



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN POR TAXONOMÍA MOLECULAR DE HONGOS
CONTAMINANTES PERSISTENTES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: ERIKA GABRIELA MINCHALA MAURAT

CAMILA ELIZABETH TACURI OCHOA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, Erika Gabriela Minchala Maurat con documento de identificación N° 0107195463 y Camila Elizabeth Tacuri Ochoa con documento de identificación N° 0106271620; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 16 de agosto del 2023

Atentamente,



Erika Gabriela Minchala Maurat

0107195463



Camila Elizabeth Tacuri Ochoa

0106271620

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Erika Gabriela Minchala Maurat con documento de identificación N° 0107195463 y Camila Elizabeth Tacuri Ochoa con documento de identificación N° 0106271620, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del Trabajo experimental: “Determinación por taxonomía molecular de hongos contaminantes persistentes en el laboratorio de Biotecnología Vegetal”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 16 de agosto del 2023

Atentamente,



Erika Gabriela Minchala Maurat

0107195463



Camila Elizabeth Tacuri Ochoa

0106271620

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DETERMINACIÓN POR TAXONOMÍA MOLECULAR DE HONGOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, realizado por Erika Gabriela Minchala Maurat con documento de identificación N° 0107195463 y por Camila Elizabeth Tacuri Ochoa con documento de identificación N° 0106271620, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 16 de agosto del 2023

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.
0102291044

DEDICATORIA

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida, a mis padres por ser mi principal apoyo e inspiración de trabajo duro y constancia, gracias a su amor y dedicación me motivan siempre a seguir adelante; a mis hermanas Leonor, María Augusta, Isabel y a toda mi familia por confiar en mí, estar presentes a lo largo de este camino y motivarme siempre a seguir preparándome.

A mi primo Rodrigo quien me inspiro a ver más allá de lo ordinario, que disfrute cada momento y que sea motivo de aprendizaje cada experiencia.

A mis amigas Camila, Maday y Noelia con quienes he compartido grandes años de mi vida y como cada una deja algo especial en mí. A Gerardo por su cariño, paciencia y recordarme lo capaz que puedo llegar a ser, siempre encontrando un motivo para verme feliz.

Erika

DEDICATORIA

A Dios por regalarme la vida y permitirme vivir esta experiencia a mis padres Marco y Karina por su amor, su apoyo incondicional y su confianza; a mis tíos y abuelitos por sus palabras de aliento y siempre darme una mano cuando lo necesito; a mis hermanos, José y Adrián por brindarme su sonrisa alegrándome los días y a mis dos ángeles que me envían fuerza y valentía para seguir adelante; a Erika, Maday y Noelia por brindarme su amistad y permitir que estos años se hayan convertido en una agradable experiencia.

Camila

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra sincera gratitud a todos los docentes que han sido parte de este proceso de formación académica, quienes nos han impartido sus conocimientos y sabiduría. De manera especial a la Dra. Inés Malo por ser nuestra inspiración de vida y profesionalismo, por su paciencia, su apoyo y la guía que nos ha brindado durante todo el proceso investigativo, con el mismo cariño agradecemos toda la labor brindada como directora de la carrera, incentivando a la investigación, el compañerismo y a tener en mente el impacto positivo que puede tener el mundo a través de la Biotecnología. También queremos brindar nuestro agradecimiento al Dr. Pablo Arévalo por su ayuda y sus recomendaciones para lograr realizar este trabajo y a la Dra. Mónica Espadero por su amabilidad y compartir sus conocimientos.

De igual manera queremos agradecer a nuestra querida amiga Maday Rivera por su apoyo incondicional y su cálida compañía durante este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
ABREVIATURAS.....	14
CAPÍTULO 1.....	15
INTRODUCCIÓN	15
1.1 Introducción	16
1.2 Planteamiento del problema.....	17
1.3 Justificación.....	17
1.4 Formulación del problema	18
1.5 Objetivos	18
1.5.1 General.....	18
1.5.2 Específicos.....	19
CAPÍTULO 2.....	20
FUNDAMENTOS TEÓRICO	20
2.1 Hongos y su importancia.....	21
2.2 Hongos filamentosos	23
2.2.1 Modo de acción de los hongos filamentosos - Reproducción	23
2.3 Contaminación por hongos.....	25
2.4 Caracterización.....	27
2.4.1 Identificación morfológica y molecular de los hongos filamentosos	27
2.5 Extracción de ADN	28
2.5.1 Método de extracción GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol ...	28
2.5.2 Método de extracción convencional	29
2.6 Cuantificación de ADN.....	29
2.6.1 Espectrofotómetro NanoDrop.....	30
2.7 Electroforesis.....	30
2.8 Reacción en cadena de la polimerasa	31
2.8.1 Componentes de la PCR.....	32
2.9 Secuenciación de Sanger.....	33
CAPÍTULO 3.....	34
MARCO METODOLÓGICO.....	34
3.1 Nivel de investigación.....	35
3.1.1 Diseño de investigación.....	35
3.1.2 Población y muestra.....	35

3.1.3 Variables	35
3.1.4 Técnicas e instrumentación de recolección de datos	36
3.1.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	36
3.2 Procedimiento.....	36
3.2.1 Preparación de medios de cultivo y siembra	36
3.2.2 Extracción de ADN	37
3.2.3 Cuantificación de ADN	39
3.2.4 PCR para la amplificación de regiones ITS.....	39
3.2.5 Cualificación del ADN	40
3.2.6 Identificación de cepas fúngicas.....	41
3.2.6.1 Análisis morfológico	41
3.2.6.2 Secuenciación	41
CAPÍTULO 4.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 Extracción de ADN de hongos mediante protocolo convencional y comercial.....	43
4.1.1 Cuantificación de ADN	43
4.1.2 Evaluación de la eficiencia de los protocolos.....	47
4.2 Resultados de cualificación y amplificación de la región ITS	50
4.2.1 Análisis de la integridad de ADN en el gel de agarosa	52
4.3 Resultados de la Identificación	53
4.3.1 Observación de características morfológicas	53
4.3.2 Criterios de validación para la elección de muestras secuenciación de muestras ...	57
4.3.3 Identificación molecular de hongos.....	59
CAPITULO 5.....	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1 Conclusiones	68
5.2 Recomendaciones.....	69
ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración Hongo 1 con los dos protocolos empleados en el estudio.	44
Tabla 2. Concentración Hongo 2 con los dos protocolos empleados en el estudio.	44
Tabla 3. Concentración Hongo 3 con los dos protocolos empleados en el estudio	45
Tabla 4. Pureza protocolo convencional	46
Tabla 5. Pureza protocolo Comercial.....	46
Tabla 6. Pruebas de normalidad.....	47
Tabla 7. Análisis de medianas con prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon	47
Tabla 8. Evaluación de muestras extraídas con protocolo convencional.....	58
Tabla 9. Evaluación de muestras extraídas con protocolo comercial.	58

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la distribución de datos de los dos protocolos en la variable concentración y contaminación por proteínas.	48
Figura 2. Comparación de la distribución de datos de los dos protocolos en la variable pureza.....	49
Figura 3. Electroforesis para verificar la calidad de los productos de PCR.....	50
Figura 4. Electroforesis para determinar el tamaño de amplicones de ADN en la región ITS empleando TrackIt™ 1 Kb Plus DNA como marcador molecular.	51
Figura 5. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 1	53
Figura 6. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 2	55
Figura 7. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 3	56
Figura 8. Electroferograma del hongo aislado 1_EM_F_ITS1.....	60
Figura 9. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso de Hongo 1.....	61
Figura 10. Árbol filogenético de la especie <i>Rhizopus stolonifer</i>	62
Figura 11. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso de Hongo 2.....	63
Figura 12. Árbol filogenético de la especie <i>Epicoccum italicum</i>	63
Figura 13. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso de Hongo 3.....	64
Figura 14. Árbol filogenético de la especie <i>Trametes hirsuta</i>	64
Figura 15. Elaboración de medios de cultivo PDA.....	81
Figura 16. Desarrollo de los protocolos de extracción de ADN.	81
Figura 17. Medición de concentración y pureza.....	82
Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR.	83
Figura 19. Empaquetamiento de muestra seleccionadas para enviar a Secuenciar.....	83

RESUMEN

La contaminación de los explantes *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal se ha tornado una problemática difícil de lidiar puesto que los protocolos de desinfección abordan cualidades muy generales de los microorganismos sin determinar las características específicas que pueden hacerlos resistentes a los métodos de limpieza tradicional. Por esta razón, con el fin de determinar su taxonomía, se llevó a cabo el proceso de identificación de tres tipos de hongos aislados de varios cultivos *in vitro* mediante técnicas moleculares. El procedimiento comenzó con la extracción de ADN de los hongos utilizando dos protocolos distintos para comparar su rendimiento y obtener las mejores muestras para los procesos posteriores. Se continuó con PCR y electroforesis en gel de agarosa para confirmar la amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en las muestras. Finalmente, las muestras ampliadas se enviaron a la empresa Macrogen - Corea del Sur para un proceso de secuenciación mediante el método Sanger. Los resultados se analizaron utilizando la herramienta bioinformática Blast, las especies de hongos microscópicos filamentosos identificados son: *Rhizopus stolonifer*, *Epicoccum italicum* y *Trametes hirsuta*.

Palabras clave: Técnicas moleculares, hongos filamentosos, ADN, secuenciación.

ABSTRACT

In vitro plant's contamination from the Plant Biotechnology laboratory has become a difficult problem to handle since the detection protocols address very general qualities of microorganisms without determining the specific characteristics that can make them resistant to traditional cleaning methods. For this reason, to determine their taxonomy, the identification process of three types of fungi isolated from various in vitro cultures was carried out using molecular techniques. The procedure began with the extraction of DNA from the fungi using two different protocols to compare their performance and obtain the best samples for subsequent processes. This was followed by PCR and agarose gel electrophoresis to confirm the amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region in the samples. Finally, the amplified samples were sent to the company Macrogen - South Korea for a sequencing process using the Sanger method. The results were analyzed using the bioinformatics tool Blast, the species of filamentous microscopic fungi identified are: *Rhizopus stolonifer*, *Epicoccum italicum* and *Trametes hirsuta*.

Key words: Molecular techniques, filamentous fungi, DNA, sequencing.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: Potato Dextrose Agar

TAE: Tris, Ácido Acético, EDTA.

TE: Tris HCl- EDTA.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En la amplia diversidad que abarca el reino Fungi pueden encontrarse diferentes géneros del tipo macroscópico y microscópico. Dado que son seres heterótrofos que necesitan de materia orgánica para obtener los requerimientos necesarios en su alimentación, suelen convivir con otros organismos mediante interacciones como comensalismo, mutualismo, parasitismo y competencia para obtener su fuente de nutrientes, llevando a clasificarlos como hongos parásitos, descomponedores y endófitos (Cornejo, 2014).

En nuestro país existen estudios sobre la identificación de hongos filamentosos presentes en cultivos in vitro, sin embargo, al existir una diversidad relativamente amplia de este reino, es necesario conocer la influencia que pueden tener ciertas especies en los explantes. Esto lo convierte en un desafío muy grande pues se trata de establecer cultivos sin contaminación para la obtención de plántulas en condiciones fitosanitarias aceptables.

La existencia de contaminación de inóculos puede estar relacionado con la época del año, el tipo de explantes y la presencia de microorganismos superficiales y/o endófitos que se encuentran asociados a las plantas (M. L. Pérez, 2016). Los microorganismos causantes de este tipo de contaminación son perjudiciales debido a que pueden influir en el desarrollo de las plántulas por causa del medio de cultivo o el parasitismo que se puede generar entre el organismo y el vegetal, atacándolo directa e indirectamente por la colonización de sus tejidos

Uno de los métodos para la identificación de hongos microscópicos es mediante su morfología, pruebas fisiológicas y bioquímicas que permite definir una identidad genérica o específica de las cepas desconocidas (Carranza Díaz, 2006), en muchos de los casos estas metodologías son inespecíficas para cumplir su propósito, por tal motivo es necesario acompañar estos análisis con técnicas moleculares como una herramienta para la identificación de microorganismos (Paredes Morales y Yugsi Vargas, 2016); de esta forma el reconocimiento

y caracterización de las cepas por medio de técnicas a nivel molecular ayudará a la correcta detección de la fuente contaminante y poder diseñar procesos para su control (Sharry et al., 2015).

1.2 Planteamiento del problema

La biotecnología vegetal junto con el uso de técnicas moleculares beneficia y mejora significativamente los programas de micropropagación, conservación y mejoramiento de especies vegetales, trabajando en aspectos como el aislamiento, diagnóstico e identificación de fitopatógenos como hongos microscópicos que son causantes de enfermedades en los explantes. La identificación se lleva a cabo mediante técnicas tradicionales que consisten en la observación macroscópica y microscópica de las colonias; sin embargo, estas técnicas a menudo son inespecíficas para ciertos microorganismos. Por tal motivo es necesario el conocimiento de los hongos asociados a la contaminación de cultivos in vitro para poder diseñar método de control efectivo ante estos patógenos, de tal manera que la aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico que en conjunto con una identificación morfológica permita un análisis eficiente y a profundidad para la caracterización de hongos microscópicos filamentosos.

1.3 Justificación

Uno de los campos que enfoca la Biotecnología es el uso de técnicas clásicas y modernas de la biología molecular que tienen como propósito el enseñar estrategias experimentales existentes como el manipular, aislar y caracterizar los ácidos nucleicos ADN y ARN (Gutiérrez-Venegas et al., 2014).

La identificación de hongos filamentosos mediante métodos moleculares se volvió una técnica de menor tiempo y ejecución, lo que nos ha permitido establecer la identidad de cada organismo. Estos procesos revolucionaron la sistemática de hongos y propusieron estudios filogenéticos (Seifert et al., 2007), además Rodríguez, D y Hernández M (2006) mencionan que estas técnicas tienen altos alcances, un buen límite de detección, gran especificidad y sensibilidad, de igual manera su automatización puede ejecutarse para grandes muestras.

Los protocolos de desinfección de órganos y fragmentos de órganos para el cultivo *in vitro* son elaborados para controlar microorganismos saprofitos, sin embargo, puede existir resistencia al desinfectante llevando al medio a presentar contaminación (Ramírez et al., 2017). Por esta problemática, se busca mediante extracción de ADN, reconocer los hongos obtenidos con más frecuencia en los cultivos *in vitro* producidos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal controlando la calidad, cantidad y pureza obtenida mediante dos protocolos.

1.4 Formulación del problema

¿Existe eficiencia similar entre un protocolo de extracción de ADN convencional y un protocolo comercial para la identificación de hongos persistentes?

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Identificar mediante técnicas moleculares hongos aislados presentes en cultivos *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal mediante secuenciación de la región ITS.

