

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

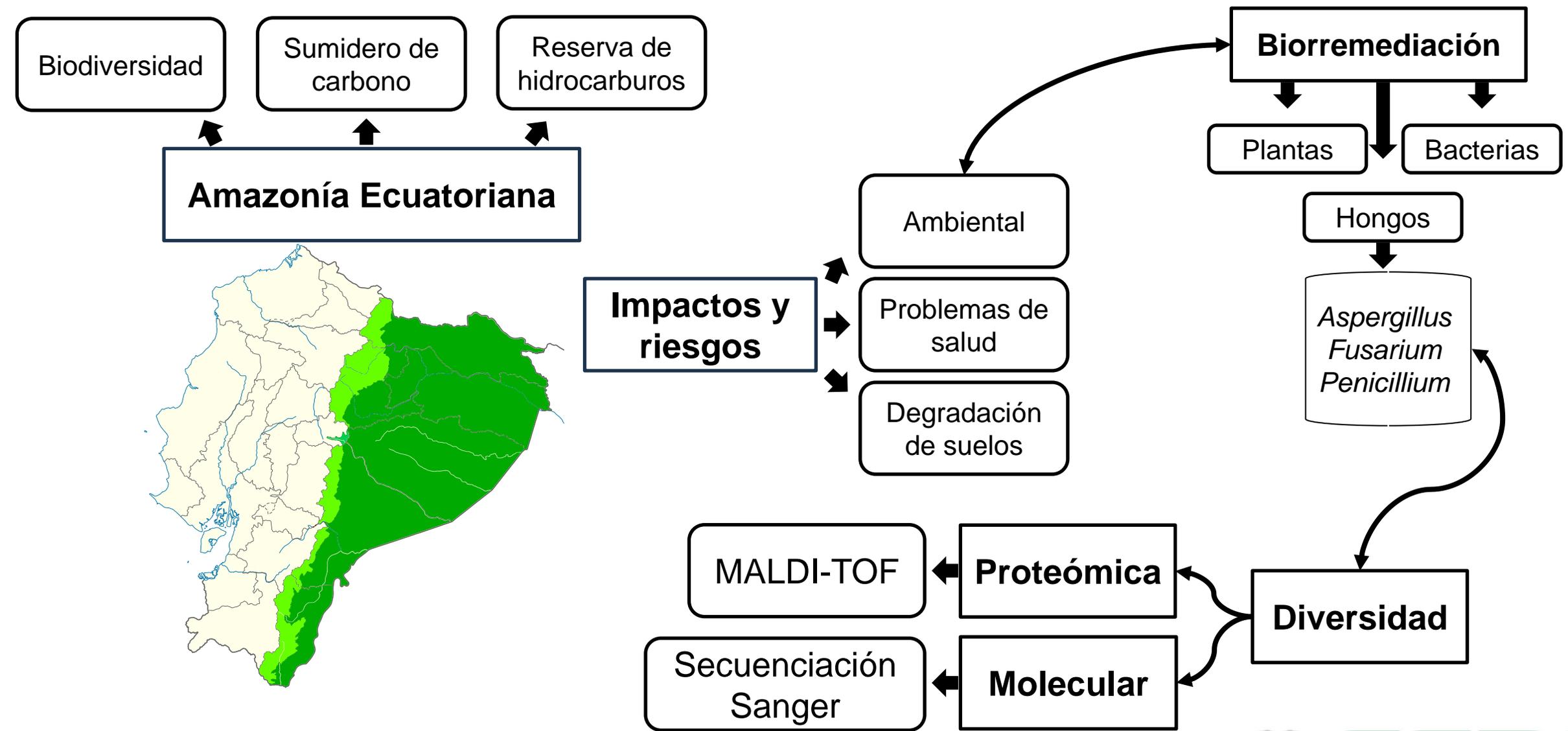


CONTENIDO

- INTRODUCCIÓN**
- OBJETIVOS**
- METODOLOGÍA**
- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- CONCLUSIONES**
- RECOMENDACIONES**



INTRODUCCIÓN



(Thapa et al., 2012; Garcés-Ruiz et al., 2019; Garcés-Ruiz et al., 2019; Flayyih, 2014)

INTRODUCCIÓN

Caracterización molecular

Identificar y analizar las características de moléculas biológicas como el ADN y ARN.

Evaluar el grado de la diversidad genética y su distribución dentro de poblaciones de una especie determinada.

Caracterización proteómica

Identificar y caracterizar proteínas

Diagnóstico de enfermedades

Diseño de fármacos

Detectar e identificar especies microbianas diversas y relevantes para el medio ambiente.

CONTENIDO

- INTRODUCCIÓN
- OBJETIVOS
- METODOLOGÍA
- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- RECOMENDACIONES



OBJETIVOS

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.

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

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

CONTENIDO

- INTRODUCCIÓN
- OBJETIVOS
- METODOLOGÍA
- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- RECOMENDACIONES



Laboratorio de Microbiología,
Agrobiotecnología y
Zoología



Activación de las cepas de los hongos
Ensayos relacionados con la biología molecular
Análisis de los índices de biodiversidad

Laboratorio de Docencia de la
Carrera de Biotecnología



Cuantificación del material genético
(ADN)

Laboratorio de Biología Molecular y
Bioquímica de la Universidad
Regional Amazónica Ikiam



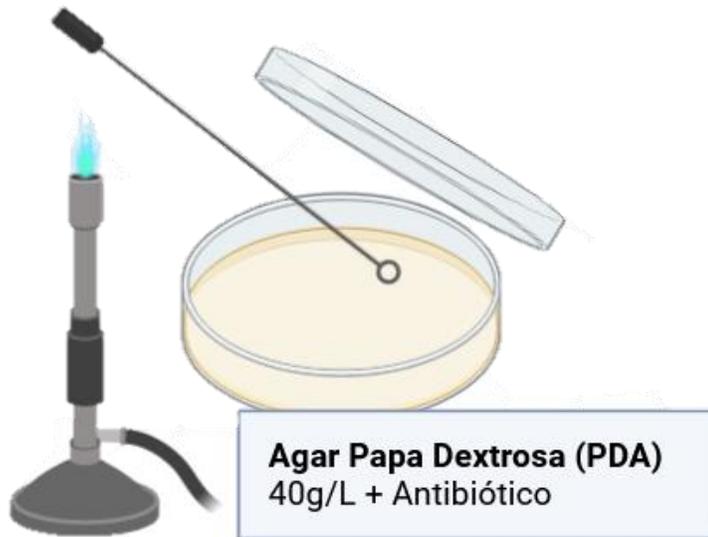
Caracterización proteómica
mediante la técnica MALDI-TOF

Tabla 1. Cepas seleccionadas de 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>

Tabla 2. Cepas seleccionadas de 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>



Identificadas previamente a partir de claves dicotómicas.

