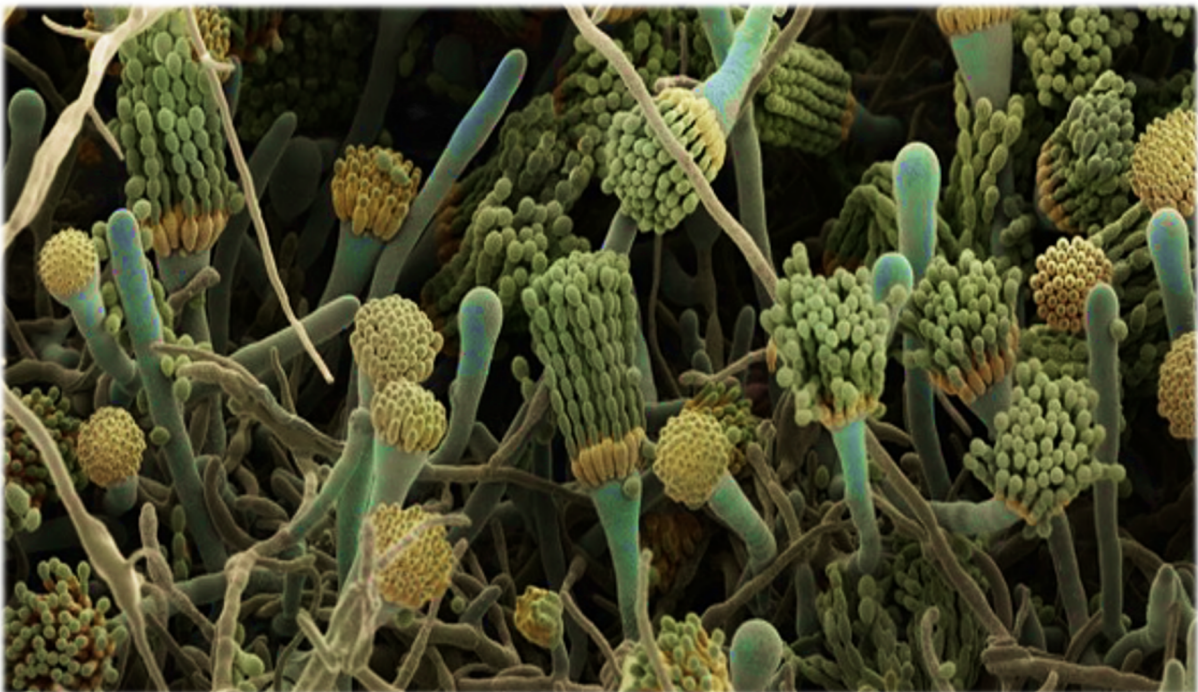


## MICROBIOTA EN SEDIMENTOS FLUVIALES

José Luis del Palacio

TABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



**Dania García**, Doctora, Unidad de Micología y Microbiología, [daniagarcias@urv.cat](mailto:daniagarcias@urv.cat)

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

8 de Junio de 2020

## ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción al reino de los hongos .....	3
2.1 Taxonomía y nomenclatura .....	5
2.2 Identificación por biología molecular .....	6
2.3 Hongos Ascomicetes .....	8
2.4 Los géneros <i>Penicillium</i> y <i>Talaromyces</i> .....	10
2.4.1. Características morfológicas.....	14
2.5 Importancia de los géneros <i>Penicillium</i> y <i>Talaromyces</i> .....	18
2.6 Hongos en sedimentos fluviales .....	20
3. Interés, hipótesis y objetivos del estudio.....	22
4. Materiales y Métodos .....	24
4.1 Organización del estudio .....	24
4.2 Origen de las muestras.....	24
4.3 Métodos de aislamiento.....	25
4.3.1 Activación de esporas latentes con ácido acético .....	26
4.3.2 Activación de esporas latentes con etanol.....	26
4.3.3 Activación de esporas latentes con fenol.....	26
4.4 Obtención de un cultivos puros .....	26
4.5 Identificación morfológica .....	28
4.6. Conservación de cepas .....	28
4.7 Estudio mediante herramientas moleculares .....	29
4.8 Extracción de DNA .....	29
4.8.1 Amplificación, Cuantificación de DNA y electroforesis .....	30
4.8.2 Secuenciación y diagnóstico molecular .....	31
4.8.3 Ensamblaje y análisis de secuencias .....	32
4.8.4 Alineamiento de secuencias .....	32
4.8.5 Análisis filogenético.....	32
5. Resultados .....	33
5.1 <i>Penicillium</i> Sección <i>Roquefortorum</i> .....	35
5.2 Taxonomía.....	37
6. Discusión.....	40
7. Conclusiones.....	43
8. Autoevaluación.....	43
10. Anexos .....	49

Yo, **Jose Luis del Palacio**, con DNI **29208478L**, soy conocedor de la guía de prevención de plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento de plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en junio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 03 de 06 de 2020

(Firma)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jose Luis del Palacio', written in a cursive style.

## 1. Resumen

Los hongos son organismos capaces de degradar una gran variedad de materiales. La producción de enzimas y de metabolitos secundarios necesarios para desarrollar su metabolismo es lo que ha promovido el interés de la industria biotecnológica por estos organismos.

El suelo, como el principal reservorio de propágulos fúngicos es dónde se han centrado la prospección de hongos productores de sustancias bioactivas. Sin embargo, las técnicas de secuenciación en masa han demostrado que los sedimentos fluviales son un hábitad de elevada diversidad fúngica, desestimada hasta la fecha. Por lo que es necesario mejorar las técnicas para el aislamiento en cultivo de estos organismos y así estudiar su metabolismo y extrólitos.

Nuestro trabajo tiene como principal objetivo el contribuir al conocimiento de la micobiota de los sedimentos fluviales en España. Para ello se aplicaron varias técnicas de aislamiento, siembra directa y activación de las esporas latentes presentes en sedimentos fluviales de dos ríos: Fondón de Chapela, Vigo y Segre, Lleida.

Se aislaron en cultivo puro, más de 150 cepas de hongos filamentosos. De estos, 57 produjeron algún tipo de esporulación por lo que pudieron ser identificados morfológicamente un total de 18 géneros, los más frecuentes fueron *Penicillium* y *Talaromyces*, seguidos de otros previamente reportados para este hábitad como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Ulocladium* entre otros.

En el presente trabajo se propone además una nueva especie de *Penicillium*, Sección *Roquefortorum*, *Penicillium gallaecium* sp. nov., la cual ha sido abordada desde la taxonomía polifásica (morfoloía-fisiología-filogenia molecular).

**Palabras claves:** micobiota, sedimentos, *Penicillium*, *Talaromyces*, *BenA*.

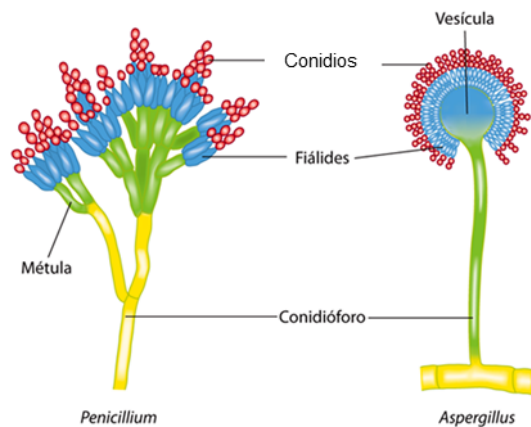
## 2. Introducción al reino de los hongos

Los hongos son uno de los grandes grupos de organismos vivos eucariotas, comparables en número de especies, diversidad y significado ecológico con animales, plantas, protistas y bacterias. Los hongos presentan pared celular de quitina, una nutrición heterótrofa mediante absorción, haciendo uso de compuestos orgánicos como fuente de energía mediante digestión extracelular (1). Pueden ser aerobios o anaerobios, aunque la mayoría aunque la mayoría son aerobios. Los hongos pueden vivir tanto en ambientes acuáticos como terrestres, y en condiciones ambientes muy diversas por lo que se dice que son ubicuos y cosmopolitas (2). Sus estado nutricionales van desde los grupos de hongos saprobios, degradadores de materia orgánica, pueden establecer relaciones simbióticas con especies de grupos taxonómicos muy diversos (plantas, algas, animales) para obtener beneficio mutuo hasta llegar a especies parásitas que se nutren de materia orgánica que les proporciona un huésped, dentro de este grupo encontramos patógenos de los animales, fitopatógenos o micopatógenos. .

Los hongos pueden ser unicelulares (con talo levaduriforme) o pluricelulares u hongos filamentosos, (talo miceliar o filamentosos) constituidos por filamentos tubulares denominados hifas las cuales se extienden formando el micelio (hifas ramificadas). Las hifas pueden ser vegetativas o reproductivas, según si están especializadas en la asimilación de nutrientes, crecimiento apical mediante elongación o si están especializadas en la reproducción (3).

Los hongos pueden seguir diferentes estrategias reproductivas y estas pueden presente en diferentes momentos de su ciclo de vida o incluso sobre susutratos diferentes. Algunos hongos solo se reproducen de manera asexual (anamorfo o forma asexual) (4) o al menos es esta fase la única conocida mientras que de otras especies solo conocemos su ciclo sexual (teleomorfo o forma sexual), Cuando se conocen ambos morfos (sexual y asexual) de un individuo decimos que conocemos la hongo como un todo, el holomorfo.

La reproducción asexual puede ocurrir mediante fisión, gemación o fragmentación dando como resultado la producción de esporas o propágulos asexuales llamados de forma genérica mitosporas (debido a su origen mitótico) y que en determinados grupos se conocen como conidios (Fig. 1). Los conidios se pueden producir sobre hifas fértiles especializadas y bien diferenciadas denominadas conidióforos sobre las cuales se desarrollan las células conidiógenas (5)(Fig. 1)

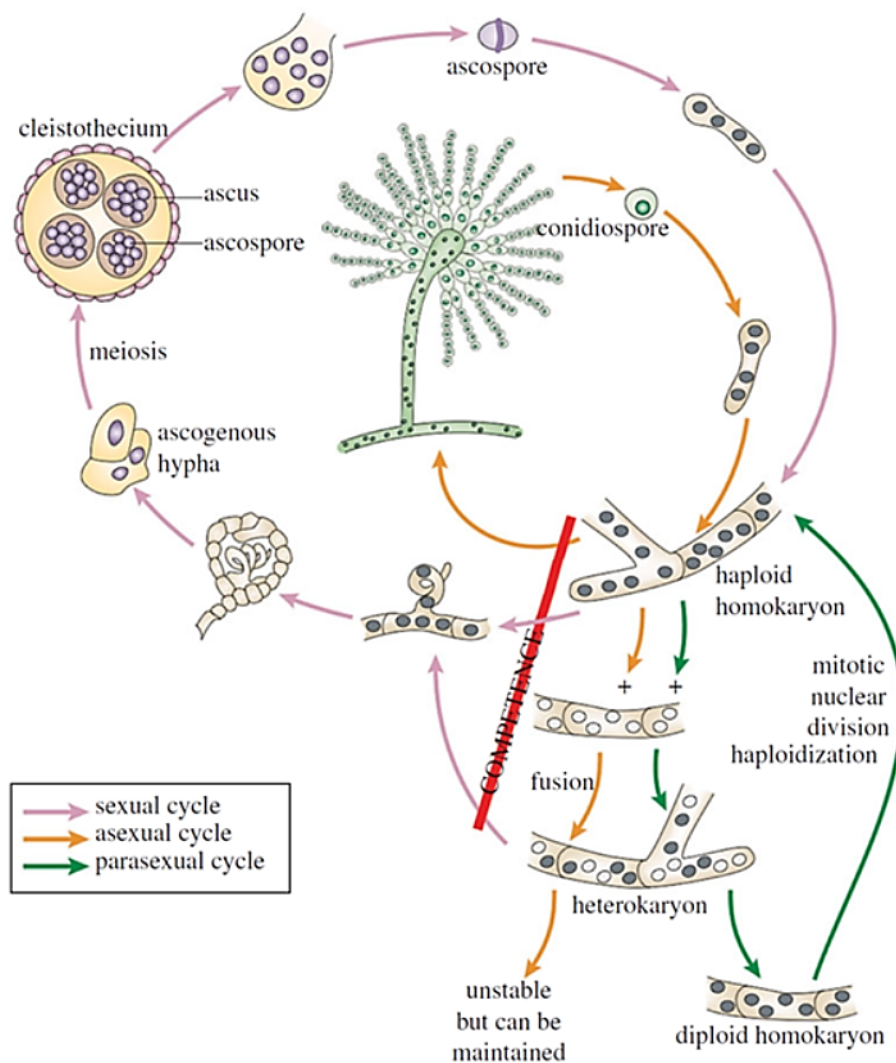


Fuente: J. Alejandro Bonifaz Trujillo: *Micología médica básica*, 5e: www.accessmedicina.com Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Los conidios suelen producirse profusamente y son dispersados por el agua, el viento o diferentes animales. Este mecanismo consigue propagar el hongo manteniendo su línea genética prácticamente idéntica a la célula parental.

**Figura 1.** Principales estructuras de la reproducción asexual de los hongos filamentosos.

En los hongos el entrecruzamiento y la propagación a través de esporas de origen sexual está controlado por genes conocidas como genes del *mating-type*. Los loci *MAT* tienen dos idiomorfos (dos versiones diferentes, pero no alélicas) denominados por ejemplo *MAT $\alpha$*  y *MAT $\beta$*  en *Saccharomyces cerevisiae*. En los hongos filamentosos estos idiomorfos se han dado por llamar *MAT1-1* o *MAT 1-2*. Un dato curioso en este sentido, la cepa de *Penicillium chrysogenum* descubierta por Alexander Fleming es portadora del locus *MAT 1-2*, sin embargo la cepa actualmente utilizada en la producción de penicilina fue aislada sobre un melón tipo cantalupo (*Cucumis melo*) la cual presenta el locus *MAT1-1* (6). Estos hongos se denominan heterotálicos cada cepa es portadora únicamente de uno de estos idiomorfos y solo la cariogamia hace posible la conjugación y la formación de esporas sexuales (7) (Fig. 2). No obstante hay especies homotálicas que poseen ambos idiomorfos o donde esta diferenciación no existe y son por tanto capaces de auto-fertilizarse. Por ejemplo, la mayoría de las especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces* que desarrollan fase sexual son homotálicas, aunque algunas pocas han sido descritas como herotálicas (8).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. La franja en rojo que señala la competencia se refiere a la capacidad de responder a la inducción de las fases sexual o asexual del ciclo de vida (8).

## 2.1 Taxonomía y nomenclatura

La taxonomía es la ciencia que estudia las relaciones y la clasificación de los organismos y los procesos a través de los cuales estos organismos han evolucionado (9). Los sistemas tradicionales de clasificación se han basado en los caracteres morfológicos, lo que históricamente ha propiciado un nomenclatura dual, es decir, el Artículo 59 del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) permitía atribuir nombres distintos a los estados de un mismo hongo. Por ejemplo, las especies con reproducción asexual tipo peniciloides fueron clasificadas dentro del género *Penicillium* Subgénero *Biverticillium*, pero

sus estados sexuales recibieron una nomenclatura diferente fueron relacionadas con el género *Talaromyces*. Sin embargo, en las últimas décadas, los estudios moleculares, principalmente el análisis de secuencias del ADNr, o de genes estructurales como *BenA*, han provocado cambios sustanciales no solo en la estructura taxonómica de estos organismos, sino también cambios nomenclaturales. Gracias a la filogenia basada en la información genética se ha demostrado que estas formas, anamorfo y teleomorfo, constituyen íntegramente un único individuo (10),(11),(12).

Es gracias a estas nuevas herramientas moleculares que se ha podido avanzar y delimitar con mejor precisión y autonomía las relaciones filogenéticas en el reino de los hongos. En el Congreso Internacional de Botánica celebrado en Julio de 2011 en Melbourne, Australia se discutió y publicó el nuevo Código Internacional de Nomenclatura para Hongos, Plantas y Algas (13), donde la propuesta más impactante fue la abolición del Artículo 59 sobre la nomenclatura dual de los hongos pleomórficos. Este artículo entró en vigencia el 1 de Enero de 2013 y ha dado lugar a cambios significativos en la taxonomía y nomenclatura de los hongos (14).

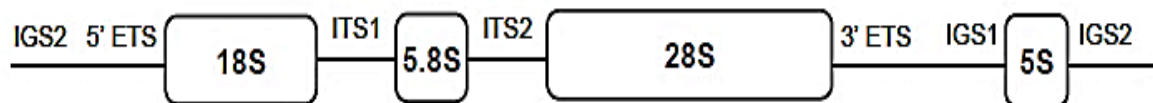
## **2.2 Identificación por biología molecular**

La identificación de especies por herramientas moleculares complementa a la identificación basada en caracteres morfológicos y fisiológicos, ya que la implementación de un sistema de clasificación basado exclusivamente en estos caracteres resulta artificial y en general muy alejada de la filogenia basada en relaciones evolutivas estimadas a partir del análisis de secuencias.

El cistrón nuclear del ARNr, compuesto por los genes 18S, 5.8S y 28S y sus espaciadores intergénicos transcripcionales (ITS), han sido durante décadas las secuencias más utilizadas para la identificación de hongos pero también para el establecimiento de sus relaciones evolutivas (15) (**Fig. 3**). El ADNr 18S, cuyo transcrito forma parte de las subunidades pequeñas de los ribosomas (SSU), es una región muy conservada a nivel evolutivo y en hongos por lo que se utiliza para determinar el rango taxonómico supra-genéricos. La secuencia del gen 28S forma parte de la subunidad ribosómica mayor, se utiliza como marcador único o en combinación con las secuencias de los ITS con el fin de establecer relaciones filogenéticas a nivel de género, aunque en algunos grupos pueden suficientemente resolutivas para discriminar a nivel de especies. El gen 5.8S, suele utilizarse junto con los ITS, ITS1 e ITS2, sobre todo para delimitar especies. Las secuencias de las regiones de los ITS suelen ser muy variables entre algunas especies fúngicas. Sin embargo, para determinados géneros de hongos anamórficos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* entre otros, la

región ITS es poco variable entre especies, por lo que en estos casos se hace necesaria la secuenciación de otros genes, principalmente los codificantes para proteínas estructurales. Para distinguir especies en géneros muy complejos, actualmente se aplican estudios multigénicos donde el análisis combinado de las secuencias de varios genes que codifican proteínas como son el factor de elongación (EF-1a),  $\beta$ -tubulina (TUB y BT2), actina (ACT), quitina sintasa (CHS) y calmodulina (CAL) han permitido delimitar la taxonomía de géneros tan complejos como *Aspergillus*(16). Los avances en el campo de la filogenia molecular impulsaron a la comunidad científica a promocionar el proyecto *Barcode of Life* (iBOL), el cual promueve la utilización de regiones de secuencias cortas y estándar como un código de barras, es decir, como una herramienta que permita identificar especies conocidas y descubrir otras de nuevas. Al reforzar la taxonomía tradicional, el código de barras del ADN está revolucionando nuestra capacidad de conocer y monitorear la biodiversidad (<http://www.ibol.org/phase1/about-us/what-is-ibol/>).

El marcador molecular que se ha secuenciado con mayor frecuencia y que ha sido considerado el código de barras del ADN oficial o primario para los hongos es la región de los ITS (15).



**Figura 3.** Representación de la estructura del *cluster* formado por los genes del ARN ribosomal y sus espaciadores intergénicos (ITS) en los hongos .

