



**Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies
arbóreas plantadas en la zona perturbada de Secoya 26 y zona no perturbada de Secoya
2-3, por la actividad de extracción de petróleo en la Amazonía ecuatoriana**

Villegas Villegas, Jennifer Stefania

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

07 de septiembre de 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en la zona perturbada de Secoya 26 y zona no perturbada de Secoya 2-3, por la actividad de extracción de petróleo en la Amazonía ecuatoriana**, fue realizado por la señorita: **Villegas Villegas, Jennifer Stefania**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de septiembre de 2023



**CARLOS EDUARDO
CHIRIBOGA
NOVILLO**

Dr. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo

C. C. 170648461-3

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Plagiarism and AI Content Detection Report

Villegas Villegas Jennifer Stefania_TIC...

Scan details

Scan time:
September 7th, 2023 at 15:8 UTC

Total Pages:
39

Total Words:
9601

Plagiarism Detection

Types of plagiarism	Words
Identical	1.2% 116
Minor Changes	0% 2
Paraphrased	0% 0
Omitted Words	3.9% 370

1.3%

AI Content Detection

Text coverage	Words
AI text	0% 0
Human text	100% 9231

[Learn more](#)

Alerts: (1)

Cross Language: Same Document Language

Submitted language and cross-language text are the same language. No credits were used.

2/5 Severity



TITULO: ACADÉMICO
CARLOS EDUARDO
CHIRIBOGA
NOVILLO

Dr. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo.

C. C. 170448461-3



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Villegas Villegas, Jennifer Stefania**, con cédula de ciudadanía No. 120861935-1, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en la zona perturbada de Secoya 26 y zona no perturbada de Secoya 2-3, por la actividad de extracción de petróleo en la Amazonía ecuatoriana**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 07 de septiembre de 2023

Villegas Villegas, Jennifer Stefania

C.C.: 120861935-1



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Villegas Villegas, Jennifer Stefania**, con cédula de ciudadanía No. 120861935-1 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en la zona perturbada de Secoya 26 y zona no perturbada de Secoya 2-3, por la actividad de extracción de petróleo en la Amazonía ecuatoriana** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 07 de septiembre de 2023

Villegas Villegas, Jennifer Stefania

C.C. 120861935-1

Dedicatoria

A mí, por tanta paciencia.

A mis padres, Jenny y Milton†.

A mis hermanos, Fernando, Jeanette y Enrique.

Jennifer Stefania Villegas Villegas

Agradecimientos

A mi madre, por sus enseñanzas en todas las etapas de mi vida, sus valores, respeto y lealtad que me brinda todos los días.

Agradezco a mi padre por ser mi profesor en mi proceso académico, la fuente de mi inspiración y apoyo. Tu amor y sabiduría perturban en cada palabra de esta tesis, descansa en paz. No hay banquete que no llegue a su fin. Pero, nunca te olvidaré - Mo Xiang Tong Xiu.

Al Dr. Carlos Chiriboga y Dr. Wilmer E. Pozo-Rivera, por su amistad y conocimientos brindados a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Dr. Darwin Rueda, Ing. Gabriela Morales e Ing. Ariana Drouet por compartir su conocimiento y consejos brindados en este proceso.

Al Dr. Francisco Flores y a la Lic. Silvana Granda por brindar su apoyo en la fase inicial de este proyecto y a la empresa IDgen por sus servicios.

A mi compañeros de proyecto, Bertha, Belén y Santiago, por su valioso apoyo y colaboración en este importante logro.

A mis amigos Ericka, Francisco, Joyce, Evelyn y Rommel por ser mi apoyo emocional durante este proceso. Gracias por sus palabras y los recuerdos compartidos, han sido una de las razones que me impulsaron a superar esta etapa de mi vida.

Índice de contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas	11
Índice de figuras	12
Resumen	13
Abstract	14
CAPÍTULO I	15
INTRODUCCIÓN.....	15
Antecedentes	15
Justificación e importancia	16
Objetivos	16
<i>Objetivo general.....</i>	<i>16</i>
<i>Objetivos específico.....</i>	<i>17</i>
Hipótesis	17
<i>Hipótesis nula</i>	<i>17</i>
<i>Hipótesis alternativa.....</i>	<i>17</i>
CAPÍTULO II	18
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y REFERENCIAL.....	18
Amazonía ecuatoriana	18

<i>Suelos amazónicos</i>	18
Hongos rizosféricos.....	18
Caracterización molecular.....	19
<i>Extracción de ADN</i>	20
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	21
<i>Electroforesis</i>	23
<i>Secuenciación molecular</i>	23
Caracterización proteómica.....	25
<i>Desorción/ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS)</i>	25
Bioinformática.....	26
CAPÍTULO III	27
METODOLOGÍA	27
Ubicación del proyecto.....	27
Activación y purificación de hongos.....	27
<i>Preparación de medios de cultivo</i>	27
<i>Activación de cepas</i>	28
<i>Selección de muestras</i>	28
Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	29
Secuenciación de productos PCR.....	30
<i>Extracción de ADN genómico de hongos</i>	30
<i>PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)</i>	32
<i>Electroforesis</i>	33
<i>Envío de productos PCR</i>	34
<i>Identificación de secuenciaciones</i>	34
Relación filogenética.....	34
Evaluación de diversidad.....	34

CAPÍTULO IV	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Activación de cepas	36
Identificación MALDI-TOF	36
Identificación por secuenciación Sanger	37
<i>Concentración y calidad de ADN</i>	37
<i>Amplicones ITS mediante PCR</i>	38
<i>Identificación de secuencias consenso</i>	39
Comparación de las metodologías utilizadas para la identificación de especies	40
Especies fúngicas y su relación con las especies arbóreas	41
Filogenia de hongos identificados molecularmente	41
Caracterización morfológica de hongos identificados molecularmente	43
<i>Mucor irregularis</i>	43
<i>Aspergillus fumigatus</i>	44
<i>Trichoderma virens</i>	45
<i>Penicillium citrinum</i>	47
<i>Rhizopus arrhizus</i>	47
<i>Trichoderma sp.</i>	48
<i>Geotrichum candidum</i>	49
Análisis de biodiversidad entre las zonas de Secoya 2-3 y Secoya 26	50
CAPÍTULO V	54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
Conclusiones.....	54
Recomendaciones.....	54
Bibliografía	55

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Hongos seleccionados en Secoya 2-3</i>	29
Tabla 2 <i>Hongos seleccionados en Secoya 26</i>	29
Tabla 3 <i>Valores promedio de pureza en muestras de ADN</i>	31
Tabla 4 <i>Componentes de la MasterMix</i>	32
Tabla 5 <i>Condiciones de la PCR</i>	33
Tabla 6 <i>Datos de cepas activadas</i>	36
Tabla 7 <i>Identificación de hongos rizosféricos mediante MALDI-TOF</i>	37
Tabla 8 <i>Resultados Multiscan Sky</i>	37
Tabla 9 <i>Identificación y porcentaje de identidad de secuencias analizadas utilizando BLAST</i> ..	39
Tabla 10 <i>Comparación de resultados de secuenciación y MALDI-TOF</i>	40
Tabla 11 <i>Especies arbóreas asociadas a hongos rizosféricos</i>	41
Tabla 12 <i>Índice de diversidad determinados por el Software PAST</i>	51

Índice de figuras

Figura 1 <i>Fases de la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)</i>	23
Figura 2 <i>Metodología de la secuenciación Sanger</i>	24
Figura 3 <i>Espectrómetro de masas MALDI-TOF</i>	26
Figura 4 <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1 % w/v</i>	38
Figura 5 <i>Árbol filogenético de Secoya 2-3</i>	42
Figura 6 <i>Secuencias alineadas de la zona Secoya 2-3</i>	42
Figura 7 <i>Árbol filogenético de Secoya 26</i>	43
Figura 8 <i>Secuencias alineadas de la zona Secoya 26</i>	43
Figura 9 <i>Características morfológicas de Mucor irregularis</i>	44
Figura 10 <i>Características morfológicas de Aspergillus fumigatus</i>	45
Figura 11 <i>Características morfológicas de Trichoderma virens</i>	46
Figura 12 <i>Características morfológicas de Penicillium citrinum</i>	47
Figura 13 <i>Características morfológicas de Rhizopus arrhizus</i>	48
Figura 14 <i>Características morfológicas de Trichoderma sp.</i>	49
Figura 15 <i>Características morfológicas de Geotrichum candidum</i>	50
Figura 16 <i>Índice de Shannon en zona contaminada (CLR) y zona no contaminada (POTR)</i>	52

Resumen

La contaminación de suelos por la actividad petrolera es una problemática a nivel mundial por que afecta la diversidad fúngica, degrada los suelos y contamina el agua. Con la finalidad de minimizar este impacto, se activaron las especies fúngicas que están presentes en las tres especies arbóreas *Piptadenia pteroclada*, *Platymiscium pinnatum* y *Zygia longifolia*, en la zona de lodos y ripios de Secoya 26 y la zona de potreros de Secoya 2-3 y su potencial en la biorremediación de suelos. De los cuales se seleccionaron 14 hongos para caracterización molecular por secuenciación SANGER y caracterización proteómica con el equipo MALDI-TOF MS, dichos hongos fueron caracterizados morfológicamente utilizando claves dicotómicas identificados previamente, de estos seis corresponden a la zona de Secoya 2-3 y ocho pertenecen a Secoya 26. Se obtuvo el ADN de cada cepa mediante un protocolo estandarizado de extracción y, mediante técnicas PCR y el uso de los *primers* ITS1 e ITS4, se obtuvieron los amplicones que fueron secuenciados. Las cepas fueron identificadas como *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Mucor* sp., *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma* sp. y *Trichoderma virens*, estos resultados fueron comparados con los obtenidos por MALDI-TOF evidenciando que la caracterización proteómica carece de una base de datos amplia para identificar los hongos seleccionados. La zona contaminada se encontró mayor diversidad de especies y una mayor riqueza específica.

Palabras clave: DIVERSIDAD, MOLECULAR, PROTEÓMICA, BIORREMEDIACIÓN.

Abstract

Soil contamination by oil activity is a worldwide problem because it affects fungal diversity, degrades soils and contaminates water. In order to minimize this impact, the fungal species present in the three tree species *Piptadenia pteroclada*, *Platymiscium pinnatum* and *Zygia longifolia*, in the zone of sludge and debris of Secoya 26 and the zone of pastures of Secoya 2-3 and their potential in soil bioremediation were activated. Of which 14 fungi were selected for molecular characterization by SANGER sequencing and proteomic characterization with MALDI-TOF MS equipment, these fungi were morphologically characterized using dichotomous keys previously identified, six of these correspond to the zone of Secoya 2-3 and eight belong to Secoya 26. DNA was obtained from each strain using a standardized extraction protocol and, by means of PCR techniques and the use of ITS1 and ITS4 primers, amplicons were obtained and sequenced. The strains were identified as *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Mucor* sp., *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma* sp. and *Trichoderma virens*, these results were compared with those obtained by MALDI-TOF, showing that the proteomic characterization lacks a broad database to identify the selected fungi. The contaminated zone was found to have a greater diversity of species and a higher specific richness.

Keywords: DIVERSITY, MOLECULAR, PROTEOMICS, BIOREMEDIATION.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La contaminación de los suelos, a causa de los derrames de petróleo, constituye un desafío a nivel global. Los derramamientos petroleros generan altos riesgo para la salud humana por la contaminación de las agua subterráneas, contaminación ambiental y resultan en la degradación de suelos destinados a la producción agrícola (Thapa *et al.*, 2012). La región amazónica ecuatoriana, que se caracteriza por su alta biodiversidad, también alberga un importante reservorio de hidrocarburos cuya explotación provoca impactos ambientales adversos (Garcés *et al.*, 2019).

Desde 1990, se han implementado técnicas de biorremediación con bacterias, hongos, plantas y enzimas degradadores de hidrocarburos, a pesar de que los primeros derrames en la Amazonia Ecuatoriana ocurrieron en la década de los setenta (Cuvi y Bejarano, 2015). Estas estrategias, para recuperar los suelos amazónicos, son de las más confiables y respetuosas con el medio ambiente para reducir o eliminar los compuestos potencialmente peligrosos utilizando microorganismos que juegan un papel importante en la degradación de contaminantes del petróleo con una elevada tasa de éxito (Kumar *et al.*, 2022).

Entre los microorganismos más importantes para estos proyectos de biorremediación están los hongos micorrízicos arbusculares contribuyen a la estabilidad de los agregados del suelo y facilitar el transporte de nutrientes y agua hacia las plantas, estas características son las determinantes para que los hongos ocupen un lugar en la restauración de ambientes contaminados con hidrocarburos (Garcés *et al.*, 2019).

En los últimos años, técnicas de biología molecular han sido de gran importancia para la investigación de la diversidad y abundancia de comunidades microbianas en diversos ecosistemas. Entre las técnicas se destacan la extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación Sanger, que ha llevado a cabo un papel fundamental en

el estudio de hongos, incluyendo a los presentes en las áreas contaminadas por petróleo en la Amazonia ecuatoriana. La literatura sostiene que *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son comúnmente registrados en los suelos contaminados, demostrando su capacidad para degradar compuestos contaminantes y como agentes biorremediadores (Flayyih, 2014).

Justificación e importancia

La contaminación petrolera de suelos representa un problema por la pérdida de biodiversidad, degradación del suelo y un importante riesgo para la salud de la población aledaña a estas zonas, por ello se le da prioridad a la identificación de hongos que puedan degradar los compuestos de hidrocarburos en el suelo lo que nos proporciona una solución para la biorremediación de los suelos contaminados por petróleo.