1.5.2 Específicos

- Evaluar el protocolo comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit y un protocolo convencional, analizando el ADN extraído de hongos determinando su eficiencia en cuanto a la concentración y pureza.
- Realizar análisis moleculares de las muestras recolectadas utilizando técnicas de PCR como insumo para procesos de secuenciación.
- Examinar los datos de secuenciación obtenidos mediante un *software* bioinformático libre comparando con los datos morfológicos previamente obtenidos determinando su clasificación taxonómica y filogenética.

1.6 Hipótesis

1.6.1 Hipótesis Nula

Los dos protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de hongos filamentosos no evidencian diferencia significativa en cuanto a la calidad y cantidad del ADN extraído.

1.6.2 Hipótesis Alternativa

Los dos protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de hongos filamentosos evidencian diferencia significativa en cuanto a la calidad y cantidad del ADN extraído.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICO

2.1 Hongos y su importancia

El término hongo proviene del latín *fungus* de manera que pertenece al Reino Fungi, aquí se incluyen a levaduras unicelulares, hongos filamentosos multicelulares y setas como especies macroscópicas (Tortora et al., 2007). Los organismos vivos se agrupan según sus características, los hongos son heterótrofos, forman parte de los organismos eucariotas porque presentan un núcleo diferenciado, limitado por una membrana bien organizada y recubierta por una pared celular conformada por polímeros como polisacáridos, polipéptidos y quitina. Existen más de 100 000 especies de hongos, de las cuales alrededor de 200 de ellas son consideradas patógenos para seres humanos y animales, provocando alergias e infecciones fúngicas más conocidas como enfermedades micóticas (Guarro, 2011), de la misma manera pueden llegar a afectar a las plantas siendo una amenaza en la economía de la agricultura. Sin embargo, se pueden establecer ciertas asociaciones con plantas durante todo su ciclo de vida, como hospedero siendo parásitos obligados o como simbióticos en el caso de las micorrizas, llegando a cumplir un papel muy importante en la descomposición de materia orgánica compleja en el ambiente para el mejoramiento de las propiedades físico químicas del suelo, proporcionando un buen estado nutricional de la planta y ayudándole a la protección de ataques de agentes externos produciendo sustancias de defensa (Carlos et al., 2020).

2.1.1 Necesidades fisiológicas de los hongos

La mayoría de los hongos son microscópicos y como menciona (Haga clic aquí para escribir texto. Gómez Daza, 2014) no tienen la capacidad de formar tejidos, además de ser considerados ubicuos por tener la capacidad de vivir en diferentes ambientes, pueden colonizar: tierra, agua e incluso el aire. Por tal motivo los hongos son los microorganismos que tienen la capacidad de adaptarse a una variedad de ambientes adversos; al ser seres quimio heterótrofos

adsorben los nutrientes de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, en condiciones de laboratorio lo más importante es que los medios de cultivo contengan ciertos requerimientos nutricionales como glucosa siendo la principal fuente de energía, pero además requieren de nitrógeno, azufre y vitaminas (Alejandro et al., 2017). Existen parámetros que pueden afectar su desarrollo, por ende, crecen mejor en un ambiente con pH 5 siendo un condicional que ayuda a evitar la aparición de bacterias; su temperatura óptima es de 25 °C- 28 °C, aunque los rangos van desde 10 °C- 40 °C (Barragán et al., 2010); la mayoría necesita oxígeno y humedad relativa para vivir, además debe tener un soporte sólido gelosado que permite a los hongos filamentosos desarrollar su micelio aéreo con órganos fructíferos (Necesidades Fisiológicas, 2014).

2.1.2 Morfología de los hongos

La mayoría de los hongos son descritos como estructuras vegetativas, a pesar de no producir fotosíntesis debido a su ausencia de plástidos y su pared celular se encuentra cubierta por quitina, un componente que no encontramos en bacterias o plantas, de tal manera que esta capa protectora evita la fagocitosis y ayuda al control de permeabilidad ante cambios osmóticos (Estrada Salazar y Ramírez Galeano, 2019). Los hongos macromicetos pueden ser comestibles o venenosos, están formados por un píleo o comúnmente conocido como “sombrero” que se localiza en la parte superior del cuerpo fructífero, este se encuentra cubierto por una membrana llamada cutícula, el cual le ayuda como protección ante ciertas condiciones o agentes externos. Son denominados organismos saprobios porque crecen en materia orgánica muerta y pueden ser potencialmente considerados organismos parásitos o vivir en simbiosis con la planta (Carrillo, 2005). Por otra parte, en los hongos micromicetos no se pueden apreciar sus estructuras a simple vista, muchos de ellos son saprófitos ambientales y se clasifican según su morfología en hongos filamentosos o mohos y levaduras.

2.2 Hongos filamentosos

El cuerpo de un hongo filamentoso tiene dos porciones, la primera la constituye la parte vegetativa haploide, no presenta coloración y su objetivo es la obtención de nutrientes, se encuentra compuesta por filamentos alargados ramificados llamados hifas (Romero et al., 2018), cuyo conjunto de hifas forma el micelio visible y denominado soma del hongo. La segunda parte del hongo la compone las estructuras que participa en la reproducción, se proyecta en la parte superficial del medio y se llama hifa reproductiva o aérea con esporas reproductivas (Estrada Salazar y Ramírez Galeano, 2019); en muchos hongos las hifas septadas se prolongan en un proceso conocido como extensión apical, las hifas septadas se constituyen por una separación por septos con poros o tabiques que dividirían a distintas células (Gutiérrez Martín, 2017; Wilkins, 2021).

2.2.1 Modo de acción de los hongos filamentosos - Reproducción

Los hongos tienen hifas aéreas que resultan en la formación de estructuras reproductivas complejas conocidos como esporocarpos (Carranza Díaz, 2006), de manera que la formación de esporas son las encargadas de la reproducción sexual o asexual, de hecho, las esporas tienen gran importancia en la identificación de los hongos, debido a que por medio de las conidiósporas y conidióforos nos brinda ciertas características de un género o especie de un hongo en particular (Reyes, 2000).

En el caso de una reproducción asexual es un proceso sencillo, rápido y además permite la producción de numerosos individuos; se da por la fragmentación de las hifas o por formación de estructuras especializadas (Uribarren Berrueta et al., 2016); por medio de la mitosis se obtendrá la producción de esporas y la posterior división celular dará como resultado hongos genéticamente iguales al progenitor (Muñoz Huerta et al., 2016). Existen varios tipos de

esporas asexuales, estas se dividen entre esporas exógenas y esporas endógenas; en el caso del primer grupo tenemos a las esporas que no están incluidas dentro de un saco tales como:

- a. **Conidiósporas** o conidios, indica que su formación se da en la punta o en los costados de las hifas, siendo una espora unicelular o pluricelular que produce una cadena en el extremo de un conidióforo.
- b. Los **artroconidios** son hifas tabicadas que se dividen en varios segmentos, en un proceso conocido como septación o fragmentación y cada segmento se liberará sucesivamente.
- c. **Blastoconidios** o **blastoesporas** se da por gemación de las esporas de una hifa vegetativa y estas se pueden encontrar aislados, en forma de racimos o cadenas.
- d. Las **clamidosporas** germinan para la producción de un nuevo micelio, la espora se forma dentro de un segmento de la hifa y es detectable debido a que forma una pared gruesa y alargada, esta estructura típicamente se forma como resultado de la respuesta de estrés medioambiental del hongo.

Así mismo para el caso de las esporas endógenas, las **esporangiosporas** son aquellas que se encuentran dentro de un saco o esporangio, su nombre deriva de esporangióforo debido a que se encuentra en los extremos de hifas aéreas o en hifas especializadas (Avilés Guzmán & Granja Valle, 2014).

Por otra parte, la reproducción sexual en hongos implica la fusión de dos núcleos compatibles haploides, los órganos sexuales se denominan gametangios y son diferenciados desde las hifas; las estructuras reproductivas masculina y femenina pueden producirse en el mismo talo en el caso de especies hermafroditas, pudiendo existir la posibilidad de auto reproducirse en el caso que sean auto compatibles y estos pueden llegar a clasificarse como homotálicos por ser sexualmente autofértiles y producir ascosporas; pero no siempre sucede

estos casos, aunque se tenga especies hermafroditas o indistintamente de que tenga estructuras reproductivas masculina o femenina se requiere la presencia de otro individuo que sea compatible para llevar a cabo la reproducción, pudiendo clasificarse como hongos heterotálicos por ser autoestériles (Conde Ferráez et al., 2004). Esta clase de reproducción tiene tres fases que constan de:

- a) **Plasmogamia:** fusión de membranas y unión de los gametos haploides.
- b) **Cariogamia:** posterior a la plasmogamia y aquí se unen dos núcleos para formar un núcleo cigoto diploide.
- c) **Meiosis:** el núcleo formado en la cariogamia da origen a nuevos núcleos haploides o conocida como esporas vegetativas.

2.3 Contaminación por hongos

Se define a la micropropagación de plantas como un método biotecnológico que por medio de meticulosos procedimientos asépticos y en condiciones controladas se obtendrá plantas mejoradas, no solo basándose en su estabilidad genética sino también en la obtención de órganos de plantas, tejidos o células y producir poblaciones de plántulas fenotípica y genotípicamente idénticos a la planta madre (Collantes et al., 1990). Para triunfar en la micropropagación, el objetivo es obtener la mayor cantidad de plántulas en poco tiempo y que se encuentren libres de cualquier agente patógeno; por eso es esencial contar con buenas prácticas de laboratorio, empezando desde los procesos iniciales de desinfección a los que se somete el material vegetal antes de cualquier ejecución ya que permite eliminar toda contaminación exógena. Posteriormente, el tratamiento hidrotérmico para reducir la pudrición y el propio proceso de micropropagación elimina casi en su totalidad algunos de los más importantes patógenos sistémicos del cultivo (Arellano et al., 2009).

Sin embargo existen varios factores que influyen negativamente en los procesos de micropropagación, pero de igual manera son necesarios para que se lleven a cabo los cultivos *in vitro*; en el caso de los medios de cultivo que contienen sales minerales, azúcares, hormonas, vitaminas y agua llegan a formar parte de los componentes indispensables para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero ya sea por un exceso o carencia sus componentes del medio pueden influenciar en el desarrollo de microorganismos contaminantes como hongos y bacterias; por tal razón es necesario incluir fungistáticos y antibióticos a los medio de cultivo los cuales previamente deben pasar por pruebas de toxicidad antes de ser aplicado al proceso de micropropagación (Estrada Basaldúa, 2010).

Otro de los factores que influyen en el crecimiento normal de los explantes y pueden causar problemas de contaminación son las condiciones del medio ambiente, las cuales deben ser controladas y ajustadas a su protocolo dependiendo de la especie vegetal que se trabaje, de manera que la temperatura, la luz y pH inadecuado originan el desarrollo de enfermedades parasitarias como los hongos. Por el contrario, en el caso de las micorrizas que son unos del tipo de simbiosis más conocida, tiene un gran potencial en la micropropagación debido a su poder de absorción de agua y nutrientes hacia la raíz, además de crear resistencia de las plantas a estrés o enfermedades, de manera que tiene ventajas comparativas con la producción *in vitro* de plantas (Urrea-Trujillo et al., 2011); pero se debe considerar la especificidad entre planta-hongo, por ende, se realizan pruebas para la selección de un buen hospedero para los explantes para tener un mayor grado de adaptación y no sufrir percances durante el proceso de micropropagación. Los hospederos pueden sufrir contaminación en cualquier etapa de su desarrollo, si un determinado hongo no coloniza en totalidad al hospedero no significa una baja eficiencia infecciosa, caso contrario debe ser monitoreado debido que puede llegar a ser un agente patógeno y a causar enfermedades a los explantes.

2.4 Caracterización

Para la identificación de hongos filamentosos uno de los métodos clásicos se basa en la morfología del conidio ya que puede ser característico de un género o especie, así como de las características bioquímicas y genéticas (Urrea-Trujillo et al., 2011).

2.4.1 Identificación morfológica y molecular de los hongos filamentosos

Muchas especies de hongos pueden llegar a identificarse por medio de criterios morfológicos, mecanismo de formación y elementos formadores de las esporas incluyendo aquí los cuerpos fructíferos; el conocimiento de estas características puede ser suficiente para identificar especies que pertenecen al grupo de los hongos filamentosos (Martí Solé et al., 1998); sin embargo, al tratar de identificar especies como levaduras es necesario la aplicación de pruebas bioquímicas y fisiológicas. Los hongos filamentosos con respecto a su aspecto macroscópico poseen ciertas características de su soma o micelio que puede ser útil para sugerir la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo (Gómez Guirao, 2020).

Actualmente es indispensable el uso de técnicas de biología molecular para análisis taxonómicos, de identificación y de diagnóstico de microorganismos fúngicos; estas técnicas moleculares en especial aquellas de secuenciación de ADN, han permitido mejorar la clasificación de los hongos y el conocimiento de sus relaciones filogenéticas (Arenas Guzmán, 2014). Otros métodos aplicados para investigaciones biológicas y evolutivas son: las regiones hipervariables del ADN_r (espacio intergénico o espacios transcritos internos); polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*); hibridación Southern y Northern; análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD, del inglés *Random Amplified Polymorphic-*

DNA); reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real (Estrada Salazar y Ramírez Galeano, 2019), de manera que se pueden realizar estudios de genes individuales o el genoma completo de un individuo.

2.5 Extracción de ADN

La extracción de ADN es el proceso de obtención de material genético, el cual atraviesa múltiples fases, siendo una de ellas la separación del resto de organelos. El objetivo es eliminar contaminantes y proteger su integridad con el fin de utilizarlo en estudios que requieran la aplicación de técnicas moleculares (Peñañiel, 2023).

Los pasos principales en la extracción de ADN implican una lisis celular que consiste en el rompimiento de la pared celular para la liberación del ADN; un proceso de purificación para eliminar desechos del lisado como proteínas, lípidos y estructuras celulares; y por último la elución del ADN que es la recuperación de la matriz de purificación mediante el uso de agua o una solución tampón (Sofian & Montes Palma, 2017).

Para la extracción y aislamiento de ADN pueden ser utilizados protocolos tradicionales que utilizan solventes orgánicos para la separación del ADN del resto de biomoléculas presentes en la célula, por lo que la preparación de los reactivos puede demorar muchas horas a comparación de los *kits* comerciales que utilizan sílica, siendo este mucho más rápido (Original et al., 2018).

2.5.1 Método de extracción GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol

El kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit es un protocolo de extracción de ADN de células eucariotas vegetales que a partir de 100 mg de tejido fresco o hasta 10 mg de

tejido liofilizado, permite la obtención de varios microgramos de ADN en un lapso corto de tiempo. El ADN obtenido posee una longitud que sobrepasa los 20 kb y posee una pureza apta que permite su posterior aplicación en pruebas de alta sensibilidad (MERCK, 2022).

