
Identificación molecular de hongos pertenecientes al filo *Ascomycota*: Un desafío que sigue a flote

Liseth D. Blanco C. ¹, Nelson H. Caicedo O. ¹, Liseth S. Osorio V.¹, Mauricio Ramírez Castrillón. ².

¹ Facultad Ingeniería, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad ICESI, Cali, Colombia.

² Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

RESUMEN

El Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi cuenta con un cepario de microorganismos en donde, parte de los hongos que componen la colección, aún no han sido identificados a nivel de género y especie. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la identificación molecular de hongos ascomicetos pertenecientes a la micoteca. Se reactivaron 20 cepas en agar PDA previamente conservados con aceite mineral a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó su caracterización macroscópica y microscópica de algunos ejemplares para una verificación de identificaciones previas y clasificación inicial por fenotipos. Se realizó extracción de ADN genómico de las cepas fúngicas para seguidamente, amplificar y secuenciar la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr usando la técnica PCR y secuenciación Sanger, respectivamente. Se identificaron catorce cepas a nivel de género mediante la comparación de secuencias contra las cepas de referencia, usando el algoritmo BLAST, y cinco de ellas fueron clasificadas a nivel de especie mediante análisis filogenético. La cepa EBB-62 no amplificó bajo las combinaciones de cebadores empleados en este estudio. Para este caso particular, se llevó a cabo un diseño experimental variando la concentración de la *Taq* polimerasa y condiciones del régimen de ciclado. Estos resultados aportan a la corrección de conservación de pureza de los aislados y brinda una metodología para la identificación a nivel de genero.

Palabras clave: Región ITS, Amplificación, Análisis filogenético.

Molecular identification of fungi belonging to the Ascomycota phylum: A challenge that remains afloat.

ABSTRACT

The biochemical-engineering department at Universidad ICESI has a collection of microorganisms where, some fungi have not yet been identified at the genus and species level. Therefore, the objective of this work was to make the molecular identification of ascomycete fungi. We reactivated 20 strains on PDA agar previously preserved with mineral oil at room temperature. Subsequently, we characterized the macroscopic and microscopic morphology of some specimens for a verification of previous identifications and initial classification by phenotypes. Genomic DNA extraction was performed from the fungal strains to then amplify and sequence the rDNA's ITS1-5.8S-ITS2 region using the PCR technique and Sanger sequencing, respectively. Fourteen strains were identified at the genus level by sequence comparison against the reference strains, using the BLAST algorithm, and five of the, were classified to the species level by phylogenetic analysis. The EBB-62 strain did not amplify under the primer combinations used in this study. For this particular case, an experimental design was carried out varying the concentration of the Taq polymerase and conditions of the cycling regime. These results contribute to the correction of conservation of purity of the isolates and provide a methodology for identification at the gender level.

Keywords: *Ascomycete fungi, ITS region, Amplification.*

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el interés hacia los hongos se ha incrementado gracias a la gama de metabolitos secundarios bioactivos que producen, cuyas aplicaciones van dirigidas cada vez a más sectores como el farmacéutico, agrícola, entre otros, siendo esta una de las principales razones para realizar la identificación de hongos, paso fundamental para asegurar la caracterización taxonómica [1]. La identificación a nivel de especie proporciona información útil que puede usarse para el desarrollo de programas de detección mejorados para el descubrimiento de productos naturales con grandes atractivos, así como datos adicionales sobre ecología, relaciones filogenéticas, genómica y transcriptómica entre hongos, convirtiéndola en una etapa esencial en la investigación científica. Además, el nombre científico cumple una función de comunicación, informando sobre los hongos, las especies con las que se relacionan estrechamente, los compuestos bioactivos que puede producir y sus aplicaciones [1].

A pesar de la importancia que muestra la identificación taxonómica de hongos, principalmente en el sector químico para la fabricación de productos naturales, actualmente sigue siendo una labor que resulta difícil aun para un micólogo experto. La identificación precisa y exacta de hongos es una problemática que aún se mantiene vigente [2]. A lo largo de casi tres siglos se ha desarrollado variedad de metodologías que involucran el seguimiento de claves taxonómicas, basados en la observación de la morfología y reacciones bioquímicas. Sin embargo, la cantidad de pruebas, el cambio en los ciclos de vida, y falencias para la identificación de cepas a nivel de especie ha limitado a los micólogos. Es por ello que las técnicas moleculares surgen como una medida para llenar tal vacío, complementando la identificación [2].

Gracias a que los métodos moleculares brindan una cobertura universal y una amplia aplicabilidad, se ha planteado el uso de taxa individuales que pueden ser identificables con marcadores de código de barras de ADN para disminuir el tiempo y aumentar la eficacia de identificación a nivel de especies. Para los hongos, un consorcio de micólogos ha llegado al consenso de utilizar el marcador estándar de espaciadores transcritos internos (ITS) ADNr como código de barras [3] gracias a que es la parte del cistron del ADNr que evoluciona más

rápida en comparación a otras regiones [1] y tiene una variación promedio del 1% [4] a nivel de la secuencia entre especies del mismo género [5]. Aun así, este marcador es sujeto de debate.

Pese a que en muchos casos la región ITS funciona para la diferenciación taxonómica de hongos [6], estas secuencias pueden estar regidas por una tasa de mutación que varía en cada grupo, ya que se han observado diferencias intraespecíficas y polimorfismo intragenómico entre copias de la región [7] ocasionando excepciones dentro del reino Fungi en donde el marcador no concuerda con las variaciones encontradas [8]. Adicionalmente, esta brecha en el código de barras depende de la edad evolutiva del complejo de especies [4]. Debido a ello, en algunos casos los resultados obtenidos de la identificación molecular pueden llegar a ser confusos e incoherentes obligando a invertir atención especial, tal es el caso para *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Trichoderma* en vista de que sus epítetos específicos no presentan polimorfismos en la región ITS [1].

El departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad ICESI ubicada en la ciudad de Cali, Colombia, cuenta actualmente con un cepario interno de microorganismos, donde algunos hongos ascomicetos no han podido ser identificados. Sin embargo, la regulación en Colombia exige que todo hallazgo de biodiversidad nacional debe estar registrada en colecciones reportadas al SIB (Sistema de Información sobre Biodiversidad). Para que una cepa sea registrada en el SIB debe cumplir con tres parámetros: características del cultivo como mínimo a nivel de género y especie definidas correctamente, pureza, y alcance en términos de aplicaciones. En virtud de ello, la micoteca busca la identificación de hongos por lo que se hace necesario diseñar una metodología con factores determinantes y realizar su validación para dar solución a este problema.

En este sentido, la importancia de este proyecto se enfoca en realizar la identificación molecular de los géneros y especies de hongos ascomicetos pertenecientes al cepario de la universidad que aún son desconocidas, pues como se ha mencionado, se hace necesario poseer conocimiento de estos para revelar información sobre sus aplicaciones, beneficios, entre otros; y, dado el caso de que no se tenga conocimiento sobre tal por ser un género o especie nueva, se requiere para el desarrollo de investigaciones que tengan impacto en el

campo académico y científico que permitan ampliar la diversidad de hongos en la ciudad de Cali.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivación de cepas.

Los hongos ascomicetos utilizados en este estudio se obtuvieron de cepas aisladas del bosque montano bajo llamado “La Carolina”, ubicado en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. Las cepas fueron conservadas en tubos de agar inclinado de medio Agar Papa Dextrosa -PDA (Scharlau) con aceite mineral estéril, y almacenadas a temperatura ambiente en el cepario del programa de Ingeniería Bioquímica de la Universidad ICESI. Se reactivaron 20 cepas en medio PDA y se incubaron a una temperatura de 27-29°C durante 7-13 días según restricción de crecimiento de cada microorganismo.

2.2 Caracterización macroscópica y microscópica.

La evaluación macroscópica de las cepas se realizó por observación de características morfológicas y cambios producidos en el medio PDA. Se tuvieron en cuenta aspectos tales como: forma de la colonia, color (anverso y reverso), producción de pigmentos o exudado y textura de la superficie.

La visualización y caracterización microscópica se realizó con cinta adhesiva en condiciones de esterilidad. Se tomó una porción de cinta y se reposo sobre el cultivo, posteriormente se extendió sobre una lámina porta-objeto, el cual contenía azul de lactofenol 0.01%. Finalmente se dejó reposar por 1 minuto y se observó bajo el microscopio [9].

2.3 Extracción y cuantificación de ADN.

La extracción de ADN se realizó empleando el kit comercial Tissue DNA kit (Omega BIO-TEK E.Z.N.A®) bajo instrucciones adecuadas (ver anexo 1). Se utilizó el espectrofotómetro

BioSpectrometer® (Eppendorf, Alemania) para determinar la concentración de ADN usando absorbancias a 260 nm – 280 nm respectivamente. Las muestras obtenidas se almacenaron en un freezer a -20°C para su posterior identificación.

2.4 Identificación molecular de hongos.

La identificación de los aislados fue llevada a cabo por amplificación y secuenciación de la región de ADNr ITS1-5.8-ITS2 (ITS) mediante Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) y secuenciación Sanger, respectivamente. Para la amplificación se utilizaron los cebadores ITS5 (5'-GGAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Como combinaciones opcionales para la región ITS, se emplearon los siguientes: ITS1 e ITS4, ITS1F e ITS4. También, se amplificaron las regiones LSU (Subunidad Grande del Ribosoma) LROR y LR5 [10] y el gen que codifica para la subunidad beta de la RNA Polimerasa, usando cebadores bRPB2 6F y bRPB2 7R [27].

Para la PCR se tomaron 5 µL del ADN extraído a una concentración aproximada de 1ng/µL, y se re suspendieron en 20 µL de de mezcla de PCR que contenía 3 µL de MgCL₂ 25 mM, 2.5 µL de Buffer 10X, 2.5 µL de solución S 10X (Solid Biodyne, China), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.6 µL de dimetilsulfóxido (DMSO al 99.5%), 0.4 µL de ITS4 20 pmol/ µL, 0.4 µL de ITS5 20 pmol/ µL, 0.2 µL de la enzima Taq polimerasa FIREPol® (Solid Biodyne, China) y 9.4 µL de agua mili Q estéril para un volumen final de 25 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, apareamiento a 52°C por 45 segundos y extensión 72°C por 1 minuto, seguido de una extensión final a 72°C por 7 minutos. La PCR incluyó un control negativo en todos los experimentos. Para el diseño experimental se varió concentración de la Taq polimerasa entre 1-2 U/uL, numero de ciclos 35-40 y temperatura de apareamiento 50-54°C.

Los amplicones fueron analizados en geles de agarosa 1.5% (p/v) en tampón TAE 1x (Tris-Acetato 0.04 M-EDTA 1mM, pH 8.0) en alícuotas de 3 µL en combinación de 1 µL de buffer de carga y 1 µL de SybrGreen o Gel Red a 20x y sometidos a una corriente de 100V por 5

minutos y a 50V por 40 minutos. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados por comparación de un marcador en escalera de 100-15000 pares de bases Quick-Load®. Los productos de PCR se purificaron utilizando 1 µL del reactivo ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems™, Thermo FisherScientific). Posteriormente sometidos al termociclador en un ciclo de 15 minutos a 30°C y finalmente llevados a un segundo ciclo por 15 minutos a 80°C. Los productos de la purificación se almacenaron en un freezer a -20°C hasta su envío a secuenciación al laboratorio de Medicina genómica de la Universidad ICESI.

Las secuencias obtenidas se editaron manualmente empleando el software CodonCode Aligner v. 9.0.2 y fueron sometidas a una búsqueda BLAST en la herramienta web NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra la base de datos de material tipo para hongos o la base de datos estándar colección de nucleótidos para determinar sus identidades [11]. Los criterios usados para asignar a la cepa fúngica un género se establecieron en un mínimo de homología de 94.3% mientras que para la asignación de especie fue de una homología mínima de 99.6% [28].