Dado que los métodos tradicionales como la identificación morfológica presentan limitaciones para confirmar la presencia de diversas comunidades de hongos rizosféricos, han surgido nuevas técnicas como las moleculares y proteómicas, esto incluye la extracción de ADN, PCR y la secuenciación, que permiten identificar de manera más exacta y detallada la población de hongos rizosféricos presentes en suelos contaminados.

En la presente investigación se evaluó la diversidad y abundancia de hongos rizosféricos presentes en las zonas contaminadas y no contaminadas de los pozos petroleros Secoya 26 y Secoya 2-3 respectivamente.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a nivel proteómico y molecular a los hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados y no perturbados por actividades relacionadas a la extracción petrolera en la amazonia ecuatoriana.

Objetivos específico

Activar las cepas de hongos rizosféricos pertenecientes al programa de fitorremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera en las zonas Secoya 26 y Secoya 2-3 en la Amazonía ecuatoriana.

Identificar los hongos rizosféricos mediante espectrometría de masas con el equipo MALDI-TOF MS.

Secuenciar el gen ITS para la identificación taxonómica de hongos endorizosféricos a nivel de especie.

Comparar la riqueza específica entre suelos perturbados y no perturbados.

Hipótesis

Hipótesis nula

La riqueza de especies fúngicas rizosféricas no es afectada entre suelos perturbados y no perturbados.

Hipótesis alternativa

La riqueza de especies fúngicas rizosféricas es afectada entre suelos perturbados y no perturbados.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y REFERENCIAL

Amazonía ecuatoriana

La Amazonia Ecuatoriana representa el 45 % del territorio nacional (Bravo *et al.*, 2015), ocupando un espacio de 115 613 km desde las estribaciones hasta el este de la planicie amazónica (Bravo, 2014), formando el 2 % de la cuenca del río Amazonas. La región es la fuente más importante de agua y biodiversidad por su papel como regulador del clima en el planeta y sumidero de gases de efecto invernadero (López *et al.*, 2013). Está formada por seis provincias: Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Huera *et al.*, 2020).

Suelos amazónicos

La elevada acidez es una de las principales características de los suelos en la Amazonía Ecuatoriana, lo que provoca una limitación en la disponibilidad de nutrientes (Herrera *et al.*, 2022), también, presenta un alto contenido de carbono orgánico sobre y debajo de la superficie.

Su cantidad y calidad de hojarasca y raíces son un buen contribuyente para cumplir los ciclos biogeoquímicos, esto mejora la disponibilidad de nitrógeno y algunos nutrientes en general (Bravo *et al.*, 2017). El suelo se divide de acuerdo con el uso que se le da, tenemos por ejemplo los suelos hidrocarburíferos, los suelos mineros y forestales (Calvache, 2015).

Hongos rizosféricos

Los hongos juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos, en la descomposición de la materia orgánica, el desarrollo y crecimiento de las plantas y en el control de las enfermedades (Wang *et al.*, 2017). La salud y el desarrollo de las plantas está relacionada con los hongos presentes en la rizosfera debido a su rol como antagonista de los patógenos, la descomposición de los residuos vegetales y el suministro de nutrientes (Ehrmann y Ritz, 2013). Sin la presencia de los hongos el crecimiento de la planta no sería favorable,

siendo más vulnerables a las sequías, enfermedades y a los metales tóxicos en el suelo (Piepenbring *et al.*, 2016).

Los hongos micorrízicos arbusculares constituyen un grupo de hongos que habitan en la zona radicular de diversas plantas y desempeñan un papel crucial en la mejora de la estructura del suelo, así como en la sostenibilidad y fertilidad de los suelos utilizados en la agricultura (Jaizme y Rodríguez, 2008). Estos hongos son reconocidos como los principales constituyentes de la biomasa microbiana del suelo. A medida que aumenta el tamaño y la distribución de la población de hongos rizosféricos, se mejora tanto la calidad como la cantidad de materia orgánica que se incorpora al suelo (Morell *et al.*, 2009).

Los agentes de control biológico y microorganismos promotores del crecimiento, como los hongos del género *Trichoderma*, son considerados hongos micorrízicos arbusculares, sin embargo, dependen del factor suelo-planta-microorganismo-ambiente para ejercer sus efectos benéficos, de su fisiología, de la bioquímica de la interacción y de la combinación de microorganismos, no obstante, es difícil predecir si la interacción tendrá un efecto positivo o por el contrario, un efecto antagónico o no ocurra efecto alguno (Cano, 2011).

Caracterización molecular

La caracterización molecular es un conjunto de técnicas y métodos utilizados para identificar y analizar las características de moléculas biológicas como el ADN, ARN y plásmidos. Dentro de estas investigaciones moleculares, se realizan diversas actividades que abarcan la purificación y cuantificación de ácidos nucleicos, así como la amplificación de genes mediante la técnica de PCR en los microorganismos de estudio, con el propósito de prepararlos para su posterior purificación y secuenciación (Salinas y Martínez, 2022). Estas técnicas permiten evaluar el grado de la diversidad genética y su distribución dentro de poblaciones de una especie determinada (García, 2008). Por lo que, la caracterización molecular se ha convertido en una herramienta para resolver incógnitas en el área de la biología, que buscan

asociaciones con los marcadores moleculares, permitiendo comprender fenómenos biológicos y detectar las posibles aplicaciones de las moléculas de interés (Aristizabal, 2016).

Extracción de ADN

La obtención de ADN de alta calidad implica el aislamiento y la purificación de las moléculas de ADN, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de esta molécula (Alejos *et al.*, 2014). La molécula de ADN está formada por una cadena de doble hélice en la que cada hebra presenta uniones covalentes continuas de desoxirribosa y fosfato, en las dos cadenas los azúcares están enlazados a las bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), las cuales están unidas a través de puentes de hidrógeno manteniendo una estable estructura helicoidal (Martínez, 2010).

Los grupos fosfatos del ADN poseen una carga neta negativa y exhiben propiedades polares. Estas características son esenciales para la interacción con moléculas cargadas positivamente. Debido a su carga negativa, los grupos fosfato tienden a repelerse entre sí, lo que permite que el ADN se disuelva en soluciones acuosas, formando una capa hidratante alrededor de la molécula. Esta capa se desestabiliza en presencia de etanol, exponiendo así los grupos fosfato. Cuando se utiliza cloruro de sodio, los cationes Na^+ contrarrestan las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos, lo que facilita la precipitación del ADN (Ramos, 2018; Sandoval *et al.*, 2013).

La extracción tradicional de ADN comprende cinco pasos fundamentales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación del ADN y su posterior redisolución (Lino *et al.*, 2023). En la etapa de ruptura de tejido y lisis celular se tiene como objetivo la destrucción de las membranas para liberar al ADN, para ello se necesita emplear un buffer de extracción utilizando diferentes reactivos que son necesarios para la obtención de ADN (Aguilar, 2006; Cadavid y Gómez, 2018), es necesario utilizar un detergente aniónico como el sodio dodecil sulfato (SDS) para desestabilizar su estructura celular o CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) que remueve las proteínas y previene la

degradación del ADN; un buffer para estabilizar el pH de la solución como el hidroximetil amino metano (Tris) (Aguilar, 2006; Rocha, 2002); EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) para evitar la degradación del ADN al quedar expuestos a las DNAsas, este agente atrapa los iones de magnesio que usan las enzimas degradadoras de ADN (Green y Sambrook, 2012) y HCl para ajustar el pH que oscile entre el rango de 8 a 8,6, debido a que en un pH ácido el ADN puede destruirse (Rocha, 2002).

Para la extracción de ADN también se emplea el mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas rompiendo los puentes disulfuro que las conforman y cloroformo para separar compuestos orgánicos y desnaturaliza proteínas y lípidos (Aguilar, 2006).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una destacada técnica de biología molecular utilizada para amplificar segmentos específicos del genoma. Este proceso se lleva a cabo mediante la utilización de pequeñas secuencias de ADN sintético conocidas como primers o cebadores, que delimitan la región a amplificar (Rodríguez y Barrera, 2004), basándose en el principio de la enzima Taq polimerasa para formar una nueva secuencia complementaria en la cadena de ADN (Santana y Díaz, 2019).

La amplificación de la región Espaciador Interno Transcrito (ITS, por sus siglas en inglés) a través de la técnica de PCR sirve para identificar por medio de un análisis de la secuencia de nucleótidos que fueron resultado de la PCR y partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las existentes en la base de datos se pueden identificar organismos a nivel de especie (Laboratorio de Servicios Genómicos [LabSerGen], 2022).

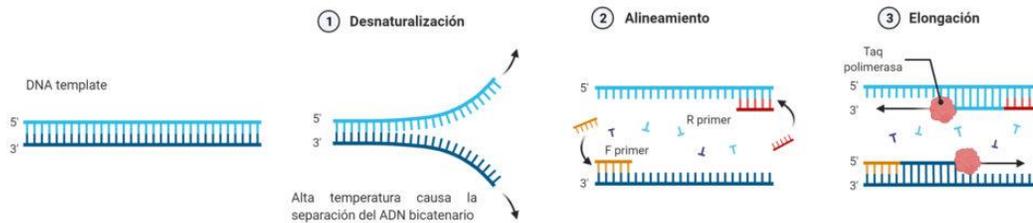
Los ingredientes clave de una PCR son: la Taq ADN polimerasa, la enzima más común en la técnica PCR, obtenida a través de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en condiciones extremas de temperatura en las aguas termales a 75 °C y es estable a 94 °C, por eso la enzima es capaz de mantener su eficacia en altas temperaturas (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Rodríguez y Barrera, 2004); los *primers* que delimitan la secuencia objetivo adhiriéndose

a la cadena de ADN para iniciar la extensión para crear una copia complementaria de ADN (Joshi y Deshpande, 2010), las secuencias de *primers forward* y *reverse* están diseñadas para que se adhieran a la secuencia y que las cadenas de ADN se extiendan con ayuda de la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (Joshi y Deshpande, 2010); los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) utilizan cuatro bases de ADN diferentes (Adenina dATP, Guanina dGTP, Citosina dCTP y Timina dTTP) que sirven como bloques de construcción en la fase de extensión para la nueva cadena de ADN (AAT Bioquest, 2021); el magnesio (Mg^{2+}) que sirve como cofactor de la actividad del ADN polimerasa dando paso a que los dNTPs se incorporen durante la fase de extensión facilitando la unión entre los cebadores y la cadena de ADN estabilizando la carga negativa del grupo fosfato (Yang *et al.*, 2004) y el agua como solvente de los ingredientes de la PCR que debe estar libre de nucleasas y enzimas que afecten a los ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los pasos para una PCR se dividen en tres (Figura 1): La desnaturalización consiste en la separación de las hebras de la doble hélice por el aumento de temperatura (94-98 °C) por 30 s a 1 min rompiendo los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias de nucleótidos dando como resultado un ADN monocatenario (Muthuraj *et al.*, 2022); El segundo paso es el alineamiento donde la temperatura disminuye (45-64 °C) dando paso a que los cebadores y la ADN polimerasa se unan a las hebras separadas de ADN y que los nucleótidos se unan a su complemento (Serrato *et al.*, 2014); En el paso final ocurre un aumento de temperatura (68 °C-72 °C), en estas condiciones la polimerasa es estable y desde el cebador comienza a sintetizar un nuevo ADN generando nucleótidos complementarios dando como resultado dos nuevas hélices compuestas por una hebra del ADN original y una nueva recién ensamblada (Biosciences, 2012).

Figura 1

Fases de la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)



Nota. Recuperado de Labbox (2022).

Electroforesis

La electroforesis es una técnica de migración y separación de moléculas de ADN, ARN y proteínas a través de una matriz o gel bajo la influencia de un campo eléctrico (Kumar, 2020). Es considerado uno de los métodos más comunes utilizados en el laboratorio debido a que no se necesita un alto poder de resolución, al contrario del gel de poliacrilamida, se pueden separar moléculas hasta 40 kb teniendo en cuenta a que concentración de agarosa se preparó el gel, mientras menor sea su concentración el tamaño de las moléculas que migran es mayor (Fierro, 2014).

Los fosfatos del ADN son de carga negativa, por lo tanto, la molécula migrará al lado con carga positiva, sin embargo, la velocidad de separación depende del tamaño que tenga el ADN y de su conformación (Bhatia y Dahiya, 2015). Se utiliza un componente llamado tampón TBE, formado de Tris, borato y EDTA, que es de pH alcalino para conservar la carga negativa de las moléculas de ADN, también se visualizan las bandas usando un colorante que se intercalan entre las nucleobases que en presencia de la luz UV emiten fluorescencia (Muñoz, 2021).

Secuenciación molecular

Es una técnica que forma parte de los pasos para la caracterización molecular, determina la secuencia del ADN conformada por las bases ordenadas de adenina (A), guanina

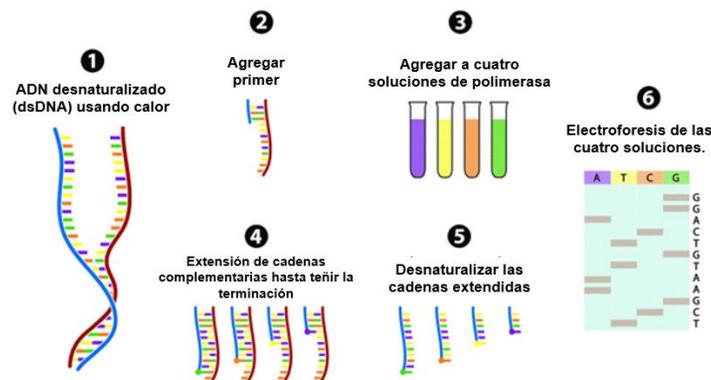
(G), citocina (C) y timina (T) en el genoma de un organismo en base a un fragmento del ADN, con esta técnica se logra obtener la secuencia de aproximadamente 500 bases nitrogenadas (Merchán *et al.*, 2016).