No obstante estas secuencias, presentan limitaciones, pues como se ha comentado previamente existen grupos taxonómicos donde estas regiones se encuentran muy conservadas, por lo que inicialmente se opta por otro marcador o código de identificación. Estos *barcodes* específicos han de poder amplificarse con facilidad y ser capaces de diferenciar especies muy próximas filogenéticamente.

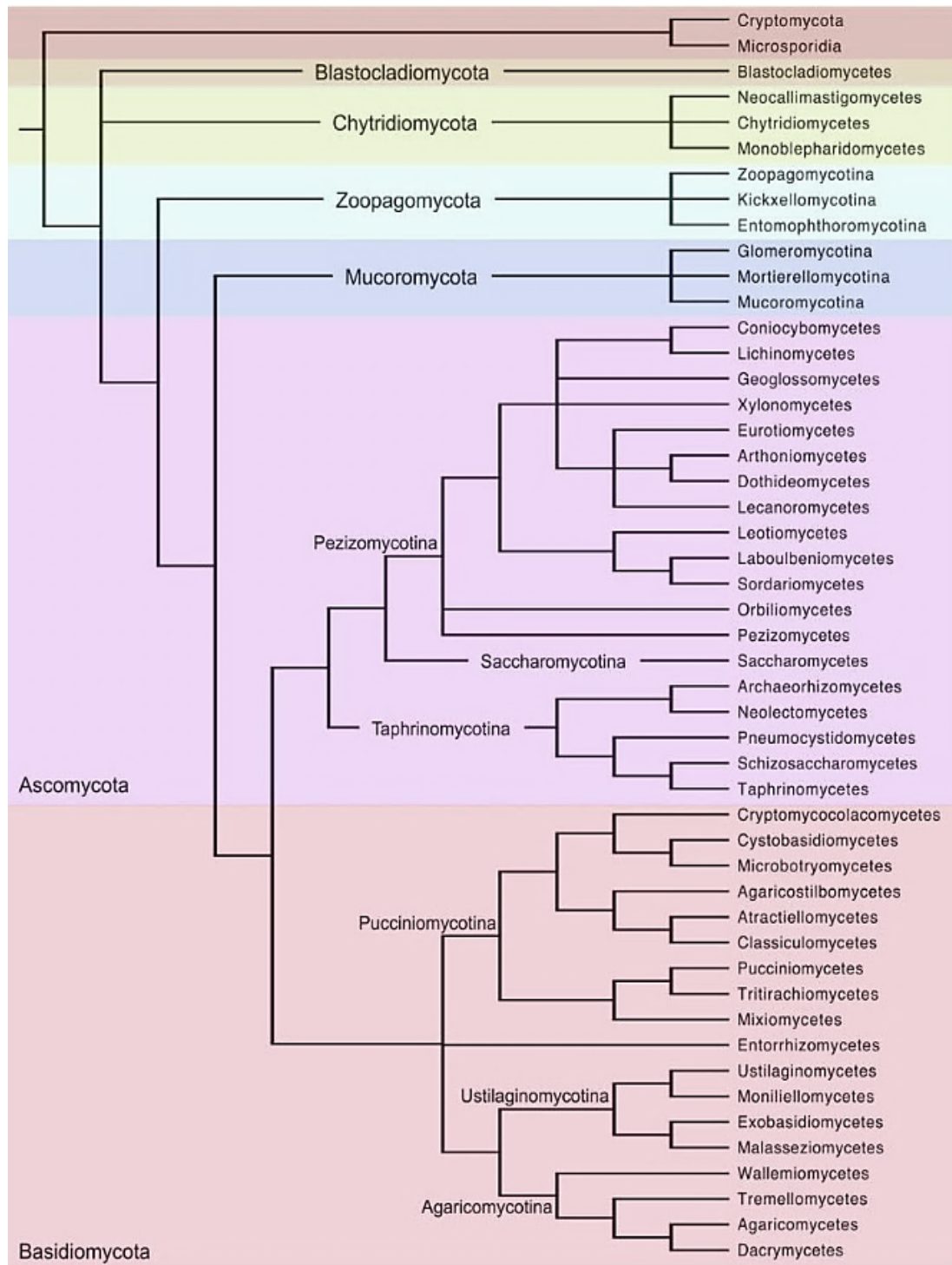
Por estas razones la identificación molecular de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces* se realizó con un fragmento del gen *BenA*, gen codificante para la  $\beta$ -tubulina. A pesar de ser un buen marcador, también presenta algunas desventajas: los alineamientos de alta diversidad interespecífica contienen muchas posiciones dudosas localizadas en los intrones, las cuales se solucionarían con un buen alineamiento bioinformático y la existencia de genes con función similar o parálogos en el orden *Eurotiales* (17),(18),(19).

Otros marcadores moleculares utilizados con características similares a *BenA* son: la *CaM* (Calmodulina) y el *Rpb2* (subunidad DNA polimerasa II). Este último tiene la ventaja de carecer de intrones en el amplicón lo que permite un alineamiento más sencillo y concluyente, pero la desventaja de ser más difícil de amplificar.

Todas las secuencias de las especies descritas se encuentran en bases de datos tales como NCBI, GeneBank, NRBC , EMBL, Myco Bank o International comisión of *Penicilium* and *Aspergillus*.

### **2.3 Hongos Ascomicetes**

El reino Fungi es uno de los seis reinos que conforman el árbol de la vida (20),(21). Se subdivide en varias categorías superiores como el subreino Dikarya y siete phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia y Neocallimastigomycota. El subreino Dikarya agrupa los Ascomycota y Basidiomycota que incluyen hongos formadores tanto de hifas como esporas dicarióticas (22), (21) (Fig. 2). El antiguo phylum Zygomycota, que antaño agrupaba a los hongos evolutivamente más antiguos y productores de hifas cenocíticas, ya no es aceptado como tal debido a su naturaleza polifilética (22) Sus miembros se encuentran ahora distribuidos entre el phylum Glomeromycota y cuatro linajes parafiléticos de agrupación incierta (21), siendo en conjunto informalmente denominados “Hongos basales” (22) (23) (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Clasificación del Reino Fungi y sus relaciones filogenéticas (18).

En el phylum Ascomycota se clasifican más del 65% del de todos los hongos descritos hasta el momento (24), y es un filo muy diverso que incluye descomponedores asociados con una gran diversidad de sustratos (estiércol, madera, tierra), simbioses y asociados con plantas y animales, y habitantes de ecosistemas marinos y terrestres. Numerosas especies están asociadas a plantas y van desde patógenos hasta simbioses antagonistas beneficiosos como

las micorrizas a endófitos foliares, de la raíz y de la madera cuyas verdaderas funciones siguen siendo desconocidas. Este grupo de hongos ha tenido un gran impacto en el desarrollo de nuestra civilización desde los albores de la humanidad, tanto por sus beneficios como por sus implicaciones negativas. Algunos ascomicetos estuvieron entre los primeros organismos domesticados por humanos y se han utilizado en la fermentación de alimentos y bebidas desde hace más de 9,000 años (25).

Actualmente los Ascomycota están configurados por tres subphyla: Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina, este último agrupa 63 000 especies, muchas más que las que reúnen los otros dos conjuntamente, distribuidas en 13 clases y 67 órdenes (23).

Los hongos incluidos en Pezizomycotina son mayoritariamente filamentosos y en esta categoría se agrupan los ascomicetos capaces de formar cuerpos fructíferos o ascomas (**Fig. 2**). Las esporas sexuales llamadas ascosporas, se desarrollan en el interior de estructuras a manera de saco denominadas ascos, que a su vez se forman en el interior de los ascomas a partir de las hifas fértiles o hifas ascógenas (ascogonio). En este grupo además de las formas sexuales la reproducción asexual se produce prolíficamente. Las especies solo tienen un estado sexual pero muchas suelen tener más de un estado asexual, este fenómeno es conocido como pleomorfismo. Los ciclos sexuales y asexuales del Phylum Ascomycota se aprecian en la (**Fig.2**). Dentro de los Pezizomycotina se encuentran los hongos productores de las mycotoxinas más potentes conocidas hasta el momento por la ciencia, las aflatoxinas de *Aspergillus* y la penicilina de *Penicillium*, ambos representantes del orden Eurotiales, clase Eurotiomycetes. El grueso de nuestro trabajo se centrará en representantes de este orden.

#### **2.4 Los géneros *Penicillium* y *Talaromyces***

Johann Heinrich Friedrich Link (1809) describió el género *Penicillium* hace ahora más de 200 años, quien propuso este nombre por la semejanza de las estructuras de reproducción asexual (anamorfo) con un pequeño pincel: *Penicillium*, deriva del latín *penicillius* que significa 'pincel'—. Desde entonces más de 1000 especies han sido propuestas para este género sobre todo durante el pasado siglo. El primer teleomorfo o forma sexual asociado al género *Penicillium* fue el género descrito como *Eupenicillium*, consistente en ascomas cerrados (cleistotecios) de paredes duras y rígidas dentro de los cuales se producían esporas elipsoidales de paredes ornamentadas. Aproximadamente 80 años después de este hallazgo, se introdujo un segundo estado sexual asociado igualmente con formas asexuales tipo penicilia, el género *Talaromyces*, que también produce ascomas cleistoteciales, de color

amarillo delimitados en este caso por una pared blanda y recubierta de un entramado de hifas, y con ascosporas de paredes recubiertas de pequeñas espinas.

La clasificación de los hongos tipo-*Penicillium* y de sus estados sexuales comenzó a revisarse críticamente a finales del siglo pasado cuando se incluyó el concepto de taxonomía polifásica, donde se complementa la identificación morfológica con información sobre la fisiología (crecimiento en diferentes medios y temperaturas, perfiles de extrólitos) y se complementa con el análisis de secuencias de diferentes genes. La revisión taxonómica más completa de este género se realizó teniendo en cuenta los resultados presentados por R. Samson, J. Houbraken *et al.* (26) sobre la reevaluación de la familia *Trichocomaceae*. Estos autores pusieron de manifiesto la incoherencia de la denominada “nomenclatura dual”, donde la clasificación era dependiente de la morfología. El abandono de este sistema condujo a cambios significativos en la taxonomía de *Eupenicillium*, *Penicillium* y *Talaromyces*.

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia de cuatro genes (subunidades I y II de la polimerasa ARN, *rpb1* y *rpb2*; el factor de maduración del ribosoma, *Tsr1* y la subunidad 8 de la chaperonina citoplasmática, *Cct8*) evidenciaron que las especies con morfología asexual típica de *Penicillium* no formaban un grupo monofilético de organismos, sino que se separaban en dos clados o grupos. El primer agrupamiento contenía las especies de *Eupenicillium* y la mayoría de las especies anamórficas sin estado sexual conocido. En el segundo clado se ubicaban las especies de *Talaromyces* y las de *Penicillium* que aunque no tenían estado sexual reconocido presentaban un patrón de ramificación del conidióforo similar a los de los *Penicillium* anamorfos de *Talaromyces*, conidióforos biverticilados simétricos (para detalles morfológicos adelante (**Fig. 6**)).

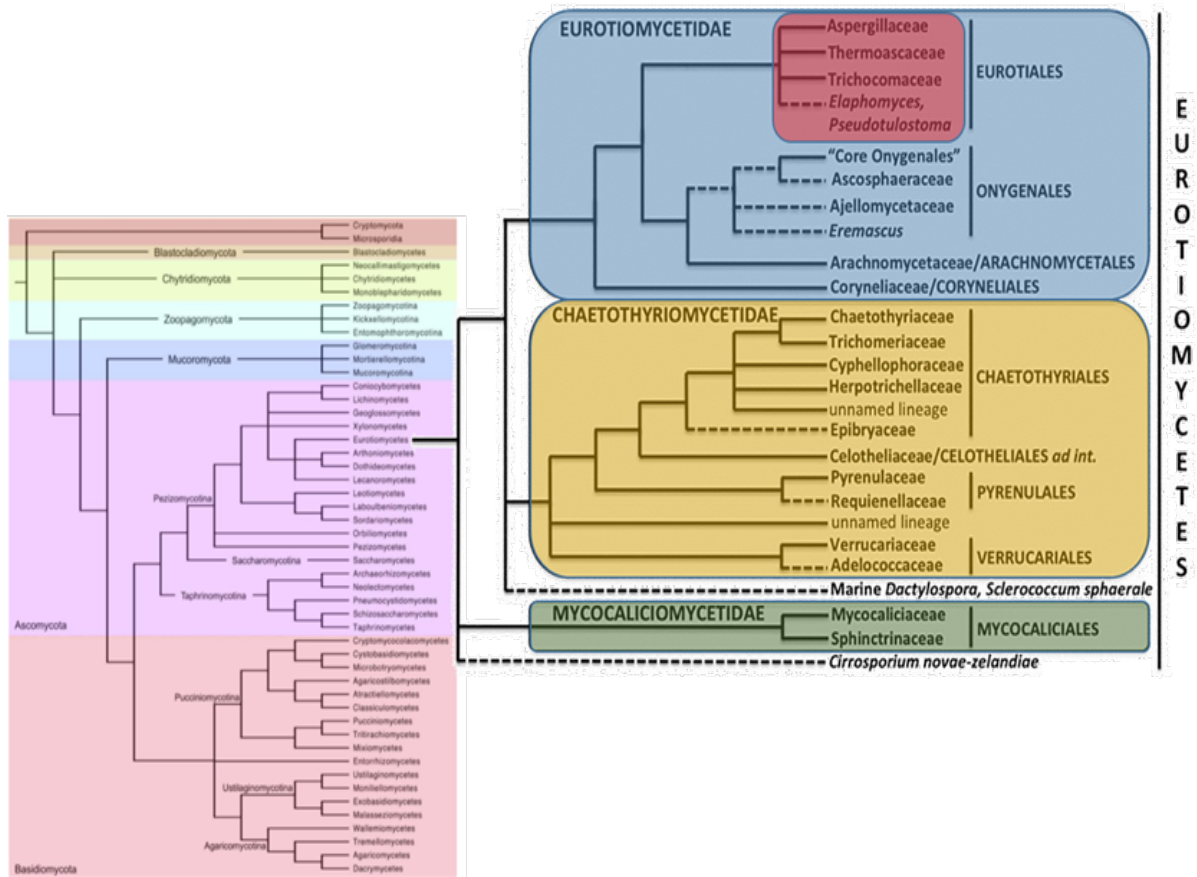
En consecuencia y siguiendo los preceptos de prioridad de nombre y de nomenclatura única, las especies aceptadas de *Eupenicillium* fueron transferidas a *Penicillium* y las de *Penicillium* biverticiladas al género *Talaromyces*.

La Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* (ICPA) se reunió en Utrecht, Holanda, para discutir las implicaciones de la nomenclatura de nombre único en la taxonomía de estos géneros y sus teleomorfos, y estableció por consenso la prioridad de uso del nombre del estado asexual para especies clasificadas dentro de *Aspergillus s. st.* y *Penicillium s. st.*

Los géneros *Penicillium* y *Talaromyces* están en la actualidad clasificados dentro del phylum Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familias *Aspergillaceae* y *Trichocomaceae*, respectivamente (**Fig. 5**). Ambos géneros cuentan con una clasificación sub-genérica dividida en secciones y basada en la identificación polifásica (27),(26),(28).

Actualmente el género *Penicillium* comprende más de 420 especies según la base de datos del ICPA, las cuales se distribuyen en dos Sub-géneros *Aspergilloides* y *Penicillium*, que

contienen 14 y 12 Secciones, respectivamente (**Tabla 1, Fig. 6A**). Por otra parte el género *Talaromyces* comprende más de 120 especies incluidas en siete Secciones (**Tabla 2, Fig. 6B**)



**Figura 5.** Representación esquemática de la ubicación taxonómica y de las relaciones filogenéticas dentro de los Eurotiomycetes. Adaptado de (29), (23).

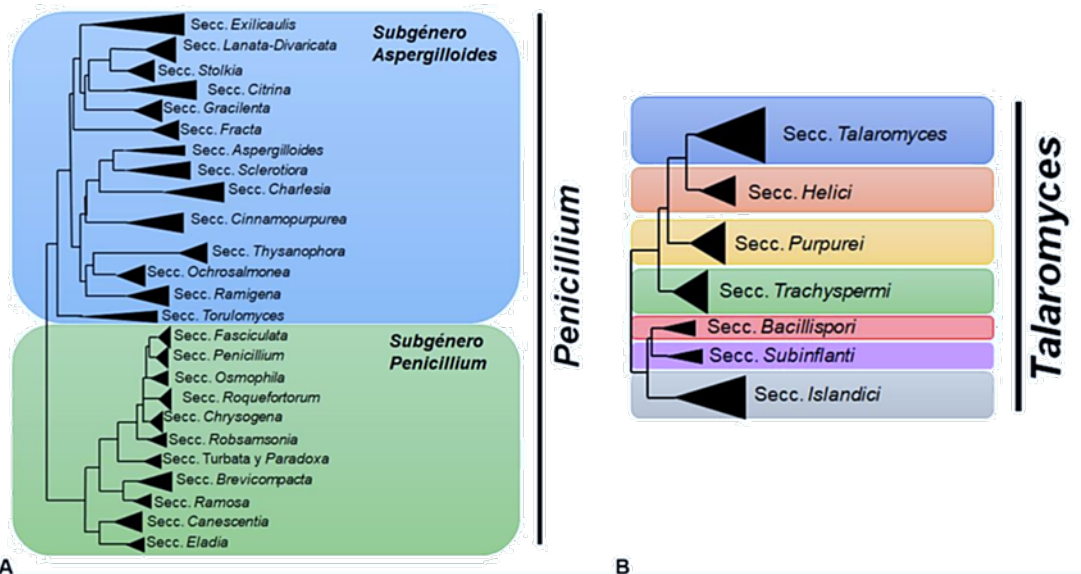


Figura 6. Representación esquemática de las relaciones filogenéticas en: A. *Penicillium*. B. *Talaromyces*. Adaptado de (30), (31).

Tabla 1. Resumen de la clasificación por secciones en diferentes estudios de *Penicillium*. (26).