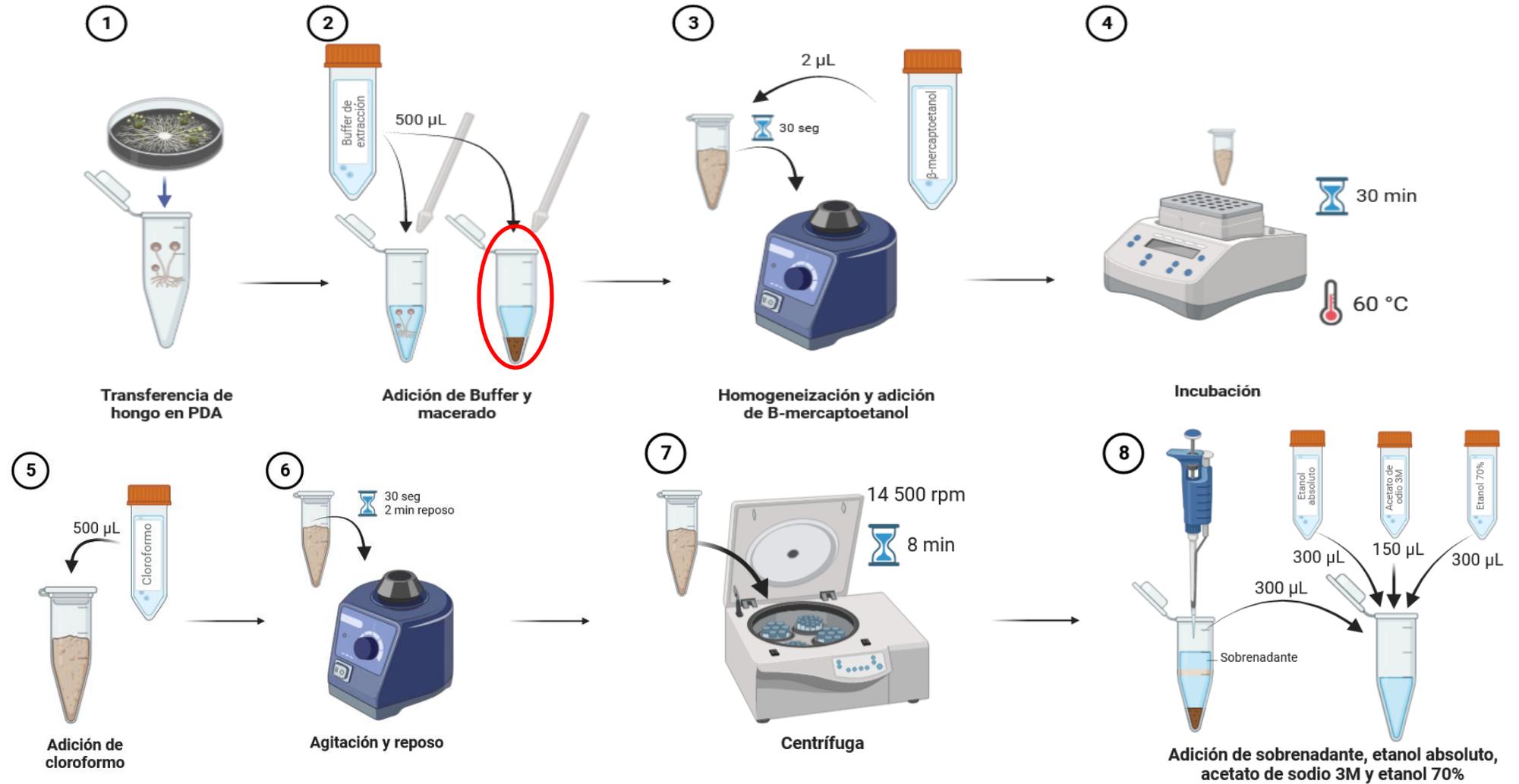
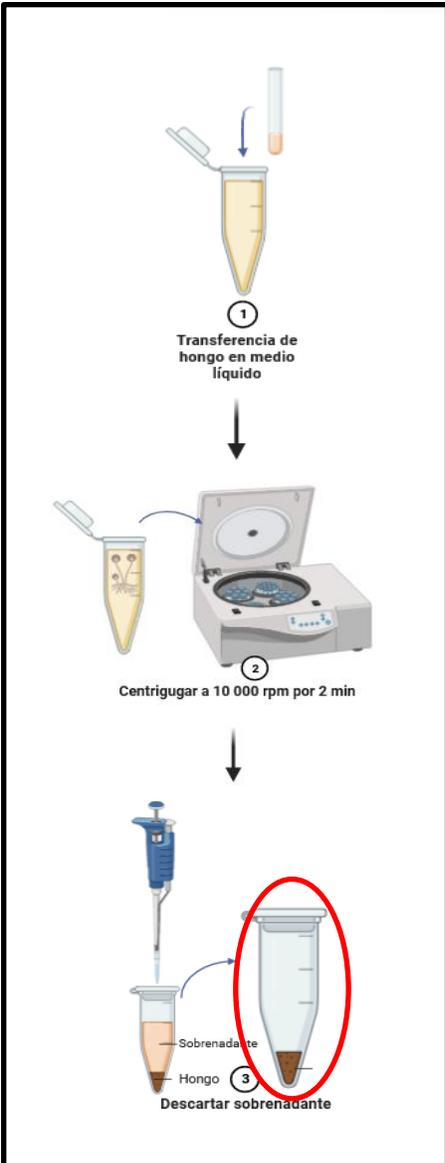
Illustrated Genera of Imperfecte Fungi
Morphologies of Cultured Fungi and key to Species