La secuenciación SANGER está diseñada para determinar secuencias de nucleótidos con una precisión del 99,99 % (CD Genomics, 2020). Este proceso implica la generación de múltiples copias de segmentos específicos de una secuencia de interés, en los cuales se incorporan de manera selectiva didesoxinucleótidos (ddNTP). Esto da como resultado segmentos de ADN con diferentes longitudes de cadena, lo que facilita la determinación de las secuencias de estudio (Hagemann, 2015; Jamuar *et al.*, 2016).

Comienza con la incorporación de un cebador y la región de interés, la polimerasa extenderá el cebador completándolo con las bases nitrogenadas complementarias de la hebra de ADN molde, luego se identifica el nucleótido que termina la cadena mediante un tinte fluorescente específico de cuatro colores y mediante electroforesis el producto de la extensión se separa (Figura 2). Un láser activa los fragmentos de ADN a medida que corre la electroforesis y un software identifica la señal y la interpreta como una base obteniendo finalmente los datos de la secuenciación en un electroferograma (Schoales, 2015).

Figura 2

Metodología de la secuenciación Sanger



Nota. Recuperado de Gauthier (2007).

Caracterización proteómica

El estudio de proteínas es una rama que implica el análisis de proteínas a nivel de estructuras, funciones e interacciones (Karlsson *et al.*, 2015). La caracterización proteómica es un proceso que sirve para identificar y caracterizar proteínas en una muestra, que puede o no ser útil para una gran variedad de aplicaciones incluyendo el diseño de fármacos, identificación microbiana y el diagnóstico de enfermedades (Zhai *et al.*, 2022). La aplicación de técnicas basadas en proteómica sirve para detectar e identificar especies microbianas diversas y relevantes para el medio ambiente (Chen *et al.*, 2019).

Desorción/ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS)

Es una técnica bien reconocida para la identificación microbiana debido a su especificidad, rapidez de resultados y bajo costos (Chen *et al.*, 2023), consiste en ionizar y separar las partículas dependiendo de su relación masa-carga de los compuestos químicos, calcula su peso molecular (Torres *et al.*, 2021) con medidas en relación con el tiempo que demoran los iones en llegar al detector al final del tubo de tiempo de vuelo (Rychert, 2019). Este proceso incluye la espectrometría de masas (MS) que determina que moléculas componen una muestra basados en el espectro de masas creadas por los iones que es característico de cada especie y luego se compara con una base de datos (Hou *et al.*, 2019)

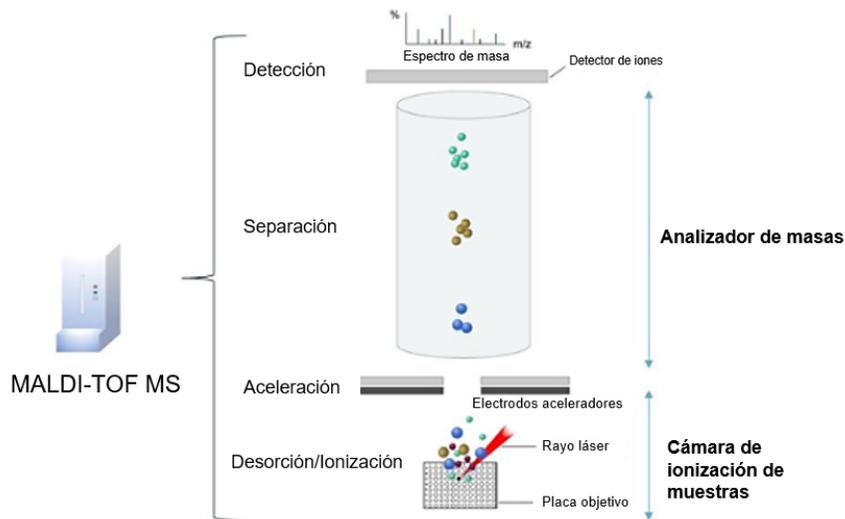
Existen restricciones para este análisis cuando se utilizan muestras de especies no incluidas en la base de datos o que son similares entre sí. La preparación de la muestra es simple y se pueden analizar hasta 40 muestras por hora, no es necesario que se conozca que tipo de organismo se está analizando, permitiendo que se identifiquen en menos de un día (Rychert, 2019).

Consiste en colocar una placa objetivo en una cámara de vacío de un espectrómetro de masas, las zonas que se van a analizar son disparadas por un láser para ionizar las moléculas de la muestra y la matriz de la placa objetivo. En el analizador de masas las moléculas ionizadas se aceleran hacia el detector, mientras las moléculas más ligeras viajan más rápido

al contrario de las más pesadas. Se genera un espectro de masas que representa la cantidad de iones que llegan al detector y luego se da la separación por la relación masa-carga que es única y se separan por el peso molecular (Figura 3) (Li *et al.*, 2022).

Figura 3

Espectrómetro de masas MALDI-TOF



Nota. Recuperado de Li *et al.* (2022).

Bioinformática

La bioinformática es una disciplina científica que utiliza herramientas informáticas para el manejo y análisis de datos biológicos, usada en una amplia gama de campos de la ciencia como la biomedicina, la agricultura, la química, entre otros. Esta se encuentra en constante crecimiento y evolución, por lo tanto existen diversos programas de biología molecular utilizado para el análisis de secuencias como el *Geneious* y *MEGA* (Instituto de Salud Carlos III [SCIII], 2020).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación del proyecto

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología, Agrobiotecnología y Zoología de la Carrera Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicados en el IASA 1, en donde se realizó la activación de las cepas de los hongos en estudio, ensayos relacionados con la biología molecular (extracción de ADN, PCR y electroforesis) y los análisis de los índices de biodiversidad, respectivamente.

La cuantificación del material genético (ADN), así como su calidad se realizó en el Laboratorio de Docencia de la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

La caracterización proteómica mediante la técnica MALDI-TOF, se realizó en Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

Activación y purificación de hongos.

Preparación de medios de cultivo

Medio sólido. Se pesó 40 g de Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA) en una balanza de precisión (Adam) y se colocó en un matraz de 1 000 mL con 800 mL de agua destilada, luego en una plancha de calentamiento y agitación (Labdin) se colocó el matraz con un imán ajustando la temperatura al máximo con una agitación media para disolver el PDA, una vez disuelto se colocó una cápsula de Amoxicilina La Santé® de 500 mg y se añadió agua hasta llegar a los 1 000 mL, finalmente la solución se trasvasó a un frasco BOECO tapón azul de 1 000 mL y se autoclavó por 15 min a 121 °C.

El medio sólido fue dispensado en 50 cajas Petri dentro de una cámara de flujo laminar (ThermoForma) previamente desinfectada con alcohol al 70 % y esterilizada con luz UV por 15 min. El agar de las cajas Petri cuando fueron gelificadas se almacenaron a 4 °C.

Medio líquido. En un matraz de 1 000 mL, se adicionó 800 mL de agua destilada y se colocó 20 g de dextrosa, 5 g de peptona y amoxicilina La Santé ® de 500 mg, para homogenizar la solución se colocó un agitador magnético y transportó a una plancha de agitación a una temperatura máxima y velocidad media. La solución fue trasvasada a tubos de ensayo de 20 mL utilizando pipetas Pasteur de 1,5 mL dejando aproximadamente 5 mL de medio líquido en cada tubo, los tubos posteriormente se colocaron en una gradilla y fueron autoclavados.

Activación de cepas

Se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % y esterilizada con luz UV por 15 min. Se colocaron los materiales en la cámara de flujo: asa de inoculación, alcohol al 96 % en un vaso de precipitación de 50 mL, cajas petri con medio PDA gelificado, cinta Parafilm y mechero de Bunsen.

Se sumergió el asa de inoculación en el alcohol al 96 % y se flameó con el mechero hasta que quede al rojo vivo, una vez enfriada se colocó una muestra de hongo en la caja petri con el medio PDA o en tubo de ensayo con medio líquido, finalmente se flameó la caja petri o boca del tubo con el mechero y selló con cinta Parafilm.

Los cultivos se incubaron a 30 °C por 72 h en una incubadora (Rebelk) (Moreno *et al.*, 2014). Pasado el tiempo se revisaron las cajas que se activaron, se descartaron las muestras de hongos que no crecieron en medio PDA y se purificaron los hongos contaminados hasta obtener hongos puros.

Selección de muestras

Se seleccionaron en total 14 cepas de hongos rizosféricos obtenidos de las raíces de las especies *Piptadenia pteroclada*, *Platymiscium pinnatum* y *Zygia longifolia*, de las cuales seis pertenecieron a la zona de Secoya 2-3 (Tabla 1) y ocho a la zona de Secoya 26 (Tabla 2). Estos fueron identificados previamente a partir de claves dicotómicas *Illustrated Genera of*

Imperfecte Fungi (Barnett y Hunter, 1998) y *Morphologies of Cultured Fungi and key to Species* (Watanabe, 2010).

Tabla 1

Hongos seleccionados en Secoya 2-3

Cepa	Género*
0	<i>Scopulariopsis</i>
1	<i>Aspergillus</i>
2	<i>Gliocladium</i>
3	<i>Trichoderma</i>
4	<i>Scopulariopsis</i>
5	<i>Fusarium</i>

Nota. * Identificación por características morfológicas. Adaptado de Quinsasamín, (2019); Remache (2020); Sosa (2018); Vega (2021).

Tabla 2

Hongos seleccionados en Secoya 26

Cepa	Género*
7	<i>Rhizopus</i>
8	<i>Acremonium</i>
9	<i>Rhizoctonia</i>
10	<i>Rhizopus</i>
11	<i>Trichoderma</i>
12	<i>Scopulariopsis</i>
13	<i>Paecilomyces</i>
14	<i>Geotrichum</i>

Nota. *Identificación por características morfológicas. Adaptado de Quinsasamín, (2019); Remache (2020); Sosa (2018); Vega (2021).

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se enviaron las muestras de hongos al laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Universidad Regional Amazónica Ikiam, donde se realizó la extracción de proteínas para la identificación de hongos rizosféricos por MALDI-TOF utilizando los softwares MALDI-MS *Application* (2.9.4.1) y la base de datos SAMARIS (*System Version* 4.1.0.9).

Secuenciación de productos PCR

Extracción de ADN genómico de hongos

Para las extracciones de ADN de los hongos rizosféricos se modificó el protocolo establecido por Flores (2021), modificado de Berrendero *et al.* (2008).

Se recuperaron los micelios de las cepas crecidas en medio sólido y líquido incubados por 48 y 72 horas, respectivamente, los cuales fueron transferidos en microtubos de 1,5 mL. Adicionalmente, para los hongos cultivados en medio líquido se agregaron 1,5 mL del cultivo. Los tubos fueron sometidos a centrifugación a 10 000 rpm durante 2 min y se descartaron los sobrenadantes.

El proceso continuó con la adición de 500 µL de buffer de extracción [Tris HCl 100 Mm (INVITROGEN), EDTA 20 mM (J.T. Baker), CTAB 2,5 % w/v, NaCl 1.4 M (EMSURE), pH 8] a los tubos con la muestra fúngica. Con ayuda de un pistilo estéril, se maceró las muestras por 1 min con la finalidad de triturar al micelio y luego homogenizadas en un vórtex por 5 s, se añadió 3 perlas de vidrio y 2 µL de β-mercaptoetanol y se volvió a homogenizar en el vórtex por 30 s. Posteriormente, los tubos se incubaron por 30 min a 60 °C en un termobloque, mezclados cada 10 min.

Pasados los 30 min de incubación, se añadieron 500 µL de cloroformo frío y se agitó en vórtex durante 30 s seguido de un periodo de reposo de 2 min. A continuación, los tubos se colocaron en la centrifuga ajustada a 14 500 g por 8 min.

En una cámara de flujo laminar previamente desinfectada y esterilizada, se transfirieron los sobrenadantes a un nuevo tubo de 1,5 mL. A estos nuevos tubos se añadieron el mismo volumen de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3 M (Baker Analyzed) y 300 µL de etanol al 70 %. Terminada esta etapa, las muestras se sometieron a una refrigeración a -20 °C hasta durante toda la noche con la finalidad de aumentar la precipitación del ADN.

Al día siguiente, se llevaron las muestras nuevamente a la centrífuga a 14 500 g por 14 min. En la cámara de flujo se desecharon los sobrenadantes y se adicionaron 200 µL de etanol

al 70 % por las paredes del tubo dos veces para eliminar impurezas. Con la muestra purificada, con ayuda del flujo de la cámara, se dejó secar por 30 min con la tapa abierta y el mechero prendido.

Terminado el tiempo, se observó si presentó un pellet notable, en el caso de la observación de un mayor precipitado, se añadieron 75 μ L de NaOH 8 mM en agua ultra pura (Gibco), caso contrario se añadieron 50 μ L. Finalmente se añadieron 1 μ L de RNAsa y se incubaron las muestras en el termobloque a 37 °C por 30 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior uso y análisis.

Pureza y concentración de ADN. Utilizando la espectrofotometría de microplacas *Multiscan Sky* (Thermo Scientific) se midieron las concentraciones (μ g/mL), y purezas usando longitud de ondas de relación A260/280 y A260/230 (Tabla 3). Para ellos se colocaron 2 μ L de ADN extraído de cada muestra, se usó como blanco 2 μ L de NaOH 8mM en agua ultra pura y se procedió a la lectura de los resultados del programa utilizado por el *Multiscan Sky* (Skantl Software 5.0 for *Microplate Readers* RE, ver. 5.0.0.42).