Pitt (1979)		Stolk y Samson (1985)		Houbraken y Samson (2011)		Clasificación actual <sup>1</sup>	
Sección	Especie tipo	Sección	Especie tipo	Sección	Especie tipo	Sección	Especie tipo
Aspergilloides	<i>P. aurantiobrunneum</i>	Aspergilloides	<i>P. glabrum</i>	Aspergilloides	<i>P. aurantiobrunneum</i>	Aspergilloides	<i>P. aurantiobrunneum</i>
Coremigenum	<i>P. duclauxii</i>	Biverticillium*	<i>P. minioluteum</i> *	Brevicompecta	<i>P. olsonii</i>	Brevicompecta	<i>P. olsonii</i>
Coronatum	<i>P. olsonii</i>	Coremigenum	<i>P. duclauxii</i>	Canescentia	<i>P. canescens</i>	Canescentia	<i>P. canescens</i>
Cylindrosporium	<i>P. italicum</i>	Divaricatum	<i>P. janthinellum</i>	Charlesii	<i>P. charlesii</i>	Charlesii	<i>P. charlesii</i>
Divaricatum	<i>P. janthinellum</i>	Eladia	<i>P. sacculum</i>	Chrysogena	<i>P. chrysogenum</i>	Chrysogena	<i>P. chrysogenum</i>
Exilicaulis	<i>P. restrictum</i>	Geosmithia	<i>P. lavendulum</i>	Cinnamopurpurea	<i>P. cinnamopurpureum</i>	Cinnamopurpurea	<i>P. cinnamopurpureum</i>
Furcatum	<i>P. oxalicum</i>	Inordinate	<i>P. arenicola</i>	Citrina	<i>P. citrinum</i>	Citrina	<i>P. citrinum</i>
Inordinate	<i>P. arenicola</i>	Penicillium	<i>P. expansum</i>	Digitata	<i>P. digitatum</i>	Eladia	<i>P. sacculum</i>
Penicillium	<i>P. expansum</i>	Ramosum	<i>P. lanosum</i>	Eladia	<i>P. sacculum</i>	Exilicaulis	<i>P. restrictum</i>
Simplicium	<i>P. minioluteum</i>	Torulomyces	<i>P. lagena</i>	Exilicaulis	<i>P. restrictum</i>	Fasciculata	<i>P. viridicatum</i>
				Fasciculata	<i>P. viridicatum</i>	Fracta	<i>P. fractum</i>
				Fracta	<i>P. fractum</i>	Gracilentia	<i>P. gracilentum</i>
				Gracilentia	<i>P. gracilentum</i>	Lanata-divaricata	<i>P. janthinellum</i>
				Lanata-divaricata	<i>P. janthinellum</i>	Ochrosalmonea	<i>P. ochrosalmoneum</i>
				Ochrosalmonea	<i>P. ochrosalmoneum</i>	Osmophila	<i>P. osmophilum</i>
				Paradoxa	<i>P. paradoxus</i> (Antes <i>Aspergillus</i> )	Paradoxa	<i>P. paradoxus</i>
				Penicillium	<i>P. expansum</i>	Penicillium	<i>P. expansum</i>
				Ramigena	<i>P. cyaneum</i>	Ramigena	<i>P. cyaneum</i>
				Ramosum	<i>P. lanosum</i>	Ramosum	<i>P. lanosum</i>
				Roquefortorum	<i>P. roqueforti</i>	Robsamsonia	<i>P. robsamsonii</i>
				Sclerotiora	<i>P. sclerotiorum</i>	Roquefortorum	<i>P. roqueforti</i>
				Stolkia	<i>P. stolkiae</i>	Sclerotiora	<i>P. sclerotiorum</i>
				Thysanophora	<i>P. glaucoalbidum</i> ** (Antes <i>Sclerotium</i> )	Stolkia	<i>P. stolkiae</i>
				Torulomyces	<i>P. lagena</i>	Thysanophora	<i>P. glaucoalbidum</i> **
				Turbata	<i>P. turbatum</i>	Torulomyces	<i>P. lagena</i>
						Turbata	<i>P. turbatum</i>

<sup>1</sup>Clasificación actual de acuerdo a: Viagie *et al.* 2014a y Houbraken *et al.* 2016.  
 \*Sección actualmente incluida en el género *Talaromyces* sección *Talaromyces* (*T. minioluteus*).  
 \*\* Sin material tipo disponible.

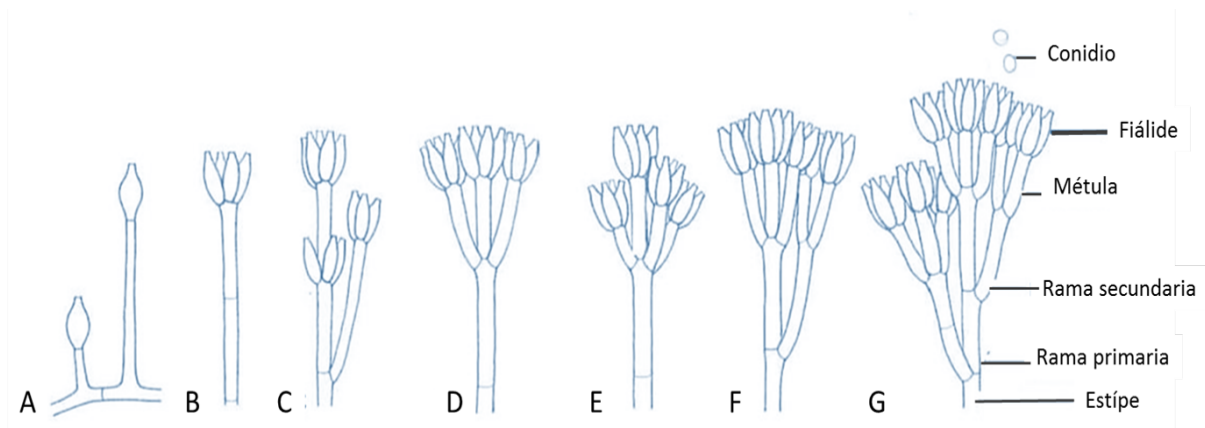
**Tabla 2.** Resumen de la clasificación por secciones en diferentes estudios de *Talaromyces*. Adaptado de (31).

Stolk y Samson (1972)		Pitt (1979)		Yilmaz et al. (2014)	
Sección	Especie tipo	Sección/Series	Especie tipo	Sección	Especie tipo
Emersonii	<i>T. emersonii</i>	<i>Penicillium</i> secc. <i>Simplicium</i> ser. <i>Islandica</i>	<i>P. islandicum</i>	Bacillispori	<i>T. bacillisporus</i>
Purpurea	<i>T. purpureus</i>	<i>Penicillium</i> secc. <i>Simplicium</i> ser. <i>Miniolutea</i>	<i>P. minioluteum</i>	Helici	<i>T. helicus</i>
Talaromyces	<i>T. flavus</i> (= <i>T. vermiculatus</i> )	<i>Penicillium</i> subgenus <i>Biverticillium</i> secc. <i>Coremigenum</i> ser. <i>Dendritica</i>	<i>P. dendriticum</i>	Islandici	<i>T. islandicus</i>
Thermophila	<i>T. thermophilus</i>	<i>Penicillium</i> subgenus <i>Biverticillium</i> secc. <i>Coremigenum</i> ser. <i>Duclauxii</i>	<i>P. duclauxii</i>	Purpurei	<i>T. purpureus</i>
		<i>Purpureus/Purpurei</i>	<i>T. purpureus</i>	Subinflati	<i>T. subinflatus</i>
		<i>Talaromyces/Flavi</i>	<i>T. flavus</i>	Talaromyces	<i>T. flavus</i>
		<i>Talaromyces/Lutei</i>	<i>T. luteus</i>	Trachyspermi	<i>T. trachyspermus</i>
		<i>Talaromyces/Trachyspermi</i>	<i>T. trachyspermus</i>		
		<i>Thermophilus/Thermophili</i>	<i>T. thermophilus</i>		

#### 2.4.1. Características morfológicas

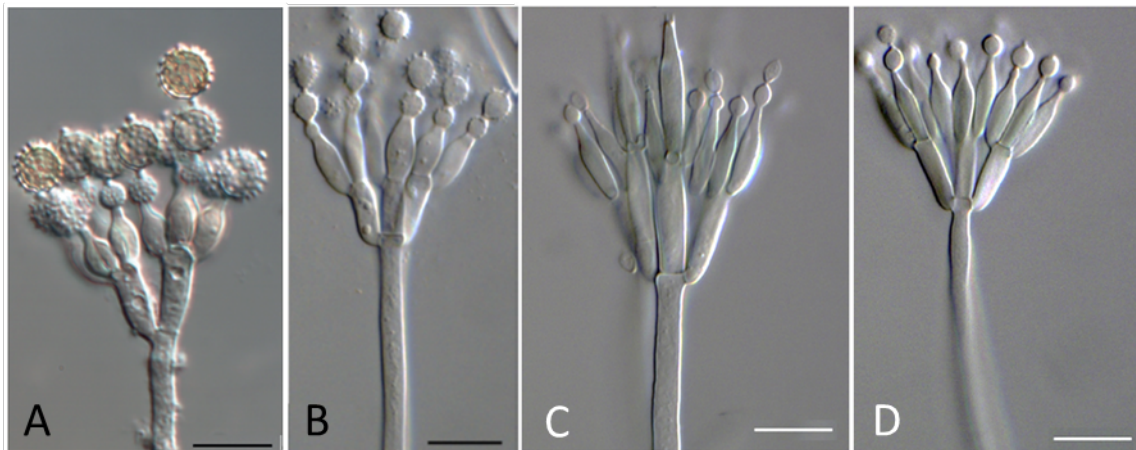
Tradicionalmente la identificación de los hongos se basó en los caracteres morfológicos, y aunque la filogenia basada en caracteres moleculares ha demostrado que este sistema es poco fiable, ciertas características morfológicas siguen siendo relevantes a la hora de separar géneros próximos o de distinguir entre especies muy cercanas filogenéticamente.

Mayormente las especies de *Penicillium* y *Talaromyces* comparten anamorfos con características en sus microestructuras muy semejantes (**Fig. 7**). Los estados asexuales en estos géneros se caracterizan por formar conidióforos simples o formando complejos patrones de ramificación, en los cuales se pueden distinguir entre la estipe o eje principal del conidióforo, generalmente largo y cilíndrico y las ramas que pueden variar en su número dando lugar ramas secundarias que varían en su número dando lugar a diferentes categorías o patrones de ramificación: monoverticilados, divaricados, biverticilados, triverticilado o cuadvverticilado. Es característico de algunas especies la formación sobre las ramas terminales de las métulas, que son células de soporte sobre las cuales se desarrollan las fiálides, tipo de célula conidiógena característica de estos géneros (**Fig. 7G**). A partir de las fiálides se forman los conidios que se disponen en cadenas no ramificadas y suelen tener tonalidades verdosas o en diferentes tonos marrinosos (20).



**Figura 7.** Tipos de conidióforos y sus ramificaciones: A. Conidióforos con fiálides solitarias. B. Conidióforo monovérticilado. C. Conidióforo divariacado. D y E. Conidióforos bivérticilados. F. Conidióforo trivérticilado. G. Conidióforo cuatrivérticilado (10 =  $\mu\text{m}$ ). Adaptado de Atlas of soil Ascomycetes (32).

No obstante algunas características sutiles nos permiten diferenciar entre las especies de ambos géneros, por ejemplo en *Penicillium* las fiálides son ampuliformes y raramente cilíndricas, sin embargo en *Talaromyces* las células conidiógenas son aceradas, lanceoladas pero raramente ampuliformes (**Fig. 8**).

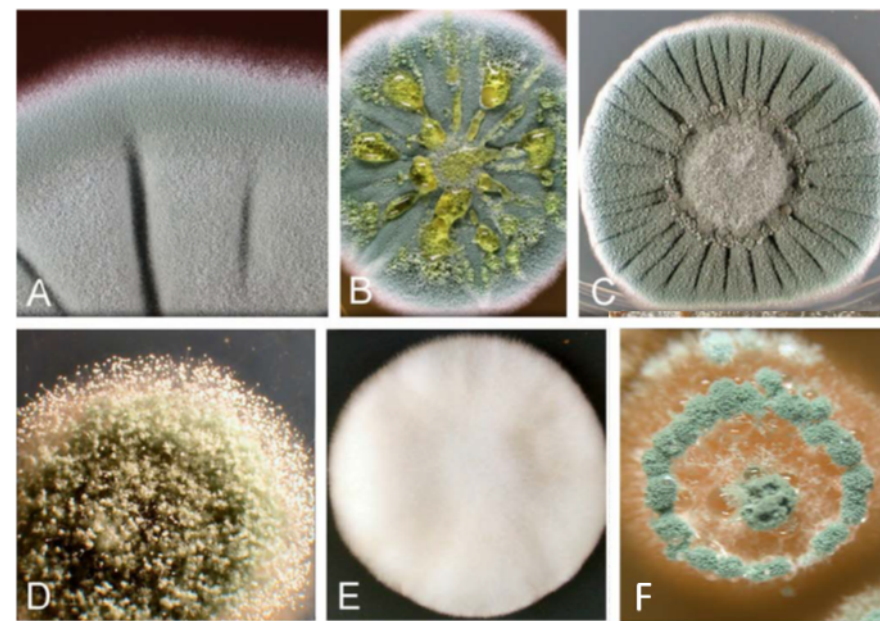


**Figura 8.** Morfología de las células conidiógenas en *Penicillium* (A, B) y *Talaromyces* (C,D). Fiálides ampuliformes en *P. nodositatum* (A) (33) y *P. Crystallinum* (28) (B). Fiálides aceradas a lanceoladas en *T. amestolkiae* (C) y *T. angelicus* (D) (31). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Como hemos mencionado previamente algunas especies de estos géneros pueden producir en cultivo sus estados sexuales, por lo que algunas características derivadas del teleomorfo son también útiles para discriminar entre ambos géneros. En ambos géneros los cuerpos fructíferos son tipo cleistotecios, es decir ascomas completamente cerrados de esféricos a

globosos, sin embargo en *Penicillium* son duros, con paredes pseudoparenquimatosas, con un patrón de maduración desde el centro hacia afuera y a menudo presentan una maduración tardía (30d o más); suelen tener coloraciones que van desde el blanco, amarillo, naranja, marrón y ocasionalmente negro o rojo (28). Por otra parte en *Talaromyces* los cleistotecios poseen unas paredes blandas, delgadas compuestas por un entramado de hifas, y suelen madurar en pocas semanas, presentan coloración comúnmente amarilla, ocasionalmente blanca, cremosa, rosa, naranja, rojiza o verde (31).

Otros caracteres utilizados provienen de la macromorfología entre ellos las texturas de las colonias, el grado de esporulación, la coloración de la masa de conidios, presencia y pigmentación de exudados superficiales o difusibles en el medio, entre otros (**Fig.9**).



**Figura 9.** Algunos caracteres macromorfológicos derivados de la morfología de las colonias: Colonias aterciopeladas (**A – C**). *P. persicinum* (**A**). *P. chrysogenym* (**B**). *P. chrysogenum* (**C**). Producción de exudados (**B**). Cabezas conidiales grandes y compactas en *P. brevicompactum* (**D**). Colonia flocosa, tomentosa en *P. camemberti* (**E**). Colonia fasciculada en *P. expansum* (**F**) (34).

Otros caracteres fenotípicos que se tienen en consideración están relacionados por ejemplo con la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas y sobre diferentes medios de cultivo, el crecimiento sobre medios con baja actividad de agua y la producción de ácido y la producción de diferentes extrolitos entre otros (**Fig. 10**).

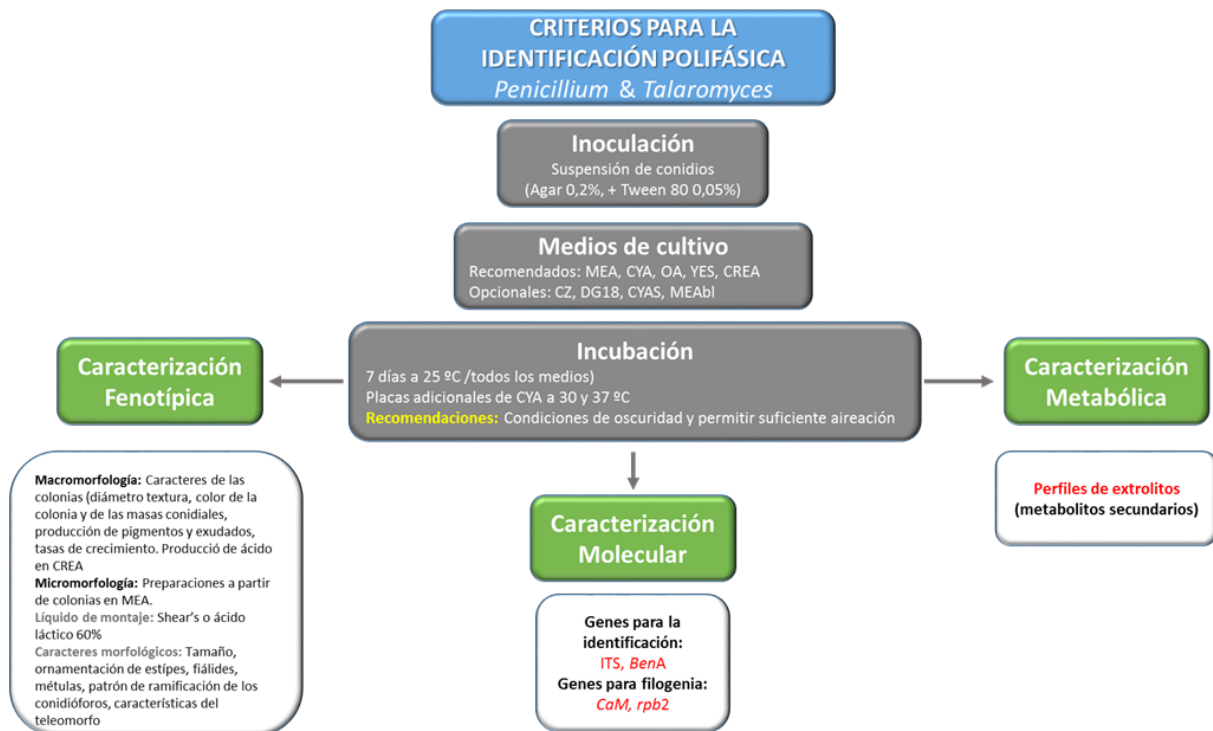
La identificación basada en los criterios previamente expuestos es usualmente compleja, laboriosa y requiere de personal altamente especializado. Esto unido a la gran diversidad de especies aceptadas hace esta tarea aún más difícil. Sin embargo, los métodos moleculares

constituyen una herramienta rápida y algo más sencilla, por lo que para el presente trabajo de fin de grado, las características morfológicas se han complementado con técnicas de biología molecular para realizar una identificación precisa.

Como se explicó anteriormente el *barcode* seleccionado para los hongos fueron los ITS, sin embargo para *Penicillium* y *Talaromyces* este marcador es poco resolutorio y no permite una identificación a nivel de especie, sino que su alcance a nivel de filogenia solo permite relacionar a nivel de secciones. Por ello para estos géneros se seleccionó un código de barra secundario para la identificación rutinaria a nivel de especie, un fragmento del gen  $\beta$ - tubulina (*BenA*). Estas secuencias cumplen con los requisitos deseados para un *barcode*: es fácil de amplificar, es capaz de discriminar especies cercanas y por último pero no menos importante, existen bases de datos de referencia muy completas, es decir hay suficientes secuencias representativas de la mayoría de los taxa descritos y estas se encuentran disponibles en plataformas de uso público.

Para la delimitación de especies potencialmente nuevas se recomienda no obstante la secuenciación de varios marcadores y la reconstrucción filogenética basada en análisis multilocus, para los que se suelen combinar las secuencias de ITS, *BenA* y *CaM* o *rpb2*.

En el presente trabajo hemos podido desarrollar algunos de los puntos de la identificación polifásica establecida para la taxonomía de *Penicillium* y *Talaromyces*, principalmente, aquellos que son estándar para la descripción de nuevas especies incluyendo datos moleculares, morfológicos, fisiológicos y ecológicos y siguiendo las recomendaciones de Visagie *et al.* (28) (**Fig. 10**).



**Figura 10.** Diagrama de flujo que resume los métodos recomendados para la identificación y caracterización de especies de *Penicillium* y *Talaromyces* (28).

## 2.5 Importancia de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*

Los géneros *Penicillium* y *Talaromyces* conjuntamente con *Aspergillus* son los organismos fúngicos que mayor impacto económico tienen para el ser humano, debido a su gran relevancia en diversos aspectos de la vida humana, ya sea en el campo de la biotecnología o la industria (farmacéutica y alimentaria), o porque algunas de sus especies son de interés clínico dada su capacidad para causar infecciones en humanos y animales.