2.4 Análisis filogenético y clasificación final.

Para las cepas que no pudieron ser identificadas a nivel taxonómico de especie, se reconstruyeron árboles filogenéticos del género, a partir de secuencias ITS1–5.8S-ITS2 reportadas en GenBank. Se alinearon las secuencias obtenidas en este trabajo y representantes de diferentes especies pertenecientes al mismo género disponibles en GenBank usando ClustalW con todos los parámetros de alineación múltiples usados en la configuración predeterminada. El Outgroup fue definido como una cepa de referencia de un género estrechamente relacionado, y previamente reportado en otros análisis filogenéticos. Para cada árbol reconstruido, se determinó el mejor método de sustitución de nucleótidos y se elaboró usando el método Maximum Likelihood (ML) con el software MEGA 11 [12]. Los valores de confianza para los clados se determinaron mediante 1000 réplicas de bootstrap. Solamente valores iguales o superiores a 70% de Bootstrap fueron considerados como determinantes para la clasificación a nivel taxonómico de especie.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación molecular de las cepas.

La Tabla 1 describe rasgos morfológicos macroscópicos (Fig. 1) y microscópicos (Fig. 2) de los aislados. Se seleccionó aleatoriamente un representante de cada grupo conformado por el mismo género para llevar a cabo la visualización bajo el microscopio. Al comparar las cepas evaluadas en este estudio, con las morfologías descritas de los aislados trabajados por Cedeño en su trabajo de grado [13], se observó un total de cinco ejemplares en común siendo estos: ET-43, ET-46, ET-47, ET-53 Y ET-61. Sin embargo, las características morfológicas macroscópicas difieren en gran medida con las cepas ET-43, ET-46 y ET-53, y en menor grado con las cepas ET-47 y ET-61. De igual modo sucede con la microscopia de los aislados, en donde solo la cepa ET-53 muestra similitud con lo aquí observado.

Tabla 1.

Características morfológicas y cepas fúngicas reactivadas en medio PDA. N/A = No aplica. Crecimiento total: colonia de 6 cm de diámetro y crecimiento medio: colonia de 4 cm de diámetro.

Morfotipo	Caracterización	
	Macroscópica	Microscópica
ET-23	Colonia blanca-beige con crecimiento total, forma irregular y textura flocosa. Presenta pigmentación del medio leve color beige.	Hifas ramificadas. No se visualizaron esporas.
ET-25	Colonia blanca con crecimiento total, forma filamentosa y textura flocosa. Presenta pigmentación del medio color beige.	Hifa septada y ramificada. No se visualizaron esporas.
ET-29	Colonia blanca-marrón con crecimiento total, forma filamentosa y textura granular. Presenta pigmentación del medio color beige.	Hifas ramificadas. No se visualizaron esporas.
ET-43	Colonia verde con crecimiento medio, forma circular y textura aterciopelada. No presenta pigmentación del medio.	Hifas septadas y ramificadas que sostienen conidios unicelulares elipsoides.

ET-46	Colonia verde-blanca con crecimiento medio, forma irregular y textura aterciopelada. Presenta pigmentación del medio color amarillo traslucido.	Hifas ramificadas. No se visualizaron esporas
ET-47	Colonia amarilla con crecimiento medio, forma rizoidal y textura glutinosa. Presenta pigmentación del medio color amarillo traslucido.	N/A
ET-53	Colonia amarilla con crecimiento medio, forma irregular y textura aterciopelada. Presenta pigmentación del medio color rojo.	Hifas hialinas septadas. Conidióforo que posee métulas cilíndricas con paredes lisas. Cadenas sin ramificar de conidios.
ET-61	Colonia verde-blanco con crecimiento medio, forma irregular y textura flocosa. Presenta pigmentación del medio color amarillo traslucido.	N/A
ET-64	Colonia blanca con crecimiento total, forma filamentosa y textura algodonosa. Presenta pigmentación del medio color beige.	Hifa septada y ramificada. Fiálide corta, fina con forma de botella, simple y ramificada
EBB-62	Colonia blanca con crecimiento total, forma irregular y textura aterciopelada. Presenta pigmentación del medio amarillo traslucido.	N/A
EBB-71	Colonia blanca con crecimiento total, forma irregular y textura algodonosa. No presenta pigmentación del medio.	N/A
EBB-79	Colonia blanca con crecimiento total, forma rizoidal y textura algodonosa. No presenta pigmentación del medio.	N/A
EBB-81	Colonia naranja con crecimiento medio, forma irregular y textura aterciopelada. Presenta coloración del medio amarillo traslucido.	Hifa ramificada. No se visualizaron esporas.
EBB-92	Colonia blanca-naranja con crecimiento medio, forma irregular y textura algodonosa. Presenta pigmentación del medio amarillo traslucido.	Hifa septada y ramificada. No se visualizaron ascosporas.
EBB-93	Colonia blanca con crecimiento total, forma filamentosa y textura algodonosa. No presenta pigmentación del medio.	Hifas ramificadas. No se visualizaron esporas.



Figura 1. Visualización macroscópica del anverso de los hongos conservados en el cepario del departamento de Ingeniería Bioquímica.

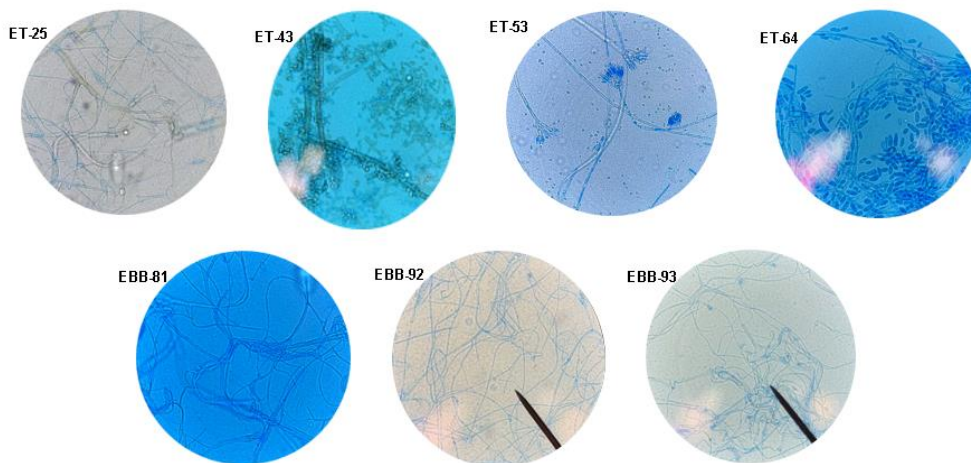


Figura 2. Visualización microscópica de los hongos conservados en el cepario del departamento de Ingeniería Bioquímica.