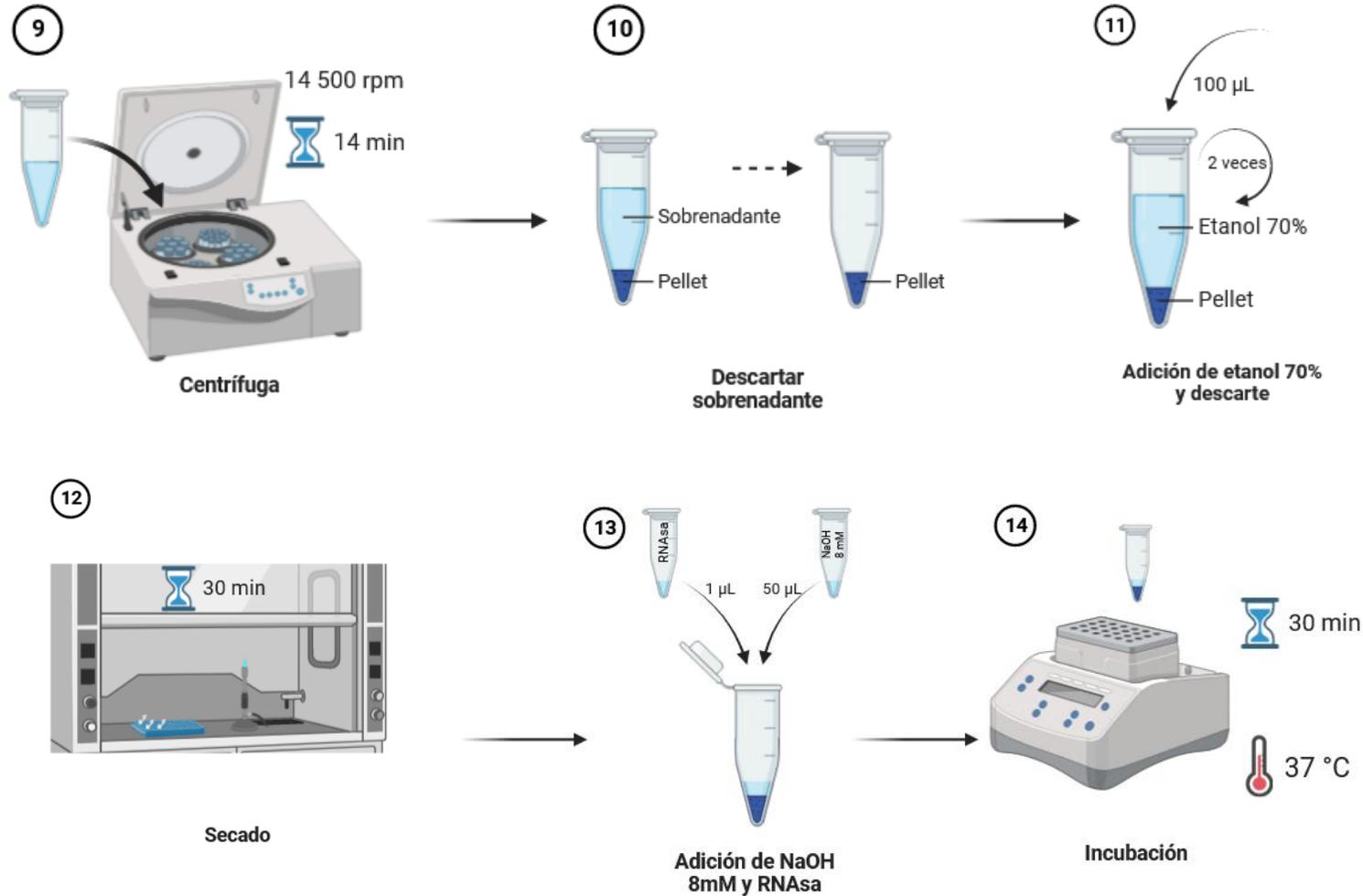
Caracterización proteómica



Extracción de proteínas para la
identificación de hongos rizosféricos.

Los softwares MALDI-MS Application
(2.9.4.1)
SARAMIS (System Version 4.1.0.9)