Tabla 3

Valores promedio de pureza en muestras de ADN

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	$\geq 1,8-2,1$. Pureza óptima
			$\geq 1,6-1,7$. Pureza aceptable < 1,6. ADN contaminado con compuestos aromáticos. >2,1. ADN Contaminado con ARN.
	A260/230	Pureza	>2-2,2. Pureza óptima >1,8. Pureza aceptable
			< 1,8. ADN contaminado con sales, hidratos de carbono. < 1,5. ADN altamente contaminado

Nota. Recuperado de Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN [BancoADN], (2020).

Integridad del ADN. Para comprobar la presencia de ADN, resultado de la extracción, se preparó un gel de agarosa al 0,8 %. En un matraz de 125 mL se colocaron 60 mL de TBE 1 X [108 g de Tris (Invitrogen), 55 g de ácido bórico (AMP) y 40 mL de EDTA (JT. Baker)] y 0,48 gr de agarosa, el cual fue calentado hasta disolver por completo. Una vez tibio se colocaron 4 µL de *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (promega) y se lo vertió en un molde con los peines previamente colocados en el gel, se dejó reposar hasta que gelificaron.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Dilución de ADN. Las muestras de ADN con concentración mayor a 100 µg/µL fueron diluidas en agua ultra pura usando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ siendo:

C_2 : Concentración deseada de ADN (50 µg – 100 µg)

C_1 : Concentración conocida de ADN

V_2 : Volumen deseado

V_1 : Volumen de ADN que se tomó para la dilución.

Preparación de la MasterMix. Se realizó una *MasterMix* (Tabla 4). en un microtubo de 1 mL donde mX donde $m=n+1$ (n: número de muestras).

Tabla 4

Componentes de la MasterMix

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (1X)
PCR Buffer con Mg^{2+}	10X	1x	5 µL
$MgSO_4$	25 mM	1,5 mM	3 µL
<i>dNTP's mixture</i>	10 mM	0,2 mM	1 µL
<i>Primer forward</i> (ITS1)	10 µM	0,5 µM	1 µL
<i>Primer Reverse</i> (ITS4)	10 µM	0,5 µM	1 µL
Taq Polimerasa	5U/µL	1U	0,2 µL
Agua ultra pura	-	-	37,8 µL
ADN	-	100 ng	1 µL

Nota. Autoría propia.

Amplificación de región ITS

En una cámara de flujo laminar se colocaron microtubos de 0,2 mL, previamente etiquetados, y los microtubos se colocaron 49 μ L de *MasterMix* y 1 μ L de ADN.

En el termociclador (TECHNE TC-412) se ajustó bajo el siguiente programa las condiciones de la PCR que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5

Condiciones de la PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95 °C	3 min	1
Denaturación	95 °C	30 s	
Hibridación	60 °C	30 s	30
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	3 min	1

Nota. Recuperado de Berrendero *et al.* (2008).

Electroforesis

Preparación gel de agarosa 1 %. Para observar las amplificaciones de los productos de la PCR se preparó un gel de agarosa al 1 % con TBE 1X y 4 μ L de *Diamond™ Nucleic Acid Dye* y se lo vertió en un molde con los peines previamente colocados, en oscuridad se dejó reposar hasta que se gelificó.

Preparación de la cámara de electroforesis y visualización. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se lo cubrió con TBE 1X hasta que estuvo completamente sumergido. En cada pocillo se colocó una mezcla de 2 μ L de *BlueJuice™* y 4 μ L de producto de PCR, para la visualización de los tamaños de los amplicones de PCR se colocó en el primer pocillo una mezcla de 2 μ L de *BlueJuice™* y 2 μ L de marcador de peso molecular de 100 bp (Promega) y en los siguientes pocillos se colocaron los controles negativos y positivos con 2 μ L *BlueJuice* y 4 μ L del control.

Cargado el gel se conectó la fuente de poder (Labnet) y se realizó la electroforesis a 70 voltios y 2 000 mAh por 80 min. Una vez terminado el tiempo se retiró el gel del soporte y se visualizaron en el transiluminador (Alpha Innotech).

Envío de productos PCR

Los productos de la PCR de cada ADN fueron correctamente sellados con Parafilm, etiquetados y almacenados en un portatubos con gel refrigerante para mantener las muestras congeladas, las muestras se enviaron al laboratorio IDgen para su posterior secuenciación en la empresa MacroGen (Corea del Sur).

Identificación de secuenciaciones

Las secuencias crudas *forward* y *reverse*, fueron ensambladas en el programa *Geneious ver. 2023.1.2* (Dotmatics), en donde se obtuvieron secuencias consenso las cuales fueron analizadas con la herramienta BLAST, se determinó la identidad de los organismos mediante la comparación de las secuencias con la base de datos del GenBank del NCBI y se analizaron los porcentajes de cobertura e identidad.

Relación filogenética

Con ayuda del programa Mega se realizó un alineamiento de todas las secuencias curadas con el algoritmo Muscle y a partir de ello se construyó el árbol filogenético con el método estadístico *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic* (UPGMA).

Evaluación de diversidad

Se analizaron los datos recolectados del 2018, 2019, 2020 y 2021 (Quinsasamín, 2019; Remache, 2020; Sosa, 2018; Vega, 2021), para extraer la Riqueza (S), abundancia (N_i), índice de diversidad Simpson ($1-D$), índice de Diversidad de Shannon (H') e índice de equitatividad de Pielou (J') y Chao-1.

Para evaluar la diversidad Simpson ($1-D$) se tomó en cuenta los rangos de diversidad baja (0-0,33), diversidad media (0,34-0,66) y diversidad alta (0,67-0,99). Las diferencias entre los índices de diversidad de Shannon se buscaron a partir de la construcción de intervalos de

confianza al 95 %, utilizando el método de Bootstrap con 10 000 iteraciones (MacGregor y Payton, 2013; Peña *et al.*, 2012). Para medir el índice de equitatividad de Pielou se obtuvieron los valores de la diversidad observada en relación con la diversidad que se esperaba, teniendo en cuenta que los valores van de 0-1, siendo 1 situaciones donde las especies tienen igualdad de abundancia (equitatividad homogénea) y 0 la falta de uniformidad (equitatividad heterogénea) (Valdez *et al.*, 2018).

Utilizando el estimador no paramétrico Chao-1 se evaluó la riqueza observada en cada zona, este estimador muestra el número de especies de una comunidad a partir del número de especies raras en la muestra. El Software utilizado para estos análisis fue Past ® (Hammer, 2023).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Activación de cepas

Se activaron un total de 57 muestras de hongos rizosféricos en medio PDA, tal como se detalla en la Tabla 6. Pedroza (2015) menciona que el medio PDA contiene una rica fuente de nutrientes, como hidratos de carbono, aminoácidos y vitaminas, que favorecen el crecimiento de una amplia gama de hongos, esto ayuda al crecimiento de micelio y además es un medio versátil para la investigación microbiológica.

Tabla 6

Datos de cepas activadas

	Secoya 2-3	Secoya 26
Cepas activadas	22	35

Nota. Autoría propia.

Identificación MALDI-TOF

La técnica MALDI-TOF realizada en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam obtuvo como resultado tres cepas identificadas como *Geotrichum clavatum*, *Aspergillus favus/oryzae* y *Penicillium* sp. con un porcentaje de identidad de 84 %, 90 % y 75 % respectivamente (Tabla 7). Taverna (2021) menciona que la base de datos para la identificación por MALDI-TOF tiene limitados espectros de referencia, lo que llega a generar identificaciones erróneas o a no presentar un resultado.

Los porcentajes de identificación obtenidos entran dentro del rango que se considera una identificación correcta, Maldonado *et al.* (2017) establece que el rango de identificación óptimo es de 60-99 %, siendo los del 99 % un resultado más exacto. Sin embargo, los resultados obtenidos no presentan similitud con las características morfológicas que se observan en las cepas por lo que se optó no considerar estos resultados.

La base de datos utilizada para la identificación de microorganismos es SARAMIS (*System Version 4.1.0.9*), sin embargo, existe una versión diferente, VITEK® MS IVD V3.0 (Leyer *et al.*, 2017) que presenta mejor rendimiento al ser una versión más actualizada que puede proporcionar identificaciones de opción única a nivel de especie, género o grupo.

Tabla 7

Identificación de hongos rizosféricos mediante MALDI-TOF

Zona	Cepa	Especie	% de identificación
Secoya 2-3	5	<i>Geotrichum clavatum</i>	84
Secoya 26	13	<i>Aspergillus flavus/oryzae</i>	90
	14	<i>Penicillium sp.</i>	75

Nota. Autoría propia.

Identificación por secuenciación Sanger

Concentración y calidad de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de cepas de hongos que fueron cultivadas en medio líquido y medio sólido mediante un protocolo de extracción tradicional estandarizado. Los valores de pureza obtenidos estuvieron dentro de los rangos adecuados para ADN con concentraciones mayores a 50 µg/mL (Tabla 8), según el programa control de calidad de muestras de ADN y ARN del BancoADN (2020), los valores mayores a 1,8 son aceptables para la relación A_{260}/A_{280} . Mientras que para la relación A_{260}/A_{230} el rango óptimo debe ser mayor a 2, y es aceptable cuando es mayor a 1,8. Sin embargo, se reportan valores de 1 a 1,7 confirmando la presencia de contaminantes como fenoles y EDTA que se absorben a 230.

Tabla 8

Resultados Multiscan Sky

Cepa	Zona	Concentración (µg/mL)	Pureza (A_{260}/A_{280})	Pureza (A_{260}/A_{230})
0	Secoya 2-3	316,5	2,079	1,58*
1	Secoya 2-3	115,6	1,981	1,056*
2	Secoya 2-3	148,8	1,989	1,6*
3	Secoya 2-3	351,5	2,07	1,7*
4	Secoya 2-3	145,2	2,124	1,8

Cepa	Zona	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (A_{260}/A_{280})	Pureza (A_{260}/A_{230})
5	Secoya 2-3	92,86	2,027	1,5*
7	Secoya 26	576,3	2,175	2,0
8	Secoya 26	472,3	2,173	2,1
9	Secoya 26	158,2	2,18	2,1
10	Secoya 26	189,1	2,043	1,7*
11	Secoya 26	531,6	2,103	1,8
12	Secoya 26	446,4	2,086	1,8
13	Secoya 26	126,7	2	1,375*
14	Secoya 26	98,88	1,982	1,1*

Nota. *Valores de pureza de ADN contaminado. Autoría propia.

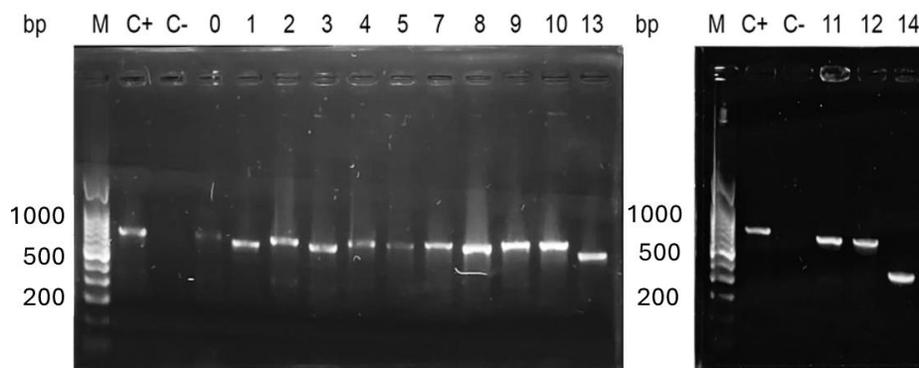
Rache-Cardenal *et al.* (2022), concluyeron que valores menores a 1,8 de pureza (A_{260}/A_{230}) se deben a las modificaciones que se realizan en el protocolo de extracción de ADN obteniendo un aumento en la relación A_{260}/A_{280} , y una disminución en la relación A_{260}/A_{230} , ocasionando que la amplificación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) llegue a inhibirse por la presencia de impurezas, por lo tanto se realiza una dilución para disminuir la concentración y eliminar impurezas.

Amplicones ITS mediante PCR

Para la amplificación de la región ITS se usaron los cebadores ITS1 e ITS4, obteniendo amplicones cuyos tamaños variaron entre los 0,3 a 0,7 kb (Figura 4).

Figura 4

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % w/v



Nota. Visualización de amplicones en gel de agarosa, obtenidos a partir del ADN de hongos, utilizando ITS1 e ITS4. M: Marcador molecular. Control (+); control (-). Autoría propia.

Lo que concuerda con lo establecido por Lee *et al.* (2020), quienes identificaron molecularmente hongos rizosféricos, amplificando dicha región con los primers mencionados.

Identificación de secuencias consenso

Los resultados obtenidos revelan que las 14 cepas se clasificaron en 7 especies, siendo *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma sp.* y *Trichoderma virens*, siendo *Mucor irregularis* la especie que más prevalece (Tabla 9). Cada resultado fue respaldado con el aspecto de su colonia en PDA y en base en sus características morfológicas a nivel microscópico.

Según los análisis realizados con la herramienta BLAST (Tabla 9) se reportaron valores de identidad que superaron el 99 %, este porcentaje coincide con lo establecido por Fungal Diversity Survey [FunDiS], (2022), quien menciona que dicho porcentaje indica la similitud entre la secuencia consenso obtenida de los ensamblajes y las secuencias blanco, siendo éste confiable si el porcentaje es mayor al 98 %.

En lo que corresponde a la identificación molecular, se logró identificar las especies de los hongos, a excepción de la cepa de *Trichoderma sp.* la cual se obtuvo a nivel de género. Por lo que Bellemain *et al.* (2010), establecen que a pesar de que la región ITS es ampliamente utilizada para la identificación molecular, ésta puede generar sesgos, lo que llevaría a resultados erróneos o incompletos, debido a que en la división de Ascomicete de preferencia se deben usar los pares de cebadores ITS2, ITS3 e ITS4. Por otra parte, Prabhakaran *et al.* (2015) mostraron que al realizar una PCR multiplex combinando cebadores específicos para amplificar las regiones de los genes *tef1* y *rpb2*, aumenta la precisión y eficiencia en la identificación del género *Trichoderma*.