2.5.2 Método de extracción convencional

Gontia, Niraj y Shared (2014) en su publicación "*A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies*" sugieren que el uso de kits comerciales implica un gasto económico considerable y cuya eficiencia depende considerablemente del pretratamiento aplicado a la muestra para obtener los resultados esperados. Dada la problemática, plantean un protocolo de extracción de ADN fúngico sencillo, rápido y de bajo costo que presentó resultados eficientes en electroforesis y su posterior uso en pruebas de PCR.

2.6 Cuantificación de ADN

La cuantificación busca conocer la cantidad de ADN existente en una muestra y dependiendo del método utilizado, también se pueden estimar los ácidos nucleicos totales, proteínas y el nivel de pureza que presentan los extractos (Del Valle, 2002). Conocer la calidad y concentración que posee una muestra de ADN es fundamental para asegurar el éxito o el fracaso de un estudio molecular ya que con una cantidad muy baja no se podrían visualizar buenos resultados mientras que con una cantidad muy alta podrían inhibirse las pruebas de PCR o se generarían picos que imposibiliten el análisis de los resultados (Haarkotter, 2019).

Para ello existen varias técnicas que incluyen equipos de espectrofotometría como el NanoDrop para el que no se necesitan reactivos adicionales ni un volumen grande de muestra, además de poseer buena precisión; de fluorometría como el Quibit que es altamente sensible;

y también la PCR cuantitativa o en tiempo real que permite detectar diversas secuencias en una misma reacción (Mancera, 2020).

2.6.1 Espectrofotómetro NanoDrop

La concentración y pureza del ADN se miden mediante herramientas de espectrofotometría ya que esta permite cuantificar la absorbancia de la luz mediante dos relaciones. La relación 260/280 mide donde absorbe la luz con mayor intensidad la muestra analizada, siendo 260 para ADN y ARN mientras que 280 para proteínas, entrando a un rango recomendable de pureza entre 1,8 y 2,0. En segundo lugar esta la relación 260/230 que involucra la medida del ADN y las sustancias residuales del proceso de extracción presentando un intervalo de aprobación entre 2,0 y 2,2. El equipo NanoDrop mediante espectrofotometría, cuantifica el amplio rango de longitud de onda (220-750nm) con exactitud sin necesidad de volúmenes grandes de muestra siendo aplicados de 1 a 2µl de volumen (LABSTER THEORY, 2021; Longoria, 2018).

2.7 Electroforesis

El análisis de ADN mediante electroforesis es considerado una técnica simple y rápida de ejecutar que puede realizarse a través de geles de agarosa o poliacrilamida. Su objetivo principal es la migración de partículas o moléculas cargadas por medio de soluciones conocidas como *buffers*, esto dentro de un campo eléctrico generado por dos electrodos y una tinción fluorescente que permite visualizar el ADN (Ruiz et al., 2017).

Existen factores que influyen en la velocidad de la migración del ADN, siendo uno de ellos la corriente eléctrica, puesto que las moléculas de ADN tienen carga negativa y migran hacia el ánodo por la corriente aplicada y por el intercambio electrolítico causado por los

buffers de carga (Green y Sambrook, 2019). El tamaño de las moléculas de ADN es otro factor por considerar, ya que, con partículas de menor tamaño hay mayor velocidad de migración debido a la porosidad del gel. Por último, la concentración de agarosa considera el peso molecular del ADN, indicando que un gel de mayor concentración será para bandas de menor concentración de ADN (López de la Mora & Sandoval Rodríguez, 2013).

La agarosa es un polisacárido que se extrae de las algas rojas que forma una red fibrosa que funciona como filtro para separar diferentes moléculas. En un gel de agarosa se pueden analizar fragmentos que máximo van de 100 pb a 2000 pb en un gel con concentración de 2-3% y una longitud mínima de más de 50 kb con una concentración sugerida de 0.25% (Lugo y Montalvo, 2019).

2.8 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR originalmente fue creada como un paso adicional a la secuenciación de Sanger, ya que su creador Mullis, notó que las señales producidas del estudio de genes de una muestra de ADN de poco concentradas eran muy bajas (Ferrari Gutiérrez, 2020). El objetivo de la PCR es la amplificación de un segmento de ADN mediante el uso de cebadores sintéticos específicos y la enzima polimerasa proveniente de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que puede tolerar el ciclo de temperaturas de la PCR sin desnaturalizarse (Zhu et al., 2020). Durante las reacciones de amplificación la plantilla de ADN sufre tres pasos principales que son la desnaturalización, la hibridación y la extensión, de tal modo que el número de cadenas de ADN aumenta exponencialmente, en función de los ciclos de PCR (Tabatabaei et al., 2021).

El primer paso de la PCR consiste en la desnaturalización de la cadena de ADN donde la doble hélice se separa debido a la rotura de los puentes de hidrógeno generados por las altas temperaturas requeridas que van en un rango de 90 °C a 95 °C, seguido a este proceso va la

etapa de hibridación en donde los cebadores o *primers* se unen a la secuencia complementaria (Avilés Guzmán y Granja Valle, 2014) La temperatura de la segunda etapa está relacionada a factores como la composición de las bases, el tamaño y la concentración de los oligonucleótidos estando en una temperatura entre 45 °C y 65 °C. En la última etapa la Taq polimerasa genera una extensión de los cebadores en una temperatura de 72 °C creando así nuevas cadenas de ADN (Orellana Canedo, 2019).

2.8.1 Componentes de la PCR

Como material base para la PCR está la muestra de ADN extraído de la célula de interés. Analizando el contexto teórico, este ácido nucleico está formado de dos cadenas complementarias que forman una doble hélice unida por puentes de hidrogeno, además posee una carga eléctrica negativa debido al grupo fosfato que se encuentra dentro de su estructura. En el proceso de PCR estas cadenas se separan y funcionan como cadenas molde para la amplificación que se busca realizar (Tamay de Dios et al., 2013).

Para lograr la síntesis de nuevo ADN es necesario el uso de una enzima ADN polimerasa, oligonucleótidos, también son necesarios nucleótidos libres, sales, una solución amortiguadora y agua. La ADN polimerasa más utilizadas es la Taq polimerasa debido a su tolerancia y estabilidad en altas temperaturas siendo ideal para la PCR. Esta enzima se aisló de la bacteria termófila aerobia *Thermophilus aquaticus* lo que le brinda la posibilidad de mantener su actividad enzimática entre 75 °C y 80 °C (Tapia, 2023).

La enzima polimerasa para cumplir con su función de sintetizar nuevas cadenas de ADN necesita un molde inicial de oligonucleotidos llamados *primer* o cebadores. Son dos cadenas cortas de entre 18 a 30 nucleótidos que delimitan el fragmento de ADN que se va amplificar (Perez, 2011). Los cebadores se unen a la cadena en dirección 5' a 3' mediante

complementariedad de bases estando el uno en dirección contraria al otro usando las denominaciones "*forward*" y "*reverse*".

Los nucleótidos libres con los que se construye la cadena durante la PCR, son agregados en forma de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) en cantidades equimolares para una buena incorporación. Son cuatro y cada uno corresponde a las bases nitrogenadas que son parte de la estructura del ADN: dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Mas et al., 2001).

Los iones Mg^{2+} son cofactores que le permiten a la polimerasa cumplir con su función enzimática pues facilitan su unión al molde y alinean los extremos 3' de los cebadores y los dNTP para lograr la formación de enlaces fosfodiéster del nuevo ADN, además permiten a la enzima avanzar a lo largo de las nuevas hebras. Por lo general estos iones son agregados como una solución de $MgCl_2$ al buffer preparado para la PCR. La solución tamponada mantiene el pH dentro de un rango apto para la reacción y ayuda a mantener la osmolaridad en la mezcla (Karunanathie et al., 2022).

2.9 Secuenciación de Sanger

Es una técnica de secuenciación de ADN dirigida y relativamente sencilla, que utiliza cebadores de oligonucleótidos para buscar regiones específicas de ADN (Aguilar Flores, 2019). Es un método que se origina desde la desnaturalización de la doble cadena de ADN, continuando por la replicación de la molécula de ADN por medio de la ADN polimerasa; a partir de un oligonucleótido cebador la ADN polimerasa empezará la síntesis del nuevo ADN, la cadena sencilla se alargará utilizando una mezcla de dideoxinucleótidos (ddNTP), en donde cada uno de ellos tendrá un marcador fluorescente (Valderrama et al., 2020). Se somete a electroforesis capilar la cual combina el uso de un láser para inducir fluorescencia, de manera que la máquina leerá la intensidad de fluorescencia y la traduce como un pico.

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel de investigación

Identificar con técnicas moleculares hongos aislados en cultivos *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal mediante secuenciación de la región ITS, es una investigación de tipo descriptiva, ya que se levanta información de variables independientes, siendo cuantitativa.

3.1.1 Diseño de investigación

El diseño de investigación es de campo al levantar información a partir de los hongos filamentosos que fueron sometidas a dos protocolos de extracción de ADN, analizando los resultados y comparándolos al final de la experimentación.

3.1.2 Población y muestra

Se tomará como población cultivos axénicos de tres hongos filamentosos presentes en cultivos *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana; como unidad experimental se tomará cajas Petri cultivadas, las muestras se harán por duplicado tomando su media de acuerdo con cada fecha de recolección de muestra.

3.1.3 Variables

Las variables independientes son los protocolos de extracción de ADN y las variables dependientes son las muestras de los hongos filamentosos. Entre las variables intervinientes se encuentra el ambiente de laboratorio, calidad de los reactivos, equipo, entre otros.

3.1.4 Técnicas e instrumentación de recolección de datos

Se usaron diversas técnicas e instrumentos de para la recopilación de datos, entre estos se encuentran libros, tesis, artículos científicos, publicaciones en revistas de alto y bajo impacto, manuales de uso equipos.

3.1.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

El procesamiento de datos se realizó mediante tablas y gráficos para una directa interpretación de la información. Por otro lado, el análisis estadístico se realizó mediante el *software* estadístico R, en el que se aplicaron los supuestos de normalidad y homogeneidad por medio del test de Shapiro-Wilks.

3.2 Procedimiento

3.2.1 Preparación de medios de cultivo y siembra

Para la preparación de las cajas Petri con medio de cultivo, se pesó en una balanza medio PDA que fue añadido en un matraz de Erlenmeyer de 1000 mL, dejando siempre para el final la adición de agua destilada. Después, se calentó con agitación el matraz que contenía el medio hasta disolver por completo, posteriormente los medios son llevados a la autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos. Finalmente, se dispensó el medio de cultivo en cajas Petri estériles dentro de una cámara de flujo laminar y se añadió una dosis de cloranfenicol como antibiótico para evitar la contaminación por bacterias.

A partir de los cultivos aislados de cepas fúngicas tomados de explantes proporcionados por el laboratorio de Biotecnología Vegetal, se realizaron subcultivos tomando muestras de micelio con una punta estéril y se sembró individualmente cada hongo en 10 cajas. Se almacenó los medios de cultivo inoculados en una incubadora una temperatura de 27 °C durante 10 días luego de su inoculación inicial.

3.2.2 Extracción de ADN

3.2.2.1 Protocolo Convencional

El protocolo convencional que propone Gontia y colaboradores (2014), en su artículo “A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies” consiste en extraer ADN a partir de una muestra de micelio fresco de cada hongo. Las muestras se colocaron en tubos cónicos estériles junto con 800 μ L de tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 2,5 M, 3,5 % CTAB, se añadieron 75 μ L de 20 mg/ml de proteinasa K) y para una lisis mecánica se usó perlas de vidrio. Luego se agitó por vórtex durante 5 minutos cada muestra y se incubó a 65 °C por 30 minutos. Después se dio paso a un ciclo de centrifugado por 10 minutos a 10 000 rpm. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo cónico y se mezcló con un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamil-alcohol (25:24:1).

Nuevamente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos y se recogió el sobrenadante en otro tubo para añadirle un volumen igual de cloroformo-isoamil-alcohol (24:1). Posteriormente se volvió a centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió un volumen igual de etanol absoluto enfriado con hielo y se incubó las muestras a -7 °C por 12 horas, posterior se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos.

A continuación, se decantó el sobrenadante, se lavó el sedimento con etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Por último, se añadió 5 μ L de ARNasa (20 mg/mL) a las muestras de ADN y se incubaron a 37°C durante 1h. Para finalizar se resuspendió en tampón TE y se almaceno a -7 °C para conservarlas.

3.2.2.2 Protocolo Comercial

Se utilizaron muestras de ADN fúngico resuspendidas en agua libre de nucleasas y se siguió el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich, 2017). Para comenzar la lisis celular se añadió al tubo de la muestra 350 μL de *Lysis Solution [Part A]* y 50 μL de la solución de *Lysis Solution [Part B]*, se agitó por vórtex y se incubó por 10 minutos a 65 °C. Continuando con el protocolo se añadió *Precipitation Solution*, se agitó por inversión y se dejó las muestras en hielo por 5 minutos. Posterior a este proceso se centrifugó los tubos a máxima potencia por 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a la *GenElute filtration column* y se centrifugó al máximo por 1 minuto. Se conservó el recolectado del tubo.

A continuación, se añadió 700 μL de *Binding Solution* al líquido recolectado en el paso anterior y se mezcló por inversión. Aparte, en la columna de unión *GenElute Miniprep* es ensamblada a un tubo de microcentrífuga que se agregó 500 μL de *Column Preparation Solution*, se centrifugó a 12 000 g por 30 segundos y se desechó el líquido. En la columna del paso anterior se colocó 700 μL de la mezcla preparada previamente con *Binding Solution* y nuevamente se centrifugó al máximo por 1 minuto, se desechó el líquido del flujo y se repitió el paso con el lisado sobrante.

Para el proceso de lavado la columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección y se aplicó 500 μL de *Wash Solution*, se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto, se eliminó el líquido de flujo y se repitió el paso cambiando el tiempo de centrifugado a 3 minutos. Para el último paso de la elución de ADN se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se aplicó 100 μL de *Elution Solution* precalentada a 65 °C, se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto y se conservó el líquido de flujo. Finalmente se aplicó por segunda vez otros 100 μL y se repitió el paso de centrifugación.

3.2.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído de los dos protocolos se realizó por medio de un instrumento de espectrofotometría NanoDrop One^e de ThermoFisher. Para realizar el experimento se seleccionó en la pantalla la función *default* para la cuantificación en microvolumen, además de colocar un blanco con agua libre de nucleasas para calibrar el equipo, se limpió los dos pedestales con una tela anti-pelusas antes y después de comenzar las lecturas. Para el análisis se descongeló las muestras a temperatura ambiente, luego se tomó 2 μ L de muestra y se colocó en la superficie del lector, se bajó el pedestal dando paso a la lectura automática del equipo para cuantificar la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm y la pureza con relación 260/280.