Integridad del ADN en gel de agarosa al 0,8%

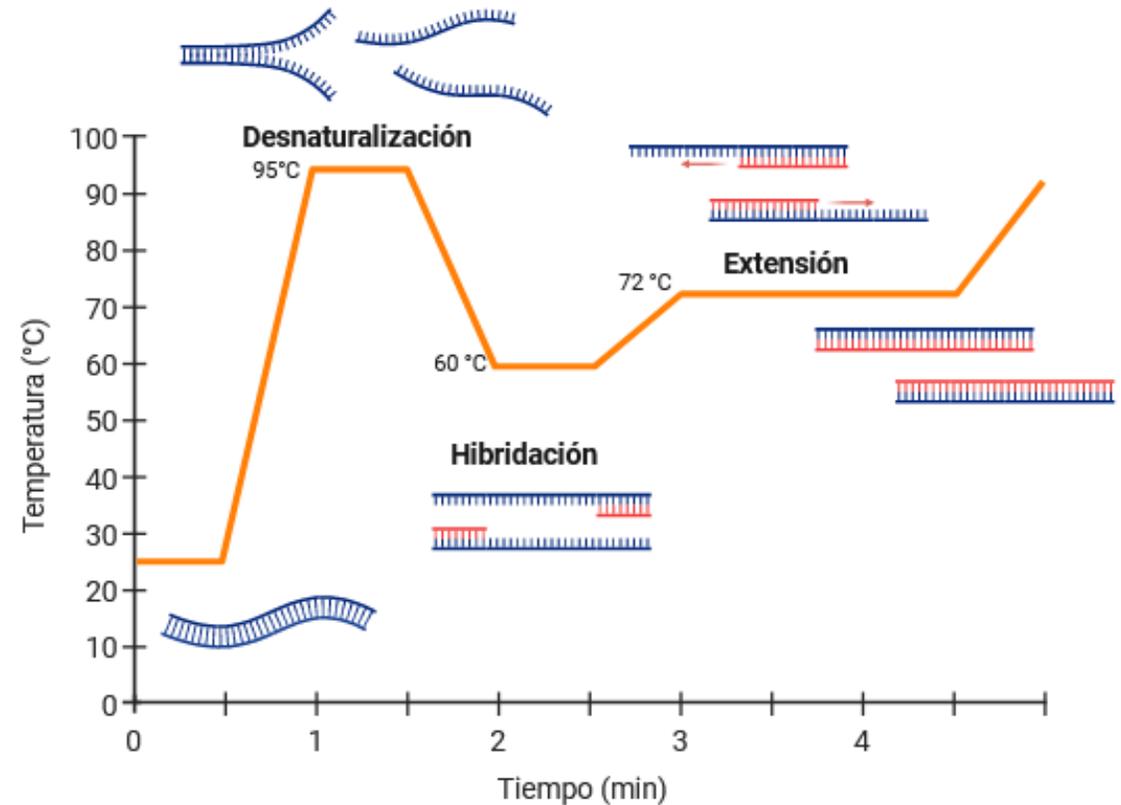
METODOLOGÍA

Tabla 3. 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
dNTP's mixture	10 mM	0,2 mM	1 µL
Primer forward (ITS1)	10 µM	0,5 µM	1 µL
Primer Reverse (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

Tabla 4. Condiciones de la PCR

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



Electroforesis en gel de agarosa 1%



METODOLOGÍA

Envío de productos PCR

Identificación de secuenciaciones

Evaluación de diversidad

geneious

Ver. 2023.2



PAST
Ver. 4,04



Se determinó la identidad de los organismos mediante la comparación de las secuencias con la base de datos del GenBank del NCBI.

Riqueza (S)
Abundancia (N_i)
Índice de diversidad Simpson ($1-D$)
Índice de Diversidad de Shannon (H')
Índice de equitatividad de Pielou (J')
Chao-1.

CONTENIDO

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **METODOLOGÍA**
- **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES**
- **RECOMENDACIONES**



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Datos de cepas activadas.

	Secoya 2-3	Secoya 26
Cepas activadas	22	35

El medio PDA contiene una rica fuente de nutrientes, como hidratos de carbono, aminoácidos y vitaminas.

Ayuda al crecimiento de micelio y además es un medio versátil para la investigación microbiológica.

Tabla 6. Identificación de hongos rizoféricos 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

Cepas identificadas:

Geotrichum clavatum, *Aspergillus favus/oryzae* y *Penicillium sp.*

La base de datos para la identificación por MALDI-TOF tiene limitados espectros de referencia.

El rango de identificación óptimo es de 60-99 %, siendo los del 99 % un resultado más exacto.

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.

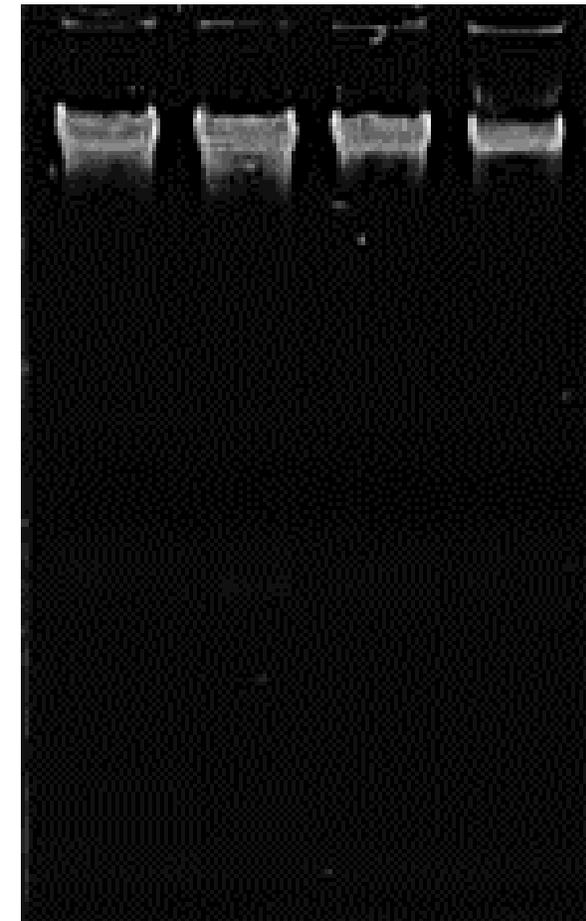
Tabla 7. Resultados Multiscan Sky

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
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* ←

Presencia de impurezas (sales, fenol, hidratos de carbono)

Aumento en la relación A₂₆₀/A₂₈₀, y una disminución en la relación A₂₆₀/A₂₃₀ (BancoADN, 2020)

Integridad del ADN



Nota. *Valores de pureza de ADN contaminado.