Tabla 9

Identificación y porcentaje de identidad de secuencias analizadas utilizando BLAST

Cepas	Organismo	% de identidad	N° Ascensión
0	<i>Mucor irregularis</i>	100	ON927130.1
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	MT597427.1

Cepas	Organismo	% de identidad	N° Ascensión
2	<i>Mucor irregularis</i>	99.65	ON927130.1
3	<i>Trichoderma virens</i>	99.83	KC576740.1
4	<i>Mucor irregularis</i>	99.67	ON927130.1
5	<i>Mucor irregularis</i>	100	MG751198.1
7	<i>Mucor irregularis</i>	99.58	ON927082.1
8	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	MN075516.1
9	<i>Mucor irregularis</i>	99.84	ON927130.1
10	<i>Mucor irregularis</i>	100	ON927130.1
11	<i>Trichoderma sp.</i>	99.84	KM066570.2
12	<i>Trichoderma sp.</i>	99.84	KM066570.2
13	<i>Penicillium citrinum</i>	99.79	MT582768.1
14	<i>Geotrichum candidum</i>	100	OR122285.1

Nota. Autoría propia.

Comparación de las metodologías utilizadas para la identificación de especies

Ambos métodos de caracterización generaron diferentes resultados (Tabla 10). Con la secuenciación SANGER se identificó el 92,8 % a nivel de especie y género, mientras MALDI-TOF identificó el 21 % de las cepas.

Tabla 10

Comparación de resultados de secuenciación y MALDI-TOF

Cepa	Zona	Secuenciación	MALDI-TOF
0		<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
1		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sin identificar
2	Secoya 2-3	<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
3		<i>Trichoderma virens</i>	Sin identificar
4		<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
5		<i>Mucor irregularis</i>	<i>Geotrichum clavatum</i>
7		<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
8		<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sin identificar
9		<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
10	Secoya 26	<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
11		<i>Trichoderma sp.</i>	Sin identificar
12		<i>Trichoderma sp.</i>	Sin identificar
13		<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Aspergillus flavus/oryzae</i>
14		<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Penicillium sp.</i>

Nota. Autoría propia.

Especies fúngicas y su relación con las especies arbóreas

Las especies arbóreas utilizadas como fitoremediadoras están asociadas a las especies fúngicas identificadas molecularmente (Tabla 11).

Tabla 11

Especies arbóreas asociadas a hongos rizosféricos

Zona	Especie fúngica	Especies arbóreas
Secoya 2-3	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Zygia longifolia</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
Secoya 26	<i>Mucor irregularis</i>	Claro
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Zygia longifolia</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Zygia longifolia</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>	Claro
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>	

Nota. Autoría propia.

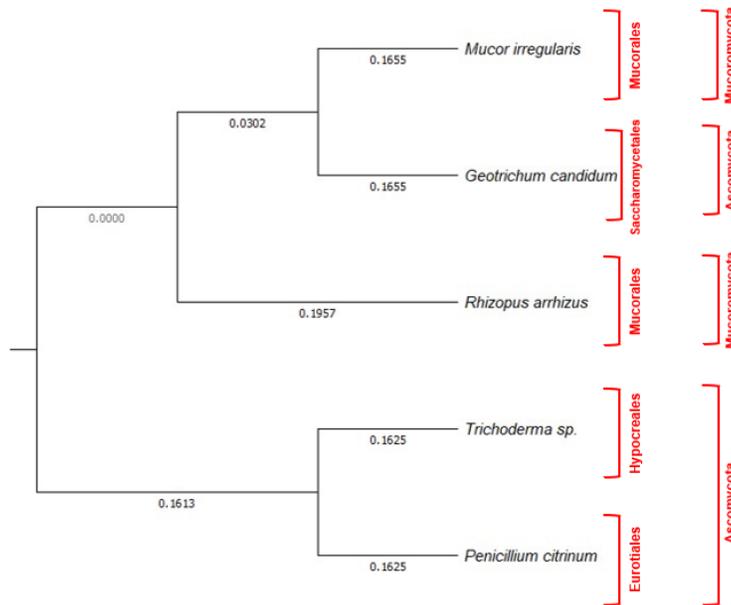
Filogenia de hongos identificados molecularmente

El total de cepas identificadas corresponden a la división Ascomycota, asociados a los órdenes Eurotiales, Hypocreales y Saccharomycetales; y Mucormycota incluido el orden Mucorales.

En la Figura 5 se presenta el árbol filogenético de tres cepas identificadas de hongos de la zona no contaminada Secoya 2-3, en donde se observan resultados similares a lo presentado por Suárez y Peñaranda (2021), quienes encontraron las mismas agrupaciones en las divisiones estudiadas.

Figura 7

Árbol filogenético de Secoya 26



Nota. En el árbol filogenético se presenta las distancias evolutivas entre las especies de los hongos identificados en suelos contaminados, con sus respectivas agrupaciones. Autoría propia.

Figura 8

Secuencias alineadas de la zona Secoya 26

Species/Abbrv	DNA Sequences	Translated Protein Sequences
1. <i>Mucor irregularis</i>	C A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T C G C A T C G A T G A A G A A C G T A G C A A A G T	
2. <i>Rhizopus arrhizus</i>	C A A C T T T T A A C A A T G G A T C T C T T G G T T C T C G C A T C G A T G A A G A A C G T A G C A A A G T	
3. <i>Trichoderma sp.</i>	A A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T	
4. <i>Penicillium citrinum</i>	A A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C C G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T	
5. <i>Geotrichum candidum</i>	A A A C T T T T A A C A A T G G A T C T C T T G G T T C T C G T A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A C	

Nota. Secuencias alineadas en el programa MEGA. Autoría propia.

Caracterización morfológica de hongos identificados molecularmente

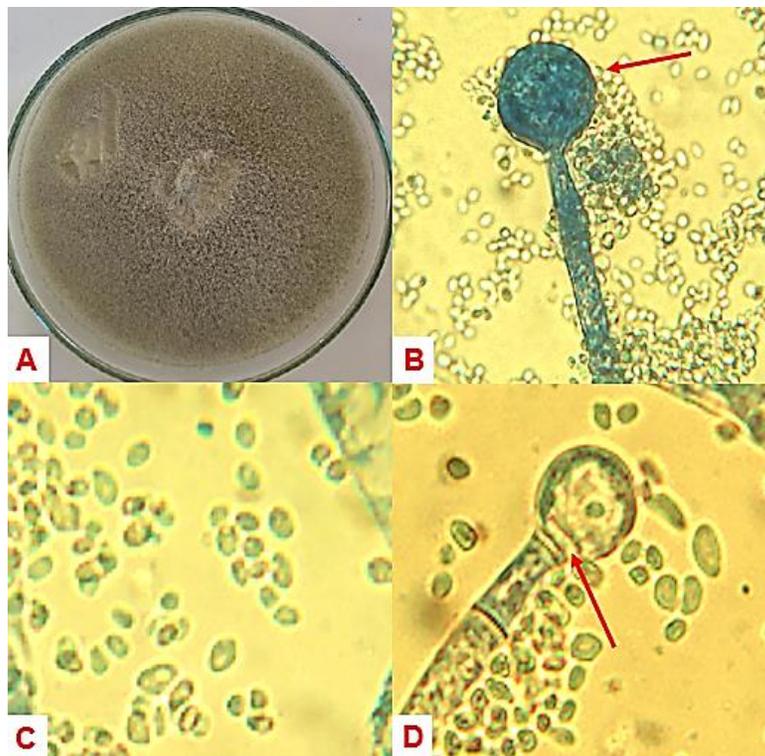
Mucor irregularis

Macroscópicamente *Mucor irregularis* presentó colonias algodonosas de color blanco que, a partir de la primera semana, cambiaron a gris oscuro (Figura 9A). Esta morfología también fue descrita por Nguyen *et al.* (2016), quienes sostienen que el cambio de color se debe al crecimiento de esporangios.

A nivel microscópico esta especie muestra una estructura erecta y ramificada llamada esporangióforos, que se encarga de sostener a los esporangios esféricos (Figura 9B). Las esporangiosporas son elipsoidales (Figura 9C), con una columela desarrollada cuando son liberadas en la base de los esporangio (Figura 9D); estas características también fueron descritas por Cruz *et al.* (2017).

Figura 9

Características morfológicas de Mucor irregularis



Nota. A: Crecimiento en PDA. B: Esporangio con esporangiosporas; C: Esporangiosporas elipsoidales; D: Esporangio liberando esporangiosporas y presencia de columela y collarete. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

Aspergillus fumigatus

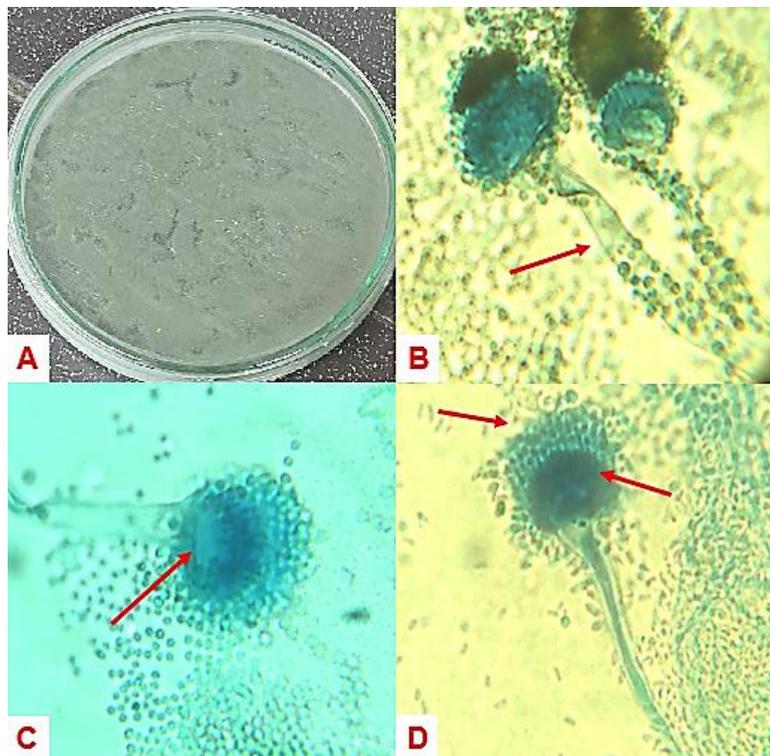
Es de crecimiento rápido y con esporulación fuerte y presenta colonias verdes de aspecto polvoso (Figura 10A). Bajo microscopio se observa la una estructura recta llamada conidióforos o estípites (Figura 10B) que terminan en una vesícula en forma cónica (Figura 10C),

esta es cubierta por una capa de fiálides y finaliza en conidios redondos que se producen en abundancia, formando la cabeza conidial (Figura 10D).

Esta descripción fue comparada con las presentadas por Jafar *et al.* (2016), Tankeshwar (2022) y Valdes *et al.* (2018), coincidiendo tanto a nivel macroscópico como microscópico para comprobar la morfología de la especie en identificada.

Figura 10

Características morfológicas de Aspergillus fumigatus



Nota: En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Conidióforos; C: Vesícula; D: Fiálide y Conidios. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

Trichoderma virens

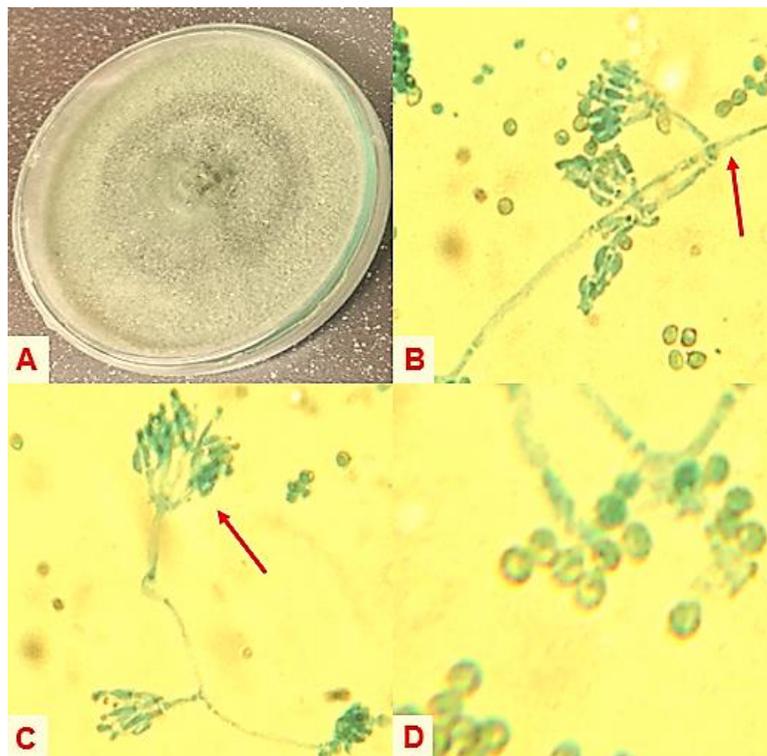
El cultivo en PDA se observó una colonia de color verde intenso que crecía en forma de anillo concéntrico alrededor del punto de inoculación y de aspecto blando (Figura 11A). A nivel microscópico presenta conidióforos rectos y ramificados irregularmente (Figura 11B), son la estructura de soporte de las fiálidas, esta estructura contiene en su terminación de tres a cinco

fiálidas adheridas (Figura 11C) y cada una termina con una fialospora de forma globosa (Figura 11D). Esta descripción coincide con las expuestas por los autores Gómez *et al.* (2020) y Paudzai *et al.* (2019).