En la industria farmacéutica el género *Penicillium* tiene una gran importancia como productor de metabolitos secundarios de acción antibiótica como la penicilina (*P. chrysogenum*) (35), metabolitos de acción antifúngica como la grisofulvina, (*P. griseofulvum*) (36), sustancias inmunosupresoras como el ácido micofenólico (*P. brevicompactum*) o anticolesterolémicos como la compactina (*P. brevicompactum*). Algunas especies también han sido tradicionalmente explotadas en la industria alimentaria para la fabricación de quesos como el Camembert o el Roquefort; la elaboración de salsas fermentadas y salamis (*P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. nalgiovense*, *P. salami*) (37),(38). Otros en cambio son productores de micotoxinas como la putalina que deterioran algunas frutas (*P. expansum*, *P. griseofulvum* y *P. novae-zeelandiae*) (39). En los ecosistemas tiene además un importante papel en la descomposición de la materia orgánica, para lo cual determina su gran diversidad metabólica,

y es esta capacidad de degradación lo que ha promovido que sus especies sean objeto constante de estudio en la búsqueda de nuevas enzimas de interés (39),(41) ,(42).

El género *Talaromyces* tiene también un gran impacto en la industria alimentaria, en este caso por capacidad de deteriorar los zumos y otros productos pasteurizados que tienen como materia prima diferentes tipos de fruta (*T. macrosporus*, *T. flavus*, *T. bacillisporus*, *T. helicus*, *T. stipitatus*, *T. trachyspermus* y *T. Wortmannii*) (43),(44). Algunas especies también son productoras de micotoxinas en alimentos, como la rubratoxina que es una potente hepatotoxina producida por *T. purpurogenus* (45) o la cicloclorotina, islanditoxina, eritrosquirina y luteosquirina, todas hepatotóxicas y carcinogénicas (46), (47), (48), (49), (50), (51). Sin embargo otras especies tienen un impacto positivo en la producción de alimentos, *Talaromyces flavus* por ejemplo, es uno de los hongos más importantes utilizados en el biocontrol de fitopatógenos residentes en el suelo debido a su actividad antagonista contra *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* (52), (53),(54) (55). Las especies del género *Talaromyces* tienen la capacidad de producir una gran variedad de pigmentos solubles y de enzimas lo que lo convierte en objeto de estudio de gran interés para la industria biotecnológica. Entre estas enzimas tenemos las  $\beta$ -rutosidasas, celulasas endoglucanasas, fosfatasas, y xilanasas (45).

Aunque las infecciones provocadas por especies de estos géneros son raras, algunas han sido descritas como patógenas para los animales y el hombre. Las manifestaciones clínicas descritas van desde micosis superficiales a infecciones invasivas, y algunas especies son además potentes alérgenos; no el desarrollo de estas afecciones está muy relacionado con el estado inmunológico de los pacientes (56), (45).

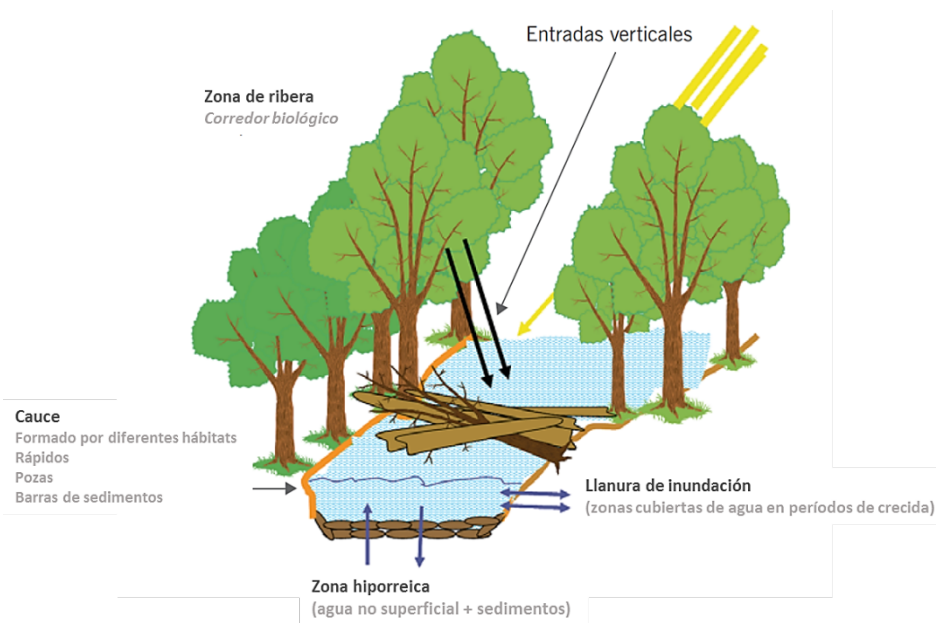
Entre las especies patógenas oportunistas de *Penicillium* podemos citar a *P. chrysogenum* asociada a infecciones cutáneas e invasoras; *P. citrinum* como responsable de queratitis, infecciones cutáneas y neumonía; a *P. decumbens* involucrado en infecciones paravertebrales; y *P. oxalicum* responsable de micosis invasivas en pacientes con leucemia mieloide aguda, diabetes mellitus, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (57),(58). Sin embargo estudios recientes basados en técnicas moleculares para la identificación de 118 aislados clínicos procedentes de Estados Unidos demostró una alta frecuencia de las especie *P. rubens* y *P. glabrum* las cuales no habían sido previamente asociadas a ningún reporte clínico (59).

*Talaromyces marneffe* es la especie más importante a nivel de casos clínicos de este género, la cual ha sido considerada como un patógeno fúngico emergente sobre todo en países del Este de Asia como China Taiwan y Tailandia donde ha provocado casos micosis letales especialmente en individuos inmunocomprometidos (31). Otras especies han sido reportadas ocasionando desde micosis superficiales hasta fungemias tanto en humanos como en animales. Otras especies del género reportadas como patógenos oportunistas son: *T.*

*amestolkiae*, *T. indigoticus*, *T. piceus*, *T. purpurogenus*, *T. radicus*, *T. ruber*, *T. rugulosus*, *T. stollii*, y *T. verruculosus*.

## 2.6 Hongos en sedimentos fluviales

Los ríos forman un ecosistema en sí mismo que se caracteriza por una dinámica y complejidad extrema. La estructura del ecosistema fluvial se puede dividir en el cauce, la zona de ribera, la llanura de inundación y la zona hiporréica (sedimentos) (**Fig. 11**), las cuales tienen una dinámica muy activa dependiente de la hidrología, la distribución de los sustratos y de la materia transportada.



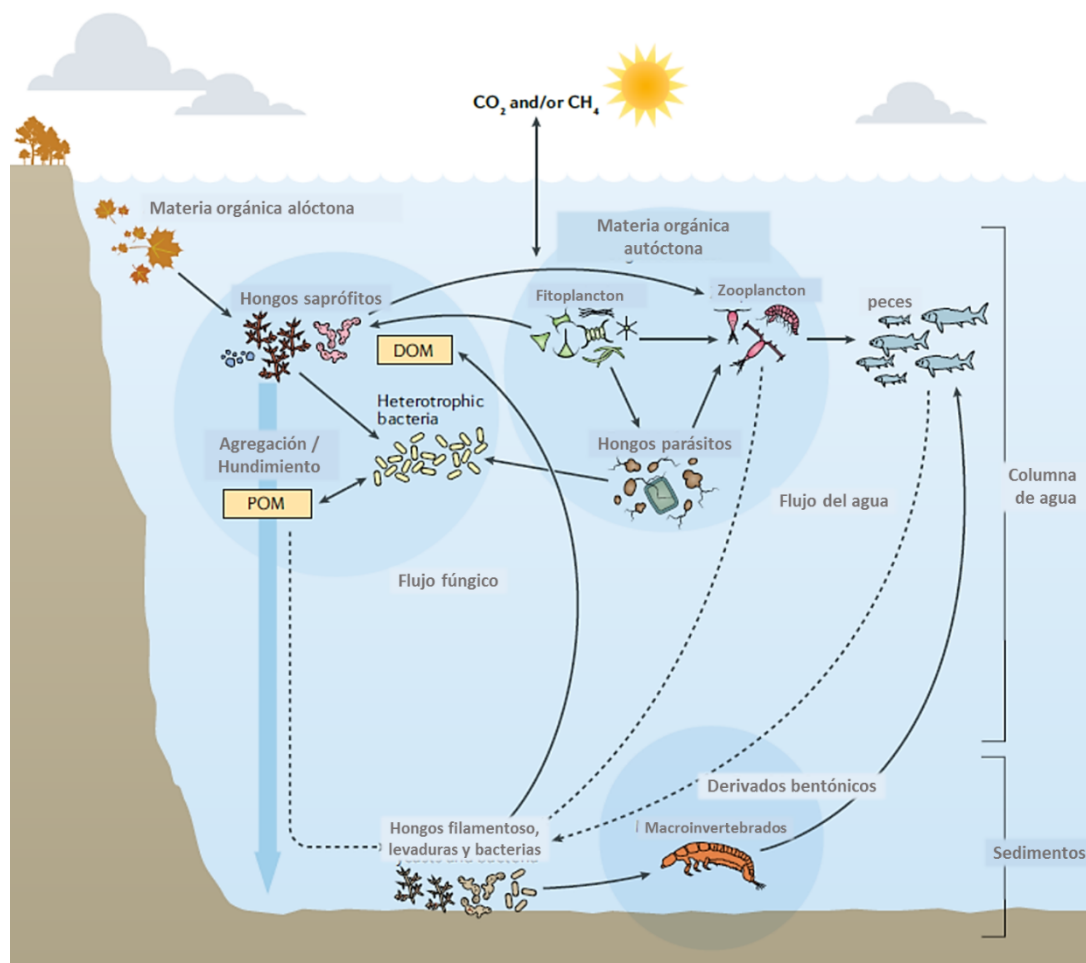
**Figura 11.** Esquema representativo de la estructura fluvial en un río. Señaladas con flechas se representan algunas interacciones entre estos componentes. Adaptado de (60).

Diferentes factores influyen en diversidad biológica de estos ecosistemas desde abióticos como las características geológicas, la meteorización y características de los suelos, el clima, la pendiente de la cuenca, el caudal circundante o la química de las aguas, o los factores bióticos que dependen por ejemplo de la densidad y el tipo de vegetación que forma la cuenca (60).

La llegada al río de material disuelto en forma de partículas varía con las estaciones, las variaciones hidrológicas y las transformaciones que se producen en el medio circundante, que puede influenciar la disponibilidad de luz (60). La biota y la microbiota que habita en este ecosistema variará en consecuencia en respuesta a la disponibilidad de materia orgánica, lo que quiere decir que su diversidad y abundancia variará influenciada tanto espacial como temporalmente, y dependerá del flujo de esta materia (**Fig. 12**) (61).

La microbiota de los ecosistemas fluviales está constituida por algas, bacterias, hongos y protozoos y en su conjunto forman el *biofilm* que recubre el lecho del río. Estos organismos son esenciales para mantener la dinámica de los materiales disueltos, tanto de los compuestos orgánicos como de la materia orgánica muerta (detritus) y esta última constituye la mayor parte de la energía química del ecosistema fluvial. Los hongos, crecen preferiblemente sobre la materia orgánica (hojas, ramas, restos de animales) pero también sobre sustratos inorgánicos que forman los sedimentos del río. Estos organismos tienen un papel crucial en el reciclaje y reutilización del material proveniente de la ribera boscosa, los cuales son capaces de descomponer gracias a su diversa maquinaria enzimática. Los hongos en especial, tienen una mayor capacidad para la descomposición del material vegetal, porque poseen enzimas capaces de descomponer moléculas complejas como la celulosa y la lignina gracias a sus enzimas celulolíticas y lignolíticas como las celobiohidrolasa y la peroxidasa. Esta actividad es la que genera las partículas de materia orgánica fina (*fine particulate organic matter*, FPOM). La materia orgánica gracias a la actividad descomponedora de estos organismos saprobios contribuye a la mineralización de los ecosistemas fluviales (**Fig. 12**). Pero además de su importante papel ecológico algunos hongos de este ecosistema pueden ser parásitos de otros organismos del mismo hábitat o llegar a otros ecosistemas a través del agua. Es por eso que el estudio de su diversidad, concentración y prevalencia es esencial para poder tener un mejor conocimiento de su distribución y posible dispersión.

Los métodos de secuenciación de primera y segunda generación han desempeñado un papel crucial en nuestro conocimiento de las dimensiones reales de la diversidad fúngica a través de obtención de ADN directamente de las muestras ambientales (eDNA). Sin embargo, existe una gran necesidad global de mejorar las técnicas y los esfuerzos por el aislamiento en cultivo de estos organismos, ya que el número de secuencias desconocidas, sin clasificación, aumenta desproporcionadamente en comparación con el número de especies descritas (62). Además, para comprender mejor la fisiología de los hongos de los sedimentos, sus metabolismo, ciclo de vida, y poder estudiar sus metabolitos como posibles productos biotecnológicos es necesario intensificar el aislamiento y obtención de cultivos puros para el posterior ensayo en laboratorio.



**Figura 12.** Papel ecológico de los hongos acuáticos. Este modelo conceptual muestra diferentes procesos mediante los cuales los hongos acuáticos transforman e incorporan materia orgánica alóctona y autóctona en la red alimentaria. DOM, materia orgánica disuelta; POM, materia orgánica en partículas. Modificado de (61).

### 3. Interés, hipótesis y objetivos del estudio

Los hongos pueden ser patógenos para los seres humanos, animales y plantas. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en su mayoría resultan ser beneficiosos para el hombre gracias a la producción de una gran variedad de compuestos bioactivos. Sobretudo metabolitos secundarios con amplio abanico de aplicaciones en la industria farmacéutica (antifúngicos, antibacterianos, inmunosupresores, depresores del colesterol) o como agentes para el biocontrol de plagas y enfermedades en la agricultura. Si tenemos en cuenta que la diversidad fúngica conocida solo representa un 2% del total estimado (15 millones de especies

aprox.)(63), es de esperar que proporcionalmente las posibilidades metabólicas aún por descubrir sean igualmente considerables.

La microbiota de los sedimentos fluviales despierta gran interés biotecnológico. Esta comprende un grupo de organismos de gran importancia por la capacidad de degradación de compuestos orgánicos complejos, que tiene un papel crucial en el flujo de energía bioquímica a la red alimentaria y en la autopurificación del ecosistema fluvial y del entorno. Debido a esta relación con el ecosistema, los cambios en la diversidad fúngica en los sedimentos podrían proporcionar información sobre las características fisicoquímicas y de la calidad del agua del río, por lo que el interés también se ha trasladado a que podrían ser utilizados como organismos indicadores de la salud del ecosistema. Por lo tanto, sería importante estudiar la diversidad fúngica de esta comunidad para posteriormente poder dilucidar qué mecanismos pueden influenciar sobre ella y en respuesta a las diferentes condiciones ambientales.

Los sedimentos fluviales son un reservorio natural de propágulos fúngicos poco explorados en nuestro país, por esta razón en la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental se lleva a cabo el proyecto BIODIV (CGL2017-88094-P), cuyo objetivo principal es el estudio de la diversidad fúngica en España, poniendo énfasis en los ecosistemas de los sedimentos fluviales hasta la fecha poco estudiados en nuestro territorio.

En el marco de estos intereses, nos planteamos como hipótesis:

Que en los sedimentos fluviales podremos encontrar una diversidad fúngica hasta el momento desconocida para nuestro territorio y para la ciencia en general. En consecuencia partimos igualmente del supósito que este ecosistema pudiera representar un reservorio de metabolitos biológicamente activos aún por descubrir.

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos como objetivo general:

- Contribuir al estudio de la diversidad fúngica de los sedimentos fluviales de España.

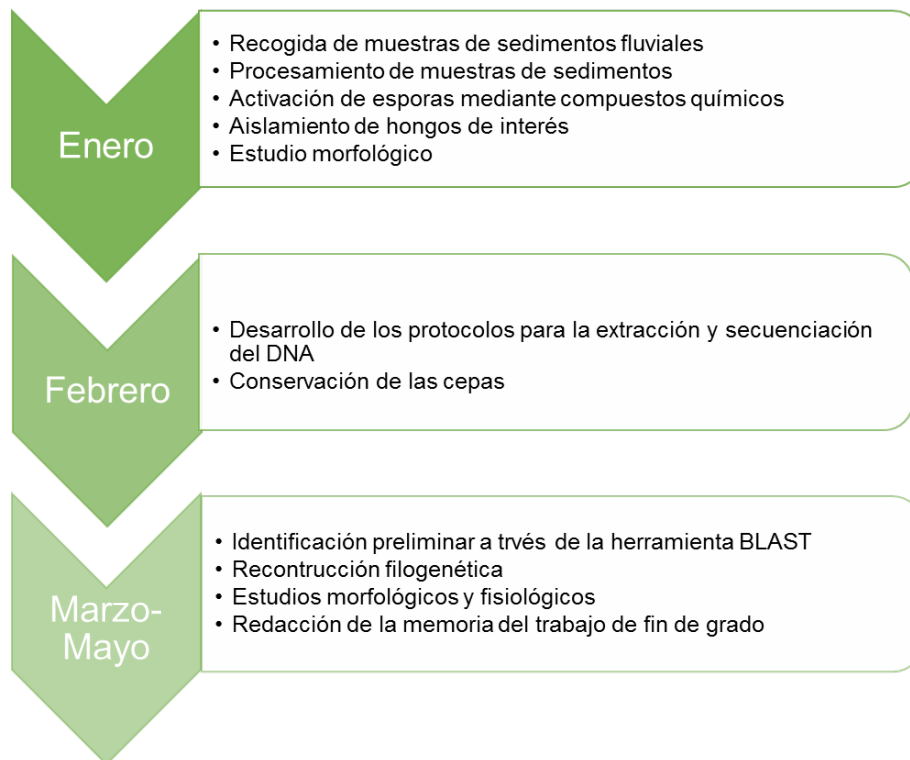
Se proponen además los siguientes objetivos específicos:

- Aplicar métodos dependientes de cultivo para el aislamiento, preservación e identificación de los hongos ascomicetos presentes en sedimentos fluviales.
- Delimitar las relaciones filogenéticas de nuestras cepas más interesantes mediante análisis de secuencias *barcode* del DNA.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Organización del estudio

En la figura que se muestra a continuación se representan en forma de cronograma general las principales tareas desarrolladas en el presente estudio (Fig.13).



**Figura 13.** Plan de trabajo seguido para conseguir objetivos propuestos.

### 4.2 Origen de las muestras

Las muestras trabajadas fueron procedentes de los sedimentos del Río Fondón de Chapela en Vigo. La recogida se realizó en bolsas individuales dos días antes de entrar en el laboratorio, el día 8 de enero de 2020. Se recogieron dos muestras en las coordenadas 42.2675045, -8.6704811: Ruta de los molinos del Río Fondón – Chapela – Vigo. Una a aproximadamente un kilómetro de la desembocadura del río y otra en la propia desembocadura (**Fig.13**).

Las muestras del Río Segre de Lleida, estaban conservadas en la nevera del laboratorio a una temperatura de 4°C. Fueron recolectadas el día 3 de diciembre de 2019 por un estudiante de tercer ciclo de la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universitat Rovira i Virgili). Trabajamos con dos de estas muestras, las del punto 1 con las coordenadas 41.89834, 0.88110, Riu Segre, Camarasa – Lleida y del punto 7, con las coordenadas: 41.42754, 0.335020, Riu Segre– La Granja d'Escarp (**Fig.14**). A estas se les realizó el mismo procesamiento que a las anteriores



**Figura 14.** Puntos de colecta de las muestras de sedimentos. **A, B.** Río Fondón, Vigo. **C, D.** Río Segre en Lleida.