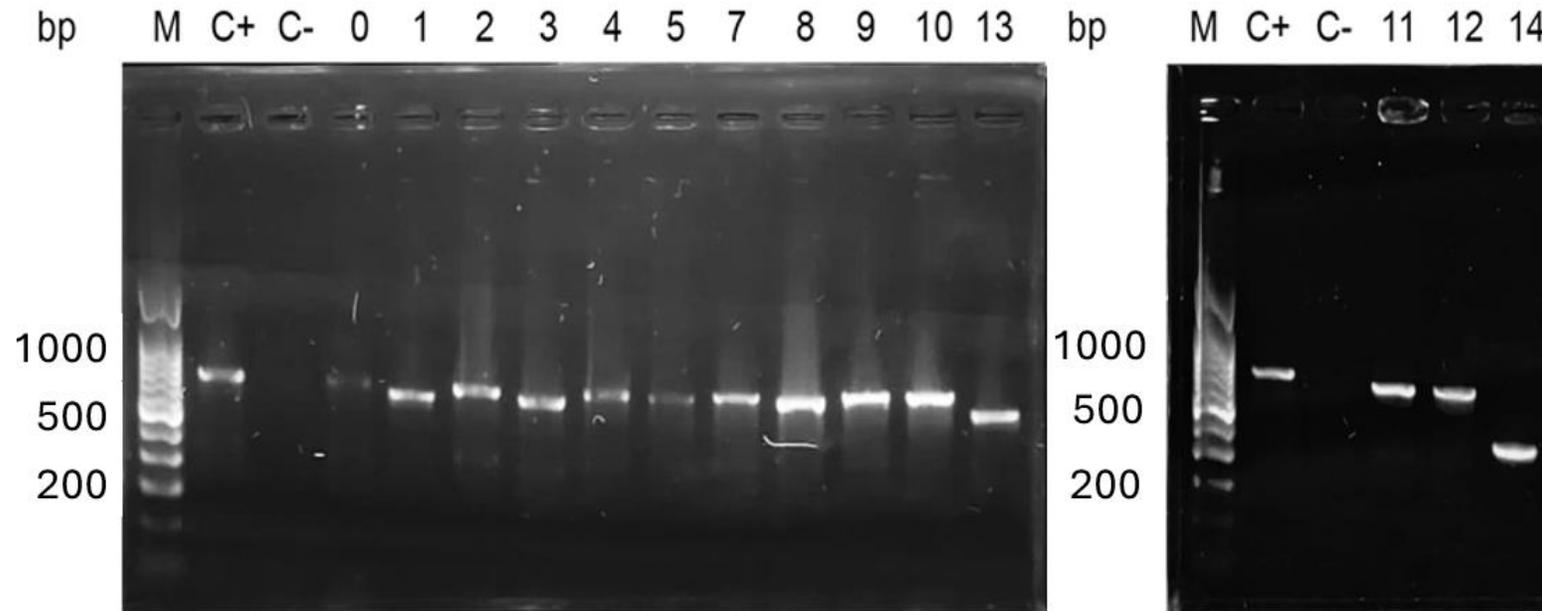
Pureza ADN:

A₂₆₀/A₂₈₀: > 1,8
 A₂₆₀/A₂₃₀: >1,8 y <1,7

Concentración de ADN:

92,86 – 576,3 µg/mL

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %



Carriles: M: Marcador molecular. Control (+); control (-).

Cebadores
ITS1 e ITS4

Tamaño
0,3 - 0,7 kb

Tabla 8. Identificación y porcentaje de identidad de cada secuencia analizada utilizando la base de datos de BLAST.

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

Cepas identificadas:

Aspergillus fumigatus, *Geotrichum candidum*, *Mucor irregularis*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma sp.* y *Trichoderma virens*

Porcentaje de identidad:

Superior al 99%

Indica la similitud entre la secuencia consenso obtenida de los ensamblajes y las secuencias blanco.

La región ITS es ampliamente utilizada para la identificación molecular, pero puede generar sesgos, lo que llevaría a resultados erróneos o incompletos.

Tabla 9. Resultados de secuenciación y MALDI-TOF

Cepa	Zona	Secuenciación	MALDI-TOF
0	Secoya 2-3	<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
1		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sin identificar
2		<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	Secoya 26	<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
8		<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sin identificar
9		<i>Mucor irregularis</i>	Sin identificar
10		<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>

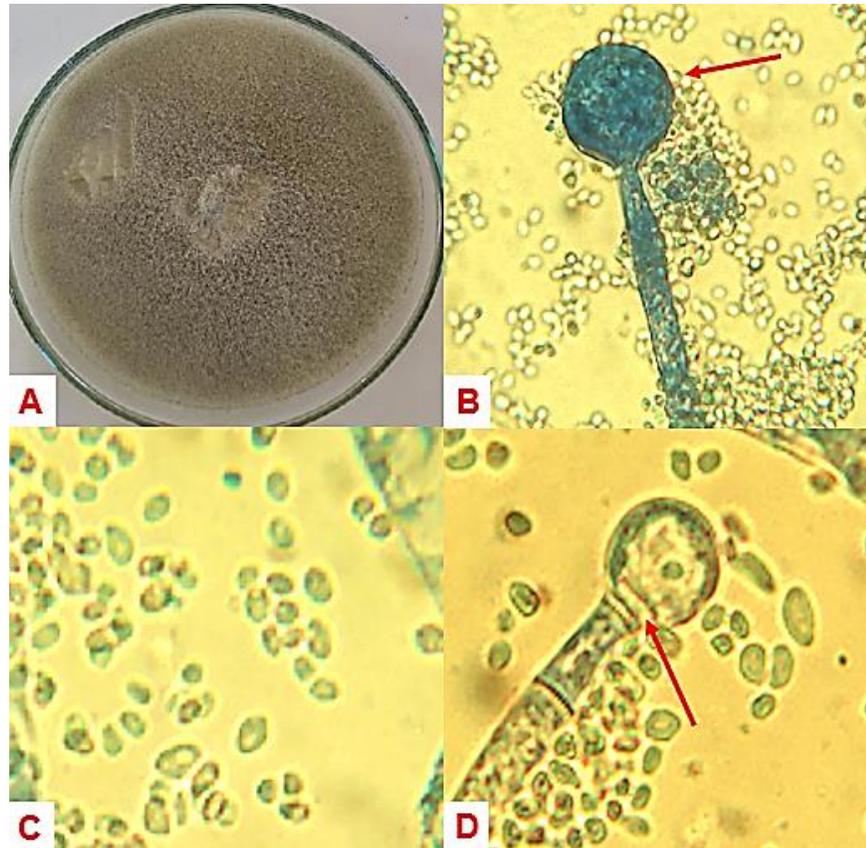
Secuenciación SANGER
92,8 % identificado