A partir de los resultados tomados de la cuantificación del ADN, se tomó una muestra de cada hongo con la concentración más alta para continuar con la amplificación de la región ITS.

3.2.3.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos con los dos protocolos se cargaron en el *software* R Studio y se evaluaron las variables de concentración, pureza y contaminación por carbohidratos. Se verificó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilks. Posteriormente se utilizaron pruebas no paramétricas para evaluar la similitud entre medianas.

3.2.4 PCR para la amplificación de regiones ITS

Para la reacción en cadena de la polimerasa de las muestras de ADN genómico se utilizó la enzima DreamTaqTM Green PCR Master Mix (2X) que dentro de su composición posee la ADN polimerasa DreamTaq, el tampón DreamTaq Green, MgCl₂ y dNTPs. En la master mix

también están presentes tinciones azul y amarillo que permiten la supervisión durante de la electroforesis (ThermoScientific, 2016). A la master mix se le añadió por cada muestra 1 μ L de los *primers* ITS1 en secuencia (3' a 5') de TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS-4 (5' a 3') de TCCTCCGCTTATTGATATGC (Corporation, 2014); para la amplificación de la región ITS. El procedimiento se llevó a cabo en el termociclador LightCycler® Nano con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C seguido de la hibridación a 53.6 °C y un paso final de extensión a 72 °C por un total de 40 ciclos durante 1 hora con 45 minutos.

3.2.5 Cualificación del ADN

Para evaluar la integridad del ADN obtenido de cada hongo investigado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica siguió la metodología presentada por Pérez y Gómez (2018), para lo cual se preparó un gel al 1% de concentración pesando 0.5 g de agarosa en 50 ml de *buffer* TAE 1X y se añadió 5 μ L de *Syber Safe* para asegurar la tinción de los ácidos nucleicos. Esta última es una opción más segura en comparación con otras tinciones, pues no es mutagénico y posee una sensibilidad alta para poder trabajar en procesos de PCR (INVITROGEN, 2016).

Luego de que este solidificara se colocó el gel en la cámara de electroforesis con los pocillos en dirección al polo negativo se procedió a llenar la cámara con *buffer* TAE 1X. En el primer pocillo con la ayuda de una micropipeta se cargó un marcador de peso molecular y de las muestras previamente amplificadas se tomaron 5 μ L para cargarlas en el gel. Se utilizó un voltaje de 110 v por 30 minutos.

3.2.6 Identificación de cepas fúngicas

3.2.6.1 Análisis morfológico

Después de 10 días de la inoculación inicial en una placa portaobjetos se colocó una gota de azul de lactofenol y con un pedazo de cinta adhesiva transparente se tomó una muestra de micelio del hongo. Se usó un microscopio óptico compuesto para visualizar las estructuras morfológicas de cada hongo. Finalmente se tomó fotografías en aumento 40 x y 100 x para la identificación de estructuras fúngicas.

3.2.6.2 Secuenciación

De los productos de amplificación provenientes de la reacción de PCR se eligió una muestra de cada hongo y se envió mediante un intermediario a la compañía Macrogen ubicada en Corea del Sur para hacer uso de su servicio de secuenciación cuyo primer paso era un proceso purificación y posteriormente la secuenciación con la técnica de Sanger. Los resultados fueron recibidos en formato Fasta junto con sus respectivos electroferogramas. Para la identificación molecular, los datos de la secuenciación se cargaron a la herramienta bioinformática BLAST del *National Center for Biotechnology Information*. Esto se realizó con el objetivo de encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas y comparar sus nucleótidos o proteínas con bases de datos, además de calcular la importancia estadística para la identificación de miembros de familias de genes (BLAST, 2023).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN de hongos mediante protocolo convencional y comercial

Se realiza la extracción de ADN fúngico mediante dos protocolos. Primero, una extracción con el protocolo convencional propuesto por Gontia y colaboradores (2014), obteniendo de cada hongo 10 muestras viables; segundo, protocolo con el kit comercial GenElute™ *Plant Genomic DNA Miniprep Kit* siguiendo la guía proporcionada por la casa comercial Sigma-Aldrich, diseñada para la purificación del ADN combinando un sistema basado en sílice con un formato de microspin (Merck KGaA, 2017), obteniendo de cada hongo cinco muestras viables; el motivo por el cual en el segundo protocolo se obtuvo de un menor número de muestras, se debe a ciertos inconvenientes con el primer protocolo planteado para el estudio, por lo que se cambió al kit comercial ya mencionado.

4.1.1 Cuantificación de ADN

Los datos obtenidos de las concentraciones de ADN por los dos métodos de extracción mediante el Nanodrop se visualizan las tablas 1, 2 y 3. Los datos se expresan en promedio de las 10 muestras extraídas de cada hongo por el protocolo convencional y las 5 muestras extraídas de cada hongo por el protocolo comercial.

La concentración de ADN promedio obtenida por el protocolo convencional de Gontia y colaboradores para las muestras del Hongo1 fue de 230,3 ng/μL, mientras que la concentración promedio obtenida por el protocolo comercial de Sigma- Aldrich que fue de 16,54 ng/μL. Así mismo, la concentración promedio obtenida por el protocolo convencional para las muestras del Hongo 2 fue de 215,53 ng/μL y por parte del protocolo comercial fue de 18,586 ng/μL. Finalmente, se obtuvieron las concentraciones promedio para las muestras del Hongo 3 por el protocolo convencional que fue de 136,89 ng/μL y con el protocolo comercial fue 26,72 ng/μL.

Tabla 1. Concentración Hongo 1 con los dos protocolos empleados en el estudio.

CONCENTRACIÓN		
Hongo 1		
N.º	Protocolo convencional	GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit
1	254 ng/μL	12,9 ng/μL
2	104 ng/μL	17,5 ng/μL
3	99,8 ng/μL	19,5 ng/μL
4	124,3 ng/μL	15,9 ng/μL
5	111,4 ng/μL	16,9 ng/μL
6	306,1 ng/μL	
7	624,8 ng/μL	
8	323,1 ng/μL	
9	103 ng/μL	
10	252,5 ng/μL	
Promedio	230,3 ng/μL	16,54 ng/μL

Elaborado por: Las autoras

Tabla 2. Concentración Hongo 2 con los dos protocolos empleados en el estudio.

CONCENTRACIÓN		
Hongo 2		
N.º	Protocolo convencional	GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit
1	249 ng/μL	20,03 ng/μL
2	239,1 ng/μL	12,7 ng/μL
3	403,7 ng/μL	13,1 ng/μL
4	330,3 ng/μL	15,7 ng/μL
5	194,2 ng/μL	31,4 ng/μL
6	203,4 ng/μL	
7	189,9 ng/μL	
8	145 ng/μL	
9	147,8 ng/μL	
10	52,9 ng/μL	
Promedio	215,53 ng/μL	18,586 ng/μL

Elaborado por: Las autoras

Tabla 3. Concentración Hongo 3 con los dos protocolos empleados en el estudio

CONCENTRACIÓN		
Hongo 3		
N.º	Protocolo convencional	GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit
1	164,6 ng/μL	16,3 ng/μL
2	179,1 ng/μL	69,4 ng/μL
3	192,8 ng/μL	17,7 ng/μL
4	292,5 ng/μL	18 ng/μL
5	102 ng/μL	12,2 ng/uL
6	71,7 ng/μL	
7	102,5 ng/μL	
8	29,4 ng/μL	
9	145,9 ng/μL	
10	88,4 ng/μL	
Promedio	136,89 ng/μL	26,72 ng/μL

Elaborado por: Las autoras

Para evaluar la pureza se consideró el rango de absorbancia 260/280, que establece valores entre 1,8 a 2,0 para considerar una muestra pura. Si la cantidad obtenida es inferior a este valor puede que la muestra presente contaminación por fenol o por proteínas y en el caso contrario, si esta supera un valor de 2,0 se puede considerar la presencia de ARN (Alejos et al., 2014).

En una absorbancia a 230 nm, se puede percibir ciertos contaminantes como sales caotrópicas o carbohidratos por lo que dentro de la relación 260/230, los valores deben ir entre 1,8 a 2,2. Mientras más bajo sea el valor obtenido, mayor será la presencia de contaminantes y podría afectar la funcionalidad de la muestra (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020).

Tabla 4. Pureza protocolo convencional

N.º	Hongo 1		Hongo 2		Hongo 3	
	260/280	260/230	260/280	260/230	260/280	260/230
1	1,83	0,82	1,86	0,55	1,72	0,86
2	1,75	0,37	1,76	0,84	1,87	0,99
3	1,75	0,47	1,8	0,95	1,38	0,29
4	1,61	0,43	1,87	1,25	2,09	1,74
5	1,67	0,43	1,83	0,24	1,97	1,19
6	1,92	0,92	1,89	0,67	1,5	0,55
7	1,98	1,22	1,77	0,48	2,03	1,62
8	1,87	0,87	1,9	0,47	1,46	0,49
9	1,73	0,5	1,85	0,48	1,47	0,54
10	1,89	0,85	1,7	0,69	1,74	0,76
Promedio	1,8	0,688	1,823	0,662	1,723	0,903

Elaborado por: Las autoras

Tabla 5. Pureza protocolo Comercial

N.º	Hongo 1		Hongo 2		Hongo 3	
	260/280	260/230	260/280	260/230	260/280	260/230
1	1,9	0,17	1,85	0,11	1,77	0,08
2	1,81	0,21	1,78	0,11	3,9	0,65
3	1,74	0,14	1,88	0,07	1,82	0,04
4	1,71	0,09	1,79	0,1	1,67	0,12
5	1,77	0,08	1,57	0,12	1,66	0,11
Promedio	1,786	0,138	1,774	0,102	2,164	0,2

Elaborado por: Las autoras

El protocolo convencional y el protocolo comercial obtuvieron en su mayoría valores aceptables en el rango 260/280 de pureza siendo estos 1,8 y 1,78 para el hongo 1; 1,823 y 1,774 para el hongo 2; 1,723 y 2,164 para el hongo 3, sin embargo, en el rango 260/230, los resultados no fueron los esperados ya que estos no superaron el valor mínimo aceptable de 1,8 para ser considerados aptos, lo que evidenció la presencia de impurezas.

4.1.2 Evaluación de la eficiencia de los protocolos

El análisis estadístico para la comparación del rendimiento de los dos protocolos en concentración y pureza partió con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk independientemente para la variable de concentración, pureza y contaminación por carbohidratos.

Tabla 6. Pruebas de normalidad.

Variable	Hipótesis nula	Valor p	Decisión
Concentración	Distribución normal	3.85e-05	Se rechaza la hipótesis nula
Pureza	Distribución normal	5.19e-08	Se rechaza la hipótesis nula
Contaminación por carbohidratos	Distribución normal	0.002176	Se rechaza la hipótesis nula

Elaborado por: Las autoras

Se realizaron pruebas de hipótesis de dos muestras basadas en resultados de normalidad. Para las variables de concentración, pureza y contaminación por proteínas se obtuvieron valores de p menores a 0.05 que es el nivel de significancia, por lo que no se considera que los valores obtenidos cumplan una distribución normal. Por ese motivo se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon y se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: Las medianas son iguales.

Hipótesis alternativa: Las medianas son diferentes.

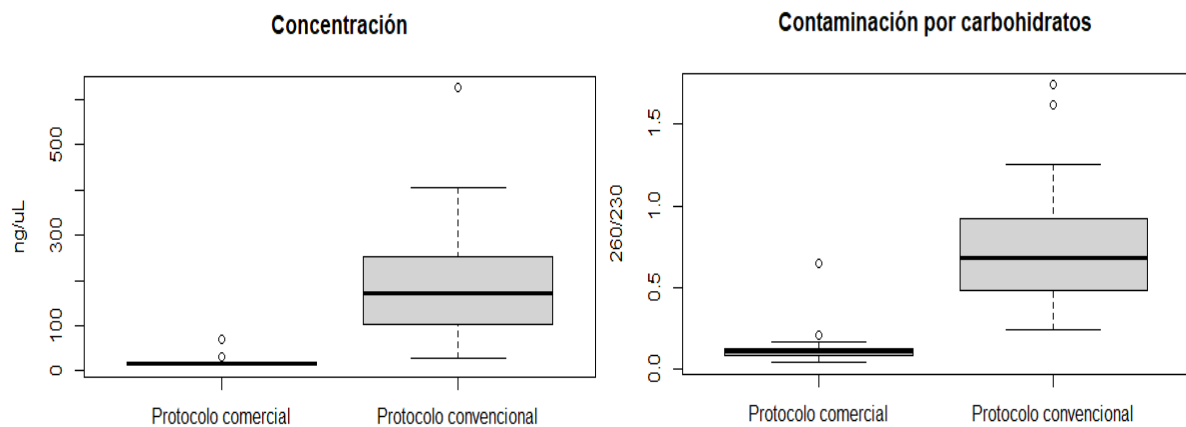
Tabla 7. Análisis de medianas con prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon

Variable	Hipótesis nula	Valor p	Decisión
Concentración	Las medianas son iguales	4.06e-11	Se rechaza la hipótesis nula
Pureza	Las medianas son iguales	0.457	Se acepta la hipótesis nula
Contaminación por carbohidratos	Las medianas son iguales	1,33E-03	Se rechaza la hipótesis nula

Elaborado por: Las autoras

Los valores de p obtenidos menores a 0.05 en las variables de concentración y contaminación por carbohidratos indican que si existe una variación significativa entre las medianas de los diferentes grupos de datos por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Figura 1. Comparación de la distribución de datos de los dos protocolos en la variable concentración y contaminación por proteínas.

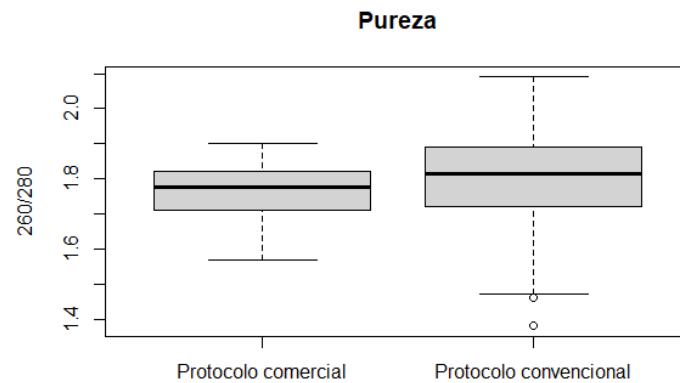


Elaborado por: Las autoras

En los diagramas de cajas de las variables de concentración y contaminación por carbohidratos se observan valores atípicos en el protocolo comercial y convencional, sin embargo, no se pueden considerar como un punto crítico al realizar las pruebas no paramétricas pues sus medianas no traslapan las cajas.