Algunos autores mencionan la presencia de clamidosporas en las cepas de *Trichoderma virens*, Naher *et al.* (2019) las describe de forma similar que las fialosporas, de aspecto globoso pero difíciles de observar y que por lo regular se encuentran en medio de los conidióforos o en los extremos. Según menciona Peng *et al.* (2021) las clamidosporas se producen en ambientes desfavorables para el hongo por lo que al estar en una condición de temperatura de 30 °C no se desarrollaron.

Figura 11

Características morfológicas de Trichoderma virens



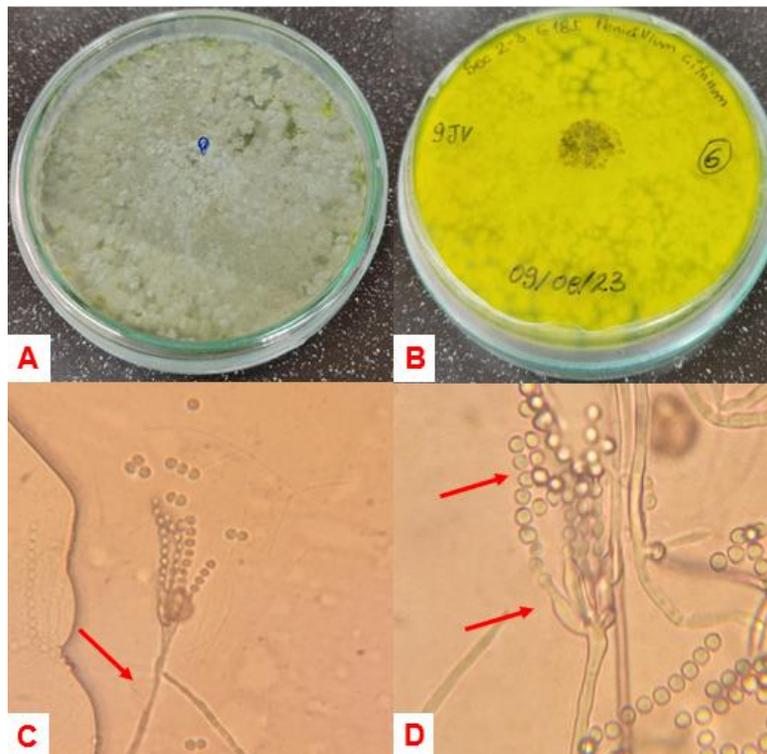
Nota. En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Ramificación de conidióforos; C: Fiálide; D: Fialospora en cada fiálide. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

Penicillium citrinum

Colonia verde redonda de aspecto polvoso y con gotas de exudados de color amarillo pálido en la parte superior del cultivo (Figura 12A) y amarillo el reverso (Figura 12B). A nivel microscópico se presentan conidióforos rectos y ramificados (Figura 12C) con métula irregulares que contiene las fiálides y conidios. Las conidias son esféricas y se encuentran ordenadas en forma de cadena (Figura 12D). La morfología de la cepa purificada fue similar a la descrita por Houbraken *et al.* (2011) y Nguyen *et al.* (2023).

Figura 12

Características morfológicas de Penicillium citrinum



Nota. En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Crecimiento en PDA reverso; C: Conidióforos; D: Métula, fiálides y conidios. Bajo microscopio (100x). Autoría propia.

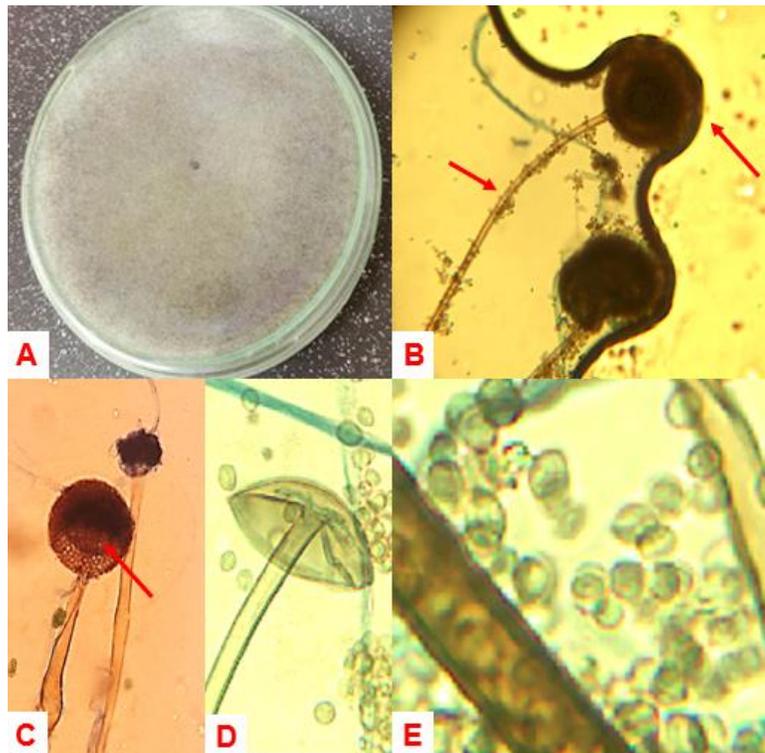
Rhizopus arrhizus

La colonia presenta un color blanco algodonoso que se torna a gris a medida que el hongo esporula (Figura 13A). Sus esporangióforos son rectos y simples de color negro que

sostiene al esporangio ovalado (Figura 13B), con una columela (Figura 13C) en forma de paraguas cuando se liberan las esporas (Figura 13D). Las esporas son elipsoidales (Figura 13E). Similares características presentaron Dolatabadi *et al.* (2014) a nivel macroscópico y Zheng *et al.* (2007) a nivel microscópico.

Figura 13

Características morfológicas de Rhizopus arrhizus



Nota. En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Esporangióforo y esporangio; C: Columela; D: Esporangio con esporas liberadas E: Esporangiospora. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

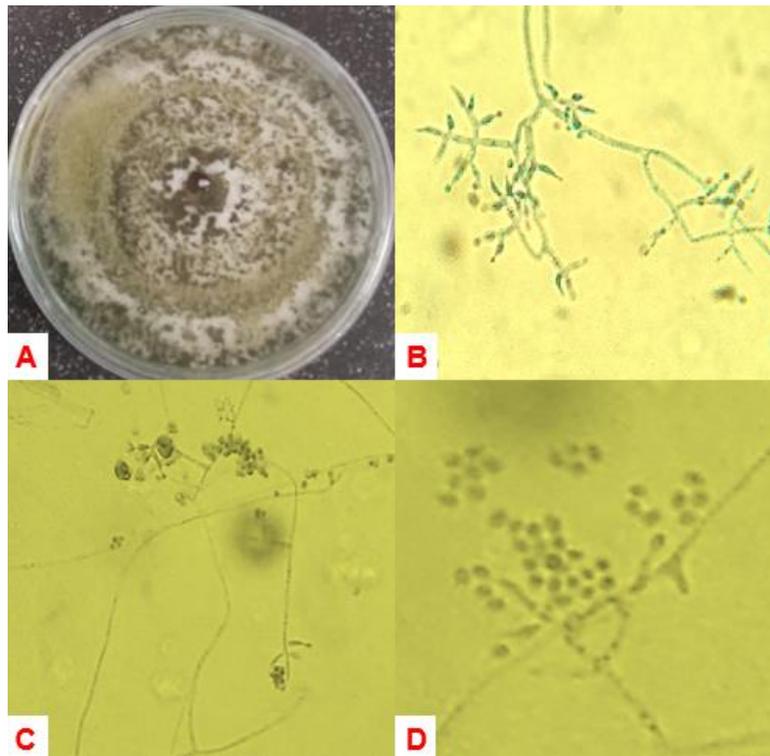
Trichoderma sp.

El cultivo puro de *Trichoderma sp.* presentó una colonia blanca de aspecto esponjoso con anillos concéntricos de color verde (Figura 14A). Su morfología microscópica mostró conidióforos ramificados (Figura 14C) con fialides (Figura 14B) y conidios globosos de color verde (Figura 14D). Basándose en la morfología, se identificó como *Trichoderma koningii* por

su descripción microscópica y aspecto de su colonia, similar a la descrita por Samuels *et al.* (2006).

Figura 14

Características morfológicas de Trichoderma sp.



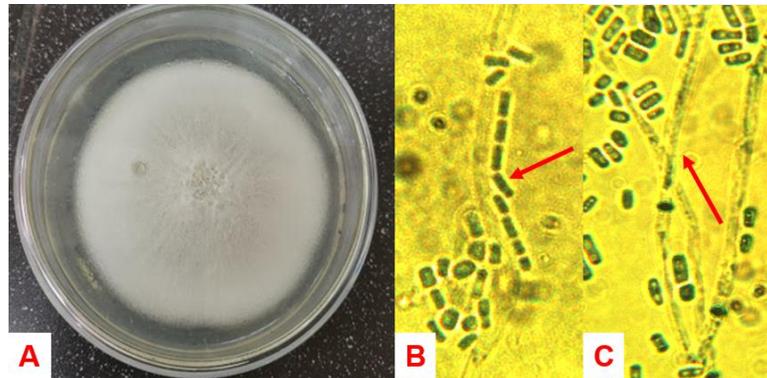
Nota. En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Fiálide C: Ramificación de conidióforos; D: Conidios. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

Geotrichum candidum

La colonia es de color blanco, plano y de aspecto cremoso (Figura 15A). Las hifas son septadas y ramificadas (Figura 15C) formando cadenas de antrosporas cilíndricas que se liberan cuando las hifas maduras se fragmentan (Figura 15B). Estas características fueron similares a las observadas por Loo *et al.* (2006).

Figura 15

Características morfológicas de *Geotrichum candidum*



Nota. En la figura se observan A: Crecimiento en medio PDA; B: Antrosporas C: Ramificación de hifas. Bajo microscopio (40x). Autoría propia.

Análisis de biodiversidad entre las zonas de Secoya 2-3 y Secoya 26

En los sitios no contaminados de Secoya 2-3 se recolectaron en total 18 individuos que pertenecen a tres especies (*Aspergillus fumigatus*, *Mucor irregularis* y *Trichoderma virens*), mientras que en los sitios contaminados se recolectaron 34 individuos que pertenecen a cinco especies (*Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus* y *Trichoderma* sp).

El valor obtenido del índice de Simpson en la zona no contaminada de Secoya 2-3 fue de 0,576 presentando una diversidad media, mientras que la zona de contaminada de Secoya 26 presentó un índice de 0,721 representando una diversidad alta, este resultado no concuerda con lo mencionado por Coral del Val (2000) quien obtuvo una menor diversidad en sitios afectados por hidrocarburos. Cabe recalcar que en los suelos contaminados a una profundidad de 0-30 cm existe una alta disponibilidad de carbono orgánico por su capacidad de absorción (Castellanos *et al.*, 2015), misma profundidad donde se encontraron los hongos rizosféricos de la zona estudiada, elemento que según Marín (2018), es también utilizado como fuente de energía de hongos, por lo tanto los niveles altos de carbono presentes en los suelos

contaminados podrían explicar la alta diversidad presentada en suelos contaminados evaluados en el presente estudio.

Esta adaptación a ambientes contaminados se explica por la capacidad de degradar hidrocarburos con ayuda de enzimas degradadoras y enzimas ligninolíticas que se aplican en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Quintero *et al.*, 2006).

El sitio no contaminado presentó un valor de equitabilidad de 0,880, mientras que el sitio contaminado fue de 0,852. Estos resultados fueron interpretados utilizando los valores estandarizados por Salazar *et al.* (2019), señalando que los valores cercanos a 1 representan una distribución uniforme con una alta equitabilidad (Homogeneidad), siendo el sitio no contaminado el que presenta el valor más bajo (Heterogeneidad). También menciona que estos resultados representan una semejanza entre las especies evaluadas por lo que no existe una clara dominancia y que presentan la misma abundancia.

El valor de riqueza estimada de la especie (Chao-1) en los dos sitios evaluados alcanzó el 100 % de los valores de riqueza específica observada. Gotelli y Colwell (2010) demostraron que, si la riqueza esperada es igual al 100 % de la riqueza observada, no se espera el registro de especies adicionales en futuros muestreos, por lo tanto se asume que el muestreo de especies fue realizado correctamente.

Tabla 12

Índice de diversidad determinados por el Software PAST

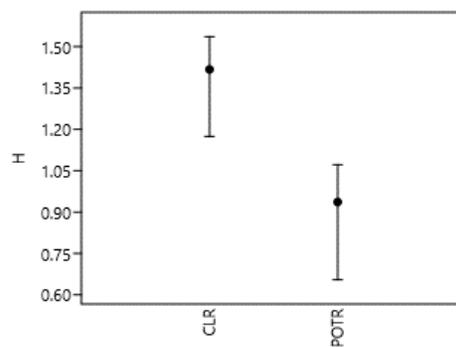
Índice ecológico	PTR	CLR
Riqueza específica	3	5
Abundancia	18	34
Diversidad de Simpson (1-D)	0,56	0,72
Diversidad Shannon (H')	0,93	1,41
Equitabilidad de Pielou (J')	0,85	0,88
Chao-1	100 %	100 %

Nota. CLR: Celdas de lodos y ripios en Secoya 26. POTR: Potreros en Secoya 2-3. Autoría propia.

Los valores de diversidad de Shannon fueron de 0,93 y 1,41 para la zona no contaminada y contaminada, respectivamente. MacGregor y Payton (2013) establecieron que los IC separados indican que existen diferencias de diversidad entre ecosistemas, por lo que se presume que la diversidad fúngica de Shannon es diferente entre potreros y celdas de lodos y rípios (Figura 16).