MALDI-TOF
21 % identificado

Tabla 11. Especies arbóreas asociadas a hongos rizosféricos

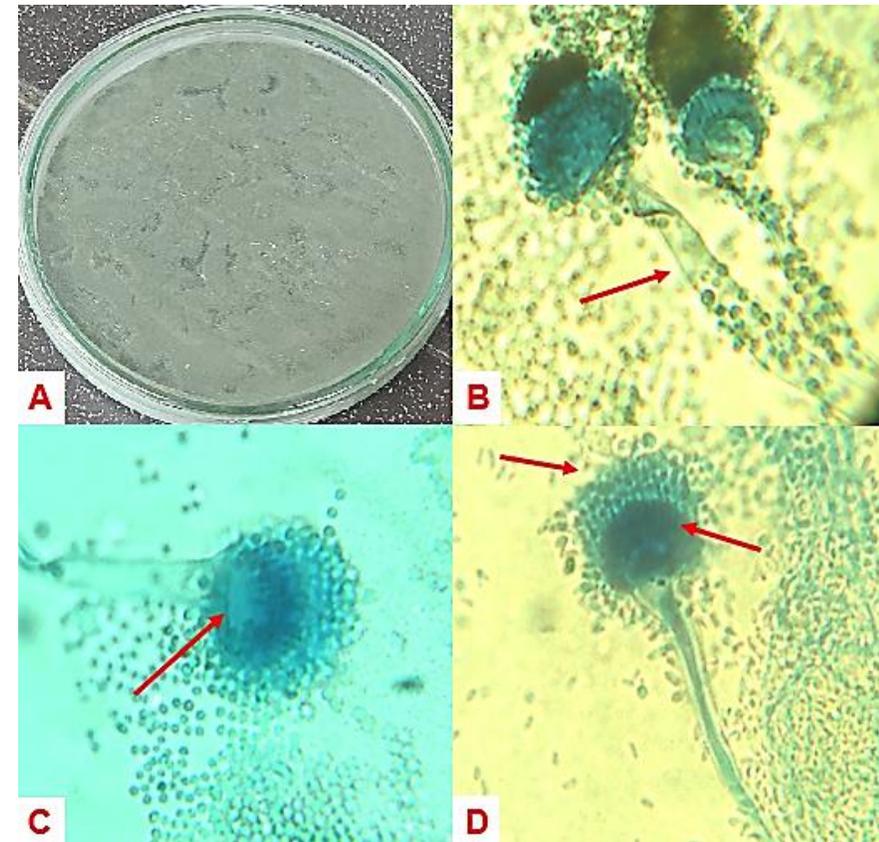
Zona	Especie fúngica	Especies arbóreas	
Secoya 2-3	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<div style="border: 1px dashed blue; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">35,7% pertenecen a la especie de <i>Piptadenia pteroclada</i> (Guarango espinudo)</div> <div style="border: 1px dashed red; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">28,5% pertenecen a la especie de <i>Platymiscium pinnatum</i> (Caoba).</div> <div style="border: 1px dashed green; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">21,4% pertenecen a la especie de <i>Zygia longifolia</i> (Chíparo).</div> <div style="border: 1px dashed black; padding: 5px;">14,4% pertenecen a zonas sin especies arbóreas.</div>
	<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>		

Mucor irregularis.



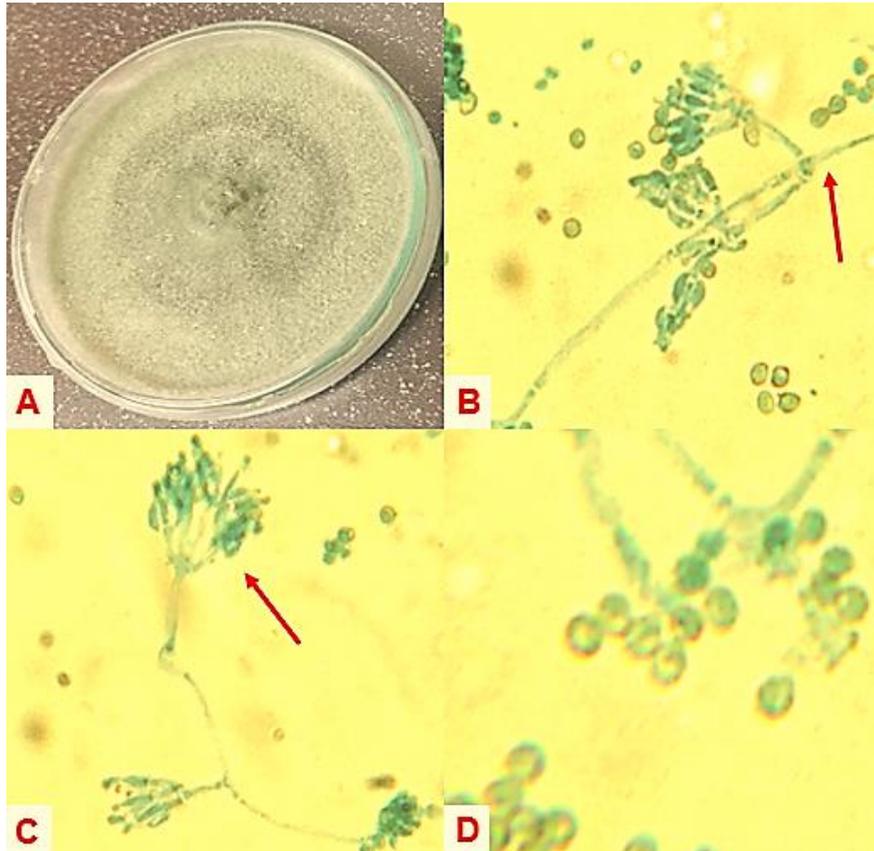
A: Crecimiento en PDA. B: Esporangios con esporangiosporas; C: Esporangiosporas elipsoidales; D: Esporangio liberando esporangiosporas y presencia de columela y collarete.