La Tabla 2 muestra la identificación molecular de catorce (14) cepas, utilizando el espaciador transcrito interno (ITS). Otras cinco cepas fueron descartadas debido a que sus secuencias mostraron contaminación proveniente desde el proceso de extracción de ADN.

Las características morfológicas visualizadas concuerdan con el género asignado con base a reportes literarios [14,15]. Adicionalmente, los códigos asignados a cada cepa indican su fuente de aislamiento, siendo endófitos (ET) o macromicetos (EBB). Dentro de los géneros identificados, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Pezicula*, *Fusarium* y *Diaporthe* se han reportado como endófitos de ecosistemas tropicales [13, 16 y 17], mientras que *Xylaria* [18] se reporta como macro-hongo. A excepción de *Pestalotiopsis* que es reportado comúnmente como fitopatógeno de especies vegetales [13] y *Nemania* que es encontrado como hongo endófito, la codificación concuerda con los resultados, dando soporte a las identificaciones. Cabe aclarar, que los resultados de la Tabla 2, son aquellos que cumplieron con el criterio de % de identidad evaluado.

Tabla 2.

Identificación molecular de los hongos ascomicetos de la colección del Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad ICESI, basada en la comparación de secuencias de la región ITS.

ID cepa	# bases de secuencia	Genero	Especie	% Homología	Análisis filogenético
ET-23	544	<i>Diaporthe</i>	<i>chinensis</i>	98,22	SI
ET-25	349	<i>Diaporthe</i>	<i>sp.</i>	97,5	SI
ET-29	435	<i>Diaporthe</i>	<i>kochmanii</i>	100	SI
			<i>sojae</i>	99,76	
ET-43	577	<i>Cladosporium</i>	<i>oxysporum</i>	99,82	
			<i>tenuissimum</i>	99,82	
			<i>colocasiae</i>	99,82	
			<i>welwitschiicola</i>	99,63	
			<i>angustisporum</i>	99,61	
ET-46	451	<i>Penicillium</i>	<i>adametzioides</i>	99,31	
			<i>angulare</i>	95,99	
ET-47	360	<i>Pezicula</i>	<i>bilaiae</i>	94,38	SI
			<i>carpinea</i>	95,6	
ET-53	505	<i>Penicillium</i>	<i>cosmopolitanum</i>	99,01	
			<i>miczynskii</i>	99,01	
			<i>ubiquetum</i>	99,01	
			<i>aurantiacobrunneum</i>	99,01	
			<i>quebecense</i>	99,01	
ET-61	428	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	99,53	
			<i>hetheringtonii</i>	98,83	

			<i>tonkinense</i>	100	
			<i>obliquiseptatum</i>	99,21	
ET-64	567	<i>Fusarium</i>	<i>tuaranense</i>	99,01	
			<i>ambrosium</i>	98,59	
EBB-71	477	<i>Nemania</i>	<i>diffusa</i>	99,26	SI
EBB-79	477	<i>Nemania</i>	<i>primolutea</i>	98,12	SI
EBB-81	571	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>sp.</i>	99,44	SI
EBB-92	405	<i>Xylaria</i>	<i>adscendens</i>	99,01	SI
EBB-93	547	<i>Nemania</i>	<i>primolutea</i>	98,90	SI

3.2. Análisis filogenético de secuencias del gen Internal transcribed spacer (ITS).

Un total de cuatro (4) arboles filogenéticos fueron obtenidos (Ver Anexo 2, fig. A1, A 2, A3 y A4) permitiendo la clasificación de las cepas trabajadas. Es importante resaltar que las especies de hongos utilizadas para cada género, poseen el código de acceso a GenBank previo al nombre de la cepa. De las cepas pertenecientes a la familia *Xylariaceae*, se determinó la especie de dos de estas (fig. A1), siendo el aislado EBB-92 *Xylaria adscendens*, y EBB-71 *Nemania diffusa*, información respaldada por el BLAST, ya que dentro de los resultados se obtuvo un 99.01% y 99.26% de homología respectivamente para las especies asignadas. Basados en el mismo árbol, este sugiere que las cepas EBB-79 y EBB-93 corresponden a la misma especie, cercanos a la especie de *Nemania primolutea*. La cepa EBB-81 (fig. A2) se clasificó como cercanamente relacionado con *Pestalotiopsis dracontomelon*, no obstante, el nivel de confianza arrojado fue de 38%, por lo la información no se puede afirmar [22] y se requiere de ampliar otras regiones para otorgar robustez al árbol filogenético reconstruido. De igual manera ocurrió con el aislado ET-47, identificado como *Pezizula*, el cual fue asignado a la especie *carpineae* (fig. A3), donde el nivel de confianza siendo un valor bajo, indica que se requiere de mayor información que confirme los datos obtenidos.

De las tres (3) cepas que se identificaron como *Diaporthe*, la ET-23 se determinó como *Diaporthe chinensis*, mientras que ET-25 y ET-29, no comparten especie con las cepas utilizadas para generar el árbol filogenético (fig. A4) aun después de que ET-29, mostró el 100% de homología con *Diaporthe kochmanii*. El género *Diaporthe-Phomopsis* (DP)

constituye un grupo de amplia diversidad genética con más de 900 especies distribuidas en un amplio rango de hospedantes que incluye especies cultivadas y no cultivadas, forestales nativas, frutales y malezas [27], con base en lo anterior, en este estudio se analizaron las secuencias de que se estiman corresponden tan solo al 15.67% e incluso, un valor menor del género *Diaporthe*. Por ello, se hace necesario ampliar la búsqueda de especies para obtener información confiable y acertada.