Lo contrario ocurre con la variable de pureza, donde el valor de p es mayor a 0.05, esto indica que no existe una diferencia significativa entre las medianas obtenidas por lo que se acepta la hipótesis nula.

Figura 2. Comparación de la distribución de datos de los dos protocolos en la variable pureza.



Elaborado por: Las autoras

En la gráfica de cajas de la pureza se muestra una dispersión ligeramente sesgada hacia arriba en el protocolo comercial y con una distribución uniforme en el protocolo convencional con la presencia de valores atípicos. Además, existe un traslape de cajas por lo que se dice que existe similitud entre los rangos de valores de los dos protocolos.

Los datos obtenidos de la concentración de ADN con respecto al protocolo comercial GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol presentan una variación significativa con respecto al estudio de Karaaslan y colaboradores (2014), en el cual evalúan la eficiencia de seis protocolos comerciales para extracción de ADN de plantas. Los resultados obtenidos por GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol presentan valores superiores a 90 ng/μL lo que supera en gran medida a los valores obtenidos en este estudio. Esta situación puede deberse principalmente a la diferencia existente entre estructuras celulares, pues al ser un protocolo para material vegetal, sus componentes pueden direccionarse a la degradación de celulosa y no de quitina presente en la estructura de los hongos. Otro aspecto a considerar es el pretratamiento utilizado, pues es un paso indispensable para una extracción de ADN eficiente. La guía de la casa comercial sugiere un pretratamiento con nitrógeno líquido, pero este se reemplazó por una lisis mecánica con micropistilos. Un tratamiento previo con nitrógeno líquido

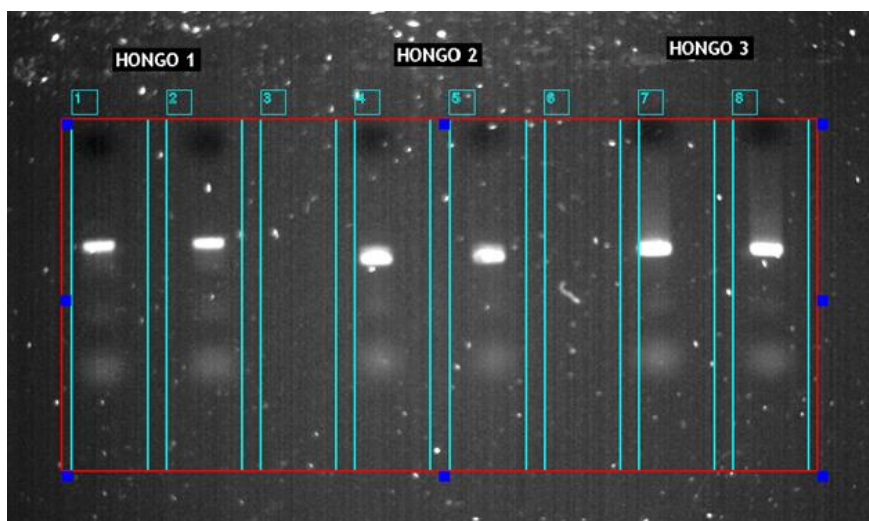
permite aumentar la concentración de ADN debido a la formación de cristales que perforan la pared celular dando paso a una liberación de ADN más eficiente. (De Armas et al., 2005).

4.2 Resultados de cualificación y amplificación de la región ITS

En base a los resultados de la cuantificación de ADN genómico se selecciona una muestra de cada hongo que cumpla con una excelente concentración y pureza en relación 260/280. Las tres muestras seleccionadas a partir del protocolo convencional fueron amplificadas para la región ITS1 e ITS4; de manera que la calidad de los amplicones de ADN extraído se evaluó por medio de un proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Con la migración de las bandas y en conjunto con un marcador de peso molecular con fragmentos de tamaño conocido se estimó el tamaño de los amplicones.

En la figura 4 se visualiza la presencia de bandas cada dos carriles correspondientes a cada hongo, esto como resultado de la amplificación por PCR de la región ITS, de igual manera en los carriles 7 y 8 se evidencia bandas con *smear* o degradación de ácido nucleico que corresponde al hongo 3.

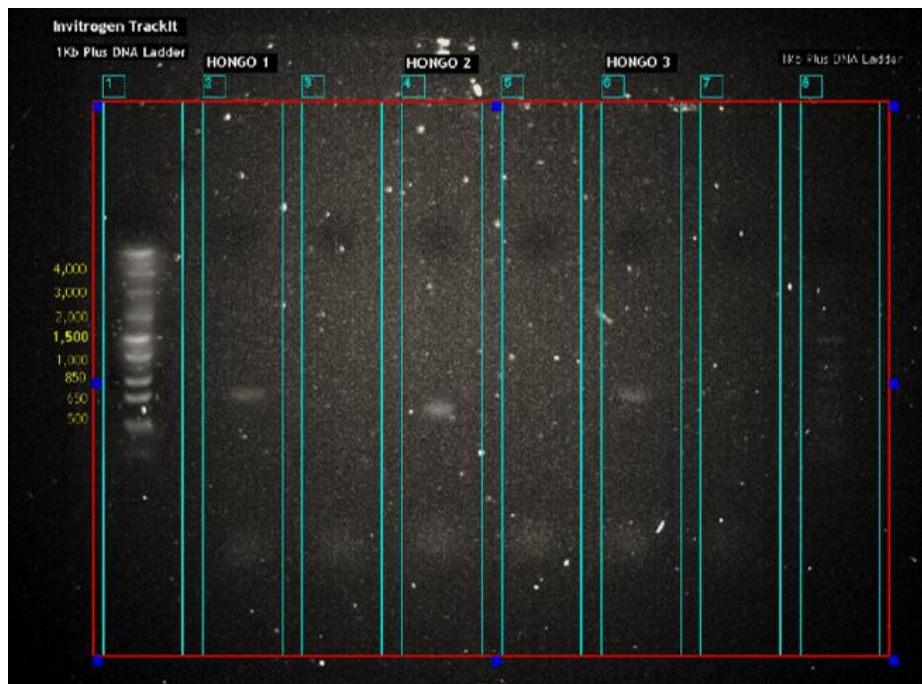
Figura 3. Electroforesis para verificar la calidad de los productos de PCR



Elaborado por: Las autoras

Para determinar el tamaño de los amplicones se emplea el TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder diseñada para determinar el tamaño de ADN de doble cadena en el rango de 100 pb a 15 000 pb con un fragmento intermedio de 1 500 pb. En la figura 5 se observa que al colocar el gel de agarosa bajo el E-Gel™ Imager existe bandas de baja intensidad, pero visibles en comparación con el marcador de peso molecular y como resultado los productos de PCR de la región ITS amplificada se detectaron bandas de alrededor de 600 pb.

Figura 4. Electroforesis para determinar el tamaño de amplicones de ADN en la región ITS empleando TrackIt™ 1 Kb Plus DNA como marcador molecular.



Elaborado por: Las autoras

En el análisis de la región ITS realizada por Fujita (2001) se encontraron fragmentos de entre 350 y 880 pb en la amplificación con los *primers* universales ITS 1 e ITS 4 dando prueba de la variabilidad en la región dependiendo de la especie y genero presentada. La amplificación del ADN extraído de los hongos en este estudio alcanzó valores de entre 600 a 650 pb que se encuentran dentro del rango presentado por Fujita. Además, en la amplificación del fragmento

amplificado en estudio sobre *Penicillium oxalicum* (Allende Molar et al., 2012), un hongo filamentoso del filo *Ascomycota*, presentó bandas de 590 pb y para un estudio con hongos filamentosos del género *Plectosphaerella* (Álvarez López et al., 2013), se presentaron bandas de 600 pb posterior a una PCR con primer IST1 e ITS 4, siendo estos valores cercanos a los fragmentos obtenidos de los tres hongos.

4.2.1 Análisis de la integridad de ADN en el gel de agarosa

Para que el ADN de una muestra sea íntegro, debe cumplir con ciertos criterios. Debe presentar una banda definida estrecha, si se encuentra fragmentada presentará una banda muy ancha o *smear* luminoso, no se puede considerar una muestra íntegra (Fierro, 2014). Según el Programa de Control de Calidad de Muestras de ADN y ARN (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020), hay cuatro criterios de validez para una muestra de electroforesis que se puntúan desde 3, siendo el valor más alto hasta llegar a 0 con una muestra totalmente degradada. Para que la muestra tenga una integridad alta, la banda debe estar bien definida en la parte superior del gel; si bien en el gel se visualiza la banda en la parte superior, pero presenta un ligero *smear*, podemos hablar de una muestra con integridad adecuada; en el caso de una muestra parcialmente degradada, no habrá banda definida y existirá un *smear* más concentrado en la parte superior; por último, en un ADN totalmente degradado el *smear* concentrado se encontrará en la parte inferior del gel.

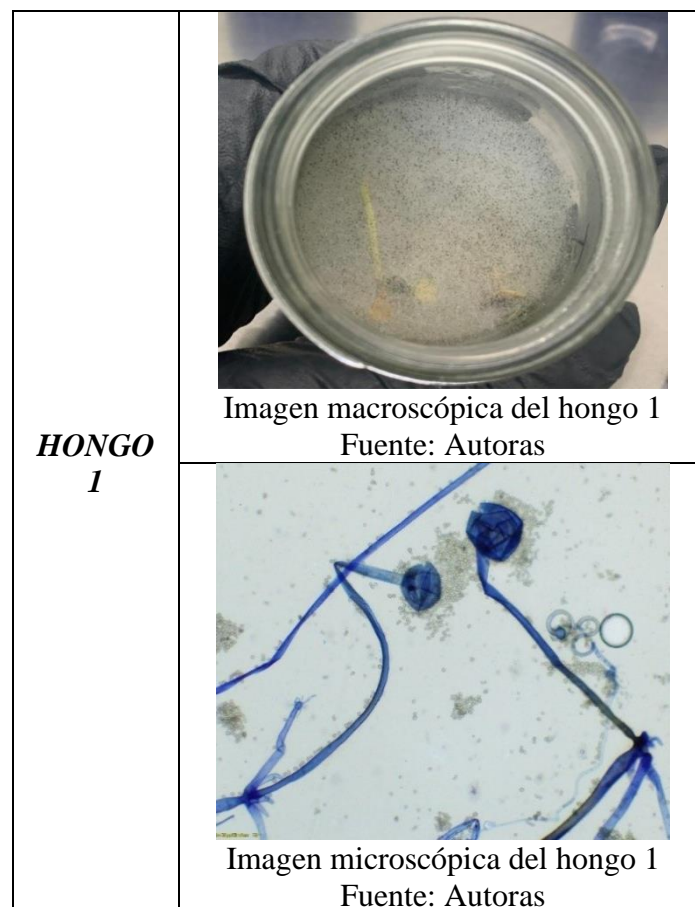
Con los parámetros mencionados, a las dos primeras muestras se le dio una puntuación de 3 ya que presentan bandas bien definidas, sin embargo, la tercera muestra obtuvo una puntuación de 2 pues presenta un ligero *smear* en la parte superior del gel.

4.3 Resultados de la Identificación

4.3.1 Observación de características morfológicas

La taxonomía de los hongos filamentosos se basa principalmente en criterios morfológicos, en este estudio para la identificación de las cepas se observaron sus características macroscópicas que consistieron en evaluar su forma, color, textura y tamaño; de igual manera se examinaron sus estructuras microscópicas que permiten la detección de estructuras características como esporocarpos, conidiósporas, conidióforos e hifas con presencia o ausencia de septos.

Figura 5. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 1



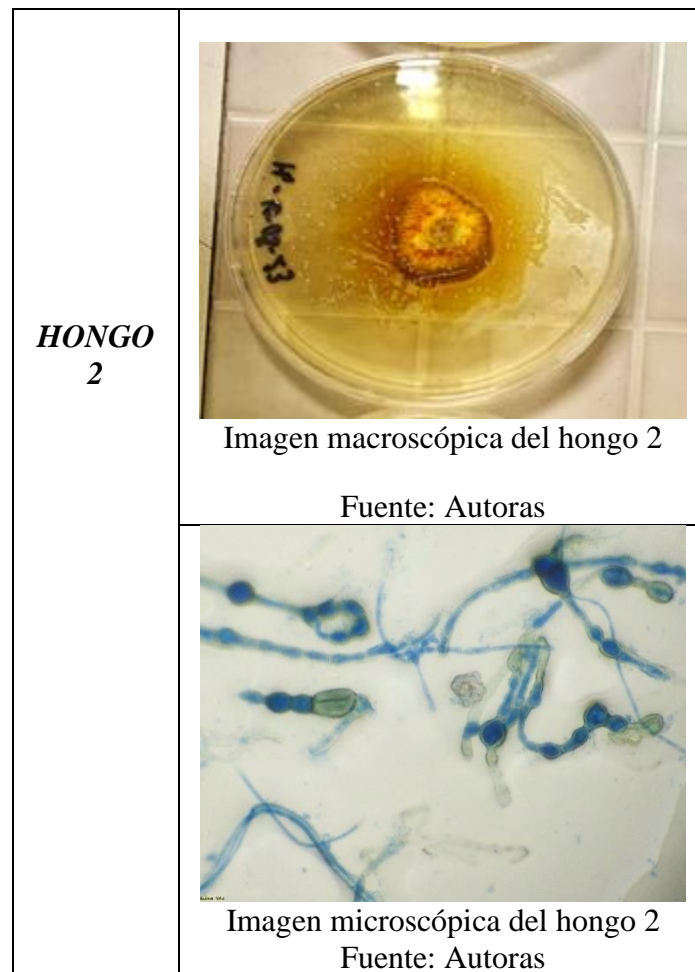
Características macroscópicas

Las colonias fueron de rápido crecimiento. A simple vista se pudo apreciar el micelio aéreo y de aspecto algodonoso blanco que presentaba al inicio y que posteriormente se tornó oscuro debido a la formación de endosporas.

Características microscópicas

Con el lente objetivo 10 x se observó que carece de hifas septadas, tiene los esporangióforos largos no ramificados naciendo de un rizoide, y también se distinguieron los esporangios esféricos gris pardo o negros y pequeñas esporas alrededor.