Aspergillus fumigatus



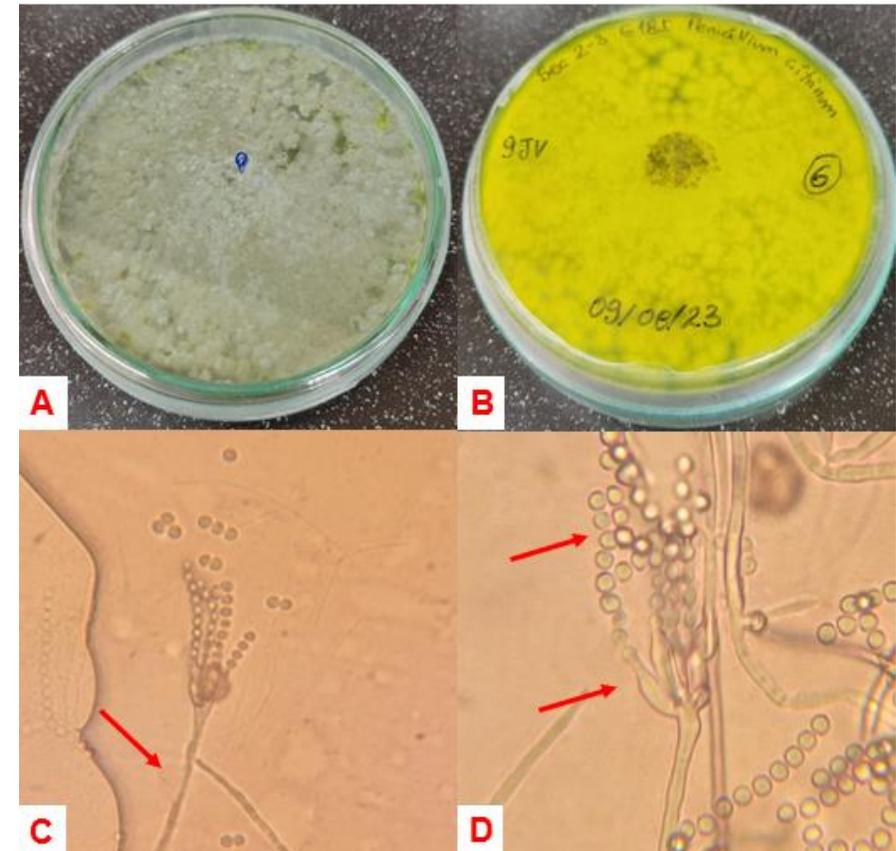
A: Crecimiento en medio PDA; B: Conidióforos; C: Vesícula; D: Fíalide y Conidios. Bajo microscopio (40x).

Trichoderma virens



A: Crecimiento en medio PDA; B: Ramificación de conidióforos; C: Fiálide; D: Fialospora.

Penicillium citrinum

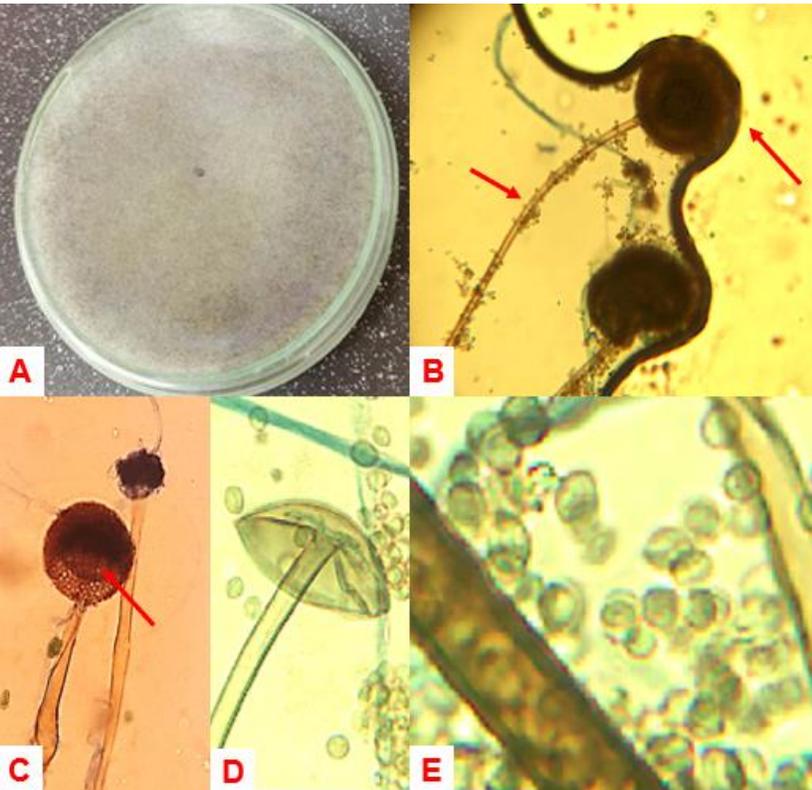


A: Crecimiento en medio PDA; B: Crecimiento en PDA reverso; C: Conidióforos; D: Fiálides y conidios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

