

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE”

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración.

Autor: José Gabriel Terán Gutiérrez

Tutor: Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz

Fecha: 15 de marzo de 2024



Índice de Contenidos



Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda "El Prado" - IASA I

I. Introducción

II. Objetivos e Hipótesis

III. Materiales y Métodos

IV. Resultados y Discusión

V. Conclusiones y Recomendaciones



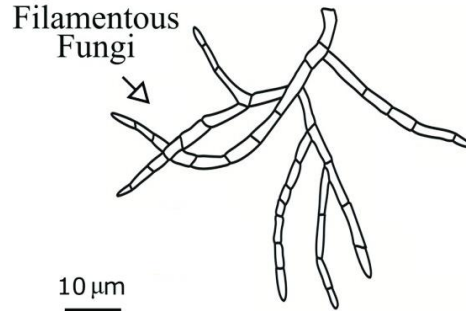
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

I. Introducción

Marco Referencial

Reino: Fungi

2.2 a 3.8 millones de especies (~ 5% descrito)



Eucariotas
quimioheterótrofos

Con pared celular de quitina o celulosa

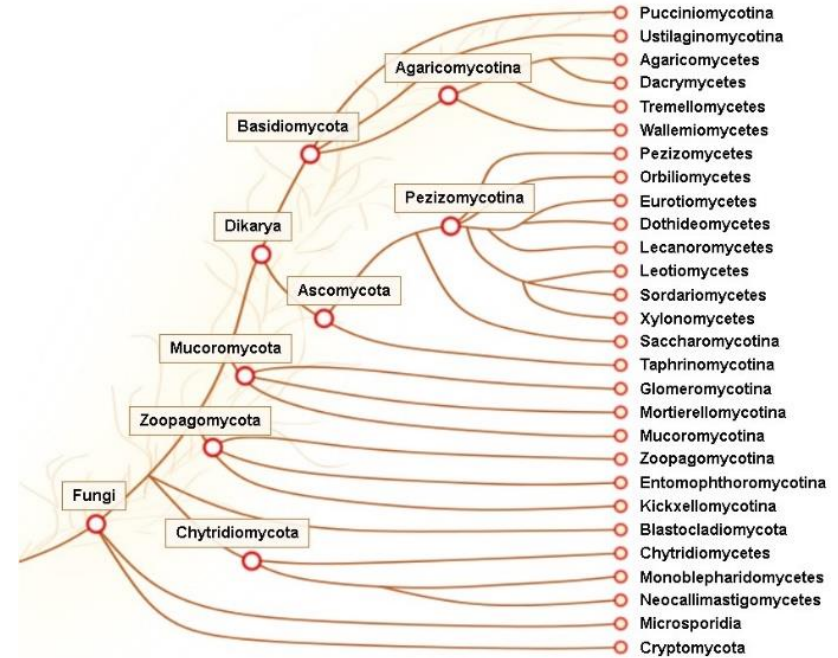


Figura 1. *Árbol filogenético del reino Fungi*. Recuperado de: (Ahrendt et al., 2023).

I. Introducción

Antecedentes

Papel esencial
en los
ecosistemas

Patógenos

Descomponedores

Mutualistas

Nace la necesidad de
caracterizar
biodiversidad fúngica

Mediante diversas
metodologías morfológicas
y moleculares

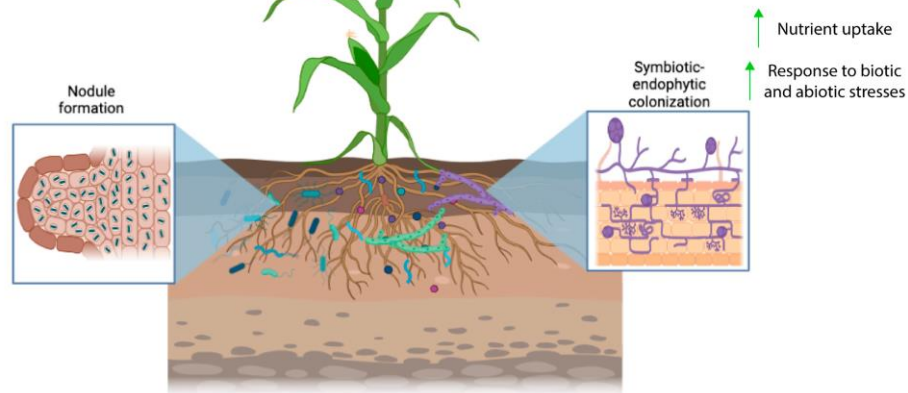
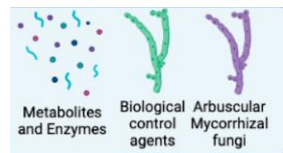


Figura 2. Colonización y procesos biológicos mediados por microorganismos. Recuperado de: (Rocha et al., 2024).

Justificación

El equilibrio ecológico se ha afectado por actividad humana

Monocultivo

Compactación de suelo

Uso de agroquímicos



Hacienda "El Prado"
IASA I

Centro integral de formación superior agropecuario



Se debe caracterizar la diversidad fúngica:

Diagnosticar el rol ecológico de especies presentes

Establecer una línea base para estudios posteriores

Identificación de Hongos filamentosos

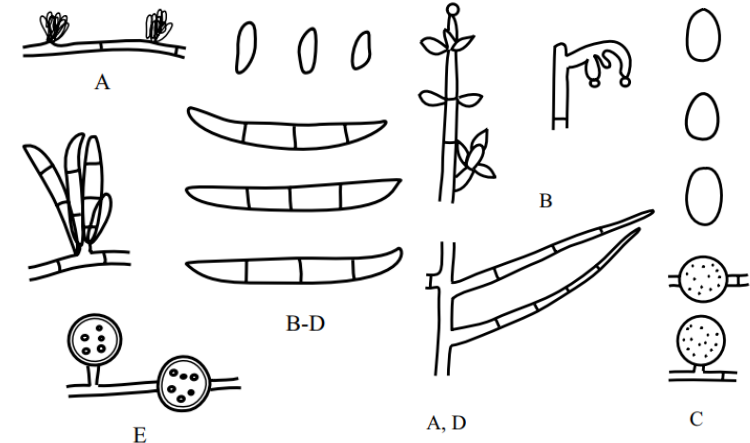
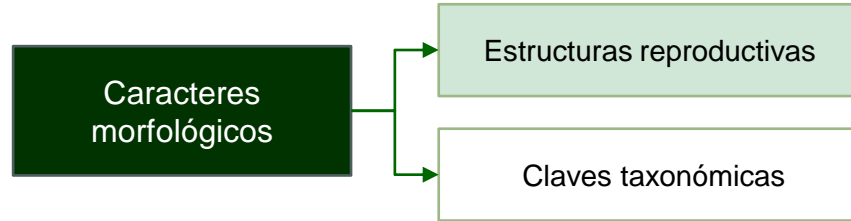


Figura 3. Características fenotípicas microscópicas de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. Recuperado de : (Watanabe, 2010).