Figura 6. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 2



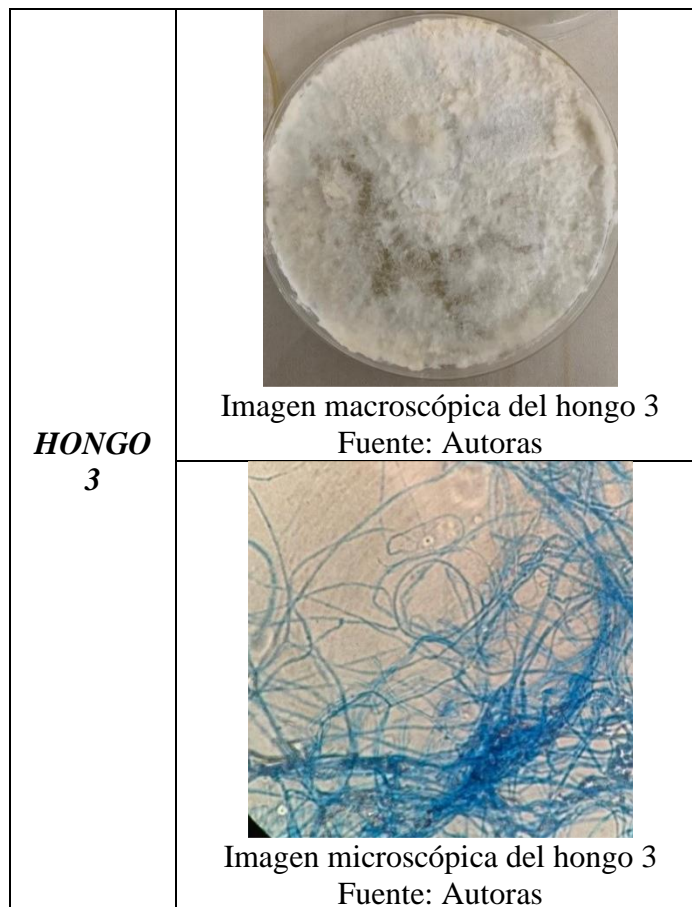
Características macroscópicas

Se aprecia un micelio aéreo denso de coloración brillante con tonos entre amarillo y marrón anaranjado que se oscurecieron posteriormente a una tonalidad marrón oscuro. Su textura inicial fue globulosa, al pasar los días la parte superior se volvió algodonosa.

Características microscópicas

Con objetivo de 60 x, se observaron conidios que nacen a partir de conidióforos cortos septados con ligeras ramificaciones generalmente en racimos con base ancha, formando clamidosporas globosas o cilíndricas en cadena intercalar.

Figura 7. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos del Hongo 3



Características macroscópicas

La colonia presentaba una coloración blanca amarillenta y mantenía un crecimiento acelerado, además su consistencia era algodonosa.

Características microscópicas

Se realizó un enfoque con un objetivo de 100 x, sin embargo, solo se pudo apreciar el micelio del hongo y no el resto de las estructuras.

En el trabajo actual se demostró mediante un análisis morfológico de las estructuras microscópicas que los microorganismos a evaluar están dentro del espectro de estudio, se confirmó estar trabajando con cepas de hongos filamentosos. De igual manera en función a su morfología se logró identificar al Hongo 1 con el género *Rhizopus* con características de ser una cepa de crecimiento rápido, tener un micelio algodonoso con puntos negros, sus estructuras como los esporangióforos y esporangios tiene forma y color indicado por Farrera y Zambrano (Farrera P et al., 2007). La cepa correspondiente al Hongo 2 se consideró que pertenece al género *Epicoccum*, debido a su particular morfología como poseer un micelio globuloso de color marrón anaranjado y características microscópicas como conidióforos cortos ramificados formando cadenas con base ancha que concuerdan con los resultados reportados en la literatura (Chen et al., 2017; Pitt y Hocking, 2009). La última cepa para evaluar no se pudo distinguir el género al que pertenece debido a que no se distinguieron estructuras en particular.

Una alternativa cuando hay dificultades en la evaluación de criterios morfológicos para la identificación de hongos es mediante análisis bioquímico enzimático o fisiológicos, que consiste en la capacidad de actividad enzimática que tiene las cepas las cuales varían entre cada especie, dependiendo del número, tipo y posición de los dominios catalíticos y de unión al sustrato (Kobayashi et al., 2002); no obstante, el análisis con este tipo de pruebas son aplicados sin excepción para levaduras (Arenas Guzmán, 2014) por tal motivo se decide la aplicación de pruebas moleculares para la identificación más precisa de las cepas a estudiar.

4.3.2 Criterios de validación para la elección de muestras secuenciación de muestras

A demás de los valores mínimos de pureza que debe presentar una muestra de ADN, la concentración debe también tener un valor mínimo para que el proceso de secuenciación tenga éxito. En el protocolo de preparación de muestra para envío a secuenciación -caso Macrogen-

(Cadavid y Gómez, 2018) se recomienda que la concentración para muestras purificadas sea de 50 ng/μg y para muestras no purificadas 100 ng/μg para asegurar la calidad de la secuenciación de los amplicones. Por ese motivo se plantearon los criterios para la aceptación o el descarte de las muestras de ADN obtenidas de cada protocolo.

Para la validación se tomaron los datos del promedio de cada protocolo y el respectivo hongo. La evaluación se dio de manera cualitativa mediante afirmación (+) y negación (-).

Tabla 8. Evaluación de muestras extraídas con protocolo convencional.

Parámetro	Criterio de validez	Validación		
		H1	H2	H3
Concentración	Presenta una concentración mínima de 50 ng/μL	(+)	(+)	(+)
Pureza	En el rango 260/280 los valores se encuentran entre 1,8 a 2,0	(+)	(+)	(-)
Contaminación por carbohidratos	En el rango 260/230 los valores se encuentran entre 1,8 a 2,2	(-)	(-)	(-)

Elaborado por: Las autoras

Tabla 9. Evaluación de muestras extraídas con protocolo comercial.

Parámetro	Criterio de validez	Validación		
		H1	H2	H3
Concentración	Presenta una concentración mínima de 50 ng/μL	(-)	(-)	(-)
Pureza	En el rango 260/280 los valores se encuentran entre 1,8 a 2,0	(-)	(-)	(-)
Contaminación por carbohidratos	En el rango 260/230 los valores se encuentran entre 1,8 a 2,2	(-)	(-)	(-)

Elaborado por: Las autoras

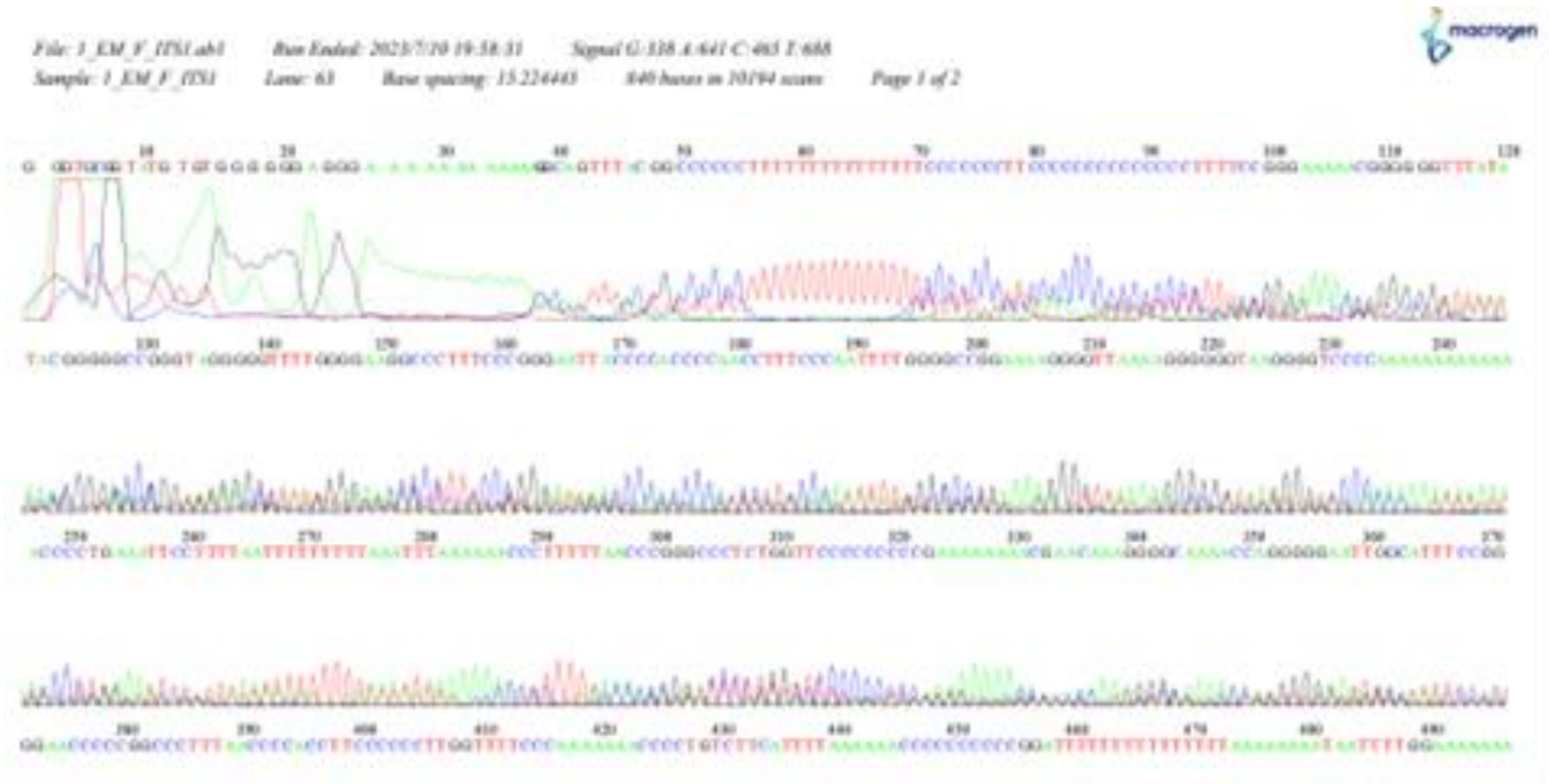
Después de la evaluación se seleccionaron muestras extraídas con el protocolo convencional para el hongo 1 y el hongo 2, pero en el caso del hongo 3 se evaluó cada muestra para encontrar una que cumpla con los requisitos necesarios para la secuenciación.

Para la validación de la muestra se consideró indispensable que cumpla con el criterio de concentración y pureza. No se consideró el criterio de contaminación por carbohidratos debido a los valores bajos obtenidos en el protocolo comercial y el convencional, por este motivo se contrató el servicio de secuenciación más purificación para eliminar cualquier residuo que haya presentado la muestra.

4.3.3 Identificación molecular de hongos

Una vez recibido los resultados de secuenciación de Sanger de las 3 cepas enviadas se procedió hacer un chequeo de las secuencias base por base y observar que tenga relación con su electroferograma, para este proceso se utilizó el programa de alineación de secuencias múltiples Clustal Omega, que por medio de una edición y limpieza de las secuencias permite eliminar o definir bases de ADN erróneas; de manera que se obtuvo una secuencia consenso al alinear las dos secuencias *forward* y *reverse*. En la figura 3 se muestra un ejemplo de electroferograma obtenido de una secuencia con el *primer ITS1*.

Figura 8. Electroferograma del hongo aislado 1_EM_F ITS1.



Fuente: Macrogen, Corea del Sur

Se realiza un análisis Blast de las secuencias obtenidas frente a la base de datos de acceso libre NCBI, recopilando información sobre la secuencia buscada que se alinea con la secuencia encontrada; indica el nombre científico del microorganismo con un mayor grado de identidad de

secuencia y el *E-value*. De igual manera se examina la filogenia de cada uno de los hongos lo que nos permite apreciar la comparación de organismos muy distantes y como se encuentran emparentadas con especies cercanas.

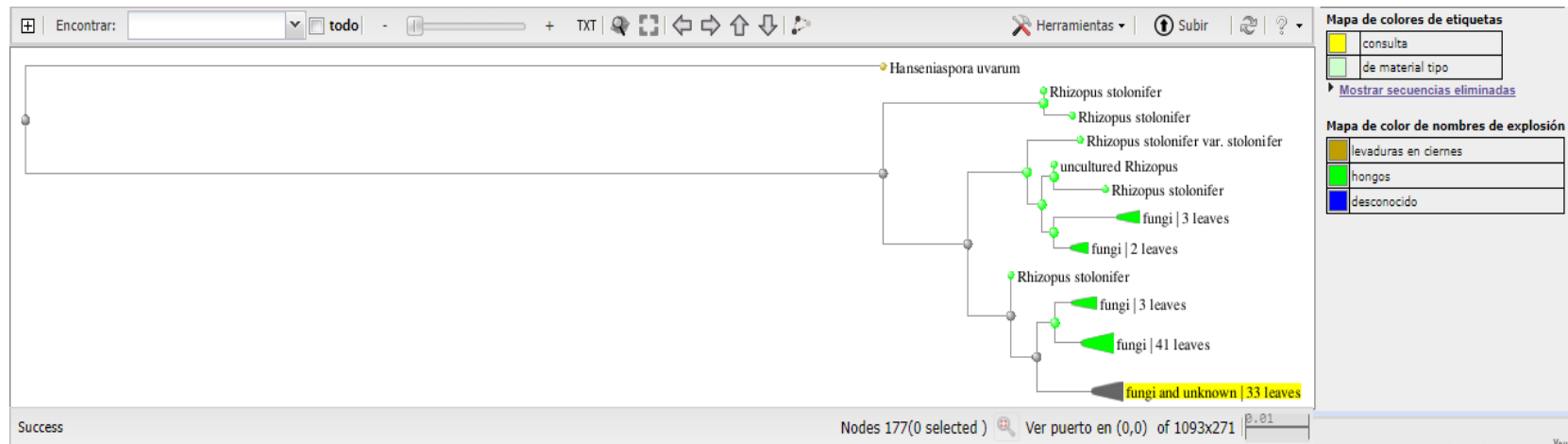
Se identificó que la muestra *Hongo 1* puede estar formado por la especie *Rhizopus stolonifer* con un porcentaje de identidad de 87,92%. En la figura 4 se observa los alineamientos más significativos para la identificación de la cepa, los valores de identidad y *E-value* de la secuencia del *Hongo 1*.

Figura 9. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso de Hongo 1.

	Description	Scientific Name	Taxid	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizopus stolonifer isolate AR1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete ...	Rhizopus stolonifer	4846	990	55%	0.0	87.92%	MF461020.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizopus stolonifer isolate AR4 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete ...	Rhizopus stolonifer	4846	966	55%	0.0	87.22%	MF461023.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizopus stolonifer isolate AR7 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete ...	Rhizopus stolonifer	4846	919	53%	0.0	86.76%	MF461026.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizopus stolonifer isolate AR6 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete ...	Rhizopus stolonifer	4846	891	54%	0.0	86.14%	MF461025.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizopus stolonifer isolate AR2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete ...	Rhizopus stolonifer	4846	884	52%	0.0	86.02%	MF461021.1

Fuente: Blast NCBI

Figura 10. Árbol filogenético de la especie *Rhizopus stolonifer*.