#### 4.3 Métodos de aislamiento

Una vez en el laboratorio, las muestras de sedimentos fueron homogenizadas, y se tomaron dos sub-muestras de 1g. Cada una de estas fue sometida a los métodos de activación química de esporas latentes utilizando ácido acético, etanol y fenol. Este procedimiento se realizó con el objetivo de generar un choque químico y causar la germinación de esporas en latencia, para así poder obtener una mayor variabilidad de especímenes en cultivo.

Posteriormente fueron sembradas por duplicado en placas de Petri con medio PDA (PCA; 20g de papas ralladas, 20 g; agar, 20 g; agua destilada, 1 L al que se le adicionaba L-cloranfenicol (200 mg) y 1% p / v de dieldrin en dimetil-cetona (20 gotas ), que se utilizan para inhibir el crecimiento de colonias bacterianas y la presencia de ácaros, respectivamente. Las muestras procesadas fueron incubadas a 25 °C, para aislar los hongos, con crecimiento más rápido, y 15 °C para aislar hongos, de crecimiento más lento y con requerimientos de temperatura inferiores (este tipo de muestras se suele incubar además a 4 °C para simular las condiciones del medio de procedencia, sin embargo por cuestiones de tiempo, ya que la tasa de crecimiento suele ser muy baja y las muestras han de ser observadas al menos durante 4 meses, esta variante no fue considerada en el presente estudio).

Las muestras fueron evaluadas además a través de la siembra directa en superficie sobre medio PDA (mismo lote de medio que para las muestras activadas) en placas de Petri de 9mm e incubadas a las mismas temperaturas 25°C y 15°C.

Para cada uno de los métodos/temperaturas se realizó una réplica.

#### **4.3.1 Activación de esporas latentes con ácido acético**

Cada gramo de sedimento fue suspendido en un tubo de ensayo con 5ml de ácido acético preparado al 5% v/v. Fue agitado durante 5 minutos y dejado en reposo otros 5 minutos. Posteriormente el ácido fue eliminado por decantación y los sedimentos fueron resuspendidos en agua destilada estéril. El contenido de los tubos fue distribuido en cuatro placas de Petri de 9mm (37).

#### **4.3.2 Activación de esporas latentes con etanol**

Se suspendió aproximadamente 1 g de cada muestra de suelo en 5 ml de etanol al 65% v / v. Los siguientes pasos fueron los mismos que para la técnica de activación con ácido acético (37).

#### **4.3.3 Activación de esporas latentes con fenol**

Se suspendió aproximadamente 1 g de cada muestra de suelo en 5 ml de fenol al 2% p / v. Los siguientes pasos fueron los mismos que los descritos para la activación por ácido acético (64).

#### **4.4 Obtención de un cultivos puros**

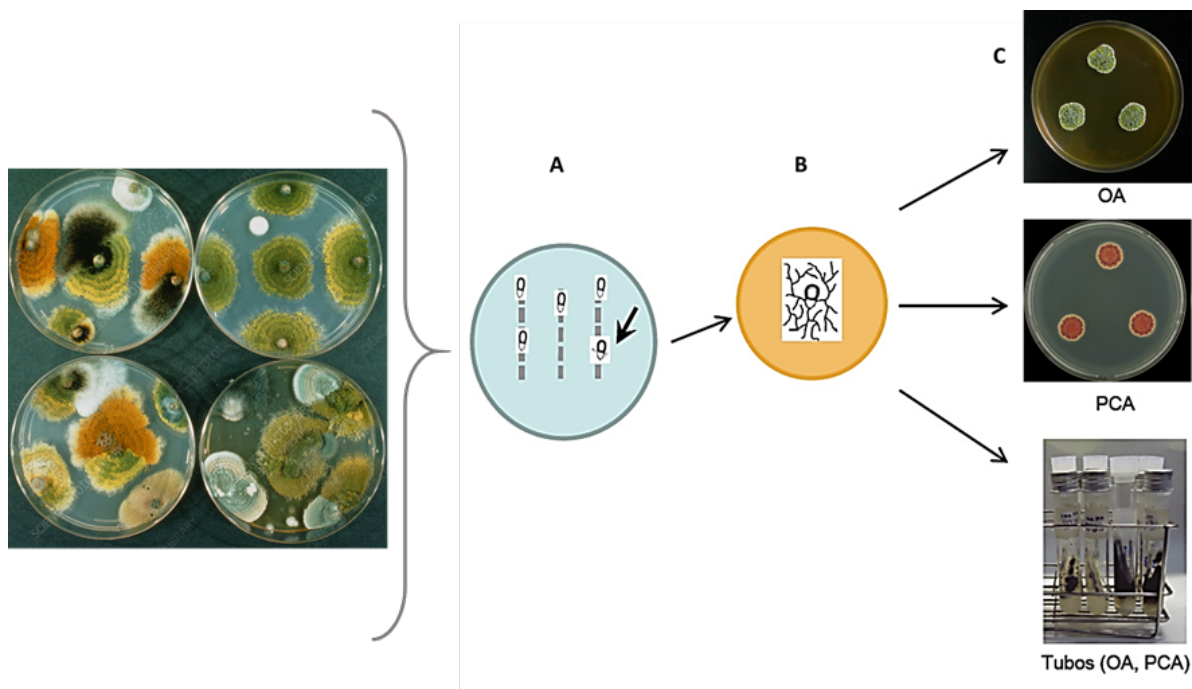
Las placas fueron observadas periódicamente para detectar crecimiento fúngico y comprobar la esporulación de las colonias bajo un microscopio estereocópico (Leica Wild 5A, con aumentos entre 4x y 50x).

Cuando comenzó a detectarse crecimiento fúngico, se tuvieron en cuenta sus características macroscópicas e color de la colonia, presencia de estructuras de reproducción, colores de superficie.

Una vez localizada las zonas con evidente esporulación se recogían conidios o bien ascosporas liberadas, o bien ascomas tipo cleistotecios con ayuda de agujas hipodérmicas estériles. Estos propágulos eran entonces depositados, sobre medio PCA suplementado con antibiótico (Cloranfenicol 50mg/L), dibujando tres estrías en paralelo sobre la superficie del agar (**Fig. 15**). Esta manera de proceder permite obtener propágulos aislados sobre la estría. Estos cultivos se incubaban a  $25 \pm 2$  °C y se revisaban diariamente bajo la lupa o con ayuda del microscopio óptico a pocos aumentos (4X, 10X) para detectar crecimiento. Porciones

periféricas de las colonias procedentes de un único propágulo se transferían a otros medios de cultivos, principalmente sobre agar harina de avena (OA copos de avena, 30 g; agar-agar, 20 g; agua destilada, 1L,) y agar patata-zanahoria (PCA g de patata, 20 g de zanahoria, 20 g de agar, 1000 mL de agua destilada), contenidos en placas de Petri de 5 cm de diámetro obteniendo de esta forma cultivos monospóricos. Estas placas se incubaban a  $25 \pm 2$  °C en la oscuridad hasta observar esporulación y confirmar que el hongo en el medio de cultivo fuese el mismo que el observado previamente sobre el sustrato original.

Se seleccionaron estos medios porque son medios pobres, sin azúcares añadidos que simulan el ambiente natural de los hongos saprobios en naturaleza y que propician la esporulación. El medio OA no es válido para todos los grupos pero si lo es para la clase Sordariomycetes, estimulando la formación del holomorfo. La incubación se realizó a temperatura ambiente. En caso de aparecer algún tipo de contaminación se realizaron pases a otras placas de cultivo hasta obtener un cultivo puro, el cual se sembró en placas de PCA con 9 cm de diámetro para su evaluación macro y micromorfológica.



**Figura 15.** Representación de la obtención de cultivos monospóricos. **A.** Esporas procedentes del crecimiento en placa (cultivo primario), inoculados en estrías paralelas sobre PCA; espora germinada (flecha). **B.** Espora germinada y formación de colonia miceliar sobre OA o PCA, cultivo monospórico. **C.** Subcultivos en placas para la caracterización *in-vitro* de los hongos y sub-cultivos en tubos para su conservación.

#### **4.5 Identificación morfológica**

En el caso de obtener crecimiento *in vitro*, la caracterización morfológica se complementaba con el estudio macro y microscópico de las cepas creciendo en diferentes medios de cultivo. Los aislados de interés taxonómico fueron caracterizados macroscópicamente. Para ello, se cultivaron en medios de cultivos estándares recomendados para el género *Penicillium* específicamente: agar extracto de malta (MEA), agar extracto de levadura Czapek (CYA; evaluar crecimiento y producción de pigmentos), agar creatina sacarosa (CREA; ideal para comprobar la producción de ácido), agar harina de avena (OA; ideal para observar la producción de telomorfos) y agar sacarosa extracto de levadura (YES) y Diclorán glicerol (DG18; para evaluar crecimiento en baja actividad de agua). Estos medios se incubaron a temperatura de 25°C.

Finalmente se evaluó su temperatura óptima de crecimiento mediante cultivo en CYA a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C.

El estudio de las estructuras microscópicas, tanto del anamorfo como del teleomorfo, se realizó a partir de preparaciones de colonias con 7–10 días de crecimiento, utilizando como líquido de montaje el medio de Shear's (3 g de acetato de potasio, 150 mL de agua destilada, 60 mL de glicerina, 90 mL etanol 95 %) (65). En los casos en que la producción de conidios era profusa y muy densa, se realizaban lavados con etanol al 70% con el fin de eliminar el exceso de conidios (28).

El examen microscópico, incluyendo las mediciones de las estructuras, se realizó en un microscopio de campo claro Olympus CH-2 (Olympus Corporation, Japón), mientras que las microfotografías se obtuvieron con un microscopio automatizado Zeiss Axio-Imager M1 (Zeiss, Alemania) provisto de una cámara digital DeltaPix Infinity X21, utilizando óptica de contraste de fases y óptica Nomarski (óptica contraste interferencial), capturando y procesando las imágenes mediante el software DeltaPix InSight 5.0 (DeltaPix, Dinamarca).

#### **4.6. Conservación de cepas**

Se comprobó que todos los cultivos fueran puros y los aislamientos fueron depositados en la colección de la Facultad de Medicina de Reus (FMR). Esta conservación se realizó a la vez que se realizaban las extracciones de DNA. Tanto la conservación como la extracción se obtuvo de la misma placa de Petri con diámetro de 9cm.

La conservación se realizó mediante diferentes métodos:

- **Conservación en tubo con agar inclinado:** Con una asa de Kolle en condiciones asépticas, se retiró parte de micelio de la placa de Petri y se depositó en dos tubos de polietileno estéril con PCA/OA y tres de vidrio estéril, dos de PCA y uno de OA. Se conservaron a temperatura ambiente, dejando la tapa desenroscada para favorecer la entrada de oxígeno al tubo, hasta que crecieron los aislados. Posteriormente se rellenaron los tubos con aceite estéril mineral conservándolos a temperatura ambiente.
  
- **En viales con agua de grifo y destilada estéril :** Mediante el asa de Kolle en condiciones asépticas se retiraron micelio junto con medio y se introdujo en viales de cristal con agua de grifo y agua destilada estéril. Se usaron estos dos tipos de agua, ya que dependiendo de la cepa fúngica, esta se conserva mejor en una u otra. Los viales quedaron totalmente sellados y se conservaron a temperatura ambiente.
  
- **Mediante liofilización:** En esta técnica se raspó micelio con un bisturí en condiciones asépticas y se depositó en un vial de vidrio con una solución de leche desnatada al 10%. Esta actúa como agente crioprotector. Posteriormente se introdujeron en un liofilizador siguiendo el protocolo que este indicaba y se sellaron al vacío para mantenerse conservados a temperatura ambiente.

#### **4.7 Estudio mediante herramientas moleculares**

Una vez realizada la identificación morfológica preliminar se pasaba al estudio molecular con la finalidad de corroborar la identificación de los especímenes y dilucidar su identificación a nivel de especie de aquellos aislados de interés taxonómico. La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación de diferentes marcadores genéticos: ITS, BenA, rpb2, y CaM.

#### **4.8 Extracción de DNA**

Para la obtención de ADN nuclear, los aislados se cultivaron en placas de PDA durante 7–14 días a 25°C. Posteriormente, se realizó la remoción del micelio aéreo y de las estructuras fértiles mediante el raspado superficial de la colonia utilizando un bisturí estéril. La extracción de DNA se realizó siguiendo un protocolo estándar. Se llevó a cabo haciendo uso de Glass beads sigma y mediante procesos químicos con buffer de lisis (acetato, cloroformo e isopropanol).

#### 4.8.1 Amplificación, Cuantificación de DNA y electroforesis

La amplificación se realizó con distintos *primers* o cebadores, según la región a estudiar dependiendo del género identificado previamente de manera morfológica. Para el estudio de *Talaromyces* y *Penicillium* se utilizaron cebadores para amplificar la secuencia *BenA*. En caso de obtener una especie nueva también se amplificarían los genes *ITS*, *RPb2* y *CaM* (Tablas 3 y 4).

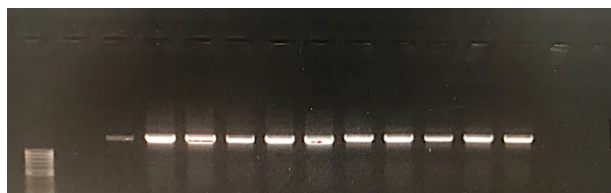
**Tabla 3.** Ciclos de amplificación utilizados para la amplificación y ciclo de PCR en taxonomía fúngica.

Locus	Primer	Dirección	Secuencia primer	Ref.
<i>ITS</i>	ITS1		TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	(41)
	ITS4	Reverse	TCC TGA GGG AAA CTT CG	(66)
<i>BenA</i>	Bt <sub>2</sub> a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	(67)
	Bt <sub>2</sub> b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	(67)
<i>CaM</i>	CMD5	Forward	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	(68)
	CMD6	Reverse	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	(68)
<i>RPB2</i>	5F	Forward	GA(T/C) GA(T/C) (A/C)G(A/T) GAT CA(T/C) TT(T/C) GG	(69)
	7R	Reverse	CCC AT(A/G) GCT TG(T/C) TTR CCC AT	(69)

**Tabla 4** . Ciclos de amplificación utilizados para la amplificación y ciclo de PCR en taxonomía fúngica.

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Elongación final	Período restante
<b>ITS, Ben A, CaM</b>	94 °C, 5 min	35	94 °C, 45s	55 °C, 45 s	72 °C, 60 s	72 °C, 7 min	10 °C, ∞
<b>RPB 2</b>	94 °C, 5 min	35	94 °C, 45 s	52 °C, 45 s	72 °C, 60 s	72 °C, 7 min	10 °C, ∞

Se cuantificó la cantidad de DNA mediante el Nanodrop, un espectrofotómetro de UV visible de espectro completo utilizado para cuantificar y evaluar la pureza del ADN. Esto se hizo antes de realizar la amplificación para ajustar la concentración de ADN obtenido de la extracción a una concentración óptima para la polimerasa de la PCR.



Finalmente se cuantificó el ADN después de la PCR para comprobar la amplificación de la región a secuenciar mediante electroforesis en gel de agarosa al 70% (90V-110') (**Fig.16**).

**Figura 16.** Resultados de PCR mostrados con electroforesis.

Ejemplo de Bandas de electroforesis que demuestran la amplificación después de realizar PCR.

Amplificación de *BenA* de socas de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.

#### 4.8.2 Secuenciación y diagnóstico molecular

Finalmente, los productos de la PCR se enviaron para su purificación y secuenciación en ambas direcciones (*forward* y *reverse*) a Macrogen Corp. España (Madrid), utilizando los mismos pares de cebadores empleados para su amplificación.

#### 4.8.3 Ensamblaje y análisis de secuencias

Las secuencias recibidas sin ruido fueron editadas y ensambladas con el programa SeqMan, para posteriormente ser analizadas con el algoritmo BLAST, en GeneBank.

BLAST es una herramienta bioinformática capaz de identificar porcentajes de similitud entre dos o más secuencias. Si el porcentaje de similitud con la secuencia más próxima es inferior a 98%, se considera que la muestra pertenece a una especie potencialmente nueva. Las especies analizadas se muestran en la (Tabla 5).

Especie	FMR	Activación	T(°C)	Sección	BenA	BLAST
<i>P.mexicanum</i>	18203	Ácido acético	25	<i>Paradoxa</i>	KJ775178.1	98,25%
<i>P.mexicanum</i>	18208	Ácido acético	25	<i>Paradoxa</i>	KJ775178.1	98,38%
<i>P.mexicanum</i>	18211	Ácido acético	15	<i>Paradoxa</i>	KJ775178.1	98,25%
<i>P.crustosum</i>	18212	Directo	25	<i>Citrina</i>	KJ410745.1	98,80%
<i>P.crustosum</i>	18213	Ácido acético	25	<i>Citrina</i>	MK682847.1	98,37%
<i>P.crustosum</i>	18225	Fenol	25	<i>Citrina</i>	MK682847.1	98,38%
<i>P.Roqueforti</i>	18204	Ácido acético	25	<i>Roqueforti</i>	KF225087.1	96,83%
<i>P.Roqueforti</i>	18209	Ácido acético	25	<i>Roqueforti</i>	KM503650.1	96,67%
<i>T.muroii</i>	18229	Etanol	25	<i>Talaromyces</i>	JQ965105.1	98,08%
<i>T.liani</i>	18207	Ácido acético	25	<i>Talaromyces</i>	MH792909.1	100%
<i>T.wortmannii</i>	18205	Fenol	25	<i>Islandici</i>	KF196853.1	100%
<i>T.wortmannii</i>	18206	Fenol	25	<i>Islandici</i>	KF984648.1	100%
<i>T.wortmannii</i>	18227	Ácido acético	15	<i>Islandici</i>	KF984648.1	100%
<i>T.wortmannii</i>	18228	Ácido acético	15	<i>Islandici</i>	KF984648.1	99,48%

**Tabla 5:** Aislados de *Penicillium* y *Talaromyces* incluidos en este trabajo de fin de grado y números de acceso a diferentes secuencias depositadas en GeneBank.

#### 4.8.4 Alineamiento de secuencias

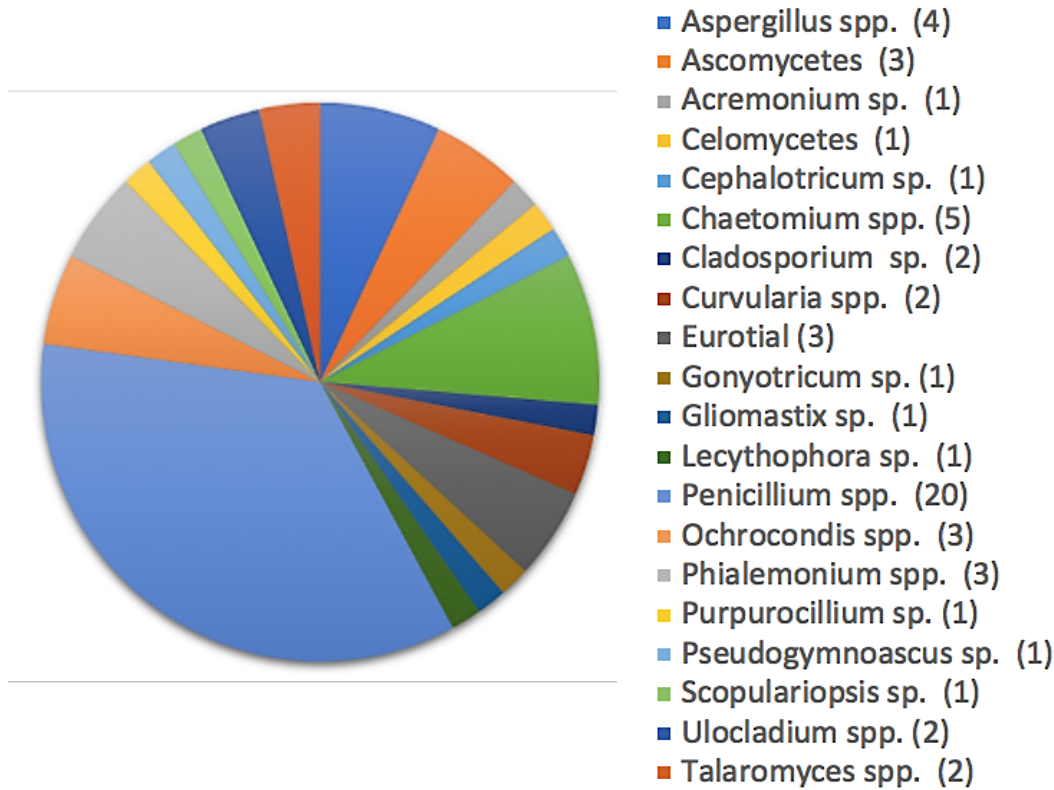
Las secuencias pertenecientes a una especie potencialmente nueva fueron alineadas, mediante el algoritmo *ClustalW*, con las secuencias de las cepas de la sección a la cual pertenecía la especie tipo más cercana filogenéticamente.