Nuevos enfoques y metodologías

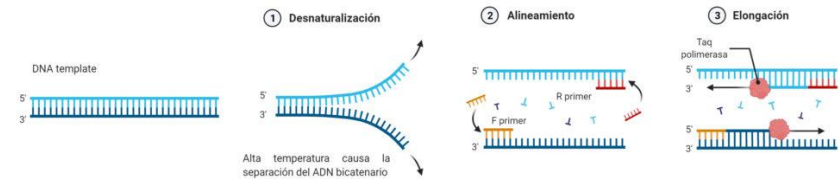
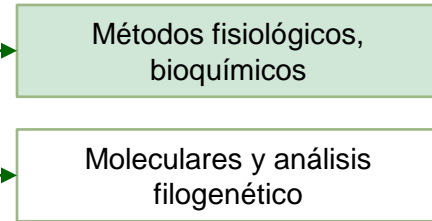


Figura 4. Esquema de etapas de amplificación por PCR. Recuperado de: <https://cutt.ly/0w0OBIMr>

Identificación molecular de hongos filamentosos

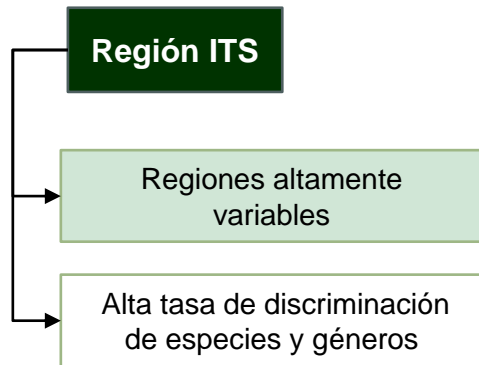
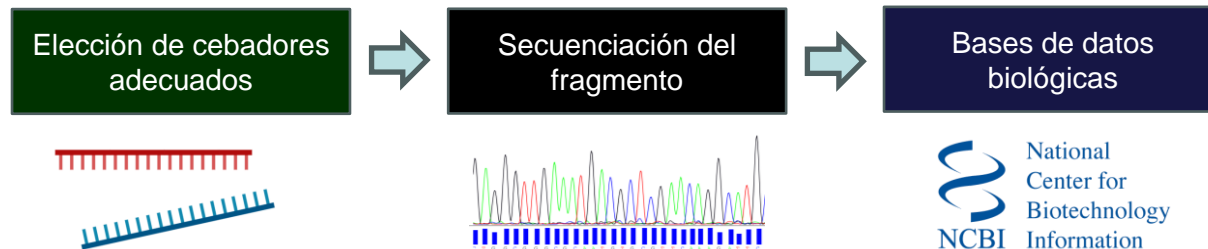


Figura 5. Descripción esquemática de la región ITS de hongos



II. Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente los hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración.

Objetivo Específicos

- Identificar morfológica y molecularmente las especies de hongos filamentosos recolectados en los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I.
- Evaluar la biodiversidad presente en el suelo en base a las especies registradas.
- Establecer un cepario de microorganismos con potencial benéfico.

Hipótesis

- H_0 : No existe diferencia entre la riqueza de especies de hongos filamentosos observada y la riqueza esperada según el estimador no paramétrico Chao 1.
- H_1 : Existe diferencia entre la riqueza de especies de hongos filamentosos observada y la riqueza esperada según el estimador no paramétrico Chao 1.

Muestreo



Sector de Avicultura

Área: 84 760 m²

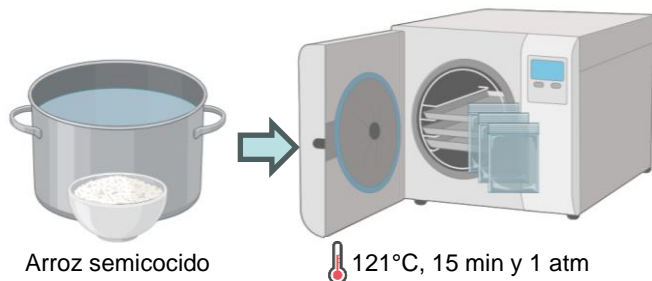


Figura 3. Esquema de vista satelital ubicación geográfica del sector de avicultura



III. Materiales y Métodos

Preparación de trampas microbianas

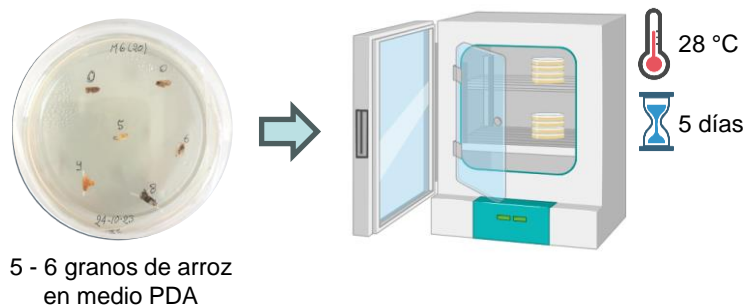


50 g de arroz

Incubación

- 20 cm de profundidad
- 15 días

Aislamiento de hongos filamentosos



Purificación en medio de cultivo

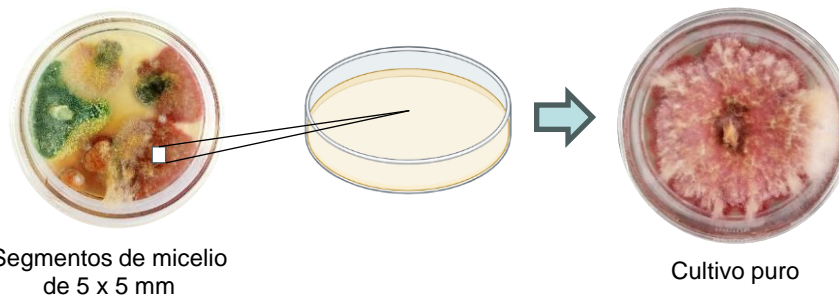
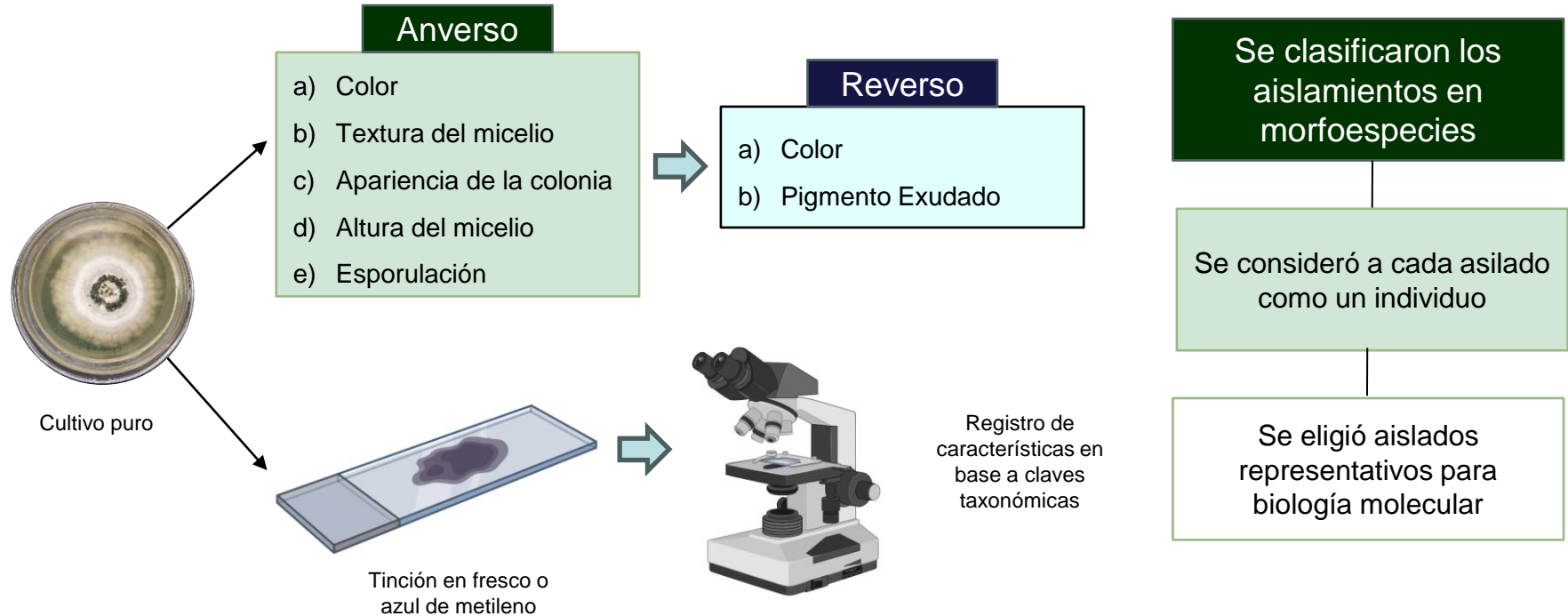