Fuente: Blast NCBI

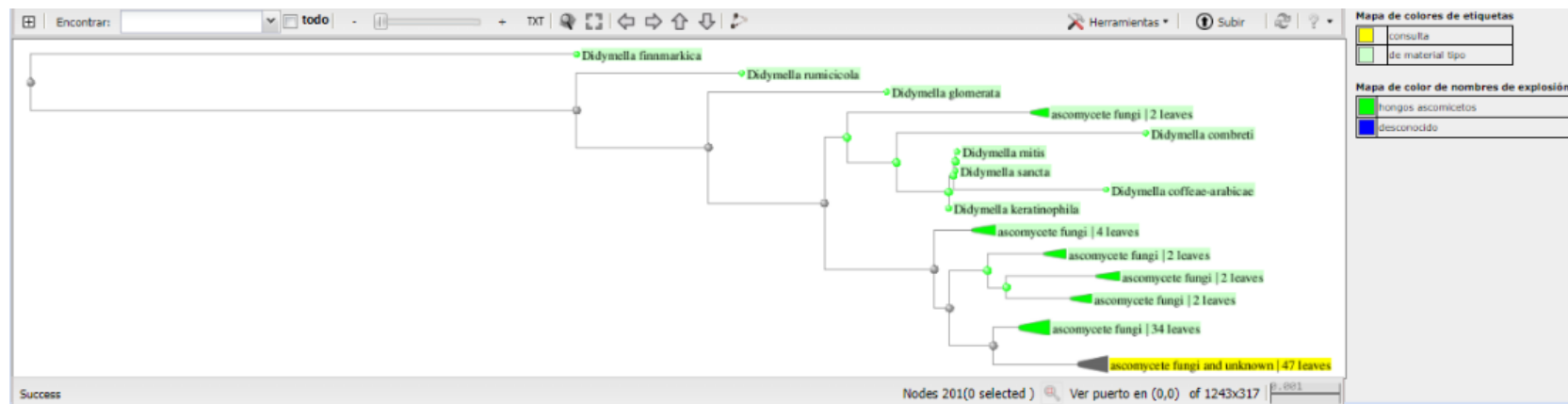
De la misma forma se identificó la muestra *Hongo 2* como *Epicoccum italicum* con un porcentaje de identidad de 99,79%. La muestra *Hongo 3* se reconoció como *Trametes hirsuta* con un 97,48% de identidad. En las figuras 5 y 6 se observa los alineamientos más significativos para la identificación de las cepas, el porcentaje de similitud y E-value de las secuencias de *Hongo 2* y *Hongo 3* respectivamente.

Figura 11. Listado de organismos y la similitud con la secuencia consenso de Hongo 2.

	Description	Scientific Name	Taxid	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Epicoccum italicum CGMCC 3.18361 ITS region; from TYPE material	Epicoccum italicum	2021036	846	39%	0.0	99.79%	NR_158264.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Epicoccum phragmospora CGMCC 3.19339 ITS region; from TYPE material	Epicoccum phragmospora	2598770	834	25%	0.0	97.21%	NR_165920.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Epicoccum dendrobii CGMCC 3.18359 ITS region; from TYPE material	Epicoccum dendrobii	2021033	814	39%	0.0	98.31%	NR_158261.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Epicoccum keratinophilum UTHSC DI16-271 ITS region; from TYPE material	Epicoccum keratinophilum	2301245	813	24%	0.0	97.74%	NR_158278.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Didymella keratinophila UTHSC DI16-200 ITS region; from TYPE material	Didymella keratinophila	2301244	811	24%	0.0	97.53%	NR_158275.1

Fuente: Blast NCBI

Figura 12. Árbol filogenético de la familia *Didymillaceae* para la especie *Epicoccum italicum*.



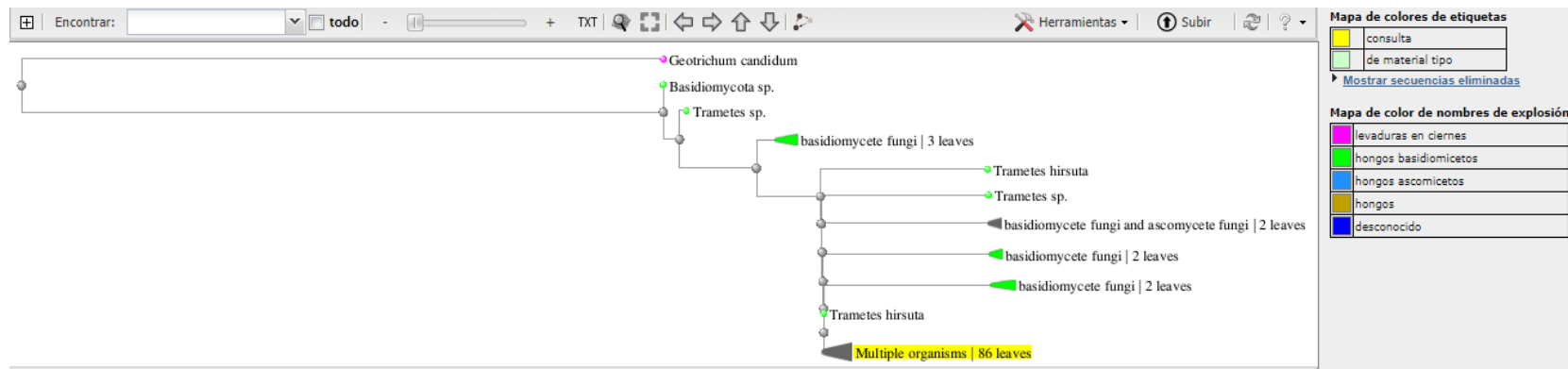
Fuente: Blast NCBI

Figura 13. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso de Hongo 3.

	Description	Scientific Name	Taxid	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Trametes hirsuta strain MFYC13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Trametes hirsuta	5327	1065	62%	0.0	97.48%	OK184590.1
✓	Trametes hirsuta isolate Rubia plants small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Trametes hirsuta	5327	1042	61%	0.0	99.16%	MN826454.1
✓	Trametes hirsuta strain FWJ10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal...	Trametes hirsuta	5327	1042	61%	0.0	99.16%	OK184569.1
✓	Trametes hirsuta strain MFFC14 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Trametes hirsuta	5327	1041	62%	0.0	98.99%	OK184580.1
✓	Trametes hirsuta strain WZ-219 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Trametes hirsuta	5327	1039	61%	0.0	99.49%	MN856345.1

Fuente: Blast NCBI

Figura 14. Árbol filogenético de la especie *Trametes hirsuta*.



Fuente: Blast NCBI

Los resultados del análisis morfológico básico apoyarán la identificación molecular para determinar las especies a las que pertenecen las tres cepas. En el Hongo 1 se tiene un porcentaje de identidad de 87,92%; de acuerdo con los parámetros aceptables para la identificación de un microorganismo desarrollados por la Universidad Autónoma de Madrid (2009), debe tener valores del 97 al 100% para identificar su especie, caso contrario, si los valores se encuentran fuera de ese rango solo se inferirá en el género al que pertenece (Paredes Morales y Yugsi Vargas, 2016) de manera que, solo se logró determinar que el Hongo 1 pertenece al género *Rhizopus* concordando con la identificación morfológica previamente realizada. Este valor de porcentaje de identidad fuera de rango puede deberse a que durante la secuenciación haya existido ruido de fondo posiblemente producido por contaminación con otro ADN o por algún primer que se usa para PCR, por tal motivo al realizar una edición o limpieza de secuencias se reduce su longitud de modo que el porcentaje de similitud disminuye. Si comparamos el listado de organismos y analizamos la filogenia del Hongo 1 podemos observar cómo especies como *R. stolonifer* tienen caracteres compartidos, lo que permite agrupar las especies debido a un ancestro en común; pudiendo inferir que la especie identificada posiblemente pertenezca a la especie *Rhizopus stolonifer*.

A diferencia del Hongo 2 que tiene un porcentaje de identidad de 99,79%, comparando con los parámetros establecidos anteriormente, se determinó que corresponde a la especie *Epicoccum italicum*, en cuanto a la identificación morfológica podemos afirmar que existió una coincidencia en cuanto a su género. Al analizar la filogenia determina que la especie *E. italicum* pertenece a la división de hongos *Ascomycota* y forma parte de la familia *Didymellaceae*, gracias a estudios recientes sobre la taxonomía de dicha familia, se reconoce la delimitación de nuevos géneros entre ellos *Epicoccum* (Chen et al., 2017) de manera que la asignación de género se basa de acuerdo con su relación evolutiva y caracteres compartidos como se muestra en la figura 12.

Finalmente, para el Hongo 3 se identificó que pertenece a la especie *Trametes hirsuta* por su 97.48 % de porcentaje de identidad, de manera que hubo una coincidencia en la identificación morfológica y molecular hasta el nivel género; de acuerdo con las características macroscópicas del micelio anteriormente descrito y con la literatura, este género hongo se caracteriza por ser degradadoras de lignina causantes de las pudriciones blancas en la naturaleza como mencionan (Cruz Muñoz et al., 2015 y Malik et al., 2020) y analizando su filogenia se determina que la especie *T. hirsuta* pertenece a la división de hongos *Basidomycota*.

CAPITULO 5

**CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

5.1 Conclusiones

En este estudio se identificaron tres cepas fúngicas aisladas de cultivos *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal mediante técnicas moleculares de extracción, amplificación y secuenciación del ADN para caracterizar las especies de hongos.

Se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN utilizando los valores de concentración y pureza de las muestras, obteniendo mejores resultados en el protocolo convencional, sin embargo, no se debe descartar el uso del protocolo comercial ya que con un mejor pretratamiento puede presentar mejores resultados.

El conjunto de técnicas moleculares proporcionó una alta precisión y especificidad para la identificación de hongos, mediante la amplificación por PCR dirigida al espacio transcrito interno (ITS), se pudo presenciar bandas de moderada intensidad y se logró obtener fragmentos de alrededor de 600pb.

La secuenciación nos proporciona una resolución taxonómica más detallada que nos permite distinguir especies estrechamente relacionadas. Mediante la técnica de secuenciación de Sanger y la herramienta bioinformática Blast del NCBI se pudo identificar a las especies *Rhizopus stolonifer*, *Epicoccum italicum* y *Trametes hirsuta*.

En base a los resultados obtenidos podemos demostrar la eficacia de las técnicas moleculares en el campo de la identificación de hongos, superando así a técnicas convencionales como el estudio morfológico y contribuyendo a una mejor comprensión de la diversidad fúngica. Además, este estudio ha brindado la base principal para una futura elaboración de protocolos de desinfección de explantes para cultivo *in vitro*, en los que se deberá hacer énfasis en las características específicas de estos microorganismos para evitar la contaminación en próximos proyectos del área de Biotecnología Vegetal.

5.2 Recomendaciones

Para futuras investigaciones, se recomienda que, se realice una desinfección correcta para evitar confusiones al momento de la identificación morfológica y que se analice la pureza de las cepas utilizadas; esto puede ayudarse mediante pruebas bioquímicas que evalúen su etapa de desarrollo, estado sexual, metabolismo y fisiología.

Para asegurar la recolección del material a analizar, se deben seguir con precisión los pasos especificados por los protocolos de extracción; de igual manera se deben aplicar métodos de limpieza para evitar la contaminación de las muestras por agentes externos. Además, es necesario realizar la experimentación con una mayor cantidad de muestras para observar el comportamiento del kit comercial.

Se recomienda como método experimental el uso de diferentes combinaciones de *primers* al usado en este estudio (ITS1 y ITS4), para determinar si existe alguna diferencia o si presenta mayor porcentaje de similitud para la identificación de hongos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Flores, C. S. (2019). Confirmación de variantes detectadas por secuenciación de Nueva Generación en diferentes tipos de tumores sólidos de Guatemala por medio de Secuenciación de Sanger. <https://repositorio.uvg.edu.gt/static/flowpaper/template.html?path=/bitstream/handle/123456789/3430/COR1%20Informe%20final%2003022020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alejandro, B., Cabrera, O., & Delgado Fernández, M. E. (2017). “SISTEMATIZACIÓN DEL CEPARIO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA.”
- Allende Molar, R., Alejandra, P., Muñoz, P., Zequera, I. M., Armando, J., Fasio, C., Saúl, R., Estrada, G., Félix, J. L., Molar, A., Zequera, M., & Félix, L. (2012). Morphological and Molecular Identification of *Penicillium oxalicum* Causing Stem and Fruit Rot in Tomato. *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA*/13. *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA*, 31, 12–19.
- Álvarez López, C. L., Osorio Vega, N. W., & Marín Montoya, M. (2013). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA EN COLOMBIA. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 18, Issue 2). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
- Arellano, A. C., Korneva, S. B., Fischer, F. C., Cabanilla, L., Tola, N., Ochoa, A., Ramos-Leal, M., Pincay, A., & para correspondencia, A. (2009). Micropropagación de caña de azúcar en Ecuador. In *Comunicación Corta Biotecnología Vegetal* (Vol. 9, Issue 4).
- Arenas Guzmán, R. (2014). *Micología Medica Ilustrada*.
- Avilés Guzmán, M. C., & Granja Valle, G. F. (2014a). IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS MICROSCÓPICOS OBTENIDOS EN CULTIVOS

COMERCIALES ENFERMOS, EN LA REGIÓN INTERANDINA CENTRO-NORTE DEL ECUADOR EN EL PERÍODO 2011-2012 ALTUNAQUITO, 2014.

Avilés Guzmán, M. C., & Granja Valle, G. F. (2014b). IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS MICROSCÓPICOS OBTENIDOS EN CULTIVOS COMERCIALES ENFERMOS, EN LA REGIÓN INTERANDINA CENTRO- NORTE DEL ECUADOR EN EL PERÍODO 2011-2012. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8763/PONTIFICIA%20UNIVERSIDAD%20CAT%20LICA%20DEL%20ECUADO1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Barragán, A., Flores, V., Cristóbal López, C., Concepción, G., Córdova, R., Ángel, J., Ramírez, R., Azahel, A., & De, F. (2010). ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

BLAST. (2023). National Library of Medicine. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Cadavid, I., & Gómez, G. (2018). Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación (Caso Macrogen). In *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* (pp. 127–134). <https://dspace.tdea.edu.co/bitstream/handle/tdea/1478/Protocolo%20de%20preparaci%C3%B3n%20de%20muestras%20para%20env%C3%ADo%20a%20secuenciaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Carlos, M., Saparrat, N., Ruscitti, M. F., & Arango, M. C. (2020). Micorrizas arbusculares.