Por otro lado, para los aislados asignados a los géneros *Penicillium*, *Cladosporium* y *Fusarium* no fue posible determinar su especie, puesto que la diferenciación sobre bases de secuencias ribosómicas es compleja [23]. Para ello, se requiere desarrollar un enfoque de análisis de secuencia multi-locus, en donde además de la región ITS, se busquen combinaciones de marcadores moleculares que amplifiquen regiones como el gen que codifica para el factor de elongación transcripción para *Fusarium* [19], el gen β -tubulina para *Penicillium* [20] y actina para *Cladosporium* [21] en conjunto o individualmente.

3.3 Validación metodológica.

Del total de 20 cepas que se buscaban amplificar mediante la técnica PCR, únicamente la cepa EBB-62 no mostró resultados positivos con las combinaciones de cebadores ITS5 e ITS4, ITS1 e ITS4, ITS1F e ITS4 para la región ITS, LROR y LR5 para la región LSU y bRPB2 6F y bRPB2 7R para la región RPB2. A causa de esto, se sometió el aislado a un diseño factorial 2³, cuyos factores evaluados se observan en la Tabla3, del cual no se obtuvieron resultados consistentes, puesto que como se observa en la Figura 3, hubo contaminación de los reactivos.

Tabla 3. Factores evaluados sobre la cepa EBB-62.

Factores		
Concentración <i>Taq</i> polimerasa	No. Ciclos	Temperatura
1 U/uL	35	50°C
2 U/uL	40	54°C

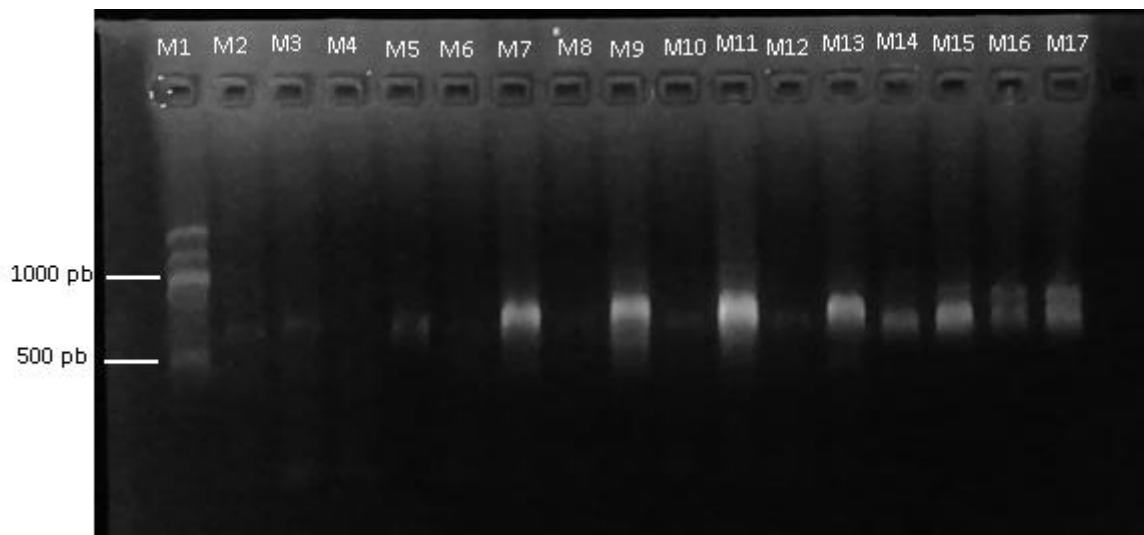


Figura 3. Diseño experimental aplicado a la cepa EBB-62. M1: Marcador de peso molecular. M2: Muestra EBB-62, 50°C, 35 ciclos, 1 U/uL. M3: Muestra EBB-62, 50°C, 35 ciclos, 2 U/uL. M4: Control negativo, 50°C, 35 ciclos, 1 U/uL. M5: Control negativo, 50°C, 35 ciclos, 2 U/uL. M6: Muestra EBB-62, 50°C, 40 ciclos, 1 U/uL. M7: Muestra EBB-62, 50°C, 40 ciclos, 2 U/uL. M8: Control negativo, 50°C, 40 ciclos, 1 U/uL. M9: Control negativo, 50°C, 40 ciclos, 2 U/uL. M10: Muestra EBB-62, 54°C, 35 ciclos, 1 U/uL. M11: Muestra EBB-62, 54°C, 35 ciclos, 2 U/uL. M12: Control negativo, 54°C, 35 ciclos, 1 U/uL. M13: Control negativo, 54°C, 35 ciclos, 2 U/uL. M14: Muestra EBB-62, 54°C, 40 ciclos, 1 U/uL. M15: Muestra EBB-62, 54°C, 40 ciclos, 2 U/uL. M16: Control negativo, 54°C, 40 ciclos, 1 U/uL. M17: Control negativo, 54°C, 40 ciclos, 2 U/uL.

A pesar de que los genes ribosomales (ADNr) como la región ITS y LSU ha sido empleada comunmente para la identificación de hongos hasta niveles de especies y para analisis filogenético, se han encontrado problemas referente a su uso. Un problema importante son las variaciones de ITS dentro de las especies para algunos hongos, por lo que es necesario reconsiderar el rango de secuencia de ITS a amplificar. Además, se ha reconocido la variación intragenómica (a veces denominada variación intraesfuerzo o intraindividual) entre las diversas copias de la matriz ribosómica en varias especies de hongos [24]. Una de las suposiciones por la que ocurre este fenomeno, es que las matrices de ribosomas nucleares no siempre pueden evolucionar de una manera estrictamente concertada [25]. Las matrices en tándem de hongos pueden contener entre 45 y 200 copias de la región teribosomal y estas copias pueden distribuirse en una o más ubicaciones cromosómicas lo que permite una variación significativa dentro de el genoma de un individuo [24]. Lo que sugiere que pudo haber ocurrido una mutación que se extendió a lo largo del gen de la cepa EBB-62, alterando el sitio de unión con los cebadores, lo que no permitió la hibridación de estos con la secuencia de ADN diana, ya que ésta no se puede realizar si la región complementaria al

cebadore en cuestión no existe en el ADN del individuo [26]. En base a lo anterior, se recomienda realizar la secuenciación del genoma de esta cepa.

Por otra parte, un factor determinante al llevar a cabo la reacción en cadena polimerasa, es la temperatura de hibridación. Cuanto mayor sea la temperatura utilizada en esta fase, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde; en condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos [27]. Es así como en la Figura 2, para las muestras M7, M9 y M11, se obtuvieron bandas inespecíficas asociado al uso de baja temperatura. Lo anterior, da lugar a la hipótesis de que no se llevó la reacción a la temperatura adecuada y se debe re evaluar las temperaturas habituales en esta fase que oscilan entre 35 y 60°C [27].

3.4 Potenciales de las cepas conservadas en el Departamento de Ingeniería Bioquímica.

La importancia de la identificación de los hongos ascomicetos que pertenecen al cepario del Departamento de Ingeniería Bioquímica radica en la información que otorga el conocimiento de su clasificación y las investigaciones que se pueden desarrollar con estos gracias a que han mostrado ser fuentes potenciales de nuevas enzimas y otros metabolitos con bioactividad. Un claro ejemplo del potencial de estas cepas es demostrado por Charria et al. (2021) donde se identificaron hongos endófitos aislados de *Otoba gracilipes* correspondientes a los géneros *Xylaria* y *Diaporthe* y se demostró el potencial promisorio de estos microorganismos para producir metabolitos secundarios bioactivos contra cepas de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) [17].

En la investigación realizada por el Dr. Nelson H. Caicedo y colaboradores, mostraron en el año 2019 que la cepa ET-01 identificada como *Fusarium oxysporum* mediante morfología para asignación de género y amplificación de la región ITS y LSU rDNA para determinación de especie, aislada de hojas de *Otoba gracilipes*, presentó actividad antioxidante in vitro del

51.5% en 5 minutos, demostrando potencial para posibles aplicaciones farmacéuticas y medicinales [16].

En el trabajo de Laura I. Cedeño en el año 2021, donde hongos endofitos como *Penicillium spp.*, muestran potencial biocatalítico al biotransformar tres colorantes de referencia, además de actividad ligninoperoxidasa. Así mismo una alta actividad endoglucanasa para la misma cepa *Penicillium spp.*, y para *Pezizula spp.* Adicionalmente, se determinó el potencial de biosíntesis de precursores aromáticos que posee *Pestalotiopsis spp* [13].

Finalmente, es clave resaltar el potencial que aún no ha sido completamente explotados y pueden representar aquellas cepas que no fueron clasificadas en los árboles filogenéticos reconstruidos en este trabajo, puesto que pueden representar reservorios enzimáticos novedosos que aún no han sido explorados, y, que se sugiere se evalúe con mayor profundidad, si las enzimas producidas podrían tener algún factor diferencial y novedoso en comparación de aquellas que ya se han reportado.

4. CONCLUSIÓN

Este estudio se enfocó en la identificación a nivel de género y especie de los hongos ascomicetos que pertenecen a la micoteca del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad ICESI, en el cual se alcanzó la identificación del 93.33% de las quince cepas trabajadas como mínimo a nivel de género a través de caracterización morfológica, identificación molecular y análisis filogenético. Los datos recopilados pueden ser la base para futuras investigaciones y pueden ser útiles para el desarrollo de estrategias que mejoren la metodología aquí empleada.

Se hace necesario la verificación de pureza de las cepas secuenciadas más no analizadas. No obstante, la caracterización morfológica de los aislados permite la asignación de género y corroboración de los resultados obtenidos.

Adicionalmente se requiere de la planeación y uso de metodologías basados en la secuenciación de varios genes (MLST) para dar respuesta a la especie de las cepas

pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. En lo que respecta al resto de aislados, la caracterización morfológica, la identificación molecular y la filogenia son herramientas que afirman y dan mayor soporte a la identificación y clasificación a nivel de género y especie de las cepas.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Doctor Mauricio Ramírez, estudiantes de microbiología de la Universidad Santiago de Cali, a la microbióloga Stefania Osorio y el Doctor Nelson Caicedo por los recursos, espacios y apoyo brindados para la culminación de este trabajo. También agradezco a todas las personas que, aunque no mencioné, no significa que sean de menor importancia, puesto que de alguna manera hicieron parte y ayudaron para alcanzar este logro.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 756-770.
- [2] Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2014). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS DE TEJIDOS DE FRÍJOL CON SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS. *Acta Biológica Colombiana*, 143-154.
- [3] Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Aoki, T., Ariyawansa, H. A., . . . Schoch, C. (2021). Fungal taxonomy and sequence-based. *Nature microbiology*, 540–548.
- [4] Hawksworth, D., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 1-17.
- [5] Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). CÓDIGOS DE BARRAS DE LA VIDA: INTRODUCCIÓN Y PERSPECTIVA. *Acta Biológica Colombiana*, 161-176.

-
- [6] Stadler, M., & Webwe, E. (2021). New developments in mycological taxonomy and nomenclature. *Mycological Progress*, 223-225.
- [7] Rush, T. A., Golan, J., McTaggart, A., Kane, C., Schneider, R. W., & Aime, C. (2019). Variation in the internal transcribed spacer (ITS) region of *Phakopsora pachyrhizi* and implications for molecular diagnostic assays. *Plant Disease*.
- [8] Villalobos, C. (2017). Identificación morfológica y molecular del hongo *volvariella volvácea* aislado del bagacillo de la caña de azúcar en una industria papelera del Cauca-Colombia. Cali.
- [9] Manganyi, M., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C., & Ateba., C. (2018). Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium*. *South African Journal of Botany*, 192-199.
- [10] Motato, V., Grassi E., Gugliotta A., & Robledo G. (2018). Evolutionary relationships of *Bresadolia* (Basidiomycota, Polyporales) based on molecular and morphological evidence. *Mycol Progress* 17, 1031–1048.
- [11] Manganyi, M., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C., & Ateba., C. (2018). Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium*. *South African Journal of Botany*, 192-199.
- [12] Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 38, Issue 7, Pages 3022–3027.
- [13] Cedeño L. (2020). Evaluación del potencial biotecnológico para uso sostenible de hongos endófitos asociados a *Vismia baccifera*. [Ingeniera bioquímica y Bióloga, Universidad ICESI].
- [14] Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo. (2016). Fichas de agentes biológicos: *Penicillium spp.* DataBio Recuperado de: <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>
- [15] Tapia C., Amaro J. (2014). Género *Fusarium*. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (1): 85-86.
- [16] Caicedo N., Dávalos A., Puente P., Rodríguez A. & Caicedo P. (2019). Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: An endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba gracilipes*. *MicrobiologyOpen*, Vol. 8, Issue 70.

-
- [17] Charria E., Espinosa M., Zapata A., Méndez M., Caicedo J., Dávalos A., Ferro B., Vasco A. & Caicedo N. (2021). Evaluation of the Antibacterial Activity of Crude Extracts Obtained From Cultivation of Native Endophytic Fungi Belonging to a Tropical Montane Rainforest in Colombia. *Frontiers in Microbiology*. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.716523>
- [18] Soto E. & Bolaños A. (2013). XYLARIACEAE EN UN BOSQUE DE NIEBLA DEL VALLE DEL CAUCA (COLOMBIA). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 37 (144): 343-351. ISSN 0370-3908.
- [19] Rodríguez J., Cuesta I., Gómez A., Alastruey A., Bernal L. & Cuenca M. (2007). Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26 Supl 13:47-53.
- [20] Visagie C., Hirooka Y., Tanney J., Whitfield E., Mwange K., Meijer M., Amend A., Seifert A. & Samson R. (2014). *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, Volume 78, Pages 63-139, ISSN 0166-0616. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.002>.
- [21] Iturrieta I., García D. & Gené J. (2021). Nuevas especies de *Cladosporium* de origen medioambiental en España. *MycKeys* 77: 1-25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.77.60862>
- [22] hhmi BioInteractive. USANDO SECUENCIAS DE ADN PARA CONSTRUIR ÁRBOLES FILOGENÉTICOS. <https://www.loligo.cl/educacion/>
- [23] Sting R., Eisenberg T. & Hrubenja M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 159, Pages 148-156.
- [24] Lindner D. & Banik M. (2011). Intragenomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. *Mycologia*, 103 (4), pp. 731-740.
- [25]. Simon U. & Weib M. (2011). Intragenomic Variation of Fungal Ribosomal Genes Is Higher than Previously Thought. *Molecular Biology and Evolution*, Volume 25, Issue 11, November 2008, Pages 2251–2254.
- [26]. Castaño L. & Bilboa J. (1997). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr*; 46:305-310.

[27]. Coniglio R, Fonseca M. & Zapata P. (2017). Aspectos bioquímicos y moleculares de celobiohidrolasas fúngicas con potencial aplicación en el proceso de sacarificación. [Doctor en Ciencias Aplicadas, Universidad Nacional de Misiones].

[28]. Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V., & Verkley, G. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxón delimitation. *Studies in mycology*, 92, 135–154.

ANEXO 1. Protocolo extracción de ADN fúngico.

1. En un tubo eppendorf adicionar 200 μ L de buffer TL y 25 μ L de solución proteinasa k.
2. Con un palillo de dientes o un asa plástica arrastre micelio de la caja petri hacia el tubo eppendorf con las soluciones agregadas en el paso 1.
3. Usando un micro macerador, destruya todo el micelio hasta observar que este se haya disuelto completamente en la solución. Realizar este proceso durante 5 minutos.
4. Agite durante 30 segundos en vortex.
5. Lleve el tubo eppendorf hacia el baño María a 55°C durante una hora y 30 min.
6. Adicione 220 μ L de buffer BL, lleve al vortex durante 15 segundos.
7. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
8. Adicione 220 μ L de etanol absoluto, lleve al vortex durante 15 segundos.
9. Inserte una columna de extracción en un tubo de colección de 2 mL.
10. Transfiera la muestra completa del tubo eppendorf hacia la columna, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado.
11. Centrifugar a 9000 rpm durante 1 min.
12. Descartar el tubo de colección con el filtrado que contiene.
13. Inserte un nuevo tubo de colección.
14. Adicione 500 μ L de buffer HBC en la columna de extracción.
15. Centrifugar a 9000 rpm durante 1 minutos.
16. Descarte el filtrado y re use el tubo de colección.
17. Adicione a la columna de extracción 700 μ L de DNA Wash Buffer.
18. Centrifugar a 9000 rpm durante 30 segundos.
19. Repita el paso 16,17 y 18 dos veces más.
20. Tomar un tubo eppendorf codificado, en él se debe anclar la columna de extracción.
21. Adicionar 30 μ L de buffer elution en el fondo de la columna teniendo precaución de no romper la membrana.

-
22. Centrifugar la columna junto con el tubo eppendorf a 9000 rpm durante 1 min para colectar el DNA extraído.
 23. Tomar los 30 μ L del buffer elution que cayeron en el tubo eppendorf y volver a añadirlos a la columna.
 24. Repetir paso 22.
 25. Guardar el tubo eppendorf con el DNA extraído a 4°C y cuantificar la concentración del ADN obtenido.

ANEXO 2. Caracterización morfológica macro y microscópica.