Tabla 1

Guía de denominación de colores de crecimiento fúngico en los granos de arroz

Color	Número de identificación
Café	0
Rojo	1
Morado	2
Rosado	3
Gris	4
Blanco	5
Verde	6
Amarillo	7
Negro	8
Anaranjado	9

Caracterización macro-microscópica



III. Materiales y Métodos

Extracción de ADN genómico

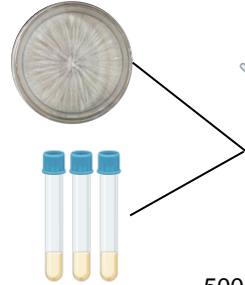
Método de Extracción Convencional por CTAB

Descrito por: Ausubel et al. (2003)

Modificado por: Flores (2021)

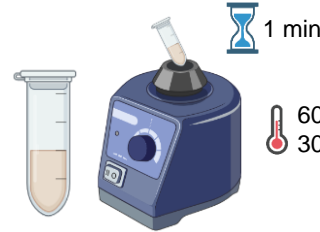
Adaptado por: Chiriboga (2023)

1 Recolección de muestra



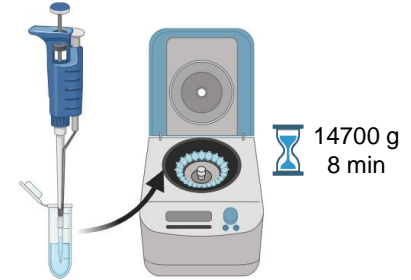
500 μ L de buffer de extracción + perlas de vidrio

2 Disrupción celular



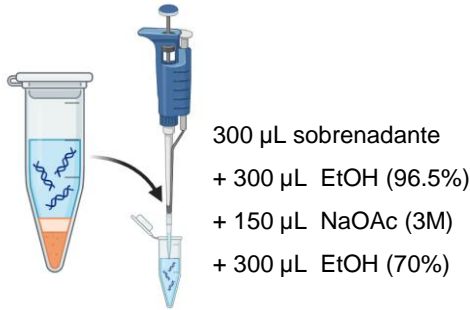
2 μ L de β -mercaptoetanol

4 Precipitación de proteínas

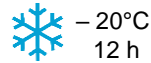


500 μ L de cloroformo frío

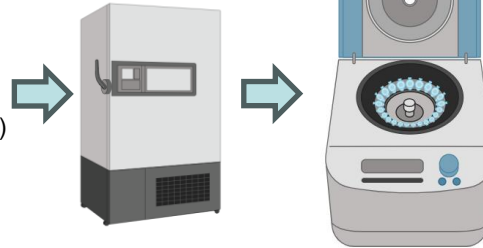
5 Precipitación de ADN



300 μ L sobrenadante
+ 300 μ L EtOH (96.5%)
+ 150 μ L NaOAc (3M)
+ 300 μ L EtOH (70%)

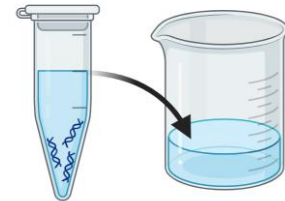


-20°C
12 h

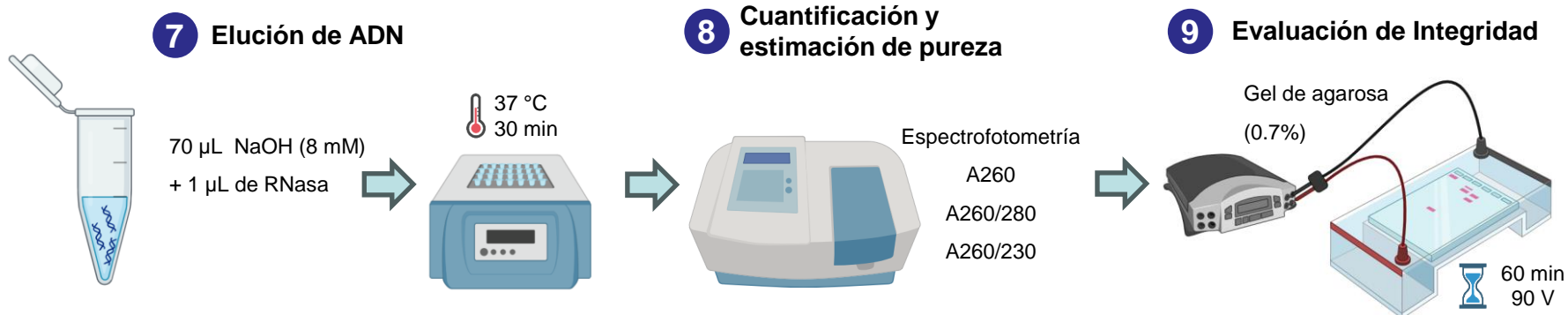


14700 g
17 min

6 Lavados



200 μ L EtOH (70%)
X3



PCR Convencional

Tabla 2

Primers para amplificación de regiones de ADNr fúngico

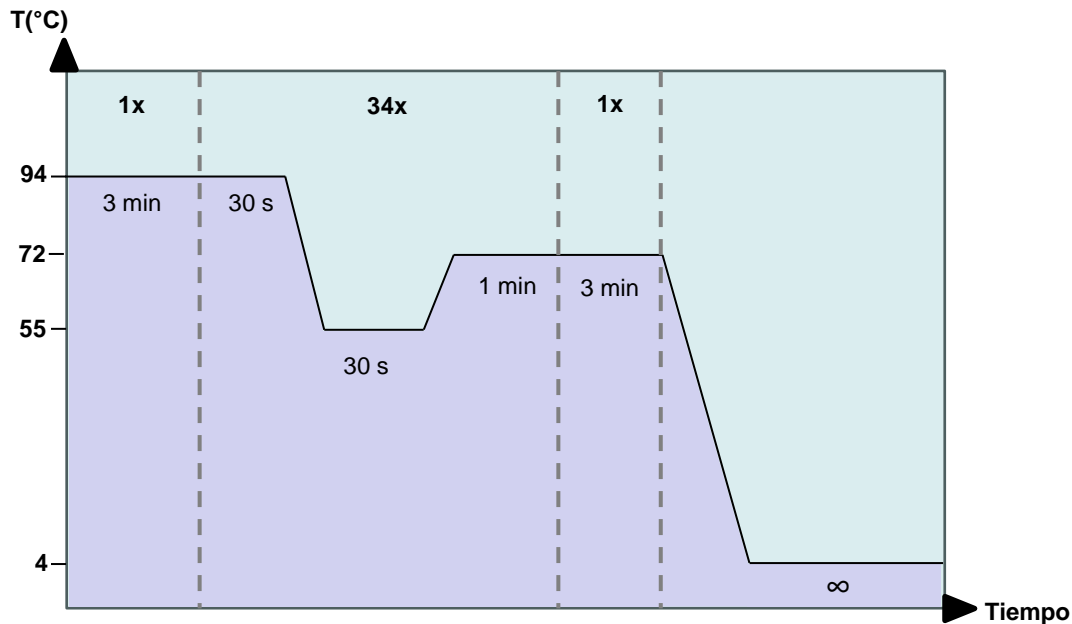
Primer	Secuencia	T _m (°C)
ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~65
ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~58

Tabla 3

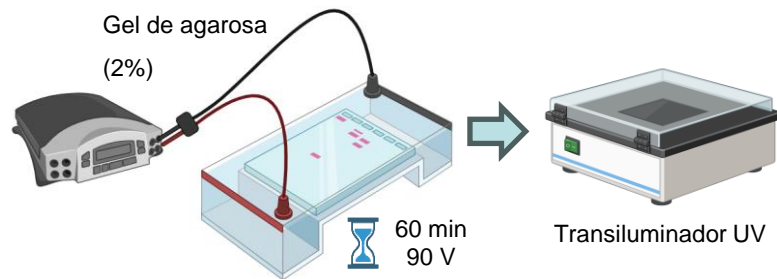
Ajuste del master mix de reacción para un volumen final de 25 µL

Componente	Concentración Final	Volumen por reacción 1x (µL)
Agua ultrapura	–	19.15
Platinum II PCR Buffer	1x	2.5
dNTPs mix	0.2 mM	0.5
MgCl ₂	1.5 mM	0.75
Primer forward	0.2 µM	0.5
Primer reverse	0.2 µM	0.5
Platinum Taq DNA Polymerase	1 U/µL	0.1
Plantilla de ADN	<500 ng/rxn	1

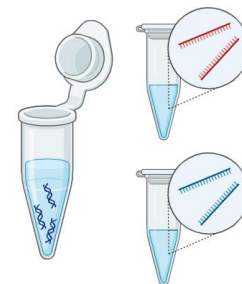
Condiciones de amplificación



Evaluación de longitud de fragmentos



Secuenciación Sanger



- 10 μ L producto de PCR
- 5 μ L primer forward (2 μ M)
- 5 μ L primer reverse (2 μ M)



Análisis Bioinformático



Staden Package:

Eliminación de fragmentos
(Pregap4)

Ensamblaje de secuencias
(Gap4)



Figura 7. Alineamiento de secuencias del fragmento de la región ITS

Identificación de especies



BLASTn



Clasificación de acuerdo
con el rol ecológico

Análisis de biodiversidad

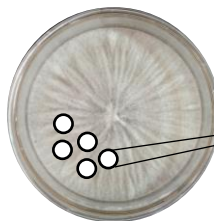
- Riqueza (s)
- Abundancia (N)
- Abundancia por especie (n_i)
- Abundancia relativa (p_i)
- Estimador no paramétrico Chao 1 (S_{chao1})
- Índice de Margalef (D_{mg})
- Índice de Shannon-Wiener (H')
- Índice de dominancia de Simpson (D)
- Índice de diversidad de Simpson (D')
- Índice de equidad de Pielou (J')

Análisis filogenético



Método de **Máxima Verosimilitud**
 Modelo evolutivo de **Tamura-Nei**
 Bootstrap con **500 réplicas**

Criopreservación

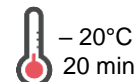


Segmentos agar de 5 mm de diámetro

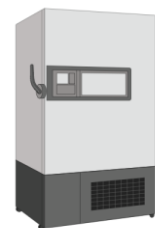
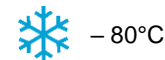


Solución

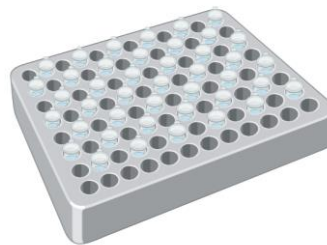
- Peptona (0,1%)
- Glicerol (10%)



- 20°C
20 min



Cepario



Cepas identificadas

Ficha de identificación:

- Macroscópica
- Microscópica
- Molecular

<p>Fecha: marzo 2024 Especie: <i>Aspergillus nidulans</i> Código de cepa: 01</p> <p>Características Macroscópicas</p> <p>Arroves: (foto)</p> <p>Altura del micelio: 400, Abund: 100, Esp: X, Irregular, Denso: X, Peludo: 1</p> <p>Reverso: (foto)</p>	<p>Características Microscópicas</p> <p>Micelio: (foto) Esporas: (foto)</p> <p>Formas: Sistema: X, Acropolar: X, Estructuras: X, Curvas: X, Esporangiosporas: X</p> <p>Descripción microscópica: Formación de vesículas esféricas decoronadas de bucles, que para <i>A. nidulans</i> se forman a partir de una base multiseptada.</p>
<p>Fecha: marzo 2024 Especie: <i>Aspergillus nidulans</i> Código de cepa: 02</p> <p>Caracterización Molecular</p> <p>Secuencia en GenBank: MH14_034_03 (81)</p> <p>Organismo: <i>Aspergillus nidulans</i></p> <p>Parámetro de Identidad: 100.0%</p> <p>WUOL: WUOL_000001_01</p>	<p>Fecha: marzo 2024 Especie: <i>Aspergillus nidulans</i> Código de cepa: 03</p> <p>Caracterización Molecular</p> <p>Secuencia en GenBank: MH14_034_03 (81)</p> <p>Organismo: <i>Aspergillus nidulans</i></p> <p>Parámetro de Identidad: 100.0%</p> <p>WUOL: WUOL_000001_01</p>



ESPE
 UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
 INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Captura y aislamiento de hongos filamentosos

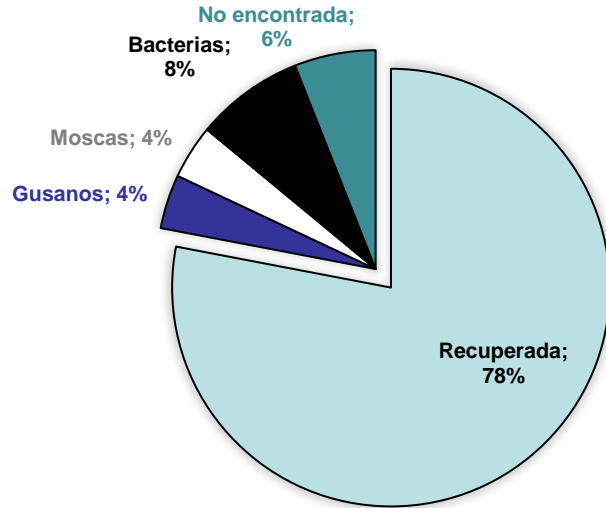


Figura 8. Condición de trampas microbianas después de 15 días de incubación

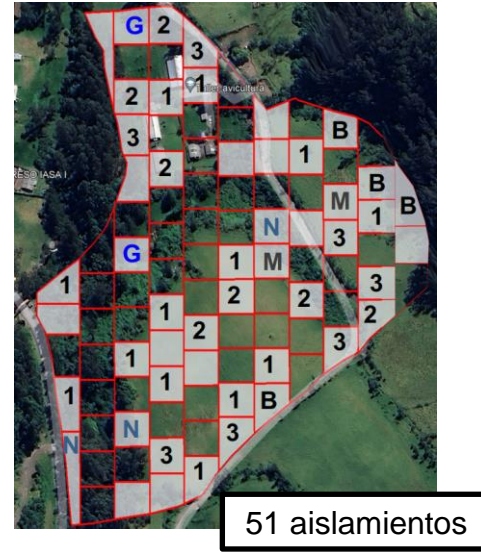
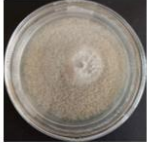

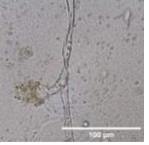
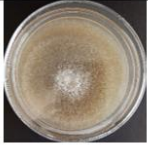
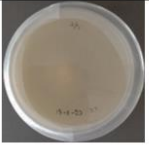
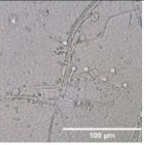
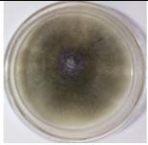
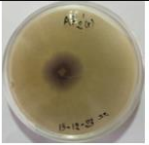
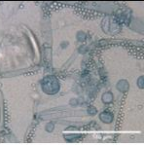
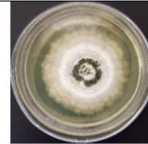
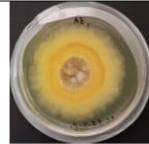
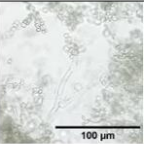

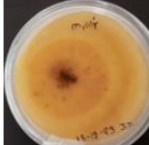
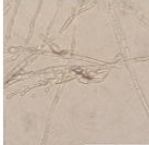
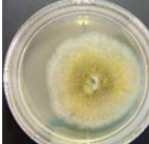
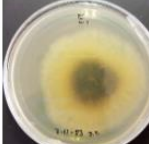

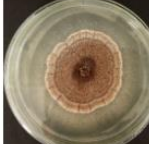
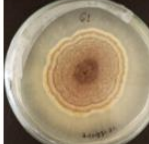
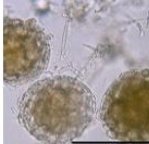


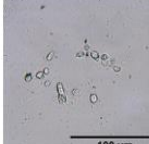

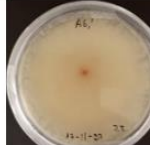
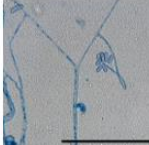

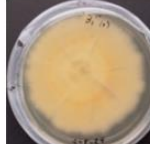


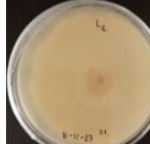
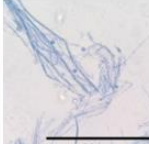
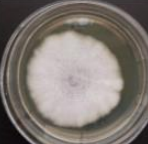
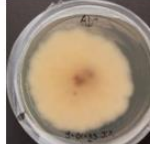
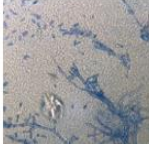


Figura 9. Aislamientos obtenidos en las subparcelas muestreadas. G, gusanos; M, moscas; B, bacterias; N, no encontrada

Tabla 4
Morfología macroscópica y microscópica de aislamientos de hongos filamentosos

N°	Crecimiento en medio PDA		Morfología microscópica
	Anverso	Reverso	
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

IV. Resultados y Discusión

Aislamiento de hongos filamentosos

Tabla 4
Morfología macroscópica y microscópica de aislamientos de hongos filamentosos

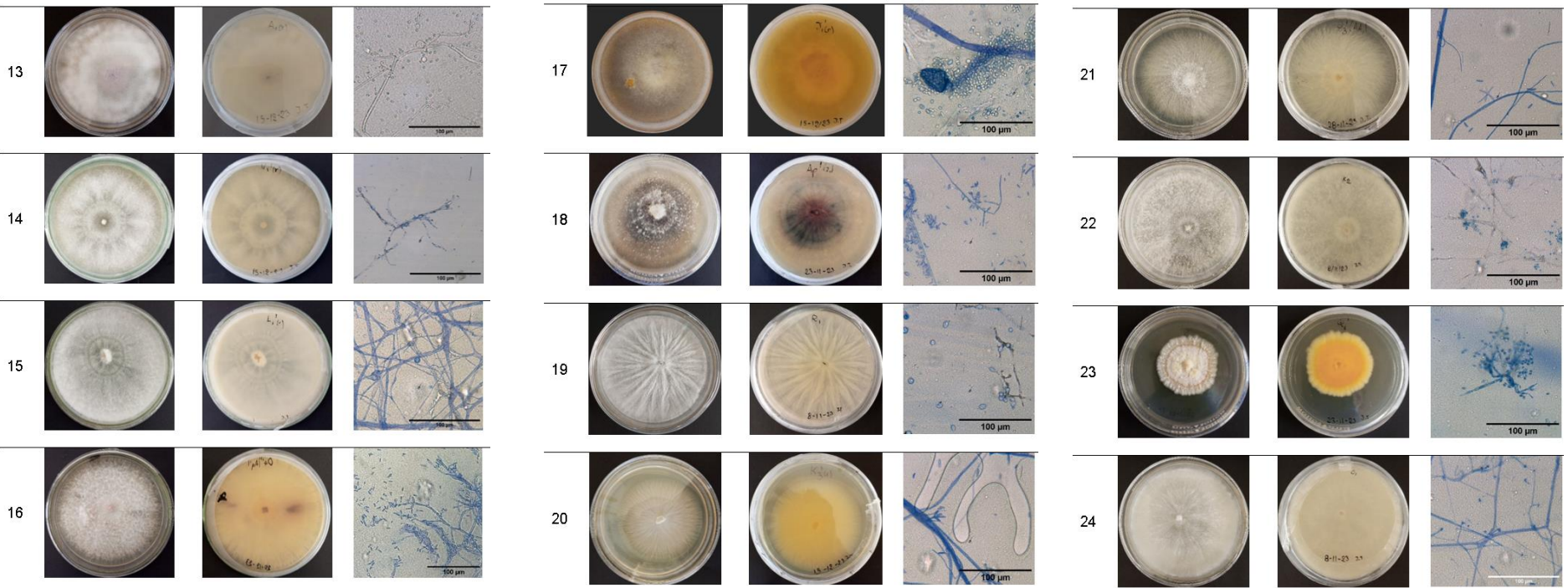
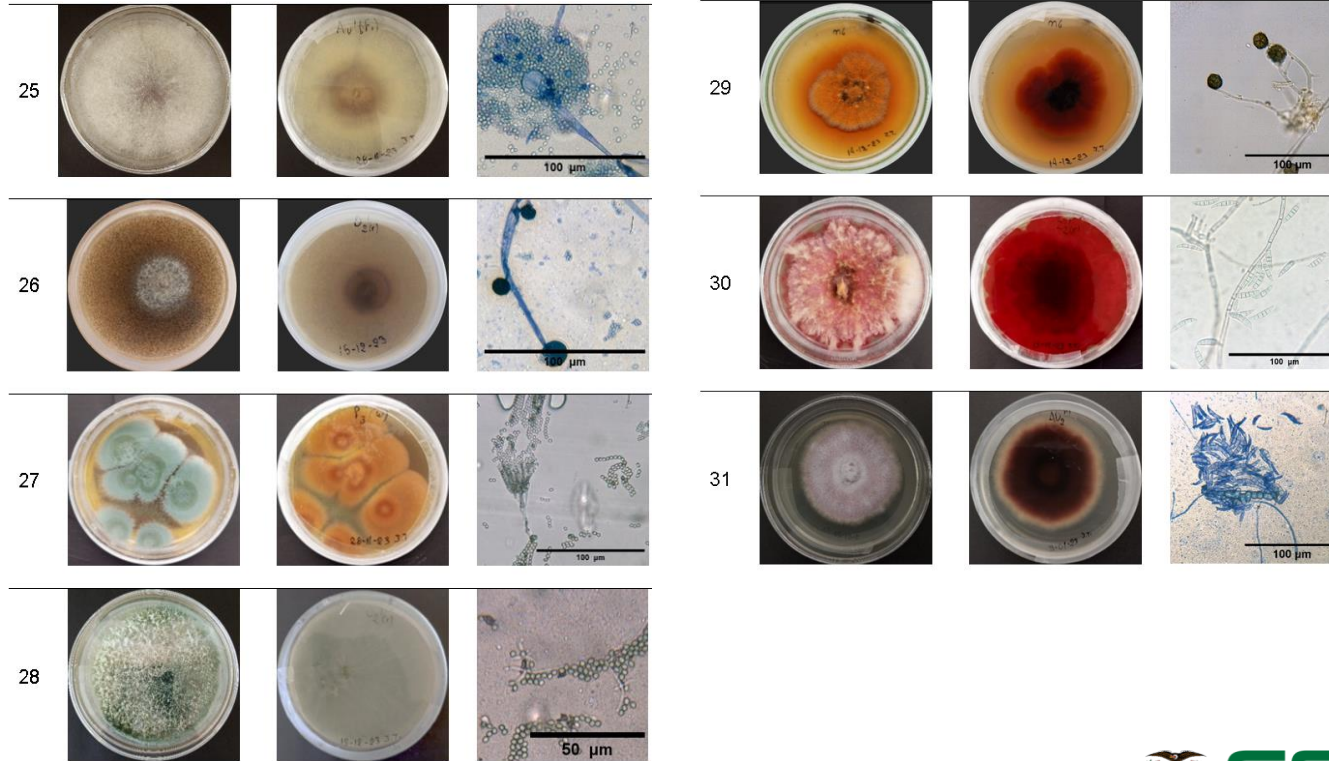


Tabla 4

Morfología macroscópica y microscópica de aislamientos de hongos filamentosos



IV. Resultados y Discusión

Cuantificación y estimación de pureza de ADN

31 morfoespecies

Tabla 5

Media ± D.S. de concentración y calidad de ADN

Parámetro	
Concentración (µg/mL)	209.3 ± 103.4
A260/280	1.84 ± 0.24
A260/230	0.97 ± 0.24

Relación 260/230

100% de muestras <1.5

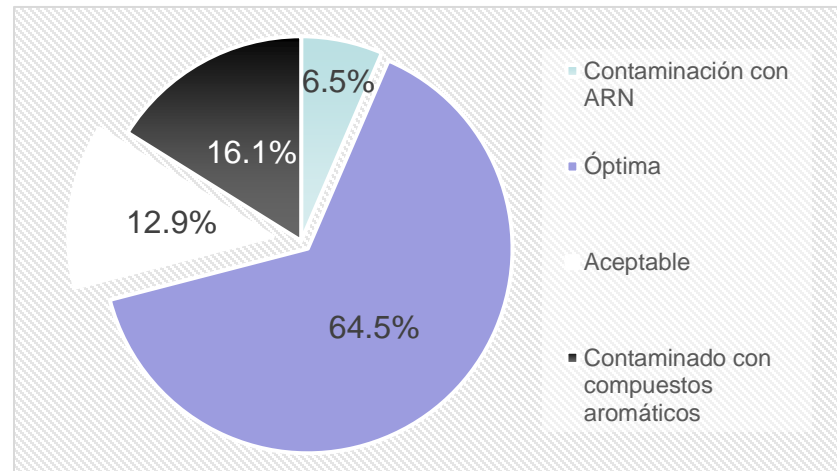


Figura 10. Calidad de muestras de ADN estimado por la relación 260/280

Integridad de ADN por electroforesis

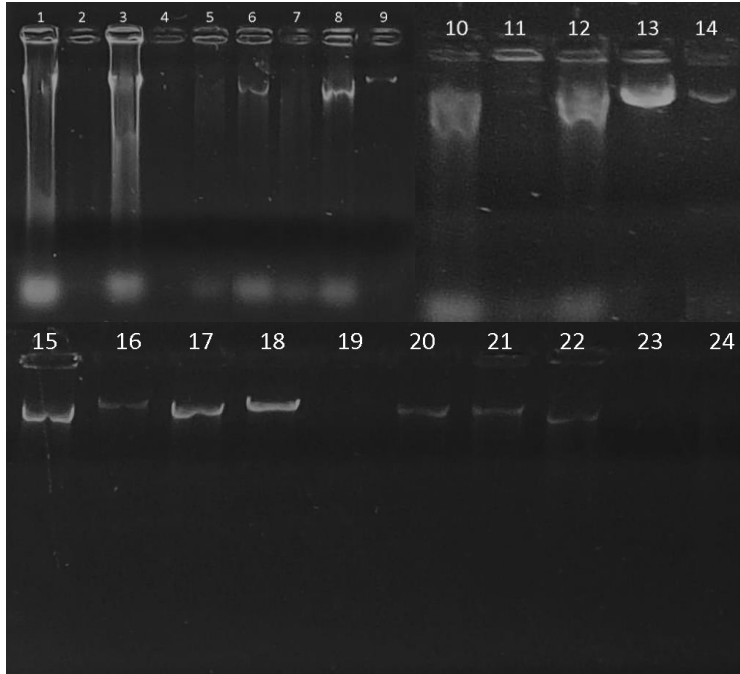


Figura 11. Evaluación de integridad de ADN genómico

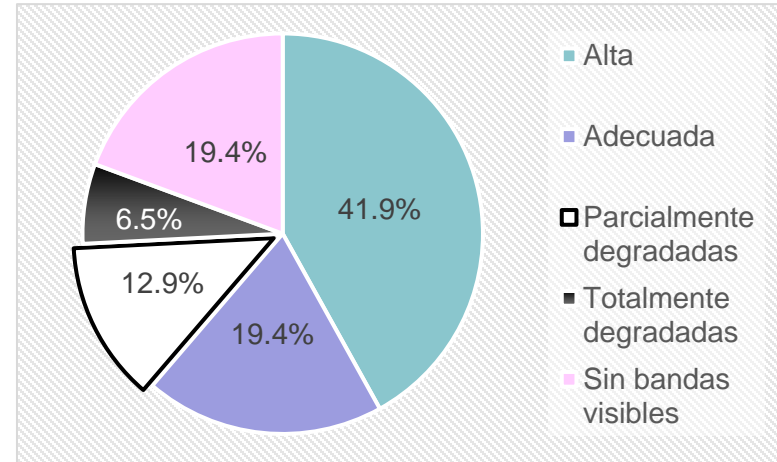


Figura 12. Clasificación de integridad de ADN genómico

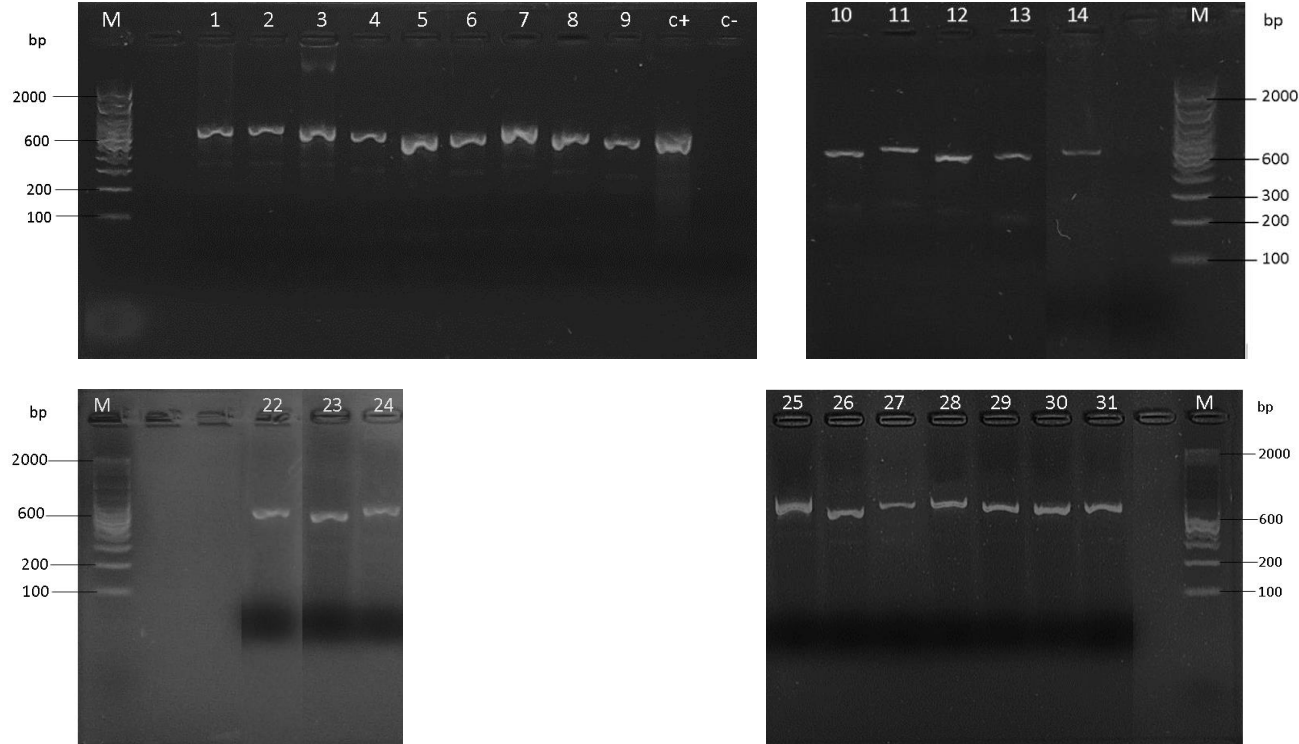


Figura 13. Amplificación de la región ITS a partir de ADN genómico

(Pauvert et al., 2019), (de Oliveira et al., 2015)

Tabla 6

Hongos filamentosos identificados mediante búsqueda en BLAST del ensamblaje de lecturas

#	Longitud (pb)	Organismo	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión	#	Longitud (pb)	Organismo	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión
1	611	<i>Mucor circinelloides</i>	98.37	NR_126116.1	17	608	<i>Mucor hiemalis</i>	99.35	LC413619.1
2	631	<i>Mucor circinelloides</i>	98.69	AY243943.1	18	549	<i>Fusarium verticillioides</i>	99.81	MH729013.1
3	600	<i>Mucor janssenii</i>	99.67	MH855051.1	19	572	<i>Trichoderma hamatum</i>	99.83	MT348552.1
4	549	<i>Clonostachys divergens</i>	99.25	NR_137532.1	20	544	<i>Fusarium</i> sp.	99.43	MH862670.1
5	521	<i>Fusarium equiseti</i>	100	MN722428.1	21	524	<i>Fusarium</i> sp.	98.66	NR_120263.1
6	548	<i>Chaetomium cochliodes</i>	100	MH856972.1	22	577	<i>Trichoderma paraviridescens</i>	100	MN900599.1
7	639	<i>Minimedusa polyspora</i>	99.53	NR_145335.1	23	542	<i>Clonostachys solani</i>	100	OM967396.1
8	571	<i>Trichoderma hamatum</i>	100	MH113926.1	24	528	<i>Xylaria</i> sp.	98.11	OP443871.1
9	521	<i>Fusarium foetens</i>	99.22	NR_159865.1	25	644	<i>Mucor hiemalis</i>	99.51	LC413619.1
10	557	<i>Clonostachys chloroleuca</i>	99.28	PP163405.1	26	536	<i>Mucor griseocyanus</i>	98.84	MH854579.1
11	586	<i>Trichoderma</i> sp.	99.66	OP497948.1	27	591	<i>Penicillium camemberti</i>	99.82	MT530220.1
12	522	<i>Fusarium foetens</i>	99.22	NR_159865.1	28	571	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	MK841003.1
13	614	<i>Mucor moelleri</i>	99.67	QW986506.1	29	522	<i>Epicoccum nigrum</i>	100	MT582797.1
14	586	<i>Trichoderma</i> sp.	100	MK871236.1	30	531	<i>Fusarium culmorum</i>	100	MH681154.1
15	577	<i>Trichoderma</i> sp.	100	MN900599.1	31	547	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	MN856310.1
16	523	<i>Fusarium</i> sp.	99.81	MH862657.1					

Identificación: 20 a nivel de especie y 4 a nivel de género, distribuidos en 9 géneros.

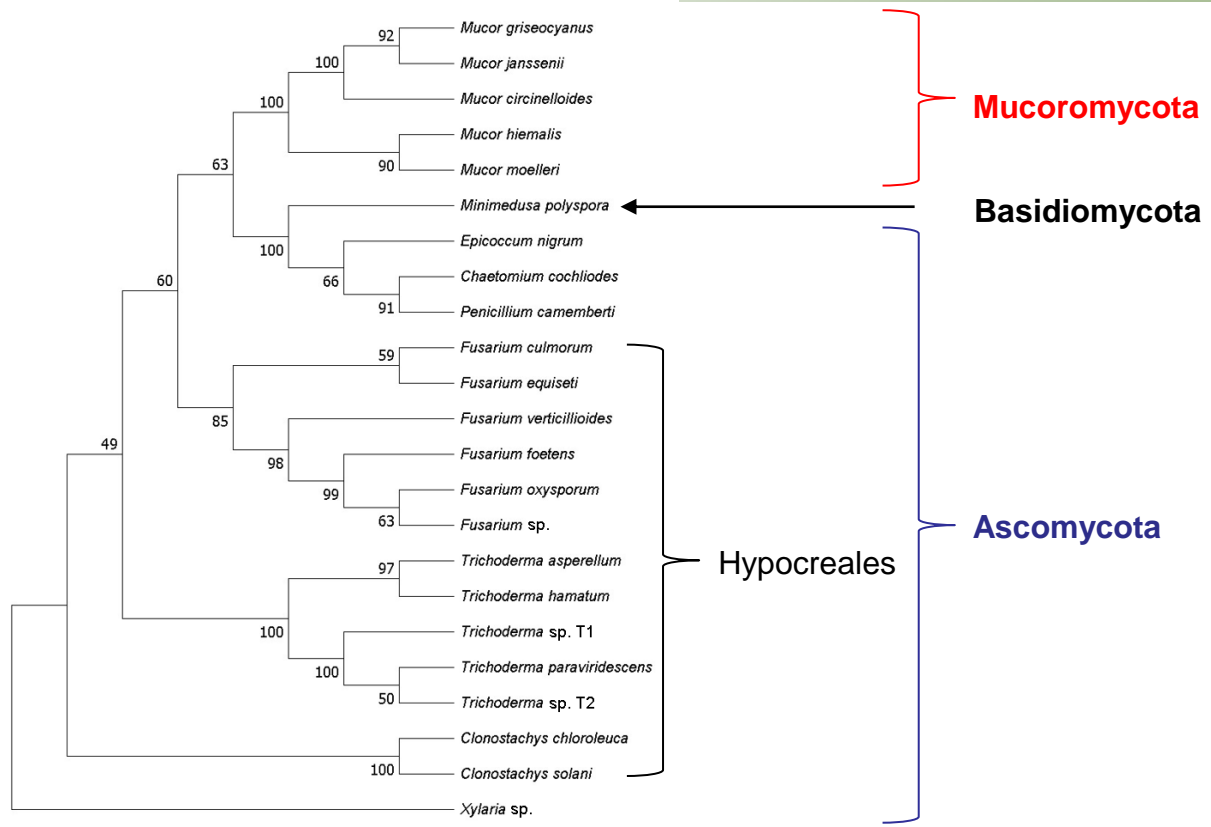


Figura 16. Árbol filogenético de especies identificadas

Identificación de especies

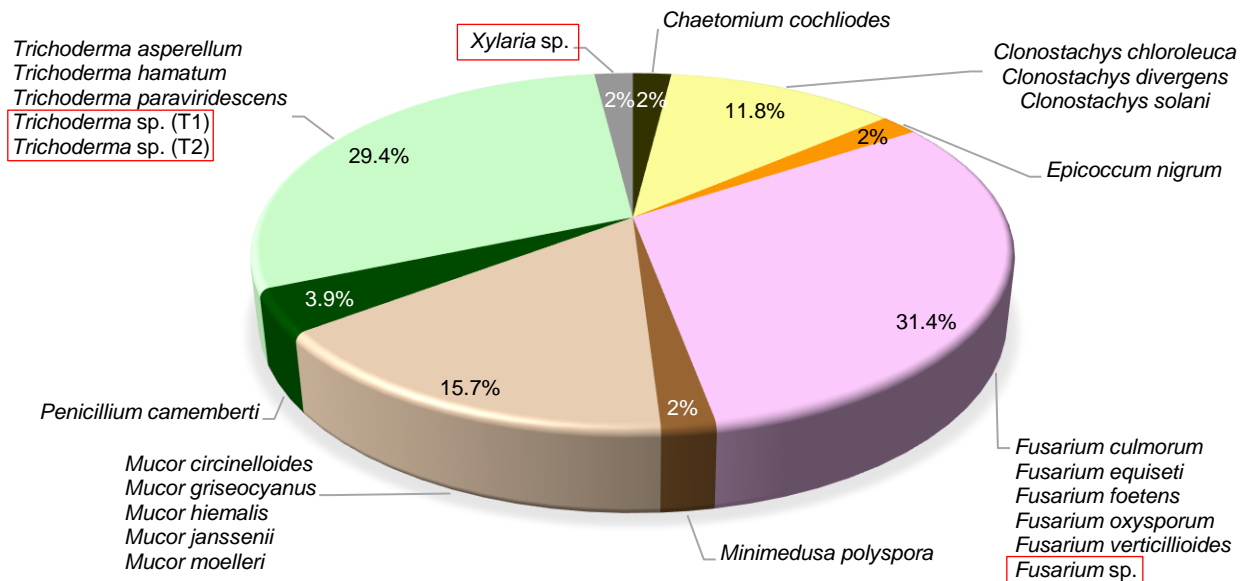


Figura 14. Especies de hongos filamentosos identificadas

IV. Resultados y Discusión

Clasificación por Rol Ecológico y evaluación de biodiversidad

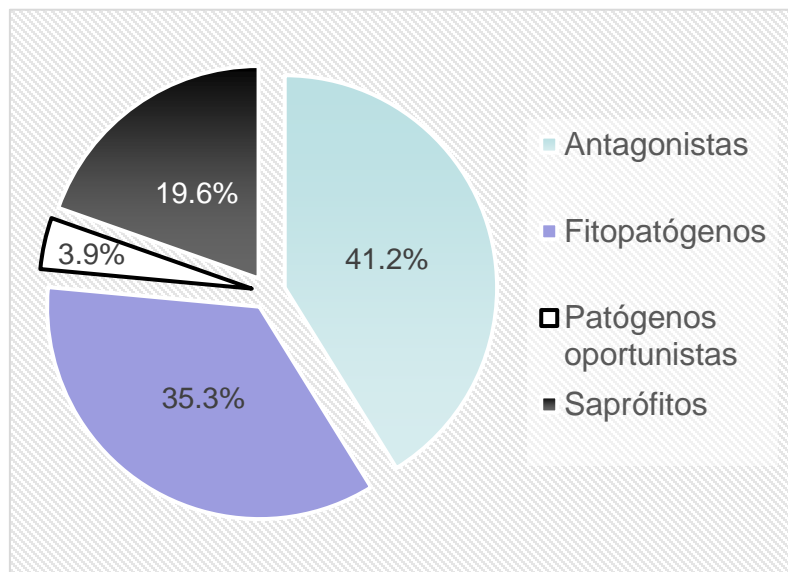


Figura 15. Clasificación de aislamientos de acuerdo con su rol ecológico

Tabla 5

Resultados de la evaluación de biodiversidad de hongos filamentosos presente en el suelo

Parámetro	Valor
Riqueza (s)	24 especies
Riqueza esperada (s_{chao1})	28.96 \approx 29 especies
Abundancia (N)	51 individuos
Índice de Margalef (D_{mg})	5.85
Índice de Shannon-Wiener (H')	3.03
Índice de dominancia de Simpson (D)	0.055
Índice de diversidad de Simpson (D')	0.945
Índice de equidad de Pielou (J')	0.954

Tabla 7
Ficha técnica de identificación macro y microscópica de hongos filamentosos

Fecha: marzo 2024 Especie: *Chaetomium cochlioides* Código del cepario: J7

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Anverso		Centro: blanco
Color anverso	Medio: café verdoso	
	Anillo: café oscuro	
	Borde: café amarillento	
Textura	Algodonosa	
	Polvosa	X
	Irregular	-
Aspecto	Radiado	-

Altura del micelio	Alto	
	Medio	
	Bajo	X
	Irregular	
Tipo de crecimiento	Denso	
	Regular	
	Tenue	X

Tiempo de crecimiento (días): 7

Reverso		Centro: café oscuro
Color reverso	Medio: café	
	Borde: café amarillento	
Exudado:	s/n	
Color de esporulación:	s/n	
Tiempo de esporulación (días):	s/n	

Fecha: marzo 2024 Especie: *Chaetomium cochlioides* Código del cepario: J7

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS



Hifas	Septadas	X	Esporas	Ascosporas	X
	No septadas			Basidiosporas	
				Conidios	
				Esporangiosporas	
Tamaño de espora: ~8.48 ± 3.43 µm					

Clave para ascomicetos

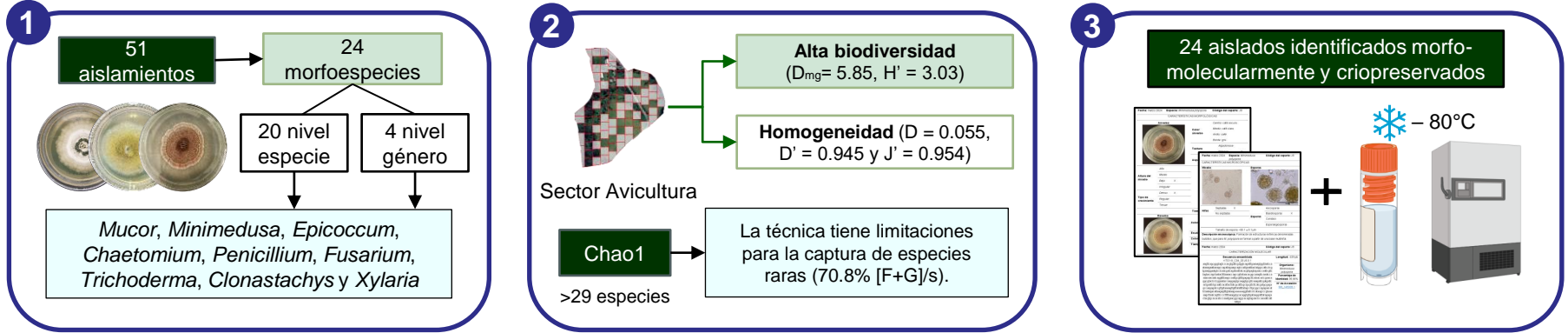
Ascocarpos en forma de panal	Formado		Ascocarpo ostiolado (peritecio)	Formado	X
	No formado	X		No formado	
Ascosporas	Unicelulares	X	Ascocarpos con micelio a manera de pelos terminales	Formado	X
	Formada por 2 o más células			No formado	
Pelos terminales del ascocarpo	Desarrollados (<i>Chaetomium</i> spp.)	X			
	Poco desarrollados				

Clave para especies del género *Chaetomium*

Ramificación de pelos terminales	Ausente	X	Aspecto de pelos terminales	Rectos	
	Ramificado			Enrollados	X
Enrollamiento de pelos terminales	Solo en la zona apical		Tamaño de ascos	Mayor a 70 µm (<i>C. cochlioides</i>)	X
	En todo el micelio	X		Menor a 50 µm	

V. Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones



- La presente investigación permitió el establecimiento de una línea base del sector de avicultura, que consta de cepas clasificadas por su rol ecológico de los hongos filamentosos registrados como antagonistas (41.18%), fitopatógenos (35.29%), patógenos oportunistas de animales (3.92%) y saprófitos (19.61%).

Recomendaciones

- Se recomienda el empleo de la línea base establecida en la presente investigación con el fin de diseñar estrategias de biorrestauración y control biológico.
- Se sugiere emplear amplificación de los genes de β -tubulina y factor de elongación 1 α , con el objetivo discriminar las distancias genéticas en especies altamente emparentadas.
- Para identificar especies fúngicas no cultivables en condiciones *in vitro* o de difícil recolección, es recomendable la aplicación de técnicas con mayor sensibilidad como las de secuenciación de siguiente generación (NGS). Al igual que se requiere promover investigación sobre las interacciones del microbioma del suelo, así como el uso de hongos filamentosos en bioinsumos o producción de metabolitos secundarios.

VI. Agradecimientos



“Caracterización morfológica y molecular de hongos filamentosos asociados a los suelos del sector de Avicultura de la Hacienda “El Prado” - IASA I, para el establecimiento de una línea base con fines de biorrestauración”

Laboratorio de Agrobiotecnología
Laboratorio de Microbiología
Hacienda “El Prado” – IASA I
Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”

Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz
Dr. Carlos Chiriboga
Ing. Ariana Michelle Drouet
Ing. Gaby Morales

Familia y amigos