Carranza Díaz, Z. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. <http://200.57.56.70:8080/xmlui/handle/231104/167>

- Carrillo, L. (2005). LOS HONGOS DE LOS ALIMENTOS Y FORRAJES. Universidad Nacional de Salta.
- Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, 87, 105–159. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>
- Collantes, G., Melo, C., & Candia, A. (1990). Micropropagación clonal, una alternativa biotecnológica en el cultivo de macroalgas marinas chilenas de importancia económica.
- Conde Ferráez, L., Canto Canché, B., & James, A. (2004). La vida sexual de los hongos (y su clave molecular).
- Cornejo, F. (2014). Diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia de Loja, Ecuador, 2013. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7043/101.B03.000625.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., Villanueva Arce, R., Acueducto, A., & La Laguna Ticomán, B. (2015). *Pycnopus sanguineus* PIGMENT PRODUCTION ON SOLID MEDIA.
- De Armas, Y., Rodriguez, M., & Bisset, J. (2005). Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 31.
- Del Valle, C. (2002). COMPARACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE RESTOS OSEOS.
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>

- Estrada Basaldua, J. A. (2010). Morfogénesis in vitro, identificación y control de hongos contaminantes y efecto de rayos gamma en nardo (*Polianthes tuberosa* L.).
- Estrada Salazar, G. I., & Ramírez Galeano, M. (2019). *Micología general*. Centro Editorial Universidad Católica de Manizale.
- Farrera P, R., Zambrano V, A., & Ortiz M, F. (2007). Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. In *Revista de la Facultad de Agronomía* (Vol. 24, Issue 2). 2000. Universidad del Zulia. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ferrari Gutiérrez, Ó. (2020). PCR: historia de una (r)evolución biomédica. https://www.savnet.cl/mundo-medico/reportajes/pcr-historia-de-una-revolucion_biomedica.html
- Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (1st ed., Vol. 1, pp. 27–50).
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3617–3622. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>
- Gómez Daza, F. (2014). Características generales de los hongos.
- Gómez Guirao, A. (2020). CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CON POTENCIAL ANTIFUNGICO.

- Gontia-Mishra, I., Tripathi, N., & Tiwari, S. (2014). A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. In *Indian Journal of Biotechnology* (Vol. 13).
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), 6–15. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Guarro, J. (2011). *Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos*. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X11003016>
- Gutiérrez Martín, S. (2017). LOS HONGOS FILAMENTOSOS: LOS HONGOS FILAMENTOSOS: HISTORIA DE UN ÉXITO HISTORIA.
- Gutiérrez-Venegas, G., Sánchez-García, S., Golzarri-Moreno, A., Ramírez Peralta, A., & Hernández Bermúdez, C. (2014). Molecular biology protocols assessment in the Biochemistry subject of the National School of Dentistry, National University of Mexico (UNAM). https://www.scielo.org.mx/pdf/rom/v18n2/en_v18n2a7.pdf
- Haarkotter, C. (2019). La cuantificación como herramienta de optimización en el análisis de ADN mitocondrial en restos óseos antiguos.
- Hongos Necesidades Fisiologicas. (2014). <https://www.clubensayos.com/Ciencia/Hongos-Necesidades-Fisiologicas/1632211.html>
- INVITROGEN. (2016). SYBR™ Safe DNA Gel Stain | 2.
- Karaaslan, Ç., Akel, H., Ünlü, S., Perçin, I., & E T, Ö. Z. (2014). Comparison of Six Commercial DNA Extraction Kits for DNA Extraction from Wheat *Buğdaydan* DNA

- Ekstraksiyonu için Altı Ticari DNA Ekstraksiyon Kitinin Karşılaştırılması. In Hacettepe J. Biol. & Chem (Vol. 42, Issue 3).
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. In *Biochimie* (Vol. 197, pp. 130–143). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J. A., & Oudemans, P. V. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1047–1054. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1047-1054.2002>
- LABSTER THEORY. (2021). Cuantificación del ácido nucleico - Labster Theory. <https://theory.labster.com/rna-quantification-es/>
- Longoria, K. (2018). Fundamentos de Nanodrop.docx - Fundamentos de Nanodrop y fluorógenos Los ácidos nucleicos absorben luz a una longitud de onda de 260 nm. Si una fuente de | Héroe del curso. <https://www.coursehero.com/file/29352292/Fundamentos-de-Nanodropdocx/>
- López de la Mora, D. A., & Sandoval Rodríguez, A. S. (2013). Electroforesis | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=1027437>
- 71
- Lugo, M., & Montalvo, C. (2019). ELECTROFORÉISIS: FUNDAMENTOS, AVANCES Y APLICACIONES. *EPISTEMUS*, 48–54.

Malik, A., Butt, T. A., Naqvi, S. T. A., Yousaf, S., Qureshi, M. K., Zafar, M. I., Farooq, G., Nawaz, I., & Iqbal, M. (2020). Lead tolerant endophyte *Trametes hirsuta* improved the growth and lead accumulation in the vegetative parts of *Triticum aestivum* L. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04188>

Mancera, P. (2020). CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS.

Martí Solé, M. del C., Alonso Espadalé, R. M., & Constans Aubert, A. (1998). NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos.

Mas, E., Poza, J., & Ciriza, J. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Aquea*, 15. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139/128>

MERCK. (2022). GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol (G2N10, G2N70, G2N350).

Merck KGaA. (2017). User Guide GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.

Muñoz Huerta, V., Meléndez Salcido, C. G., Puentes Gurrola, F., Parada Sánchez, S., & Cruz Ochoa, N. I. (2016). *Micología media-Reproducción asexual*.

Orellana Canedo, Z. (2019). OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL “qPCR” PARA LA CUANTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO FRESCO. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/22945/TE-1954.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Original, A., Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., & Mayta-Huatuco, E. (2018). COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE

ADN DE *Giardia* spp. MEDIDOS POR PCR CONVENCIONAL . Rev Peru Med Exp Salud Publica , 423–424. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4160>

Paredes Morales, M. F., & Yugsi Vargas, I. E. (2016). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE LEVADURAS CON CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA ALCOHÓLICA AISLADAS DE PITAHAYA (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber).

Peñañiel, D. (2023). Evaluación de dos protocolos convencionales para la extracción de ADN humano a partir de hisopados bucales.

Perez, A. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Pérez, A., & Gómez, L. (2018). Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. In *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* (pp. 163–169).

Pérez, M. L. (2016). Caracterización de microorganismos contaminantes en sistemas de micropropagación de yerba mate (*Ilex para guariensis*).

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

Ramirez, S., Palacios, A., Osuna, F., Kanul, J., Garcia, F., Ornelas, K., & Landa, P. (2017). MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED TO *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch EXPLANTS PRODUCED in vitro (Vol. 10).

Reyes, C. A. (2000). Fitopatología General-Guías de Apoyo CAPÍTULO III HONGOS FITOPATÓGENOS.

Romero, E., Melendres, K. P., Ángel, L., & Polo, T. (2018). CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE HONGOS.

- Ruiz, V., Garrote, H., Diaz, C., & Fernández, L. (2017). Electroforesis capilar para el análisis de marcadores oncohematológicos en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 33.
- Seifert, K. A., Samson, R. A., DeWaard, J. R., Houbroken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J. M., Louis-Seize, G., & Hebert, P. D. N. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 3901–3906. https://doi.org/10.1073/PNAS.0611691104/SUPPL_FILE/11691DATASET3.PDF
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro.
- Sigma-Aldrich. (2017). User Guide GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.
- Sofian, C.-A., & Montes Palma, L. (2017). DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL Extracción de ADN de los dientes.
- Tabatabaei, M. S., Islam, R., & Ahmed, M. (2021). Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1143, 250–266. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.08.030>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2, 70–78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tapia, F. (2023). Taq polimerasa: historia, características y aplicaciones.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* 9a EDICION.

- Uribarren Berrueta, T., Bazán Mora, E., & Castañón Olivares, L. (2016). *Micología Generalidades*.
- Urrea-Trujillo, A. I., Canal, A., & Monsalve-F, Z. I. (2011). MICROPROPAGACIÓN E INDUCCIÓN DE ÓRGANOS DE ALMACENAMIENTO en *CurCumA longA L*. MICROPROPAGATION AND INDUCTION OF STORAGE ORGANS IN CURCUMA LONGA L. In *Actual Biol* (Vol. 33, Issue 94).
- Valderrama, J., Ortigosa, F., & Cañas, R. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA*, 13, 19–25.
- Wilkin, D. (2021). 8.9 Estructura de los Hongos-Conceptos *Biología*. <https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-conceptos-biologia/section/8.9/primary/lesson/estructura-de-los-hongos/>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR past, present and future . *BioTechniques*, 69(4), 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

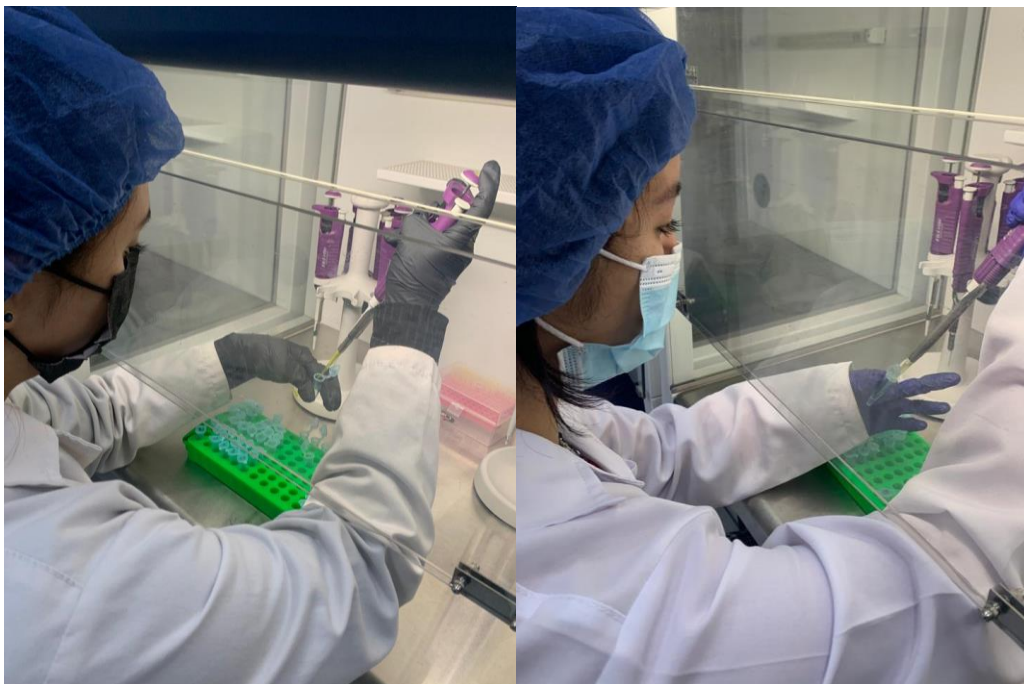
ANEXOS

Figura 15. Elaboración de medios de cultivo PDA.



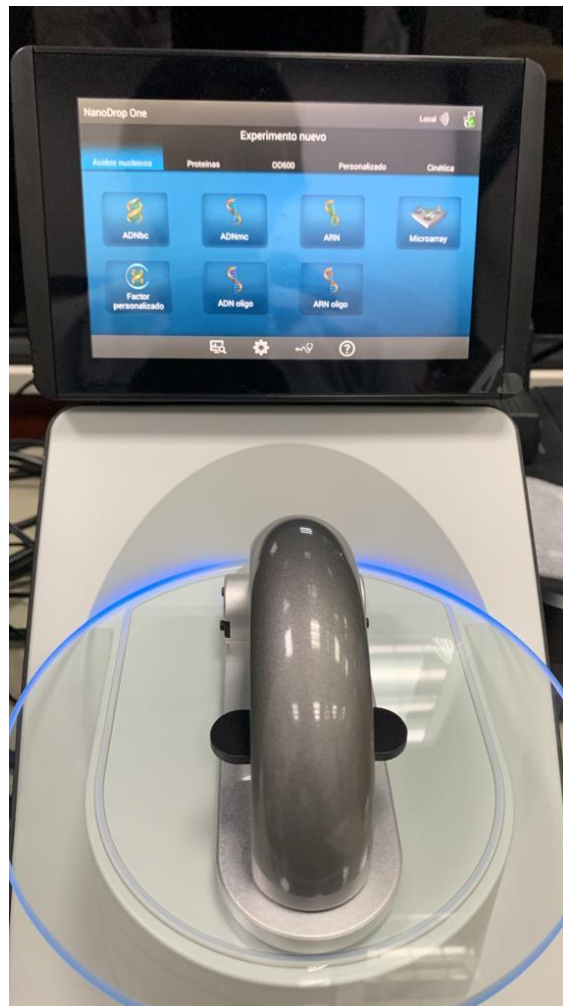
Fuente: Las autoras

Figura 16. Desarrollo de los protocolos de extracción de ADN.



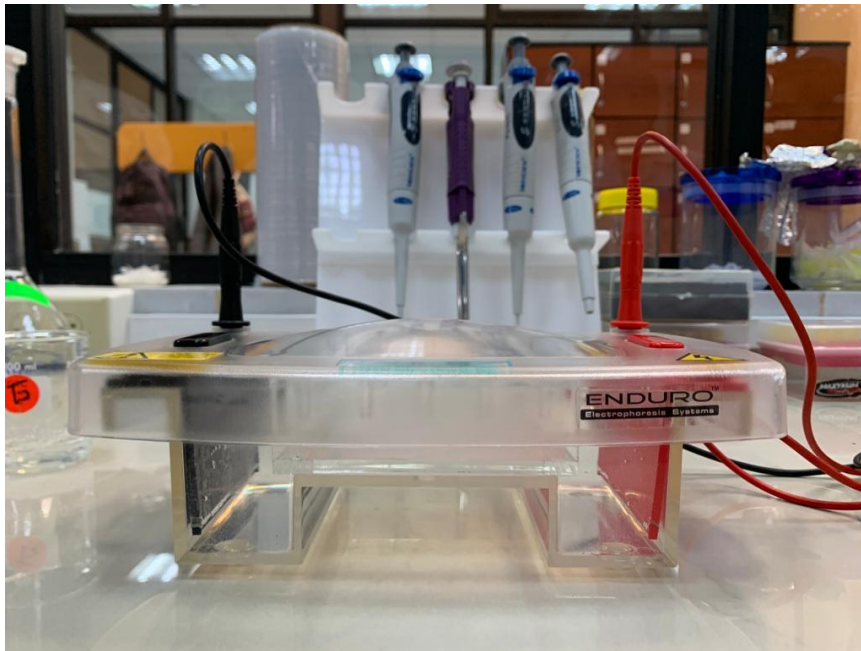
Fuente: Las autoras

Figura 17. Medición de concentración y pureza



Fuente: Las autoras

Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR.



Fuente: Las autoras

Figura 19. Empaquetamiento de muestra seleccionadas para enviar a secuenciar.



Fuente: Las autoras