Figura 16

Índice de Shannon en zona contaminada (CLR) y zona no contaminada (POTR)



Nota. CLR: Celda de lodos y rípios (Secoya 26); POTR: Potreros (Secoya 2-3). Autoría propia.

En base a la abundancia de especies fúngicas presentes en la zona contaminada Secoya 26, se evidencia que estos microorganismos se han adaptado a vivir y a alimentarse del carbono disponible en los suelos contaminados con hidrocarburos (Marín, 2018).

Las especies identificadas tienen potencial para degradar hidrocarburos y ser aplicadas para la biorremediación de suelos contaminados por petróleo. *Aspergillus fumigatus* tiene la capacidad de degradar antraceno, este material se encuentra en algunos insecticidas, su enzima extracelular puede metabolizarlo (Al-Hawash *et al.*, 2019), además de tener la habilidad de biodegradar petróleo crudo, Al-Dossary *et al.* (2019) realizó aislamientos que en 30 días lograron biodegradar el 60 % del crudo.

Mucor Irregularis se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y tiene potencial para ser aplicado en el campo para la degradación de crudo. Un estudio realizado por

Asemoloye *et al.* (2020) con cepas aisladas de *Mucor irregularis* de zonas contaminadas por petróleo demuestra que puede degradar hidrocarburos pero se limita a aquellos que presentan cadena larga.

El género *Trichoderma* ha sido ampliamente estudiado por sus beneficios en mantener las condiciones ideales para suelos destinados para la agricultura y sus función como controlador biológico, además, Pesántez y Castro (2016) estudio diversas cepas de *Trichoderma*, concluyendo que tiene potencial para remover los hidrocarburos y metales pesados reduciendo el 47 % de la concentración de hidrocarburos.

El potencial biorremediador de *Penicillium citrinum* fue estudiado por Kumar *et al.* (2023) que tuvo el objetivo de evaluar la capacidad cepas biosurfactantes para biodegradar petróleo crudo, concluyendo que este hongo es candidato para ser usados en la biorremediación por su producción de enzimas extracelulares que absorben y utilizan carbono, eliminando las sustancias contaminantes del aceite.

La cepa de *Rhizopus arrhizus* presenta un mejor potencial cuando se encuentra asociada con otro cultivo con capacidad de degradación de petróleos, Wemedo *et al.* (2018) demostraron que la asociación *Rhizopus arrhizus* + *Aspergillus niger* funcionó mejor que usar cepas individuales de este organismo, con capacidad de degradar distintas longitudes de cadenas de hidrocarburos.

Las cepas de *Geotrichum candidum*, además de ser empleadas en la industria agroalimentaria, tiene el potencial de reducir o eliminar los contaminantes y metales pesados presentes en el medio acuático, ofreciendo soluciones ecológicas ayudar a estos ecosistemas afectados por los desechos orgánicos y toxinas (Kamilari *et al.*, 2023).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Con la reactivación de las cepas fúngicas en medio PDA se logró un total de 57 hongos, 35 hongos pertenecen a la zona de Secoya 26 y 22 hongos a la zona de Secoya 2-3.
- La técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF identificó 3 hongos rizosféricos de un total de 14, que corresponden a las especies *Geotrichum clavatum*, *Penicillium* sp. Y *Aspergillus favus/oryzae*. Las demás cepas no fueron identificadas por desactualización en la base de datos SARAMIS (*System Version 4.1.0.9*).
- La secuenciación SANGER identificó 14 cepas de hongos rizosféricos que correspondieron a las especies: *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma* sp. y *Trichoderma virens*.
- Los suelos afectados por la actividad petrolera presentaron una mayor abundancia, riqueza y diversidad fúngica con relación a los no afectados; lo que indica que en estas zonas contaminadas se inició un proceso de biorremediación natural.

Recomendaciones

- Se recomienda usar la técnica de secuenciación SANGER para futuras identificaciones moleculares de hongos.
- Con el propósito de mejorar los resultados utilizando proteómica (MALDI-TOF MS), es recomendable la actualización constante de la base de datos.
- Para futuros trabajos de biorremediación se recomienda utilizar los géneros fúngicos identificados morfológica y molecularmente en este estudio.
- Se recomienda secuenciar otros fragmentos de gen para la identificación de las cepas de *Trichoderma* sp.

Bibliografía

- AAT Bioquest. (19 de febrero de 2021). *What functions do the dNTPs play in PCR?*. AAT Bioquest. AAT Bioquest. Recuperado el 31 de julio de 2023 de <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-functions-do-the-dNTPs-play-in-PCR>
- Aguilar Rivera., X. (2006) *Optimización del protocolo de extracción de ADN de Mycosphaerella fijiensis* [Proyecto de graduación, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/427>
- Al-Dossary, M. A., Abood, S. A., y Al-Saad, H. T. (2019). Biodegradation of Crude Oil Using *Aspergillus* species. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 9(4), 60–64. <https://doi.org/10.7176/JBAH/9-4-09>
- Alejos V., L. P., Aragón Martínez, M. del C., y Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Conejo Romera, A. Serrano Díaz, B. Rendón Aguilar, y M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1 ed., pp. 1–25). SEMARNAT, INECC, UAM-I. https://www.researchgate.net/publication/280731680_Microsatelites
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X., y Ma, F. (2019). Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *MicrobiologyOpen*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.619>
- Aristizabal, F. A. (2016). Evolución en caracterización molecular en procesos de investigación biológica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61559>
- Asemoloye, M. D., Tosi, S., Daccò, C., Wang, X., Xu, S., Marchisio, M. A., Gao, W., Jonathan, S. G., y Pecoraro, L. (2020). Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites. *Microorganisms*, 8(12), 1912. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121912>

- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. (4ª ed.). Editorial Burgess Pub.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., y Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Berrendero, E., Perona, E., y Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of Rivularia and Calothrix (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447–460. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>
- Bhatia, S., y Dahiya, R. (2015). Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. En *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 121–156). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02123-5>
- Biosciences. (2012). *Polymerase Chain Reaction (PCR)* [Archivo PDF]. https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/protocol/BE-305_protocol.pdf
- Bravo, C., Benítez, D., Burgos V., C., Alemán, R., Torres, B., y Marín, H. (2015). Caracterización socio-ambiental de unidades de producción agropecuaria en la Región Amazónica Ecuatoriana: Caso Pastaza y Napo. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología Volumen*, 4(1), 3–31. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5271972>
- Bravo, C., Ramírez, A., Marín, H., Torres, B., Torres, R., Alemán, R., Navarrete, H., y Changoluisa, D. (2017). Factores asociados a la fertilidad del suelo en diferentes usos de la tierra de la Región Amazónica Ecuatoriana. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(11), 1–16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653574014>
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6788>

- Cadavid S., I., y Gómez G., G. (2018). Preparación de solución de lisis para extracción de ADN descrito por Collins *et al.* (1987) en Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas (pp. 93–97). Sello Editorial Tecnológico de Antioquia. <https://dspace.tdea.edu.co/handle/tdea/1476>
- Calvache, M. (2015). *Manejo sostenible de los suelos del Ecuador* [Archivo PDF]. https://cidecuador.org/wp-content/uploads/congresos/2019/x-congreso-latinoamericano-de-agronomia/diapo/manejo-sostenible-del-suelo-agricola_marcelo-calvache.pdf
- Cano, M. A. (2011). Interacción microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*, 14(2), 15–31. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/771>
- Castellanos, M. L., Isaza, R. J., y Torres, J. M. (2015). Evaluación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) sobre suelos urbanos en Maicao, Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 11–17. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55605>
- CD Genomics. (21 de febrero de 2020). *Sanger Sequencing: Introduction, Principle, and Protocol*. CD Genomics Blog. Recuperado el 05 de agosto de 2023 de <https://www.cd-genomics.com/blog/sanger-sequencing-introduction-principle-and-protocol/>
- Chen, D., Geis A., L., Gomes, F. P., Ostrand R., S., y Fenselau, C. (2019). Top-Down Proteomic Characterization of Truncated Proteoforms. *Journal of Proteome Research*, 18(11), 4013–4019. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00487>
- Chen, L., Gao, W., Tan, X., Han, Y., Jiao, F., Feng, B., Xie, J., Li, B., Zhao, H., Tu, H., Yu, S., y Wang, L. (2023). MALDI-TOF MS Is an Effective Technique To Classify Specific Microbiota. *Microbiology Spectrum*, 11(3). 1-10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00307-23>
- Coral del Val Muñoz, M. (2000). *Diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares en suelos contaminados con metales pesados* [Tesis doctoral, Universidad de Granada]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=141082>

- Cruz L., I., Márquez Z., I., García E., R. S., Carrillo F., J. A., León F., J., y Allende M., R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Revista mexicana de Fitopatología*, 35(3), 397–417. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>
- Cuvi, N., y Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *Historia, Ciencias, Saude - Manguinhos*, 22, 1693–1714. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702015000500009>
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa control de calidad de muestras de ADN y ARN* [Archivo PDF]. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Díaz Granda., J. L. (2016). *Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (Physalis peruviana L.) en varias localidades del cantón Quito, Pichincha* [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12516>
- Dolatabadi, S., Walther, G., Gerrits Van Den E., A. H. G., y De Hoog, G. S. (2014). Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Diversity*, 64(1), 145–163. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0229-6>
- Ehrmann, J., y Ritz, K. (2013). Plant: Soil interactions in temperate multi-cropping production systems. *Plant and Soil*, 376, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1921-8>
- Fierro F., F. (2014). Electroforesis de ADN. En A. Conejo Romera, A. Serrano Díaz, B. Rendón Aguilar, y M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1 ed., pp. 1–25). SEMARNAT, INECC, UAM-I. https://www.researchgate.net/publication/280731680_Microsatelites
- Flayyih H., I. (2014). Ability of Some Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(2), 46–52. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-2-3>

Flores, F. (2021). *Protocolo para la identificación molecular de microorganismos* [Archivo PDF].

Facilitado por el revisor.

Fungal Diversity Survey. (2022). *Examining Your BLAST Results*. Fungal Diversity Survey.

Recuperado el 29 de agosto de 2023 de <https://fundis.org/component/sppagebuilder/41-examining-your-blast-results>

Garcés R., M., Senés G., C., Declerck, S., y Cranenbrouck, S. (2019). Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants growing in a petroleum-polluted soil of the Amazon region of Ecuador. *MicrobiologyOpen*, 8(4).

<https://doi.org/10.1002/mbo3.703>

García, L. (2008). *Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú*.

[Archivo PDF].

https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/estudio_caracterizacion.pdf

Gauthier B., M. G. (2007). *Simulation of polymer translocation through small channels* [Doctoral thesis, University of Ottawa].

<https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2008PhDT.....189G/abstract>

Gómez M., E., Brito V., H., De, U., López F., C., Salaya D., J. M., Salinas H., R. M., Gómez V., A., y Cruz H., A. (2020). The Morphological and Molecular Characterization of *Trichoderma* spp. in Cocoa Agroforestry System. *Open Science Journal*, 5(4).

<https://osjournal.org/ojs/index.php/OSJ/article/view/2407/351>

Gotelli, N. J., y Colwell, R. K. (2010). Estimating Species Richness. En A. E. Magurran y B. J. McGill (Eds.), *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment* (pp. 39–54). Oxford University Press.

https://www.researchgate.net/publication/236734446_Estimating_species_richness

Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- https://books.google.com.ec/books/about/Molecular_Cloning.html?id=DgqZtgAACAAJ&redir_esc=y
- Hagemann, I. S. (2015). Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. En S. Kulkarni y J. Pfeifer (Eds.), *Clinical Genomics* (pp. 3–19). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0>
- Hammer, Ø. (2023). *PAST PAleontological STatistics Reference manual* (4.13). [Archivo PDF]. <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/downloads/past4manual.pdf>
- Herrera, R., Vásquez, S. C., Granja, F., Molina M., M., Capa M., M., y Guamán, A. O. (2022). Interaction of N, P and K on soil characteristics, growth and quality of cocoa sprouts and fruits in Ecuadorian Amazon. *Bioagro*, 34(3), 277–288. <https://doi.org/10.51372/bioagro343.7>
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., y Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Studies in Mycology*, 70, 53–138. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.02>
- Huera L., T., Labrador M. J., Blanco S. J., y Ruiz T., T. (2020). Soil Biology in the Ecuadorian Amazon. *Encyclopedia*. <https://doi.org/10.32545/encyclopedia202004.0007.v1>
- Instituto de Salud Carlos III. (30 de julio de 2020). *¿Qué es la bioinformática y qué aplicaciones tiene en biomedicina?* SCIII. Recuperado el 06 de agosto de 2023 en <https://www.isciii.es/InformacionCiudadanos/DivulgacionCulturaCientifica/DivulgacionISCCIII/Paginas/Divulgacion/Bioinformatica.aspx>
- Jafar K., S., Hossein H., A., y Atghia, O. (2016). Identification of the fungi absorbing heavy metals isolated from waste deposits of zinc factories, Zanjan province, Iran Isolation and Identification of Plant Pathogenic Fungi in Iran View project. *Mycologia Iranica*, 3(1), 65–73. <https://doi.org/10.22043/mi.2017.42384.1070>

- Jaizme V., M. del C., y Rodríguez R., A. S. (2008). Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y bacterias rizosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. *Agroecología*, 3, 33–39. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/95491/91801>
- Jamuar, S. S., D’Gama, A. M., y Walsh, C. A. (2016). Somatic Mosaicism and Neurological Diseases. En *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry* (pp. 179–199). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800105-9.00012-3>
- Joshi, M., y Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5), 81–97. <https://www.scilit.net/publications/61b99e08571967e6ed04755a14a397ab>
- Kamilari, E., Stanton, C., Reen, F. J., y Ross, R. P. (2023). Uncovering the Biotechnological Importance of *Geotrichum candidum*. *Foods*, 12(6), 1124. <https://doi.org/10.3390/foods12061124>
- Karlsson, R., Gonzales S., L., Boulund, F., Svensson S., L., Skovbjerg, S., Karlsson, A., Davidson, M., Hulth, S., Kristiansson, E., y Moore, E. R. B. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms *Systematic and Applied Microbiology*. 38(4), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.006>
- Kumar, R. R. (2020). *Electrophoresis-Principles and Methods* [Archivo PDF]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22115.99368>
- Kumar R., R., Gupta, S., y Verma, R. (2022). Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil. En *Crude Oil - New Technologies and Recent Approaches*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90289>
- Kumar, V., Kumar, H., Vishal, V., y Lal, S. (2023). Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of *Penicillium citrinum* and *Paecilomyces variotii* (Eurotiales) from oil-contaminated areas. *Archives of Microbiology*, 205(1), 50. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03383-x>

Labbox. (1 de marzo de 2022). *La técnica de la PCR (Introducción y principios básicos)*.