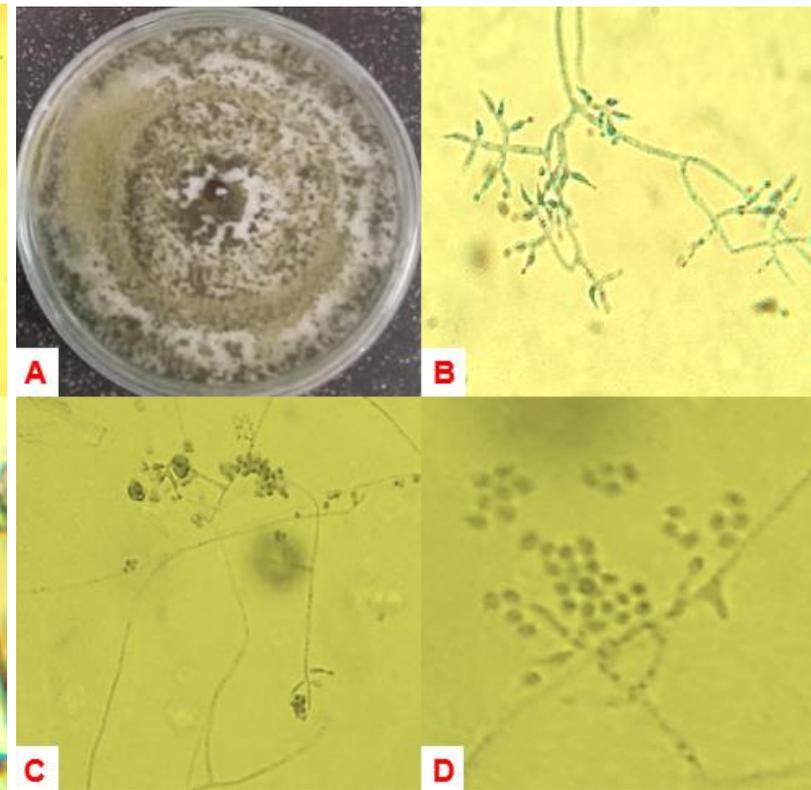
Características morfológicas

Rhizopus arrhizus



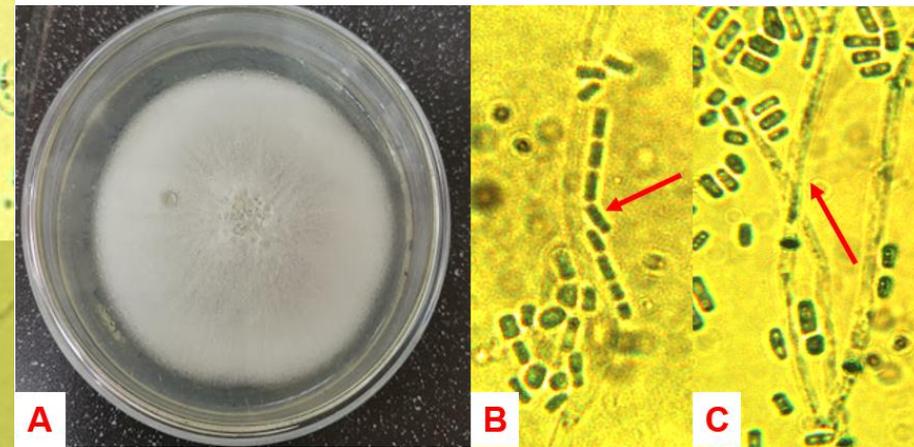
A: Crecimiento en medio PDA; B: Esporangióforo y esporangio; C: Columela; D: Esporangio con esporas liberadas E: Esporangiospora.

Trichoderma sp.



A: Crecimiento en medio PDA; B: Fiálide C: Ramificación de conidióforos; D: Conidios.

Geotrichum candidum



A: Crecimiento en medio PDA; B: Antrosporas C: Ramificación de hifas.

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 %

CLR: Celda de lodos y ripios (Secoya 26)
POTR: Potreros (Secoya 2-3).

Suelos contaminados a una profundidad de 0-30 cm existe una alta disponibilidad de carbono orgánico.

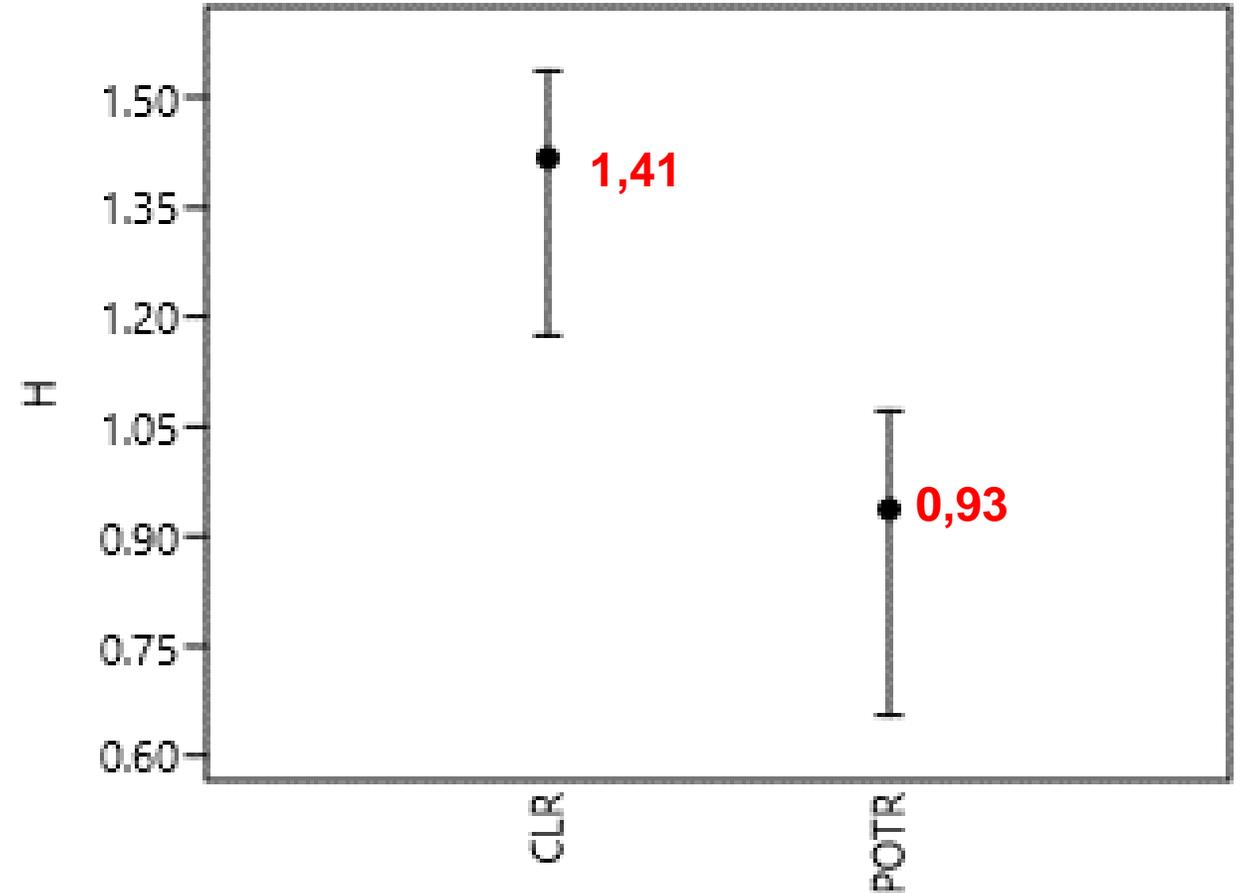
Valores cercanos a 1 representan una distribución uniforme con una alta equitabilidad

No se espera el registro de especies adicionales en futuros muestreos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferencias entre abundancia, riqueza, diversidad y equitabilidad de las zonas contaminadas y no contaminadas.

Índice de Shannon



Intervalos de confianza separados indican que existen diferencias de diversidad entre ecosistemas.

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

CONTENIDO

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **METODOLOGÍA**
- **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES**
- **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.

CONTENIDO

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **METODOLOGÍA**
- **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES**
- **RECOMENDACIONES**



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.

AGRADECIMIENTOS



Dr. Carlos Chiriboga
Dr. Wilmer Pozo
Dr. Darwin Rueda
Ing. Gabriela Morales
Ing. Ariana Drouet
Ing. Xavier Paredes

Dr. Francisco Flores
Lic. Silvana Granda



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA