) con el algoritmo BLASTn para la determinación molecular de género y especie de los hongos secuenciados, que se basada en la similitud con las secuencias presentes en la base de datos. Se asumió como significativa una identidad superior o igual al 95% ya que son los primeros acercamientos hacia la identidad del microorganismo ⁽⁵⁹⁾.

Los resultados arrojados por el algoritmo (Blastn) permitieron determinar el género de los tres hongos analizados ⁽⁶⁰⁾.

A continuación se relacionan las secuencias fungicas y el resultado del emparejamiento de las mismas con la base de datos utilizada (BLASTn), además de la comparación en porcentaje de homología:

A5 ITS4 *Chrysosporthe austroafricana* (beta-tubulina) 87.47 %

```
CTAATTAAAATATGAAAGCTGTGATGCGTTGTGGATGTACCTCTAGATACA
GGCAGGCACTGCCGGACGCGACAGGGCGGTCTTGAGAGAGGAATGATGGTG
GTGGCTTCAGTAATGACGACGGCCGGCGGCAAACCATCTGTGAGGAGCACG
GCCTTGGCAGCAGGGGGTAGTAACCATCCTCCTGCTGCAGCCGGCGGGCCG
CGAGGATCTTCCTGACCACCGCACAAACAGCAACAACACCTCCGAGGTCCAG
AGGAGCGCACAGAACGACTTCAAAAAGAGGGTCTTCGGGACCACAGTGGG
GGGTCAATATCGCGCGAACACCCCTGTGTGACCGAGATCTCGCGGACAC
GCTCCCGTCACACGCGTCTGGCAACAAAAATGTCTCCCGCGCCCTCCTCTT
GGATATCGAGCCCGGCACCACGGAGGCCCTCCGTGCCGGCCCCCTCGGCCA
GAGGTCTGCCCCGACAAAATCTCTCTGCCAT .
```

A3 ITS4 *Mortierella minutísima* (ITS) 98.08%

```
GGGTAAACAAAACAAAAGTTTTATGGCACTCCTTTAAAAATCCATATCCAC
CTTGTGTGCAATGTTTGTGGGAAAGTCTTTTCTTTCCCTTCATAAATAT
CAACCTATATCTTTAACAACATTCGTCTGATAACATATTATGAATATACT
TAATTCAAATATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCCACCAAATGCGATACATACTGACCAACTTGTACCACCATA
CATAACATCACACCCAACCCTGGATCGCGCAGATCCCCTCACTATTCTAAT
CCATTAGCAGCATCTCCGCCGCTACACCAAAGGCCCCCCCTCCGGCCGCC
GCCACACATACATGTTCTATCTAGTATCTCGTACTAGCAATCTCTTCTTG
CCCCACTCTCCGCCAGTCCCTCGCCACCCACCACATATCTCACCCGGACTT
CCGCCCCGCGCAACAGCCAACACCCCTGTCTGTCAGTGAGACTTTAACT
CCAGACCACCATAACTATGCTCATCCGAGGGAATGTACGTACACAGAAA
CAAGGGTGGACCACTTTGAGGAACGGGAAACCAAATGAGCTTTAGACGA
CAAGACTTTGCGAAACACCGGTGGAATATGGAATTTATTTAAGAAGTGCC
AATATAAGAACTCGCTTTGTGAATGGAATCTTTCACGCAGGTTACCCT
TACGGGAAAAAGATCTTTTACCAAACGAGTGTTGTTATGGGCACTCCTT
TAAAAAATCCCTAATCCCCCTTGGTGTGGCAATGATTTGTTGGGGA
AAATCCTTTTCTTTTCCCTCCACAAAATAGCTAACCTGGTATTCTTTT
ACTAACAAATCCGTCCGGAATAAGATAATTTTATGCAAATAATACCTCCA
GATTTCAAGATATAAACCTTTTCATC
```

A2_ITS4 *Epicocum nigrum* (ITS) 93.67%

```
GGAAAGTAAACTAAAAATGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGGTCT
TTTGAGTACCTTCGTTTCCCTCGGCGGGTCCGCCCCCGGATTGGACAACATCAA
ACCCTTTGCACTTGCAATCAGCGTCTGATAAACCCAGTAGCTACTACTTTCAAC
ACCGCATCTCTTGCTCCCGCACTCGCATGATCATTCTCGACGCATCTATGACCC
CCCGTCCCGAGTCCCTACAATACGTGCGCTCATGTGATGCTACACAGTACTCG
CTGCTCGCAGCTGTCATCTCGCTACTTTCCGTTTTATACTGTGCTCTGCTCAAC
TTGTAAACTCAAGGCGCGCCCCGGGTGCAGCGTTGAGGATACGCACACCCCGT
TGCTGTCATGCCCATGCTCTCCAAACACCGTTTGCCTCCTACCGCACTCAATAC
TCCGCCCCGCCTCCATCATTCTAACGCTCGATACCACCATGTCTCGTCTAGAAG
TTCCATCCCGTATCTTGACAGACACACCAGATGAACCAAAAAAAAAAGTCTCCCC
AAGGAAAAAATCATTACCTCGCATCTTTGTTCTCTTCCGGTCTGCTACCTCCTT
ACTCCCTGTTCTTTTGC GTTACCCTTCCTTTTCCTTTGCGTGTTCCTC
```

10 DISCUSIÓN:

Los hongos se repicaron en agar PDA y se encontró en algunos estudios como los realizados por (Liu K. et al. 2014) donde describe que es necesario el identificar las capacidades metabólicas de seres vivos que puedan servir para mejorar las actividades humanas ⁽⁶¹⁾, los hongos son benéficos y tienen potencial pero no se ha estudiado como sustancias preformadas por los hongos pueden deteriorar estructuras biológicas, usando como modelo experimental huevos de estrombolidos.

Se ha encontrado que los hongos producen sustancias enzimáticas como Colagenasas, elastasas, hialuronidasas entre otros, que les permite responder a estímulos en el ambiente, como lo describen los estudios realizados por (Rui Wang et al. 2015) en el que hongos como *Arthrobotrys oligospora* los producen para degradar su alimento y biodisponibilizarlos para luego ser digeridos⁽⁶²⁾, también los estudios realizados por (Magnus k. et al. 2014) donde se encuentra los hongos expresan genes que determinan la aparición de péptidos de función

huérfana o desconocida⁽⁶²⁾. Nos dimos cuenta que no es necesario el contacto previo con algún sustrato derivado de nematodos y que sustancias producidas por los hongos son capaces de causar daño sobre muestras biológicas como los huevos de nematodos suspendidos en (PBS).

A los tres días de incubación del enfrentamiento se logró evidenciar como sustancias derivadas del hongo A2, A3, A5 deterioraban los huevos y penetraban la estructura interna de los mismos resultando en un daño nivel (5) con el aislamiento (5) ver (tabla 7) observándose una constante (a menor concentración de conidias más tiempo para causar el efecto esperado, alrededor de 24 horas más por dilución); evidenciando un color rojo característico que se observó también en agar PDA y el Caldo Papa Dextrosa. En los hongos A2 Y A3 se evidencio un cambio significativo en la estructura de los huevos teniendo un nivel de daño (3) observándose la misma constante del hongo 5 (a menor concentración de conidias, más tiempo para causar el efecto esperado, alrededor de 24 horas más de reacción, por dilución) de esta manera se realizó un monitoreo de los enfrentamientos por diez días tiempo en el cual se dio por finalizado el experimento. De dicha actividad deletérea no se encontró evidencia científica en la literatura, ya que no se han realizado evaluación de péptidos o metabolitos derivados de hongos sobre diferentes sustratos, dejando un camino por recorrer en el campo del control biológico.

El daño fue concentración dependiente porque se observa como a mayores diluciones se necesitó más tiempo de incubación para poder observar dicho efecto sobre los huevos al microscopio.

La técnica de PCR es una herramienta útil para la identificación diferencial de microorganismos los cuales por medio de fenotipificación sería difícil, ya que microorganismos como los hongos tienen una gran similitud en sus características fenotípicas, pero la región ITS ya usado como código de barras de los hongos y muestra un desempeño confiable a la hora de identificarlos.

El hongo A5 identificado como *Chrysosporthe austroafricana* pertenece a un genero de hongos patogenos naturales de plantas, como por ejemplo las especies de *Eucalyptus spp.* Son causales de la necrosis progresiva de las hojas y el tronco de los mismos enfermedad que se conoce como (*canker*), su presencia es favorecida por las temperaturas y condiciones tropicales de países como Colombia, pero se conoce como un microorganismo ubicuo y un gran problema para las especies de *Myrtales*.

El genoma de este hongo tiene 44.669.169 bases la región (ITS) poseé 734pb y su contraparte la beta tubulina 464pb⁽⁶³⁾ En la búsqueda de la identidad de este organismo, y al utilizar las bases de datos para tal fin, nos dimos cuenta que la secuencia obtenida daba como resultado secuencia de la beta tubulina, un resultado no esperado debido a que la amplificación se realizó con cebadores diseñados para amplificar la región (ITS) ya que es el más sensible para identificar a los hongos y con mayor fidelidad, se sospecha que los resultados se dieron de esta forma debido a que las regiones tienen una homología del 59.3%, además se sospechan algunos errores de lectura que si bien pueden estar dados por inhibidores, alguna falla en la lectura de la secuencia o contaminación, datos que se ven reflejados en la fidelidad de la identificación del (87.47 %) de homología, este hongo obtuvo una escala de daño de (3) valor que se considera significativo para el control biológico de huevos de helmintos.

El hongo A3 identificado como *Mortierella minutísima* con una homología del (98.08%) su genoma está compuesto por 36.335.525pb su región (ITS) por 422pb⁽⁶⁴⁾.

Es un hongo utilizado para producir acido araquidónico a partir de la glucosa, desempeño bioquímico que le favorece para ser utilizado a nivel industrial en Japón y otros países de Asia, es aislado de suelos ácidos donde se encuentra como saprofito utilizando como fuente de carbono material orgánico en descomposición. Este hongo obtuvo una escala de daño de (3) valor que se considera significativo para el control biológico de huevos de helmintos.

El hongo A2 identificado como *Epicocum nigrum*, con una homología de (93.67%) y con un genoma compuesto por 34.255.654pb, la region (ITS) poseé 425pb. El microorganismo es conocido como agente causal del tizón gomoso que es una enfermedad típica del follaje en las cucurbitáceas⁽⁶⁵⁾. Los síntomas ocasionados por el, pueden ser confundidos con los de otras enfermedades fungosas y bacterianas. Además del follaje, puede producir manchas en frutos, sobre todo en la pulpa y corteza donde aparecen áreas de color amarillo a negro.

11 CONCLUSIONES:

Se aislaron 6 cepas de hongos los cuales se enfrentaron sus conidias a un pull de huevos de nematodos encontrando que tres de esas cepas ejercían sobre la estructura del huevo una actividad deletérea; Pero esta actividad no se asocia con un ataque físico, ya que no se evidencia presencia de micelios en el medio, pero si daño en los huevos en comparación con el control (sin tratamiento); Se concluye que se debe a sustancias químicas suspendidas en el medio que son metabolitos de los hongos y ejercen actividad de tipo elicitor.

Se podría pensar que el desempeño físico-químico de los aislamientos estuviese sesgado porque repique de los hongos siempre se realizó en agar (PDA) y no en un medio enriquecido con derivados de nematodos. En principio nuestro estudio no requería medios modificados ya que no se disponía de ellos, además están en fase de experimentación. Tampoco eran necesarios ya que se quería descubrir de una manera novedosa la posible acción de micelio filtrado (conidias) y sustancias preformadas por los hongos enfrentadas con huevos de estrombilidos, logrando resultados con tres de los seis aislamientos representando al 50% de la población de aislamientos fúngicos obtenidos, estos intervinieron de manera negativa en la estructura de los huevos de nematodos, siendo este efecto negativo en un punto fundamental para su multiplicación.

Podríamos citar como ejemplo los pigmentos del aislamiento A5 quien obtuvo el nivel de daño más alto en la escala, como se evidencia en la tabla (2) (HONGO 5) y en el futuro podría ser utilizado, pero es claro que se debe seguir indagando sobre el tema.

El agar PDA ofreció un buen desempeño como fuente de carbono para los hongos, además del caldo papa dextrosa permitió obtener más biomasa de los hongos y un crecimiento rápido pero con mayor riesgo de contaminación por su volumen y estado líquido, pero con buen manejo ofrece excelentes resultados.

12. Recomendaciones

Es necesario realizar estudios cuantitativos que evalúen el porcentaje de daño causado por estos hongos ya que nuestro estudio pretendía evaluar de manera cualitativa el daño de conidias filtradas sobre los huevos.

Es mandatorio también tener diseños en los que los repiques del hongo sean en medios de cultivo con componentes derivados de los nematodos, debido a que la literatura describe que el desempeño de los hongos aumenta en contacto con su presa y es por ello que los repiques en medios que no contengan derivados de los mismos no tendrían gran impacto ya que el hongo se adapta a usar como fuente de energía la dextrosa y el almidón en el medio (PDA) mostrándonos su actividad saprofita he inhibiendo su capacidad parasítica, que podría mantenerse o potenciarse si los hongos están en contacto con el derivados de nematodos, teniendo esto como objetivo observar algún tipo de daño físico evidenciable por microscopia.

Se considera imprescindible diseñar un medio PDA modificado con derivados de nematodos y seguir con la experimentación, aunque se obtuvieron resultados satisfactorios con el modelo experimental propuesto en este trabajo.

Consideramos que se deben realizar muestreos en otros lugares para hacer más enfrentamientos y no solo hongos Vs huevos sino con muchos otros especímenes de parásitos en los que los hongos tengan concreción de tener un efecto negativo y ayudar a mejorar las actividades económicas humanas de una manera más sostenible.

En la identificación de los microorganismos por técnicas moleculares es mandatorio obtener una pureza y calidad del (DNA) ya que la presencia de contaminación no favorece el proceso de la secuenciación, teniendo como resultado inconvenientes en la identificación.

Se recomienda seguir realizando estudios de estos microorganismos que quedaran en custodia del grupo (CEPARIUM), al cual pertenecemos con el fin de establecer más a fondo las capacidades de los microorganismos con fines experimentales.