#### 4.8.5 Análisis filogenético

Una vez realizado el alineamiento de las secuencias, con el programa Mega 7.0, se utilizaron distintos modelos algorítmicos tales como K2+G o K2 recomendados por el mismo programa para el análisis de las secuencias *BenA* de *Penicillium*. Posteriormente se utilizaron diferentes métodos: *Neighbor-Joining* (NJ) y *Máximo Likelihood* (ML) para realizar el análisis de todas las secuencias de la sección y así construir un árbol filogenético. En este paso se confirma si una especie es nueva. En caso positivo, finalmente se realizan amplificaciones de otros genes y siembras en medios concretos para completar la descripción de la nueva especie (Tabla 4).

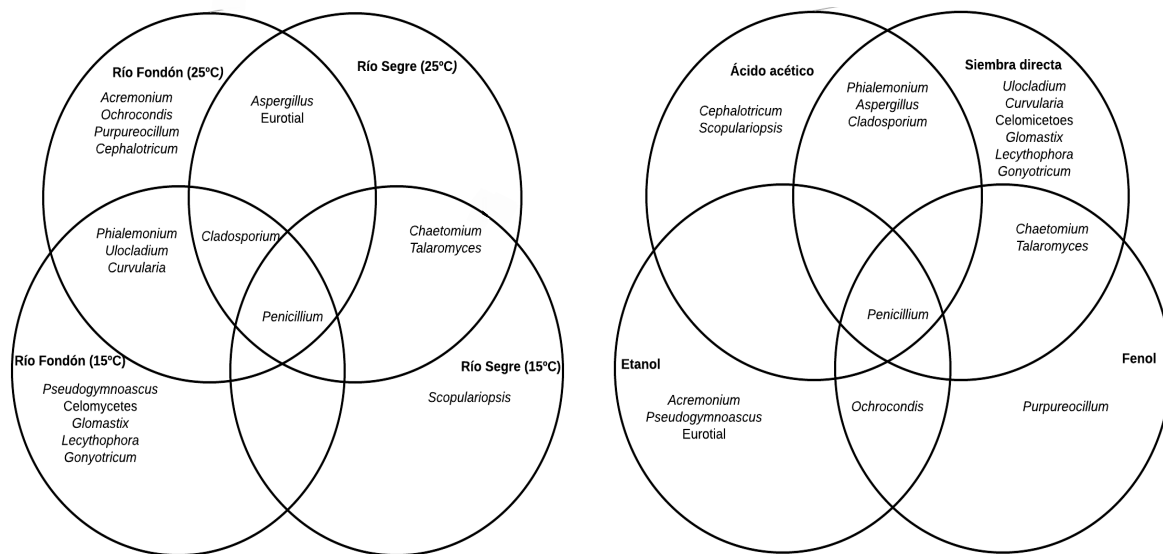
## 5. Resultados

En este trabajo, se aislaron en cultivo puro, un total de 150 cepas de hongos filamentosos. De estos, 57 produjeron algún tipo de esporulación en cultivo por lo que pudieron ser identificados morfológicamente a nivel de género o de orden. Se pudieron identificar un total de 18 géneros diferentes (**Fig. 17**).



**Figura 17.** Diversidad fúngica encontrada identificada a nivel genérico y teniendo en cuenta únicamente sus características morfológicas.

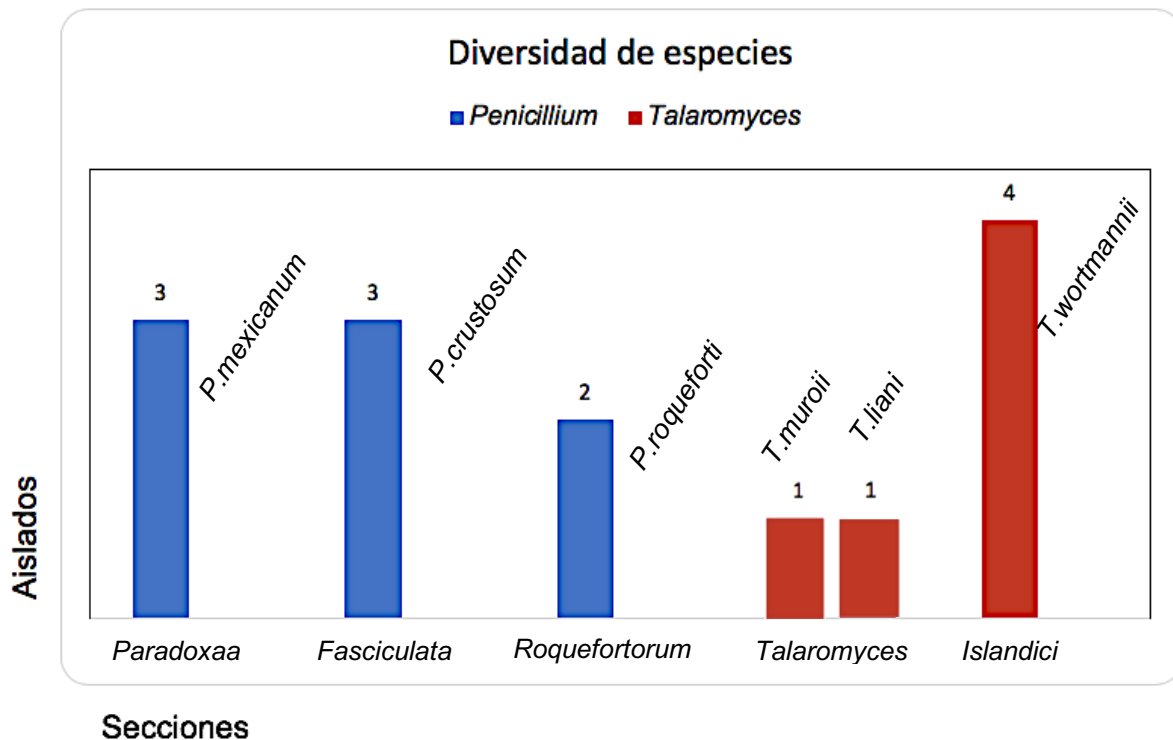
El género *Penicillium* fue el predominante en el conjunto de las muestras (n=20), seguido por *Chaetomium*, *Aspergillus* y *Talaromyces* (ver más adelante re-identificación molecular de los aislados tipo penicilia). Pero *Penicillium* es además el hongo que estuvo presente en todas las muestras (**Fig. 18**), que pudo ser recuperado a las dos temperaturas ensayadas y fue recuperado con los tres métodos de activación de esporas. Por otra parte es interesante resaltar que los géneros anamorfos, que la siembra directa en superficie permitió recuperar una mayor diversidad de géneros anamórficos y que estos se aislaron principalmente del río Fondón. Sin embargo los hongos que desarrollan su fase sexual en cultivo como *Chaetomium*, *Pseudogymnoascus* y *Talaromyces* fueron recuperados principalmente aplicando métodos químicos de activación de esporas como fenol y etanol.



**Figura 18.** Distribución de los géneros identificados en las diferentes muestras en relación con la temperatura de incubación (A) y con las técnicas de activación de esporas (B).

Debido a la poca variabilidad morfológica que existe en las especies con morfología tipo penicillia ya que estos caracteres son comunes a otros géneros próximos (*Penicillago*, *Pseudopenicillium*, y *Talaromyces*) se decidió abordar este grupo en profundidad para realizar una identificación a nivel de especie utilizando la secuenciación del marcador *BenA*.

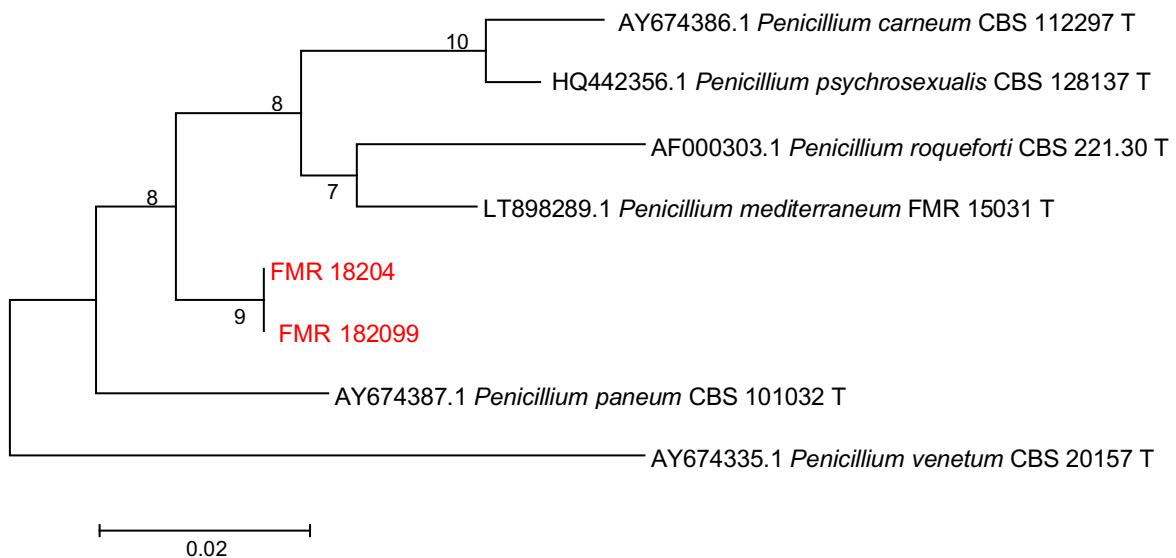
De las secuencias obtenidas solo 15 llegaron en condiciones aceptables para avanzar en el trabajo con ellas, errores ajenos a nuestra manipulación o trabajo en el laboratorio hicieron que 5 fueran descartadas. Las secuencias óptimas fueron ensambladas e introducidas en la herramienta BLAST. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19. De los 15 aislados identificados como *Penicillium-like* se pudo comprobar que 8 de ellos pertenecían efectivamente al género *Penicillium* pero el resto fueron relacionados con especies del género *Talaromyces*. Se pudieron identificar con certeza, es decir, los porcentajes de identidad con la especie más cercana era mayor igual al 98%, 6 aislados de *Penicillium* correspondientes a las Secciones *Paradoxa* (*P. mexicanum*, n=3) y *Fasciculata* (*P. crustosum*) y 6 aislados de *Talaromyces* distribuidos en las Secciones *Talaromyces* (*T. lani* y *T. murorii* con un aislado cada una) y *Islandici* (*T. wortmannii*). Sin embargo dos cepas (FMR 18204 y FMR 18209) relacionadas con la Sección *Roquefortorum* no pudieron ser identificadas con seguridad, pues la especie más cercana, *P. roqueforti*, presenta un porcentaje de identidad por debajo del punto de corte establecido para este marcador en este género (98% de identidad) (ver Tabla 6).



**Figura 19.** Identificación molecular de los aislados *Penicillium* –like basados en la comparación de secuencias del gen *BenA* en la herramienta Blast (Standard Nucleotide BLAST, [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) )

### 5.1 *Penicillium* Sección *Roquefortorum*

Para determinar con mayor certeza la relación de los aislados FMR 18204 y FMR 18209 con las especies actualmente aceptadas de la Sección *Roquefortorum* se realizó un análisis filogenético preliminar basado en las secuencias *BenA* de todas las especies hasta la fecha aceptadas en esta sección, incluyendo únicamente las especies tipo de cada uno de ellas y utilizando la cepa tipo de *P. venetum* (Sección *Fasciculata*) como *out group* (la raíz del árbol filogenético). El árbol se construyó usando el método Neighbour-Joining, analizaron un total de 8 secuencias de 525 pares de bases en cada una de ellas (**Fig. 20**).



**Figura 20.** Árbol filogenético de la Sección *Roquefortorum* del género *Penicillium* utilizando el método Neighbour-Joining. El árbol fue construido a partir de las secuencias del gen *BenA*. Los números que soportan las ramas representan los valores de bootstrap >70%. El árbol ha sido enraizado utilizando *P. venetum* (Sección *Fasciculata*). T: cepa tipo.

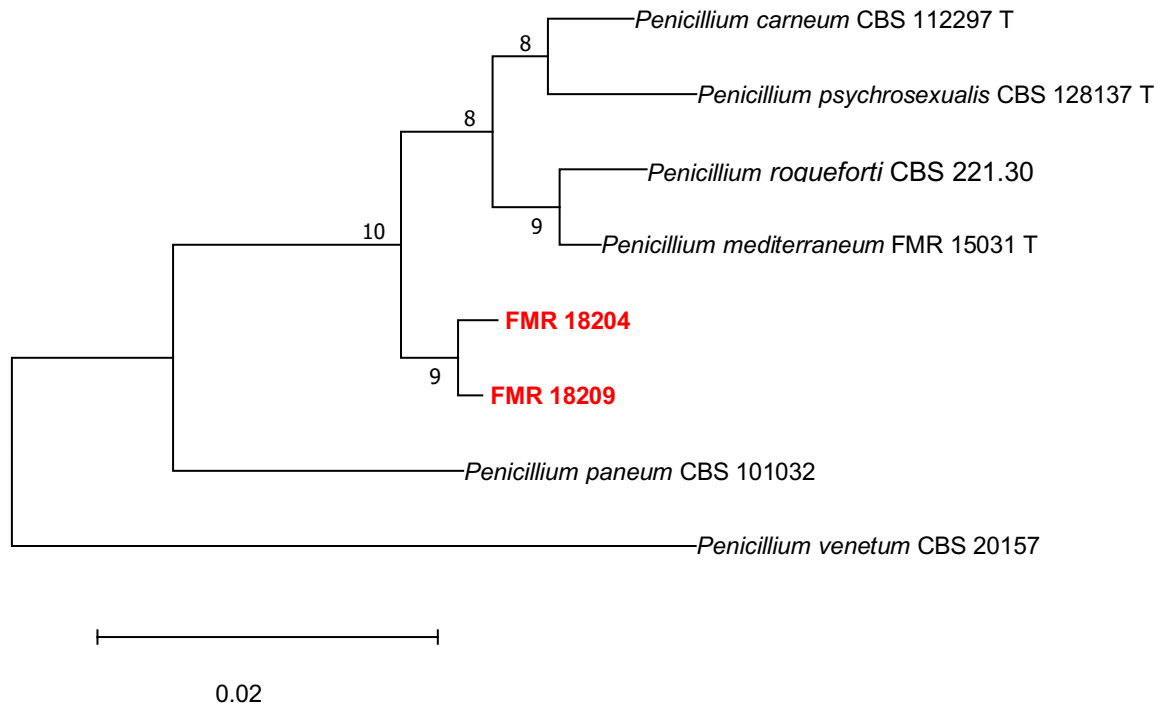
Como se observa en la Figura 20 las cepas FMR 18204 y FMR 18209 procedentes de sedimentos de la desembocadura del río Fondón forman una rama independiente, distante filogenéticamente de las especies previamente descritas para la Sección *Roquefortorum*: *P. carneum*, *P. mediterraneum*, *P. paneum*, *P. psychrosexualis* y *P. roqueforti*. Esta información refuerza la obtenida a través del Blast, confirmando de que posiblemente estas dos cepas representen un nuevo taxón para el género *Penicillium*, por lo que decidimos continuar con el estudio. Para ello se secuenciaron los marcadores recomendados para el género *CaM*, *RPB2*, además del *barcode* primario para los hongos, los ITS.

Con el objetivo de obtener una mayor robustez en el análisis filogenético, se realizó el alineamiento concatenado utilizando la combinación de todos los genes secuenciados. Para la evaluación de la concordancia filogenética entre ellos, se realizaron árboles independientes (datos no mostrados) y se realizó una comparación visual de la topología de los clados basales y terminales que presentaban soporte estadístico significativo en las filogenias de cada gen por separado y en el análisis concatenado (70).

La **Figura 21** muestra el árbol filogenético construido utilizando el método *Maximum-likelihood* (ML) con el algoritmo Kimura 2+ Gamma *distribution*, con 1000 réplicas bootstrap y *cutoff* del 95%. El análisis incluyó 2583 pb (ITS, 602 pb; *benA*, 525; *CaM*, 522 y *rpb2*, 934).

El nuevo análisis demuestra que nuestras cepas pertenecen a la Sección *Roquefortorum* (100% bs) pero que forman una rama independiente al grupo que comprende la mayor parte de las especies del género. *Penicillium paneum* actualmente aceptado dentro de la Sección no aparece dentro del agrupamiento principal y forma una rama basal respecto al resto de las

especies de la Sección. En consecuencia se confirma que estamos ante una nueva especie, perteneciente a Sección *Roquefortorum*, filogenéticamente próxima a la especie *P. roqueforti*, tipo de la Sección, y a la recientemente descrita *P. mediterraneum*.



**Figura 21.** Árbol ML Sección *Roquefortorum* combinado de: ITS, *BenA*, *CaM*, *RPB2*. El tamaño de las ramas es proporcional a la distancia genética. Se muestran los soportes de bootstrap >70%. *Penicillium venetum* (Sección *Fasciculata*). se ha utilizado como *outgrup*. **T**: cepa tipo.

## 5.2 Taxonomía

### ***Penicillium gallaecium* sp. nov.**

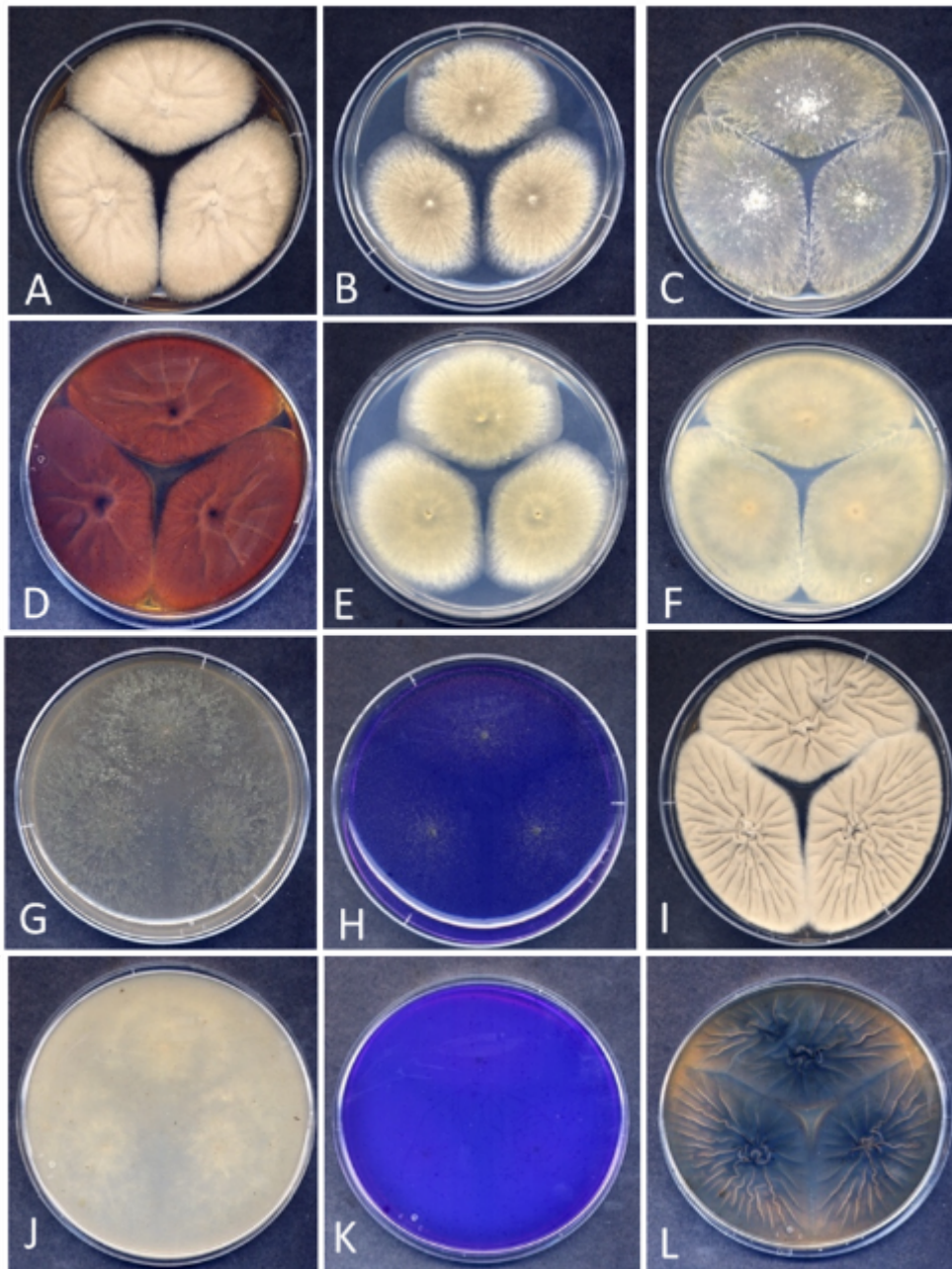
**Etimología** El nombre se refiere al sitio de donde proceden las muestras, Galicia (L.: Gallaecia), España.

**Tipo:** España, Galicia, Vigo. Ruta de los Molinos del Río Fondón: Chapela – Vigo (42.2675045, -8.6704811). Sedimentos, Enero 05, 2020. J.L. del Palacio Jr & J.L. del Palacio. Holotipo FMR = 18294).

**Material adicional examinado:** España, Galicia, Vigo. Ruta de los Molinos del Río Fondón: Chapela – Vigo (42.2675045, -8.6704811). Sedimentos, Enero 05, 2020. J.L. del Palacio Jr. & J.L. del Palacio (FMR 18209).

*Diámetro de las colonias (7 días a 25°C):* **CYA:** 65 – 68 mm. **MEA:** 63 – 65 mm. **YES:** 69 – 71 mm. **OA:** 70 mm diámetro. **DG18:** 50 – 52 mm de diámetro. **CREA:** 68 – 70 mm de diámetro.

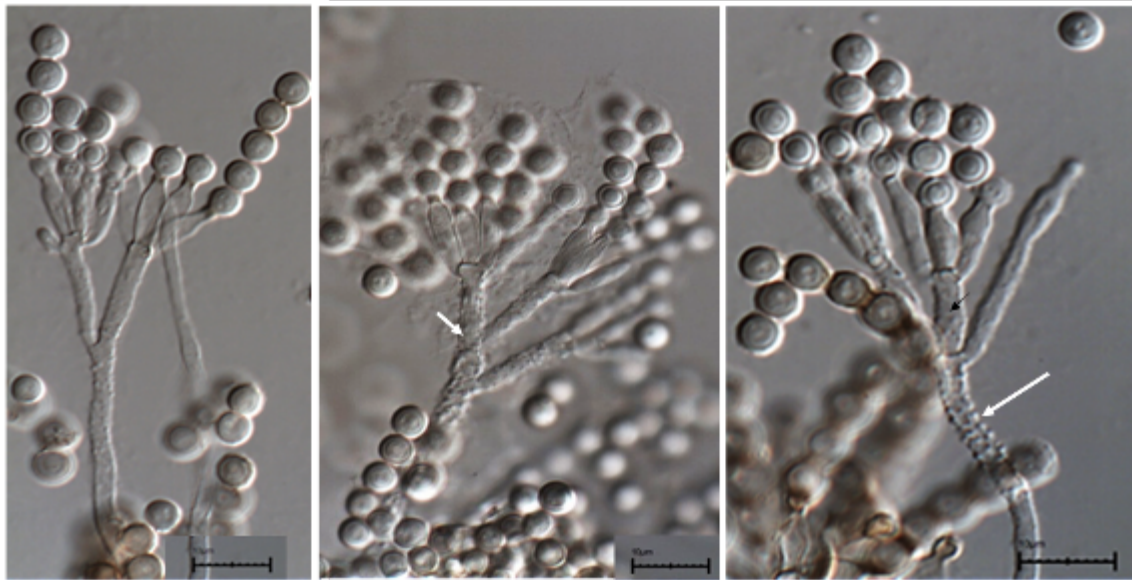
*Características de las colonias (7 días 25 °C) (Fig. 21):* **CYA**, colonias aplanadas, radialmente surcadas, aterciopeladas, crema claro (6D4) a marrón (6F6) hacia la periferia, márgenes regulares, abundante esporulación; reverso marrón oscuro (8F5). **MEA**, colonias ligeramente elevadas, aterciopeladas, verde grisáceas (28E4) a verde opaco (27E3) hacia la periferia, márgenes regulares, abundante esporulación; reverso oliva (2E4), pigmento difusible ausente. **YES**, colonias ligeramente elevadas en el centro, radialmente surcadas, aterciopeladas, de parduzcas (6C3) a verde grisáceas (25C6) y blancas (1A1) hacia la periferia, márgenes regulares, abundantes esporulación; reverso verde oscuro (30F4), pigmento difusible ausente. **OA**, colonias aplanadas, ligeramente granuladas, verdes grisáceas (28E5), márgenes irregulares, abundante esporulación; reverso marrón grisáceo (5D3), pigmento difusible ausente. **DG18** colonias aplanadas, granulares, de color marrón amarillento (5EG) en el centro, a marrón oliva (4D5) y blanco (1A1) hacia la periferia, márgenes regulares, abundante esporulación; reverso, color verde grisáceo (30E6) en el centro y verde pastel (30A4) y blanco (1A1) hacia la periferia, pigmento difusible ausente. **CREA**, colonias aplanadas, flocosas, verdes amarillentas (30A7) a blancas (1A1) hacia la periferia, márgenes irregulares, abundante esporulación; reverso gris oscuro (1F1), pigmento difusible ausente, sin producción de ácido (**Fig.22**).



**Figura 22.** Crecimiento característico de *P. gallaecium* FMR 18294 en diferentes medios medios (anverso/reverso). **A/D** CYA. **B/E.** DG18. **C/F.** MEA. **G/J.** OA. **H/K.** CREA. **I/L** YES.

*Micromorfología:* micelio superficial e inmerso, compuesto de hifas septadas hialinas de paredes lisas de 2–3.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Conidióforos tuberculados, principalmente biverticilados a tertverticilados; estipes tuberculadas; métula verruculosa, hasta 4 por estípote, divergente, 9–19 x 2.5–4  $\mu\text{m}$ ; fiálides 3–4 por métula, ampuliformes, 7–14 x 2–6  $\mu\text{m}$  que producen conidios en cadena. Conidios de paredes lisas a finamente asperuladas, globosos a subglobosos, algunos ampliamente elipsoidales, 5–6.5 x 4–5.5  $\mu\text{m}$  (**Fig.23**).

Temperaturas cardinales en CYA (7 días): Temperatura mínima: No determinada, crecimiento a 15 °C positivo (55 mm diámetro), Temperatura óptima 25 °C, Temperatura máxima 35 °C. No hubo crecimiento a 37 °C.



**Figura 23:** Micromorfología *P. gallaecium* FMR 18294. Las flechas blancas señalan la típica ornamentación tuberculada de las paredes de la estípe y en negro se señalan las paredes verrucosas de las métulas.

## 6. Discusión

Los sedimentos fluviales contienen una gran variedad de especies que intervienen activamente en el mantenimiento del equilibrio de estos ecosistemas. Una recopilación de los reportes globales sobre la microbiota asociada a este ecosistema cifraba el número especies descritas en sedimentos fluviales en más de 175 000, de ellas, más de 600 correspondían a especies fúngicas identificadas en este hábitat (71).

En los ecosistemas de agua fluviales las especies de hongos más comunes suelen ser *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Ulocladium* (72),(73), Nuestros resultados están en concordancia con estos reportes correspondientes a diferentes latitudes. Un estudio sistemático de los sedimentos de los humedales a lo largo del río Yangtsé encontraron similares resultados, donde los hongos predominantes en todas las muestras fueron: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, y *Trichoderma* (74) de forma menos frecuente al igual que en nuestro estudio reportan *Gliocladium*, *Ramichloridium*, entre otros. Otro estudio sistemático esta vez a lo largo de la cuenca del río Songhua (noreste de Asia), donde se analizan 147 muestras demuestra que los afluentes tienen una mayor diversidad fúngica que en la corriente principal, y una mayor concentración de hongos

cultivable (74) Esto nos ha parecido muy interesante como línea a seguir en futuros trabajos. En este trabajo encuentran igualmente una predominancia de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en la cuenca principal.

El género *Chaetomium* fue uno de los teleomorfos más recuperados en cultivo (n=5). Estas especies son conocidas por su capacidad para degradar la celulosa y son frecuentes en suelo, sobre material vegetal y en heces de animales herbívoros. El género ha sido reportado por Liu et al. (2016) a partir de muestras de afluentes, aunque ha sido poco reportado en la literatura consultada. Dos especies de este género fueron reportadas en España a partir de sedimentos del río Tera: *Chaetomium globosum* y *Chaetomium gracile* (Rodríguez 2002) sin embargo la identidad de nuestros aislados no pudo ser confirmada, aunque sí podemos asegurar que cada uno de ellos representa una especie, pues sus características morfológicas son bien distintivas.

Debido al poco número de muestras no podemos tener un resultado concluyente sobre si existe algún tipo de correlación entre los puntos de muestro y la diversidad encontrada, ni si existe diferencias entre los ríos muestreados. Aunque parecería que el río Fondón tiene una mayor diversidad de géneros encontrados esto pudiera deberse a que las muestras del Segre llevaban algún tiempo almacenadas en la nevera y parte de los propágulos fúngicos pudieran haberse deteriorado. Que en nuestras muestras los ascomicetes de reproducción sexual se hayan obtenido a partir de muestras donde se realizó la activación química de ascosporas coincide con numerosos trabajos previos del grupo de trabajo recopilados en las tesis doctorales de Stchigel (2000), Rodríguez (2002), García (2005) y Marin-Felix (2015).

Destacar que por falta de tiempo no pudimos llegar a identificar todos los hongos recuperados en cultivo, ni a secuenciar todas las especies morfológicamente interesantes, pero que en general nuestro trabajo ha permitido incorporar nuevos datos sobre la diversidad fúngica en los sedimentos fluviales.

Los géneros *Penicillium* y *Talaromyces* son capaces de colonizar hábitats muy diversos. Estos géneros tienen un gran impacto económico para el hombre y por ello han sido muy estudiados a lo largo de la historia. Estos estudios se hicieron populares con el descubrimiento de los antibióticos y se mostró un gran interés por el género *Penicillium*, que permitía la obtención de dichos compuestos a partir de aislamientos del suelo (75).

En los últimos años, y gracias a la estandarización de la metodología para la caracterización fúngica, se han descrito un gran número de taxones a partir de aislados de origen ambiental (76),(77),(75),(78) y debido a su ubicuidad estos géneros han sido los que mayor diversidad ha sido evidenciada dentro del Phylum Ascomycota. Por esta razón, algunos estiman que si se consideran la gran cantidad de hábitats no explorados, tan sólo el género *Penicillium* podría llegar a incluir hasta 1000 especies, conociéndose actualmente menos de la mitad de estas (78).

Los aislados tipo penicilia fueron los que se aislaron con mayor frecuencia en los sedimentos estudiados y las herramientas moleculares nos permitieron identificarlos como integrantes de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*. Comparando estos resultados con estudios realizados previamente en este grupo de investigación sobre aislamiento de hongos de origen ambiental, incluso concretamente de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.(79) se puede afirmar que existe una gran diversidad de especies de estos géneros distribuidas por una infinidad de ambientes alrededor de la península. Teniendo en cuenta el planteamiento inicial de que los ríos son un gran reservorio para la microbiota ambiental, y comparando este estudio con otro estudio de sedimentos fluviales obtenidos de un río con características distintas Al río Fondón (80), el río Tinto en Huelva, Andalucía, se puede ver que se identifican especies fúngicas muy distintas. Este río se caracteriza por tener una mayor acidez y localizarse en un clima árido muy diferente al de Vigo o Lérida. En estos estudios se aislaron otros tipos de hongos, encontrándose un 44% de hongos filamentosos y de estos sólo un 20% del género *Penicillium* (58). Esta diversidad puede ser debida a que la diversidad microbiológica en ríos está determinada por diversos factores, como la temperatura, el pH, las sustancias disueltas que puedan haber en estas como amonios o nitratos, las bacterias fecales presentes o la contaminación (81).

En este trabajo también se pudo describir un nuevo taxón perteneciente a la Sección *Roquefortorum*, una sección con un número reducido de especies descritas y de la cual recientemente se describió un nuevo taxón en el mismo grupo de investigación (24). *Penicillium mediterraneum* y *P. roqueforti* son las especies filogenéticamente más cercanas *P. gallaecium*, todas ellas presentan conidióforos con pared rugosa, pero, pero pueden diferenciarse a partir las características de crecimiento en medio YES y CYA. Mientras que *P. roqueforti* presenta un reverso oscuro negruzco-verdoso en YES, en *P. mediterraneum* el reverso es verde-grisáceo (82),(33) y en *P. gallaecium* tiene una coloración verde oscuro muy característica. Por otra parte el crecimiento en CYA de *P. roqueforti* es más restrictivo (3–15mm de diámetro – 7 días ) comparado con *P. mediterraneum* (24–27mm – 7 días) similar a *P. gallaecium*, sin embargo esta últimas pueden diferenciarse por la ausencia de producción de ácido. Otras características distintivas entre estas especies sería la presencia de métulas y fiálides más robustas en *P. gallaecium* (métulas: 9–19 x 2–4 µm vs 10–14 x 2–3 µm; fiálides: 7–14 x 2–6 µm vs 10–13 x 2–3 µm).

## 7. Conclusiones

Los géneros más frecuentes en las muestras de sedimentos estudiadas fueron *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cephalotrium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Gonyotricum*, *Gliomastix*, *Lecythophora*, *Penicillium*, *Ochrocondis*, *Phialemonium*, *Purporucillium*, *Pseudogymnoascus*, *Scopulariopsis*, *Ulocladius*, y *Talaromyces*.

Las técnicas de activación de esporas nos permitieron recuperar en cultivo ascomicetes con fase sexual de los géneros: *Chaetomium*, *Pseudogymnoascus* y *Talaromyces*.

Se describe e ilustra la nueva especie *Penicillium gallaecium* aislada de sedimentos del río Fondón y perteneciente a la Sección *Roquefortorum*.

## 8. Autoevaluación

La estancia durante los meses de enero, febrero y marzo en la Unidad de Micología y Microbiología de La Universidad Rovira i Virgili, ha superado mis expectativas con creces. Casi tres meses de trabajo en este grupo de investigación me han permitido adquirir una formación necesaria para finalizar el grado y he podido adentrarme en el mundo de laboral y conocer como funciona un grupo de investigación.

Considero que he mejorado en muchos aspectos. He ampliado mi conocimiento en ciencia, he podido poner en práctica muchas técnicas estudiadas durante años y he mejorado mis habilidades en el laboratorio.

Gracias a estas prácticas he aprendido a desenvolverme de manera independiente con fluidez en el laboratorio. También he conocido como funciona el trabajo en equipo en un grupo de investigación y como se organiza para cumplir unos objetivos comunes.

Haber sido supervisado, participar en diferentes proyectos y conocer nuevas experiencias ha cambiado mi opinión sobre la posibilidad de realizar un doctorado positivamente, un hecho que antes veía más lejano.

En definitiva, tengo una valoración muy positiva de las prácticas, he sido aceptado en todo momento y ayudado siempre que lo he necesitado.

Estoy muy agradecido con todo el grupo. Especialmente con mi tutora, tanto académica como profesional; la Doctora Dania García, por haberme aceptado en su grupo y haberme transmitido, de la mejor manera posible, muchos conocimientos y técnicas del ámbito de la microbiología, así como haber estado pendiente de mi en todo momento y prestándome ayuda en todo lo necesario.

También quiero agradecer al doctorando Daniel Torres García, quien me enseñó en profundidad como funcionaba el laboratorio, me transmitió sus conocimientos microbiológicos, moleculares e informáticos y siempre me ha prestado de su ayuda cuando la he necesitado.

## 9. Bibliografía

1. Cepero de García MC, Restrepo Restrepo S, Franco-Molano AE, Cárdenas Toquica M, Vargas Estupiñán N. Biología de hongos. Universidad de los Andes. 2012.
2. Calizaya C, Salazar Torres G, Silva Aburto J. Evaluación de hongos ambientales en mercados de abastos de la ciudad de Tacna – Perú. Rev Mex Micol. 2010;
3. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;
4. Seifert KA, Samuels GJ. How should we look at anamorphs? Stud Mycol. 2000;
5. Bonifaz A. Procedimientos y técnicas de diagnóstico. In: Micología médica básica. 2012.
6. Hoff B, Pöggeler S, Kück U. Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. Eukaryot Cell. 2008;
7. Bull JJ. Evolution of sex determining mechanisms. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA. 1983.
8. Noble LM, Andrianopoulos A. Reproductive competence: A recurrent logic module in eukaryotic development. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2013.
9. Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. In: Studies in Mycology. 2004.
10. Réblová M, Seifert KA. Discovery of the teleomorph of the hyphomycete, *Sterigmatobotrys macrocarpa*, and epitypification of the genus to holomorphic status. Stud Mycol. 2011;
11. Réblová M, Gams W, Seifert A. *Monilochaetes* and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. Stud Mycol. 2011;
12. Réblová M, Seifert KA. A new fungal genus, *Teracosphaeria*, with a phialophora-like anamorph (Sordariomycetes, Ascomycota). Mycol Res. 2007;
13. McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworths DL, et al. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Regnum Veg. 2012;
14. Phylogenetic and taxonomic studies on the genera *Penicillium* and *Talaromyces*. Stud Mycol. 2011;
15. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;
16. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol. 2014;
17. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia. 2008;
18. Peterson SW, Jurjevic Z, Bills GF, Stchigel AM, Guarro J, Vega FE. Genus *hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. Mycologia. 2010;

19. Peterson SW, Jurjević Z. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* clade 2a. *PLoS One*. 2013;
20. Kendrick B. *Fungi and the History of Mycology*. In: eLS. 2001.
21. Brandt ME, Warnock DW. *Taxonomy and Classification of Fungi*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. 2015.
22. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al. A higher level classification of all living organisms. *PLoS One*. 2015;
23. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev I V., Martin F, Stajich JE, Blackwell M. *The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies*. *Microbiol Spectr*. 2017;
24. Wijayawardene NN, Hyde KD, Rajeshkumar KC, Hawksworth DL, Madrid H, Kirk PM, et al. Notes for genera: Ascomycota. *Fungal Divers*. 2017;
25. Vidrih R, Hribar J. Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. In: *Traditional Foods*. 2016.
26. Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol*. 2011;
27. Samson R a., Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. *Food and Indoor Fungi*. In: *CBS Laboratory Manual Series*. 2010.
28. Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*. 2014;
29. Geiser D.M., LoBuglio K.F. GC. *Pezizomycotina: Eurotiomycetes*. In: McLaughlin D., Spatafora J. (eds) *Systematics and Evolution. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*. vol 7B. D. SJ (eds), editor. Springer, Berlin, Heidelberg;
30. Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, et al. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud Mycol [Internet]*. 2016;85:199–213. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061616300203>
31. Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol*. 2014;
32. Guarro J, Gené J, Stchigel AM FM. *Atlas of soil Ascomycetas*. Utrecht, Holanda: CBS-KNAW; 2012.
33. Guevara-Suarez M, García D, Cano-Lira JF, Guarro J, Gené J. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in *Aspergillaceae* . *Fungal Syst Evol*. 2019;
34. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*. 2011;
35. Barreiro C, García-Estrada C. Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: Unveiling the secrets behind penicillin production. *J Proteomics*. 2019;
36. Banani H, Marcet-Houben M, Ballester AR, Abbruscato P, González-Candelas L, Gabaldón T, et al. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics*. 2016;
37. Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically

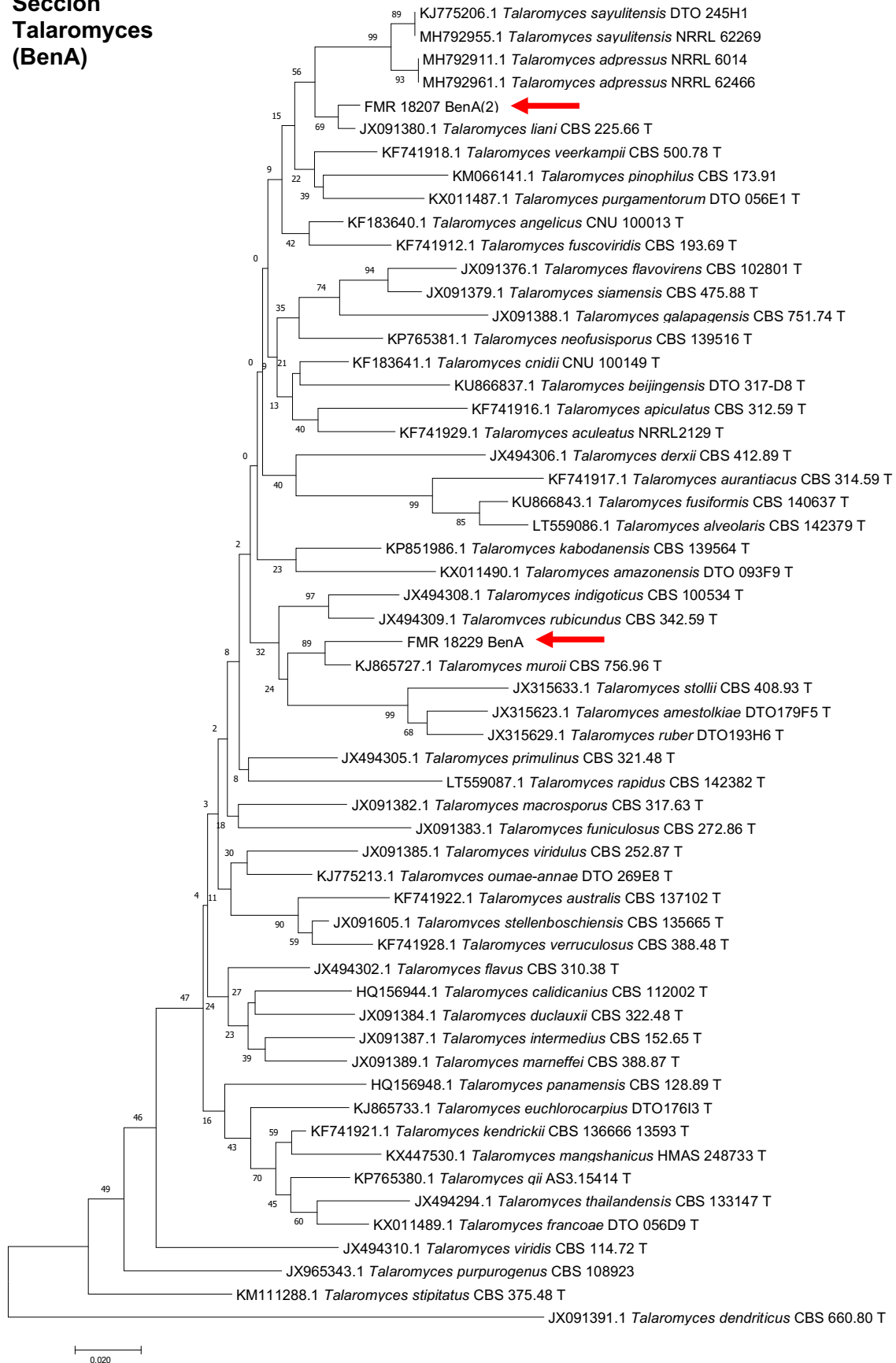
- important aspergillus and penicillium species. In: *Advances in Applied Microbiology*. 2014.
38. Magistà D, Ferrara M, Del Nobile MA, Gammariello D, Conte A, Perrone G. *Penicillium salamii* strain ITEM 15302: A new promising fungal starter for salami production. *Int J Food Microbiol*. 2016;
  39. Dombrink-Kurtzman MA, Blackburn JA. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*. 2005;
  40. Raper, K.B.; Thom C. *A manual of the Penicillia*. Williams & Wilkins, Baltimore; 1949. 878 p.
  41. Li Y, Cui F, Liu Z, Xu Y, Zhao H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol*. 2007;
  42. Terrasan CRF, Temer B, Duarte MCT, Carmona EC. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresour Technol*. 2010;
  43. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. Fungi and Food Spoilage. 2009.
  44. Dijksterhuis J, Nijssse J, Hoekstra FA, Golovina EA. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Eukaryot Cell*. 2007;
  45. Yilmaz N, Houbraken J, Hoekstra ES, Frisvad JC, Visagie CM, Samson RA. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2012;
  46. URAGUCHI K. Isolation of two toxic agents, luteoskyrin and chlorine-containing peptide, from the metabolites of *Penicillium islandicum* Sopp, with some properties thereof. *Jpn J Exp Med*. 1961;
  47. Uraguchi K, Saito M, Noguchi Y, Takahashi K, Enomoto M, Tatsuno T. Chronic toxicity and carcinogenicity in mice of the purified mycotoxins, luteoskyrin and cyclochlorotine. *Food Cosmet Toxicol*. 1972;
  48. URAGUCHI K. Hepatoma and so-called carcinogens, with special reference to the toxicity of luteoskyrin in a small dose. *olia Pharmacol Jpn* 58 19.
  49. Ueno Y, Ishikawa I. Production of luteoskyrin, a hepatotoxic pigment, by *Penicillium islandicum* Sopp. *Appl Microbiol*. 1969;
  50. Bouhet JC, Van Chuong PP, Toma F, Kirszenbaum M, Fromageot P. Isolation and Characterization of Luteoskyrin and Rugulosin, Two Hepatotoxic Anthraquinonoids from *Penicillium islandicum* Sopp. and *Penicillium rugulosum* Thom. *J Agric Food Chem*. 1976;
  51. Stark AA, Townsend JM, Wogan GN, Demain AL, Manmade A, Ghosh AC. Mutagenicity and antibacterial activity of mycotoxins produced by *Penicillium islandicum* Sopp and *Penicillium rugulosum*. *J Environ Pathol Toxicol*. 1978;
  52. Marois JJ, Fravel DR, Papavizas GC. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biol Biochem*. 1984;
  53. Punja ZK. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects. *Can J Plant Pathol*. 2001;
  54. Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, Woo SL, Lorito M, Kubicek CP, et al. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl Environ Microbiol*. 2005;

55. Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. 2006.
56. Lyratzopoulos G, Ellis M, Nerringer R, Denning DW. Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffeii*. *J Infect*. 2002;
57. Atlas of clinical fungi (2nd edn). G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras. *Int Microbiol - Off J Spanish Soc Microbiol*. 2001;
58. Chowdhary A, Kathuria S, Agarwal K, Sachdeva N, Singh PK, Jain S, et al. Voriconazole-resistant *Penicillium oxalicum*: An emerging pathogen in immunocompromised hosts. *Open Forum Infect Dis*. 2014;
59. Guevara-Suarez M, Sutton DA, Cano-Lira JF, García D, Martin-Vicente A, Wiederhold N, et al. Identification and antifungal susceptibility of penicillium-like fungi from clinical samples in the United States. *J Clin Microbiol*. 2016;
60. Acuña V, Guasch H, Giorgi A, Izagirre O. Flujo de energía en el ecosistema. *Metabolismo fluvial*. In: *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. 2009.
61. Grossart HP, Van den Wyngaert S, Kagami M, Wurzbacher C, Cunliffe M, Rojas-Jimenez K. Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*. 2019.
62. Truong C, Mujic AB, Healy R, Kuhar F, Furci G, Torres D, et al. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytologist*. 2017.
63. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007;
64. Stchigel AM. Estudio taxonómico de los Ascomycetes del suelo. UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques Unitat de Biologia i Microbiologia. 2000.
65. Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ et al. *Laboratory Manual Series 1*. CBS-KNAW. Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holanda.2009 .;
66. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: *PCR Protocols*. 1990.
67. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;
68. Hong SB, Cho HS, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;
69. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol*. 1999;
70. Wiens JJ. Testing Phylogenetic Methods with Tree Congruence: Phylogenetic Analysis of Polymorphic Morphological Characters in Phrynosomatid Lizards. *Syst Biol*. 1998;
71. Snelgrove PVR, Henry Blackburn T, Hutchings PA, Alongi DM, Frederick Grassle J, Hummel H, et al. The importance of marine sediment biodiversity in ecosystem processes. *Ambio*. 1997;
72. Moubasher AAH, Abdel-Sater MA, Soliman ZSM. Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycol*. 2018;

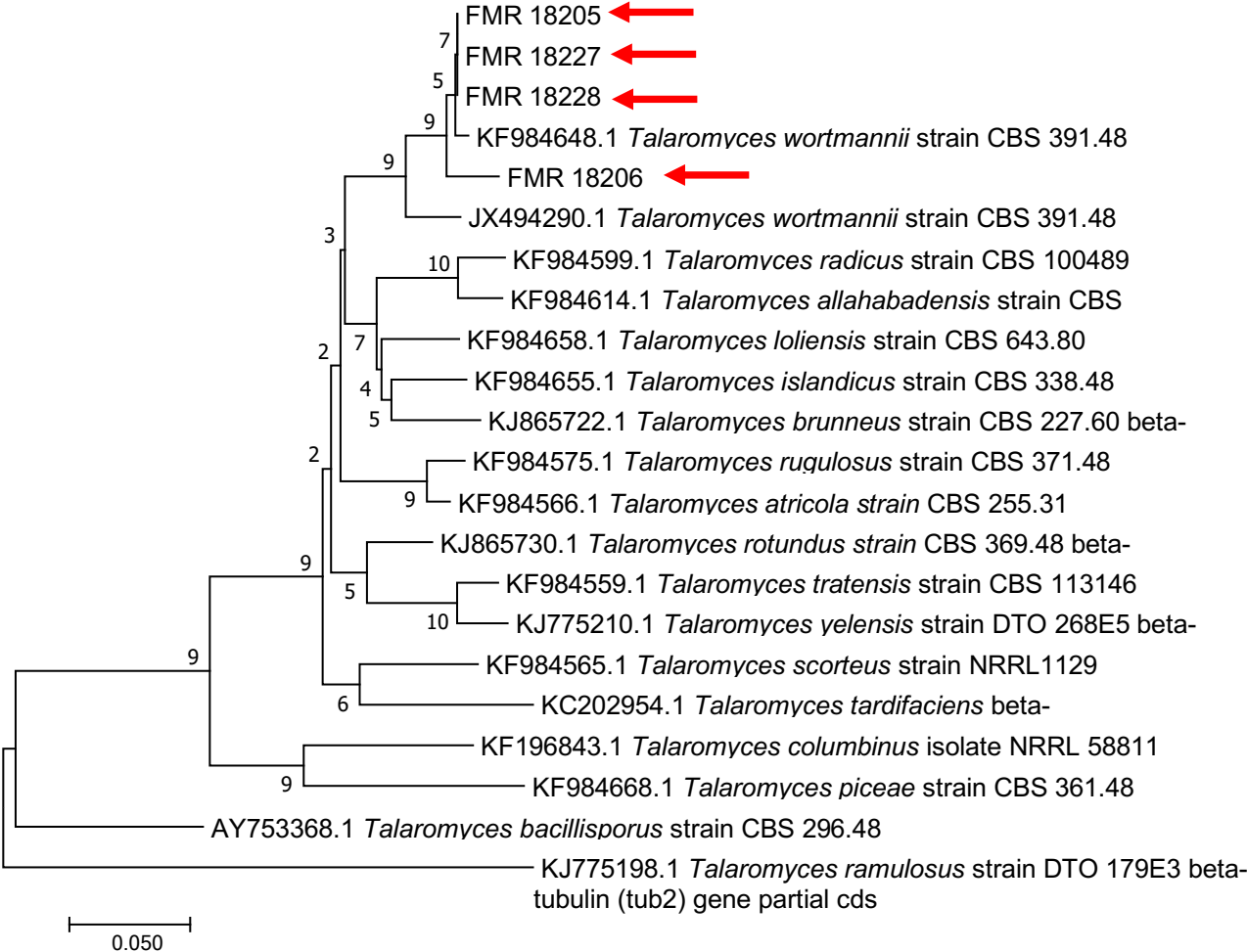
73. Wu B, Tian J, Bai C, Xiang M, Sun J, Liu X. The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. *ISME J.* 2013;
74. Liu J, Wang J, Gao G, Bartlam MG, Wang Y. Distribution and diversity of fungi in freshwater sediments on a river catchment scale. *Front Microbiol.* 2015;
75. Visagie CM, Renaud JB, Burgess KMN, Malloch DW, Clark D, Ketch L, et al. Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi.* 2016;
76. Wang XC, Chen K, Xia YW, Wang L, Zhuang WY. A new species of *Talaromyces* (Trichocomaceae) from the Xisha Islands, Hainan, China. *Phytotaxa.* 2016;
77. Yilmaz N, López-Quintero CA, Vasco-Palacios AM, Frisvad JC, Theelen B, Boekhout T, et al. Four novel *Talaromyces* species isolated from leaf litter from Colombian Amazon rain forests. *Mycol Prog.* 2016;
78. Visagie CM, Seifert KA, Houbraken J, Samson RA, Jacobs K. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus.* 2016;
79. Schneider MI. Tesis Marcela. p. 292.
80. López-Archilla AI, González AE, Terrón MC, Amils R. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Can J Microbiol.* 2004;
81. Ulfing K, Guarro J, Cano J, Gené J, Vidal P, Figueras M., et al. The occurrence of keratinolytic fungi in sediments of the river Tordera (Spain). *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;
82. Frisvad J. S. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Samson R a., editor. 2004.

## 10. Anexos

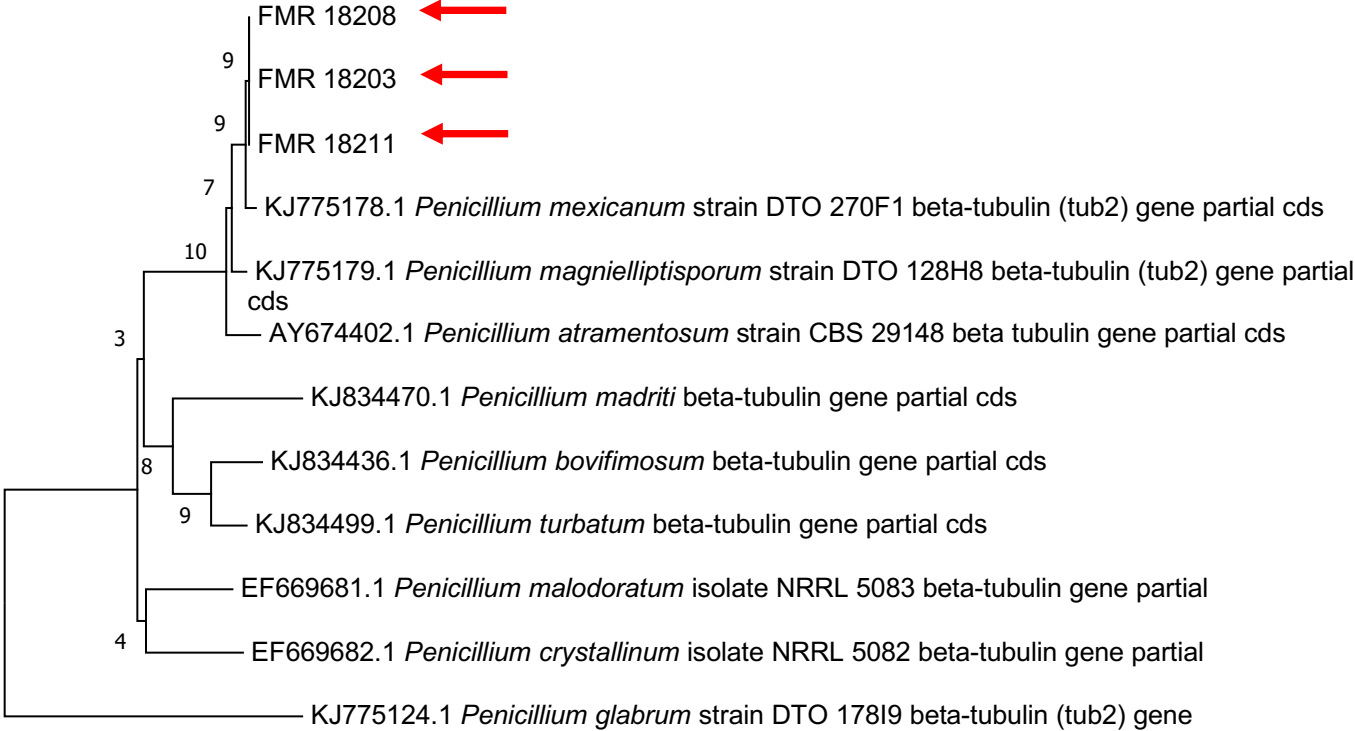
### Anexo I: Sección Talaromyces (BenA)



**Anexo II: Alineamiento Sección Islandici (BenA)**



**Anexo III: Alineamiento Sección Paradoxa (BenA)**



0.05

**Anexo IV: Alineamiento  
Sección Fasciculata**