Labbox. Recuperado el 30 de julio de 2023 de <https://esp.labbox.com/la-tecnica-de-la-pcr-introduccion-y-principios-basicos/>

Laboratorio de Servicios Genómicos. (2022). *Identificación de género y especie para hongos y otros eucariotes a partir de la secuencia ITS y secuenciación capilar*. Recuperado el 31 de julio de 2023 de

<http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?services=idhongos>

Lee, S. H., Jung, H. J., Hong, S., B., Choi, J. I., y Ryu, J., S. (2020). Molecular Markers for Detecting a Wide Range of *Trichoderma* spp. that Might Potentially Cause Green Mold in *Pleurotus eryngii*. *Mycobiology*, 48(4), 313–320.

<https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1785754>

Leyer, C., Gregorowicz, G., Mougari, F., Raskine, L., Cambau, E., y de Briel, D. (2017).

Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Culture Media. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2045–2054.

<https://doi.org/10.1128/JCM.00006-17>

Li, D., Yi, J., Han, G., y Qiao, L. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au*, 2(5), 385–404.

<https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.2c00019>

Lino A., C. A., Quijano J., C. H., y Cruz L., C. S. (2023). Comparación de tres protocolos de extracción de ADN en *Myliobatis peruvianus*. *REBIOL*, 42(2), 194–198.

<https://doi.org/10.17268/rebiol.2022.42.02.14>

Loo, J. L., Lai, O. M., Long, K., y Ghazali, H. M. (2006). Identification and Characterisation of A Locally Isolated Lipolytic Microfungus - *Geotrichum candidum*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 22–29. <https://www.researchgate.net/publication/267271047>

- López., V., Espíndola, F., Calles, J., y Ulloa, J. (2013). *Amazonía ecuatoriana bajo presión*. FLACSO. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56384.pdf>
- MacGregor F., I., y Payton, M. E. (2013). Contrasting Diversity Values: Statistical Inferences Based on Overlapping Confidence Intervals. *PLoS ONE*, 8(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056794>
- Maldonado, N., Robledo, C., y Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45.
<https://revistasanitariadeinvestigacion.com/espectrometria-de-masas-maldi-tof-en-el-diagnostico-microbiologico/>
- Marín Minda., F. J. (2018). *Biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo por Hongos Endófitos de la Amazonia Ecuatoriana* [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/16029>
- Martínez F., M. L. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen*, 36(5), 273–277.
<https://doi.org/10.1016/j.semereg.2009.12.014>
- Merchán, M. A., Inés, M., Caycedo, T., Katherine, A., y Torres, D. (2016). Molecular biology techniques for research development. *Epidemiological and Health Sciences*, 16(7), 1100–1111. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2292>
- Morell, F., Hernández, A., Borges, Y., y Marentes, F. L. (2009). La actividad de los hongos micorrízicos arbusculares en la estructura del suelo. *Cultivos Tropicales*, 30(4), 25–31.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000400014
- Moreno L., P., Herrera S., Y. A., y Prado D., A. A. (2014). Aislamiento y caracterización de *Rhizoctonia* sp. asociados a raíces de orquídeas en Fusagasugá-Cundinamarca. *Fitopatología Colombiana*, 38(1), 9-12.
https://www.researchgate.net/publication/317264588_AISLAMIENTO_Y_CARACTERIZ

ACION_DE_Rhizoctonia_sp_ASOCIADOS_A_RAICES_DE_ORQUIDEAS_EN_FUSAG
ASUGA-CUNDINAMARCA

- Muñoz Morales., J. M. (2021). *Generación de marcadores de peso molecular para la identificación de fragmentos de ADN (Ácido desoxirribonucleico) para ensayos de electroforesis* [Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/c6e352f4-92af-49bd-8b9c-dc03ca3b8ebd>
- Muthuraj, M., Usharani, B., Anbazhagi, S., Vidya Raj, C., y Venkatesh, K. (2022). *Polymerase Chain Reactions: Basic Optimization Techniques*. Notion Press.
<https://notionpress.com/read/polymerase-chain-reactions>
- Naher, L., Syawani, N., Amieza, N., Kamarudin, A. B., y Karim, S. M. R. (2019). Trichoderma species diversity in rhizosphere soils and potential antagonism with fusarium oxysporum. *Bioscience Journal*, 35(1), 13–26. <https://doi.org/10.14393/BJ-V35N1A2019-41605>
- Nguyen, H. C., Lin, K. H., Nguyen, T. P., Le, H. S., Ngo, K. N., Pham, D. C., Tran, T. N., Su, C. H., y Barrow, C. J. (2023). Isolation and Cultivation of Penicillium citrinum for Biological Control of Spodoptera litura and Plutella xylostella. *Fermentation*, 9(5).
<https://doi.org/10.3390/fermentation9050438>
- Nguyen, T. T. T., Duong, T. T., y Lee, H. B. (2016). Characterization of two new records of mucoralean species isolated from gut of soldier Fly Larva in Korea. *Mycobiology*, 44(4), 310–313. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.310>
- Paudzai, F. A. M., Sundram, S., Yusof, M. T., Angel, L. P. L., Hashim, A. M., y Abdullah, S. N. A. (2019). Induced systemic resistance and promotion of plant growth in oil palm seedlings by endophytic trichoderma virens. *Journal of Oil Palm Research*, 31(4), 572–581. <https://doi.org/10.21894/jopr.2019.0031>
- Pedroza S., A. (2015). *Manejo Integrado Fitosanitario – Guía Didáctica*. Universidad Autónoma Chapingo.

- https://www.researchgate.net/publication/282850956_Guia_Didactica_de_Manejo_Integrado_Fitosanitario
- Peng, X., Wu, B., Zhang, S., Li, M., y Jiang, X. (2021). Transcriptome Dynamics Underlying Chlamyospore Formation in *Trichoderma virens* GV29-8. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.654855>
- Peña C., M., Poorter, L., Alarcón, A., Blate, G., Choque, U., Fredericksen, T. S., Justiniano, M. J., Leaño, C., Licona, J. C., Pariona, W., Putz, F. E., Quevedo, L., y Toledo, M. (2012). Soil Effects on Forest Structure and Diversity in a Moist and a Dry Tropical Forest. *Biotropica*, 44(3), 276–283. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00813.x>
- Pesántez, M., y Castro, R. (2016). Potencial de cepas de *Trichoderma* spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. *Biotecnología Vegetal*, 16(4), 251–256. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/541/html>
- Piepenbring, M., López, F., y Cáceres, O. (2016). Colaboradores escondidos—La Importancia de los Hongos en los Ecosistemas Información para Educación Ambiental. *Puente Biológico*, 8, 57–91. https://www.researchgate.net/publication/321854269_Colaboradores_escondidos_-_La_Importancia_de_los_Hongos_en_los_Ecosistemas_Informacion_para_Educacion_Ambiental
- Prabhakaran, N., Prameeladevi, T., Sathiyabama, M., y Kamil, D. (2015). Multiplex PCR for detection and differentiation of diverse *Trichoderma* species. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1591–1595. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0998-5>
- Quinsasamín Armas., J. I. (2019). *Diversidad de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera de la Amazonía ecuatoriana* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/21015>

- Quintero D., J. C., Gumersindo, F. C., y Lema R., J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13(2), 61–67. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169813258008>
- Rache C., L. Y., Albesiano H., A. S., y Tall, H. (2022). Optimization of a DNA extraction method using Subepidermis from *Austrocylindropuntia* and *Opuntia-Opuntioideae*. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 12(2), 305–314. <https://doi.org/10.19053/20278306.v12.n2.2022.15273>
- Ramos, S. (15 de agosto de 2018). *Extracción y purificación de ADN; Introducción e importancia de la extracción del ADN*. Analitek. Recuperado el 30 de julio de 2023 en <https://blog.analitek.com/extraccion-y-purificacion-de-adn-introduccion-e-importancia-de-la-extraccion-del-adn-0-0-1>
- Remache Arequipa., A. R. (2020). *Diversidad de hongos endorizosféricos de tres especies arbóreas plantadas sobre suelos perturbados inoculados con tierra de bosque natural* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/24805>
- Rocha S., P. J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, 23(3), 9–16. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/921>
- Rodríguez S., I. P., y Barrera S., H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323–335. https://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf
- Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology Mini Review Journal of Infectiology*, 2(4), 1-15. <https://www.infectiologyjournal.com/articles/benefits-and-limitations-of-maldi-tof-mass-spectrometry-for-the-identification-of-microorganisms-Journal%20of%20Infectiology-1-1142.pdf>

- Salazar V., M. del C., Vallejo C., F. A., y Salazar V., F. A. (2019). Inventarios e índices de diversidad agrícola en fincas campesinas de dos municipios del Valle del Cauca, Colombia. *Entramado*, 15(2), 264–274. <https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.5744>
- Salinas, M. E., y Martínez, L. (2022). *Caracterización Molecular (PCR)*. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. <https://www.atmosfera.unam.mx/ciencias-ambientales/aerobiologia/caracterizacion-molecular/>
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B., Petrini, O., Schroers, H., y Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67–133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>
- Sandoval R., A., Martínez R., A., y López, D. (2013). Extracción de ácidos nucleicos. En A. Salazar Montes, A. Sandoval Rodríguez, y J. Armendáriz Borunda (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (2ª ed.). McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1803§ionid=1241556>
71
- Santana, H. G., y Díaz A., C. A. (2019). Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del “Nobel” a la actualidad. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 35(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20180974>
- Schoales, J. (17 de junio de 2015). *How Does Sanger Sequencing Work?* <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/>
- Serrato D., A., Flores R., L., Aportela C., J., y Sierra P., E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, y M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (1 ed., pp. 53–73). SEMARNAT, INECC, UAM-I. https://www.researchgate.net/publication/280731680_Microsatelites

- Sosa Vargas., V. S. (2018). *Diversidad de hongos presentes en tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera en la Amazonía ecuatoriana* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/15842>
- Suárez C., L. Y., y Peñaranda F., F. A. (2021). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194–206. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>
- Tankeshwar, A. (19 de agosto de 2022). *Aspergillus fumigatus Morphology, Pathogenesis, Lab Diagnosis*. Microbe Online. Recuperado el 16 de agosto de 2023 en <https://microbeonline.com/aspergillus-fumigatus-characteristics-pathogenesis-diagnosis/>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70–78. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427>
- Taverna, C. (2021). Identificación de hongos por MALDI-TOF MS. *I Congreso de Microbiología Veterinaria*, 145–148. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122814>
- Thapa, B., Kumar, A., y Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8(1). <https://doi.org/10.3126/kuset.v8i1.6056>
- Torres S., E., Leal R., C., y García R., C. (2021). Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms*, 9(7), 1539. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>
- Valdes, I. D., Berg, J., Haagsman, A., Escobar, N., Meis, J. F., Hagen, F., Haas, P. J., Houbraken, J., Wösten, H. A. B., y De Cock, H. (2018). Comparative genotyping and phenotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates from humans, dogs and the environment. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1244-2>

- Valdez M., C. G., Guzmán L., M. A., Valdés G., A., Forougbakhch P., R., Alvarado V., M. A., y Rocha E., A. (2018). Estructura y diversidad de la vegetación en un matorral espinoso prístino de Tamaulipas, México. *Biología tropical*, 66(04), 1674–1682.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442018000401674&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
- Vega Chimarro., M. A. (2021). *Efecto de la inoculación de suelos perturbados sobre la diversidad de hongos ectorizosféricos de tres especies arbóreas en la amazonía ecuatoriana* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/24876>
- Wang, Z., Li, T., Wen, X., Liu, Y., Han, J., Liao, Y., y DeBruyn, J. M. (2017). Fungal communities in rhizosphere soil under conservation tillage shift in response to plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 8(1301), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01301>
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press.
- Wemedo, S. A., Nrior, R. R., y Ike, A. A. (2018). Biodegradation potential of *Aspergillus Niger* and *Rhizopus arrhizus* isolated from crude oil spilled site in Rivers State. *IOSR Journal of Environmental Science*, 12(12), 49–57. <https://doi.org/10.9790/2402-1212014957>
- Yang, L., Arora, K., Beard, W. A., Wilson, S. H., y Schlick, T. (2004). Critical role of magnesium ions in DNA polymerase β 's closing and active site assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 126(27), 8441–8453. <https://doi.org/10.1021/ja049412o>
- Zhai, L., Chen, K, Hao, B., y Tan, M. (2022). Proteomic characterization of post-translational modifications in drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43, 3112–3129.
<https://www.nature.com/articles/s41401-022-01017-y>
- Zheng, R., Chen, G., Huang, H., y Liu, X. (2007). A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*, 59(2), 273–372. <https://www.researchgate.net/publication/287477426>