13 REFERENCIAS:

1. Gobernación de Antioquia; Manual técnico para la producción de carne ovina utilizando buenas prácticas ganaderas; Asociación de ganaderos ovinos ASOOVINOS; 2015; pag 86 ;(citado marzo 2018); disponible en : [https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20OVNO CAPRINO_0.pdf](https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20OVNO%20CAPRINO_0.pdf)
2. D. Moreno; H. Grajales; caracterización de los sistemas de producción ovino de trópico alto en Colombia ; manejo e indicadores productivos y reproductivos;2017; (citado el 2019-abril) pagina 3-4 disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v64n3/0120-2952-rfmvz-64-03-00036.pdf>
3. Marques D. resistencia a los antihelminticos , origen desarrollo, y control. Revista CORPOICA. 2003 (citado 2019-marzo) pagina 2-3 disponible en: <http://Dialnet-ResistenciaALosAntihelminticos-5624648.pdf>
4. Ministerio de salud y protección social ; dirección de promoción y prevención ; subdirección de enfermedades transmisibles ; publicado en mayo de 2013 pagina 7 numeral 4.12 (citado en marzo-2019) disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/LI/NEAMIENTO%20DESPARASIT%20ANTIHELM%20C3%8DNTICA%20080122014.pdf7>
5. P. Medina; F. Guebara; resistencia antihelmíntica en ovinos una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales;pastos y forrajes vol. 37; matanzas julio-septiembre 2014 ;(citado mayo 2018): pag 3-4; disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942014000300001
6. 6 (R. Ocampo) Caracterización genética de ovinos en Colombia por medio de marcadores micro satélites (para obtener el título de médico veterinario) Antioquia. Colombia. 2014. (citado febrero 2018) 10. Disponible en:

<http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/1902/1/CARACTERIZACION%20GENETICA%20DE%20OVINOS%20EN%20COLOMBIA%20POR%20MEDIO%20DE%20MARCADORES%20MICROSATELITES.pdf>

7. 7(D. Cruz et al.) serine proteases activity is important for the interaction of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with infective larvae of Trichostrongilides and free-living nematodes *Parangrellus* spp. *Fungalbiology* (2015) 119. 7;(citado julio 2018)disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26228558>
8. 8 (L.Liang et al.) A proposed adhesin (AOMad1) helps nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* recognizing host signals for live-stileswitching.*Fungals Genetics and Biology* (2015). 81.10(citado abril 2018); disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25724687>
9. 9(Y. Tezean et al.) cloning and characterization of cuticle-degrading serine protease from nematode trapping-fungus *Arthrobotrysmusiformis*. *Micociencia*.(2016).(citado marzo 2019) 57.diponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514608>
10. (P.J. waller et al.) Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in sweden. *Acta vet. Scand* (2006) 47. 23-32.(citado junio 2018) disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16722303>
11. (B. gonsel et al.)Molecular diversity of LysM carbohydrate-binding motifs in fungi. *Review* (2015) 61.103-113 recived :19 november 2014/ reviced:18 december 20147 published on line 15 junaury 2015.(citado marzo 2018 disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392113/>
12. (L. Ling et al.) Effects of abscisic acid and nitric oxide on trap formation and trapping of nematodes by the fungus *Drechslerella stenobrocha* AS6.1. *Fungalbiology*. (2015) 101-115. 5; disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315307>

13. Depaula et al) first report of activity of predatory fungus on *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Angiostrongilidae*) first stage larvae. *Actatropica*. (2013)127:187-190. disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21120369>
14. (L. Keke et al) *Dresclerellastenobrocha* genome illustrates the mechanism of constricting rings and the origin of nematode predation in fungus. Research article(2014)15:114; disponible en: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-114>
15. (P Prasad et al) whole genome annotation and comparative genomic analyses of biocontrol fungus *Purpureocillium lilacinum*. Research article BMC genomics (2015) 16 :1004; disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4658809/>
16. (Y. Hsueh et al) Nematode- Trapping Fungi Eavesdrop on Nematode Pheromones. *Current biology* January 7 (2013) disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047969/>
17. T. (Degenkolb, A. Vilcinskis) Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungus as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. Mini-Review- *Appl Microbiol Biotechnol* (2016). 14 disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715220>
18. (K. Magnus et al.) Interspecific and host-related gene expression patterns in nematode-trapping fungi. *BMC Genomics* 2014, 15:968. 15; disponible en [:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384908](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384908)
19. (J. Wang, R. Wang) Efficacy of an *Arthrobotrys oligospora* N mutant in nematode-trapping larvae after passage through the digestive tract of sheep. *Veterinary Microbiology* 161 (2013) 359–361.3 disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098555>
20. (A Khana et al) Proteomic analysis of the knob-producing nematode-trapping fungus *Monacrosporium lysipagum*. *mycological research* 112 (2008) 1447 – 1452.6 disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754708/>

21. (Juan Li et al) New insights into the evolution of subtilisin-like serine protease genes in Pezizomycotina. BMC Evolutionary Biology 2010, 10:68.14; disponible en:
<https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-10-68>
22. (R. Wang et al) The extracellular bioactive substances of *Arthrobotrys oligospora* during. Biological Control. 86 (2015) 60–65.6 disponible en :
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682009000300006
23. (L. Liang et al) the Woronin body in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* is essential for trap formation and efficient pathogenesis. Fungal Biology 2016- 1-10. (citado marzo 2018) Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/232956415_Arthrobotrys_oligospora_A_model_organism_for_understanding_the_interaction_between_fungi_and_nematodes
24. (Aguilar, M. L.) Microorganismos con uso potencial contra el nemátodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias. Texcoco, México: Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, 2012 (citado abril 2019). disponible en:
<https://www.redalyc.org/html/2691/269133036002/>
25. (Andrade, J., Cabrera M.) tipificación de parásitos intestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos en los municipios de Chía, Cajicá y Zipaquirá. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina. Santafé de Bogotá, 1992. (citado abril 2018) Disponible en:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/17744/0>
26. (O. Herrera et al.). (2013). Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 18(3), 3851-3860. Recuperado en 24 de agosto de 2018, (citado abril 2018) de
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012202682013000300015&lng=es&tlng=es

27. (Pulido M et al.) Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas del municipio de Toca, Colombia. Rev Salud Animales. [revista en la Internet]. 2014 Abr [citado 2015 Ago 24]; 36(1): 65-69. (citado abril 2018) Disponible en: [570X2014000100012&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682014000100012&lng=es).
28. (D.Marquez). (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. de Revista Corpoica Sitio web: (citado noviembre 2018) http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/8ResistenciaAntiheminticos_pp55-71_RevCorpo_v4n1.pdf. revisado el 10/08/15.
29. (O. Herrera et al.). (2013). Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. Revista MVZ Córdoba, 18(3), 3851-3860. Recuperado en 24 de mayo de 2015, (citado noviembre 2018) Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682013000300015&lng=es&tlng=es.
30. (A.Toro et al.)(2014). Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. Archivos de medicina veterinaria, 46(2), 247-252. (citado noviembre 2018) Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2014000200010&lng=es&tlng=es.10.4067/S0301
31. (C.Barrios et al.) Guía práctica de ovinocultura. enfocada hacia la producción de carne. bacom Ltda. Bogotá, Agosto de 2007. Documento PDF. (citado noviembre 2018) Disponible en: http://www.asoovinos.org/archivos/articulos_tecnicos/manual_cria_ovinos_production_carne.pdf
32. (Waller PJ, Knox MR, Faedo M.) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. VetParasitol. 2001; 102:321-30. (citado noviembre 2018) Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731075>

33. (Esteban-Andres D et al.) Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. *Rev. Med. Vet. Zoot* [online]. 2013, vol.60, n.3 [cited 2015-07-30], pp. 169-181. (citado Diciembre 2018) Availablefrom: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522013000300003&lng=en&nrm=iso. ISSN 0120-2952.
34. C. Navasa, J. GaDrcia, V. Garcia. Fundamentos y tecnicas de analisisbioquimico. 2006. international Thompson editores Spain, pag 32 (citado marzo 2019)
35. 30. Esteban-Andres, D et al. Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección.*Rev. Med. Vet. Zoot* [online]. 2013, vol.60, n.3 (citadonoviembre 2018) pp. 169-181.Availablefrom: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522013000300003&lng=en&nrm=iso.
36. Aguilar, M. L. Microorganismos con uso potencial contra el nemátodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias. Texcoco, México: Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, 2012. (citado noviembre 2018) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942014000300001
37. Vázquez-Pineda, Alejandro, Bravo-de-la-Parra, Alejandra, Mendoza-de-Gives, Pedro, Liébano-Waller PJ, Knox MR, Faedo M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol.* (citado noviembre 2018) 2001; 102:321-30. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731073>
38. Barrios, Camilo. Guía práctica de ovinocultura. enfocada hacia la producción de carne. bacom Ltda. Bogotá, Agosto de 2007. (citado marzo 2019) Documento PDF. Disponible: http://www.asoovinos.org/archivos/articulos_tecnicos/manual_cria_ovinos_produccion_carne.pdf

39. Toro, A, Rubilar, L, Palma, C, & Pérez, R. (2014). Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. Archivos de medicina veterinaria, 46(2), 247-252. (citado mayo 2018) Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2014000200010&lng=es&tlng=es.10.4067/S0301
40. Herrera O, Liseth, Ríos O, Leonardo, & Zapata S, Richard. (2013). Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. Revista MVZ Córdoba, 18(3), 3851-3860. Recuperado y citado abril 2018), de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682013000300015&lng=es&tlng=es.
41. Márquez Dildo. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. de Revista CORPOICA. pag 5-9 (citado abril 2019) Sitio web: http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/8ResistenciaAntiheminticos_pp55-71_RevCorpo_v4n1.pdf. (citado marzo 2019).
42. Pulido-Medellín Martín O, García-Corredor Diego, Díaz-Anaya Adriana, Andrade-Becerra Roy. Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas del municipio de Toca, Colombia. Rev Salud Animal. [revista en la Internet]. 2014 (citado 2018 dic 14); 36(1):65-69. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000100012&lng=es.
43. Herrera O, Liseth, Ríos O, Leonardo, & Zapata S, Richard. (2013). Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. Revista MVZ Córdoba, 18(3), 3851-3860. (Recuperado y citado septiembre de 2018), de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682013000300015&lng=es&tlng=es
44. Andrade, J., Cabrera M. tipificación de parásitos intestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos en los municipios de Chía, Cajicá y Zipaquirá. Universidad

- Nacional de Colombia Facultad de Medicina. Santafé de Bogotá, 1992.(citado junio 2018).
45. Aguilar, M. L. Microorganismos con uso potencial contra el nemátodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias. Texcoco, México: Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, 2012. (citado enero 2019)
46. L. Claudia. Taninos condensados y su efecto sobre los parásitos gastrointestinales de ovinos. Tesis (Médico Veterinario). -- Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria, 2009.(citado enero 2019) Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5651/T14.09%20L332t.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
47. Rodríguez Jorge Iván, Ligia Amira Cob. Manual técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria Segunda Edición Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. 2005 (citado mayo 2018)
48. Manejo productivo y reproductivo en el bovino, caprino, ovino y equino; nutrición y alimentación de rumiantes y equinos; anatomía y fisiología del sistema digestivo; pag 90-94 (citado abril 2019) Disponible en
49. Manual de manejo productivo y reproductivo en el bovino, caprino, ovino, equino; Anatomía y fisiología del sistema digestivo de los rumiantes; pag 91-100; (citado abril 2019) disponible en: https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Bovinos_y_Equinos_02.pdf
50. Crespo A.; Blanco O.; Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de hongos liquenizados; departamento de biología molecular II; facultad de farmacia; universidad complutense; E -28040; Madrid; pagina 24-27 (citado abril 2019) ; Disponible en : <file:///C:/Users/Asus/Downloads/7276-7359-1-PB.PDF>
51. Abarenkov K, Adams R, Laszlo I, Agan A, Ambrosio E, Antonelli A et al. Annotating public fungal ITS sequences from the built environment according to

- the MIxS-Built Environment standard – a report from a May 23-24, 2016 workshop (Gothenburg, Sweden) [Internet]. 2017 [cited 10 April 2017]. Available from: http://mycokeys.pensoft.net/articles.php?id=10000&display_type=list&elepe=9
- 52 Brandt M, Warnock D. Taxonomy and Classification of fungi. Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition [Internet]. 2015 [cited 10 April 2017];(11): 1935-1943. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381.mcm11.ch1>
- 53 Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K, Alexander I, Eberhardt U, Erland S et al. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*. 2010;186(2):281-285.
- 54 Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 2010; 10(1):189.
- 55 Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson H, Vellak K, Saar I, Veldre V et al. PlutoF—a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evolutionary Bioinformatics*. 2010;:189.
- 56 Conrad L, Schoch, Keith A, Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi* PNAS 2012 109 (16) 6241-6246; published ahead of print March 27, 2012, doi:10.1073/pnas.1117018109
- 57 Ihrmark K, Bödeker I, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 2012; 82(3):666-677.
- 58 Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A et al.

- Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*. 2013; 914-919. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/2041-210X.12073/full>.
- 59 Duke University, United States of America - Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA – (citado abril 2019) – disponible en: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/cebadores.htm#Internal>
- 60 Edger P, Tang M, Bird K, Mayfield D, Conant G, Mummenhoff K et al. Secondary Structure Analyses of the Nuclear rRNA Internal Transcribed Spacers and Assessment of Its Phylogenetic Utility across the Brassicaceae (Mustards). *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 10 April 2017];9(7). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/citation?id=10.1371/journal.pone.010134>
- 61 Bena,, G., Jubier, M., Olivieri, I., &Lejeune, B. (1997). Ribosomal External and Internal Transcribed Spacers: Combined Use in the Phylogenetic Analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal Of Molecular Evolution*, 2.
- 62 Fungal Barcoding Database - About the project (citado abril 2019)
- 63 Winafield D; Bernes I ; IMA genome –f5 draft genome sequences of *Ceratocystis eucalyptica* ,*Chrisoporthe cubensis* ,*C deuterocubensis* ,*Davidsoniella virescens*, *Fusarium temperatum*, *Graphilbum fragrans*, *Penilicillum nordicum* , and *Thielabiopsis musarom*; pubmed ;2015; citado abril 2019; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734552>
- 64 T. Ching; Production of arachidonic acid and dihomolinoleic acid from glicerol , oil-producing filamentous fungi *Mortierella* in the ARS culture collection ;2008; 35:501-506; industrial microbiology. (Citado en abril 2019: Disponible en): <https://naldc.nal.usda.gov>

65 J Perez; Symtoms and identification of the causal agent of the gumming stem blight in watermelon (*Citrolus lunatus*) in the isle of Youth; Revista de proteccion vegetal; 2012; la Habana; (citado en marzo del 2018). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100003

ANEXOS

Anexo 1

Composición de solución buffer (PBS)

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de PH neutro comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos, aunque no fue posible encontrar un experimento parecido en la literatura que utilizara esta solución como buffer, el buen desempeño en comparación con otras soluciones como la (SS) o el (BSA) y Su preparación es muy sencilla.

- **Anexo 2**

Preparación de la solución McMaster

1. Se pesan dos gramos de heces , se colocan en un vaso con 28 ml de agua para maceración y homogenización de la muestra
2. Se tamiza el contenido y se pasa a tubos falcón de 15 ml
3. Los tubos se centrifugan por 10 min a 10.000 rpm
4. El pellet se reconstituye con la solución de McMaster compuesta por una relación de $\text{NaCl} + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O}$.
5. Se espera 5 minutos y se hace el montaje en la cámara
6. Se hace lectura en el microscopio en aumento de 10 x en ambas cámaras la fórmula para obtener el resultado es :

$$\text{Hpg} = \frac{\text{Nox}100}{2}$$

- Anexo 3

HEMBRAS LEVANTE:

N°	CHAPETA O IDENTIFICACION NUMERICA	CONSISTENCIA DE LAS HECES	HUEVOS POR GRAMO DE MATERIA FECAL	POSIBLES PARASITOS ESTRONGILIDOS E EIMERIAS
1	9342	DU	200	ST
2	883	DU	250	ST
3	890	DU	300	ST
4	892	B	150	ST
5	847	MB	0	-
6	856	DU	0	-
7	1322	DU	0	-
8	889	DU	100	ST
9	893	MB	150	ST
10	864	DU	150	ST
11	874	DU	0	-
12	871	DU	0	-

- MACHOS PARA FAENADO:

13	871	DU	0	-
14	863	DU	0	-
15	1081	DU	450	ST

16	464	B	0	-
17	886	MB	0	-
18	1321	DU	350	ST
19	839	DU	0	-
20	882	DU	250	ST
21	1304	DU	0	-
22	857	MB	0	-
23	1054	DU	0	-
24	830	DU	0	-
25	897	MB	350	ST
26	873	DU	100	ST
27	107	DU	0	-
28	857	DU	0	-
29	852	DU	0	-

- **LACTANTES Y CORDEROS:**

identificación		Características de la muestra	Conteo (HPG)R	Posibles parásitos
30	840	DU	0	-
31	875	DU	100	ST /EI 34
32	862	DU	250	ST/EI 23
33	849	B	0	-EI 34
34	827	B	0	-EI 25
35	831	MB	250	ST/EI35
36	891	B	0	-
37	885	MB	450	S T/EI23
38	1326	B	1150	ST/EI 12
39	1368	DU	700	ST

40	1327	DU	1200	ST
41	418	DU	750	ST
42	1362	B	1350	ST
43	37	DU	700	ST
44	1366	DU	850	ST
45	434	MB	0	-
46	1359	DU	650	ST/EI 23
47	240	DU	1150	ST/EI 14
48	402	MB	2350	ST/EI 13
49	1356	DU	750	ST/EI34
50	1361	DU	0	-
51	1351	DU	1300	ST/EI 32
52	1363	DU	1950	ST/EI23
53	1370	DU	0	-
54	1329	MB	0	-
55	1354	B	1350	ST/ EI 23
56	1358	B	0	-/EI7
57	1365	DU	900	ST/EI 32
58	1355	DU	150	ST/EI 23
59	627	DU	0	-
60	16	B	0	ST/EI43
61	1360	B	1750	ST/ EI 32
62	1324	DU	0	-/EI19
63	620	DU	150	ST/EI 35
64	1325	MB	0	-
65	633	DU	1200	ST/EI32
66	406	DU	300	ST/EI 35
67	642	DU	0	-
68	615	MB	0	-/EI32
69	665	DU	900	ST/EI12

70	201	DU	1400	ST/
71	1357	DU	0	-/
72	426	DU	1350	ST
73	242	MB	1100	ST/EI22
74	1353	B	0	-
75	417	DU	1200	ST/EI 34
76	1364	DU	0	-
77	1367	DU	2150	ST/EI27
78	682	B	750	ST/EI 44

- **MACHOS EN LEVANTE:**

79	24	DU	300	ST/EI
80	631	DU	350	ST
81	427	DU	100	ST/EI
82	454	DU	950	ST
83	65	DU	450	ST
84	239	DU	0	-
85	423	DU	150	ST
86	42	DU	0	-
87	48	DU	200	ST
88	401	DU	250	ST
89	641	DU	0	-
90	424	DU	150	ST
91	35	DU	0	-
92	421	DU	0	-
93	44	DU	0	-

94	229	DU	350	ST
95	82	DU	150	ST
96	220	DU	0	-
97	802	B	0	-
98	462	DU	0	-
99	28	DU	100	ST
100	1	B	250	ST
101	820	DU	300	ST
102	63	DU	0	-
103	244	DU	0	-
104	446	DU	450	ST
105	205	DU	0	-
106	89	DU	0	-
107	81	B	150	ST
108	71	DU	100	ST
109	204	DU	350	ST
110	102	DU	100	ST
111	211	B	0	-
112	461	MB	0	-
113	16	DU	0	-
114	605	DU	100	ST
115	23	DU	0	-
116	65011	DU	0	-
117	603	DU	0	-
118	43	B	0	-
119	58	DU	350	ST
120	2	DU	0	-
121	6	DU	0	-
122	1321	DU	100	ST
123	1801	DU	0	-

124	1059	B	0	-
125	863	DU	0	-
126	857	MB	100	ST
127	464	DU	0	-
128	873	DU	0	-
129	886	DU	350	ST
130	1304	DU	0	-
131	882	DU	100	ST
132	897	DU	150	ST
133	857	DU	350	ST
134	839	B	0	-
135	830	MB	150	ST
136	1075	DU	0	-

- **LACTANTES:**

137	423	200	DU	ST
138	1	50	DU	ST
139	220	0	DU	-
140	91	0	DU	-
141	82	0	DU	-
142	11	100	B	ST
143	462	250	B	ST
144	6	200	DU	ST
145	424	0	DU	-
146	451	0	DU	-
147	85	0	DU	-
148	631	250	DU	ST
149	71	0	DU	-
150	77	100	DU	ST

151	81	900	B	ST
152	421	0	DU	-
153	34	400	MB	ST
154	35	150	DU	ST
155	63	0	DU	-
156	23	150	DU	ST
157	457	100	DU	ST

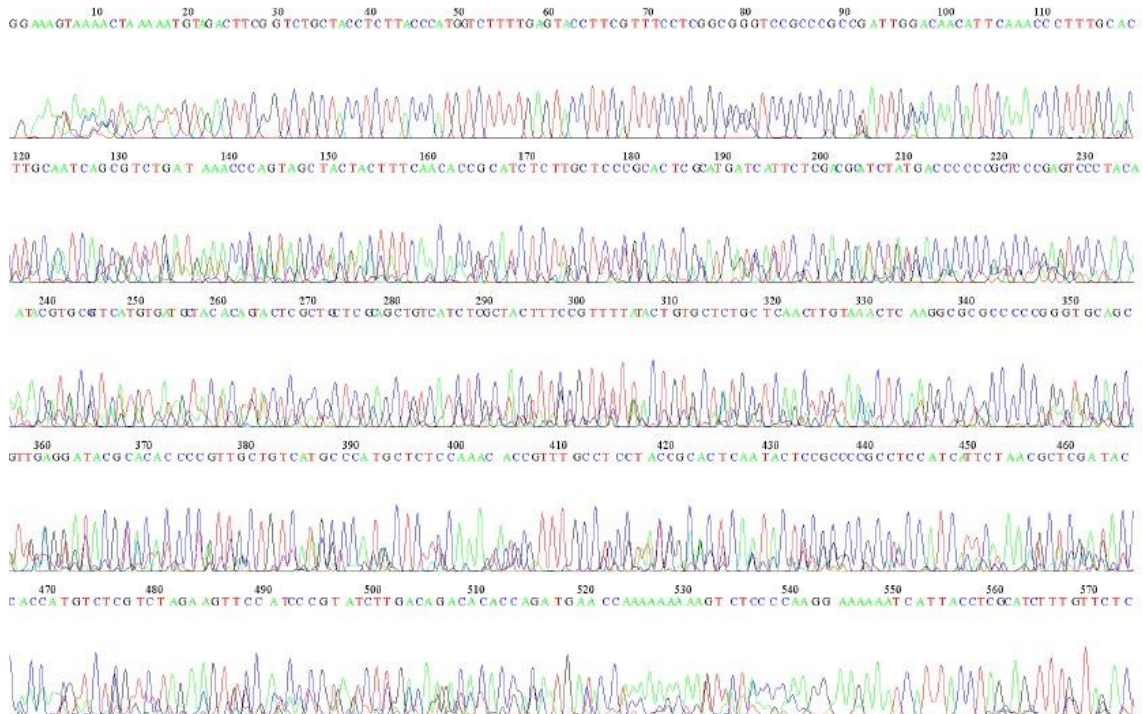
- **CORDEROS DESTETOS:**

158	1361	500	DU	ST
159	1359	200	DU	ST
160	1323	0	DU	-
161	1329	450	DU	ST
162	1358	500	B	ST
163	1325	250	DU	ST
164	1366	300	MB	ST
165	1357	150	DU	ST
166	1354	0	DU	-
167	1355	550	DU	ST
168	1362	700	DU	ST
169	1360	0	DU	-
170	1326	500	B	ST
171	1353	450	MB	ST
172	1370	350	B	ST
173	1367	250	DU	ST
174	1351	150	DU	ST
175	1338	100	DU	ST
176	1364	100	DU	ST
177	1369	0	DU	-

178	1368	0	DU	
179	1363	100	DU	ST
180	1365	450	DU	ST
181	1324	500	DU	ST
182	1367	350	M	ST

- ANEXO 4.0 Ejemplo de las secuencias recibidas por el servicio de *macrogen UU.EE. (A5)*

File: 5_JTS1.ab1 Run Ended: 2019/4/13 10:4:13 Signal G:2734 A:4477 C:4033 T:3933
Sample: 5_JTS1 Lane: 4 Base spacing: -16.163063 1726 bases in 20903 scans Page 1 of 2



Gracias.