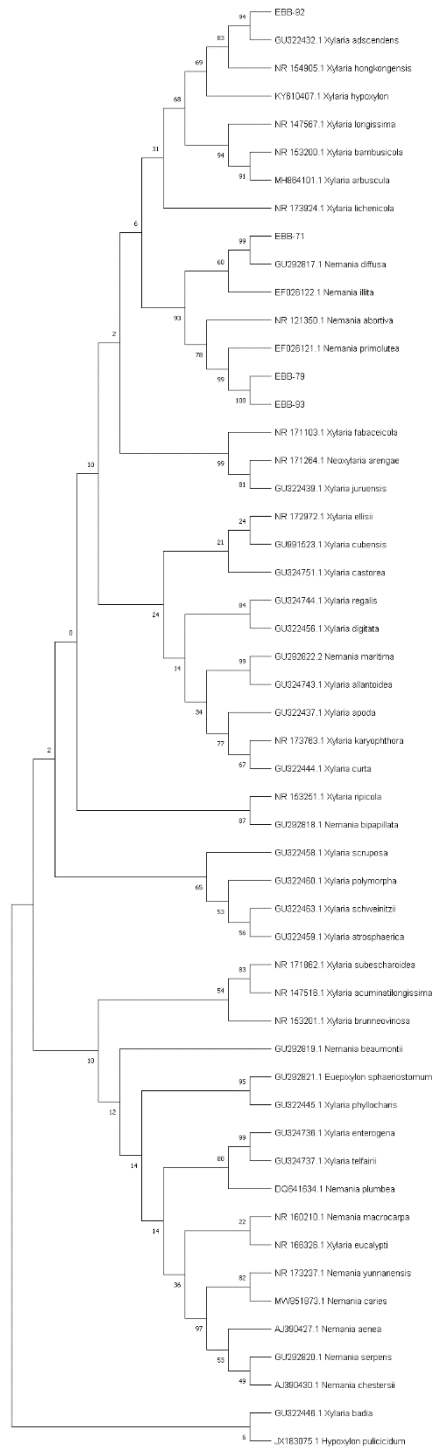


Figura A1. Reconstrucción de árbol filogenético con 48 especies para los géneros *Xylaria* y *Nemanzia* mediante el método Maximum Likelihood con un bootstrap de 1000 repeticiones bajo el modelo de sustitución Tamura-Nei y Gamma Distributed (G).

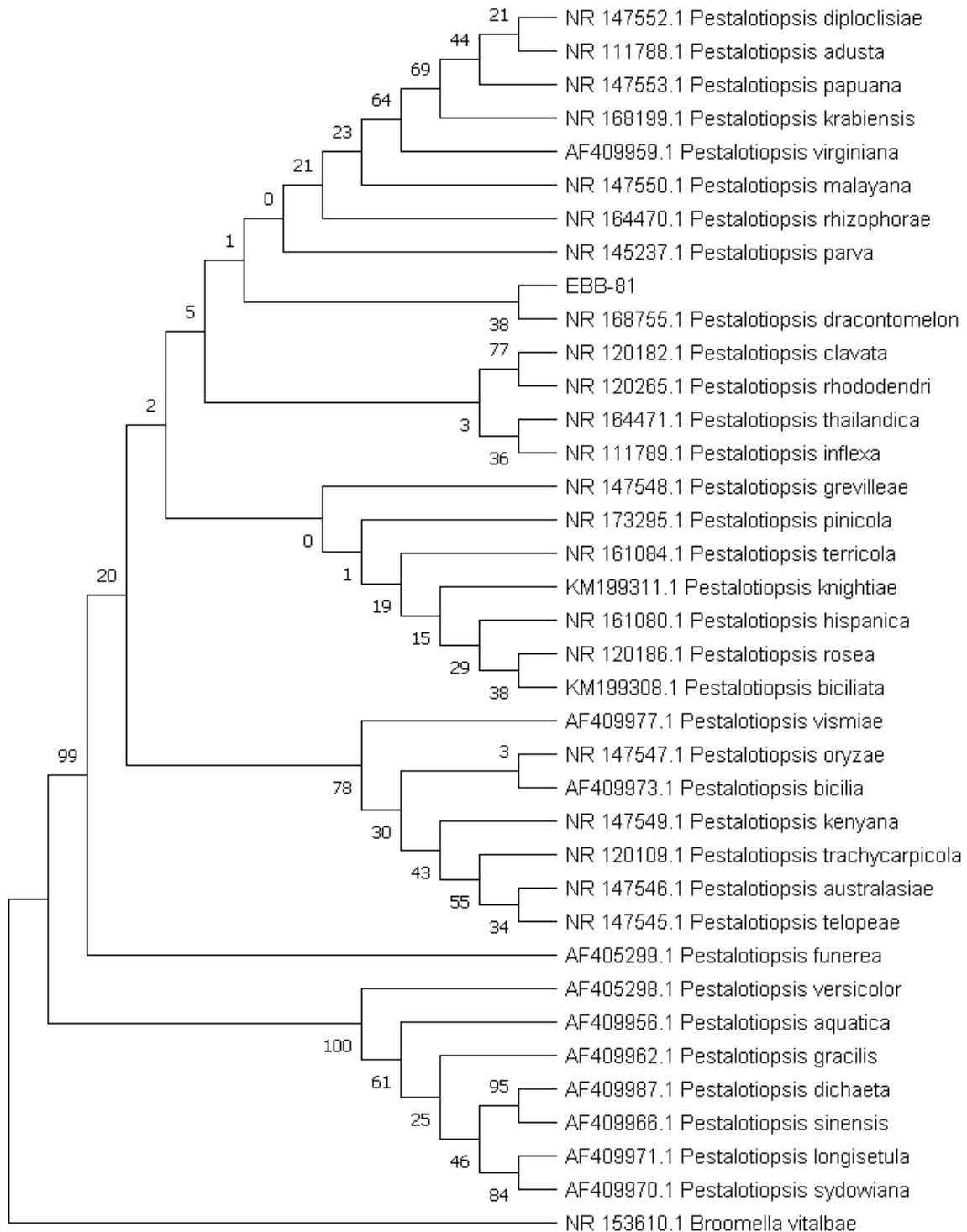


Figura A2. Reconstrucción de árbol filogenético con 36 especies para el género *Pestalotiopsis* mediante el método Maximum Likelihood con un bootstrap de 1000 repeticiones bajo el modelo de sustitución Tamura 3-parameter y Gamma Distributed (G).

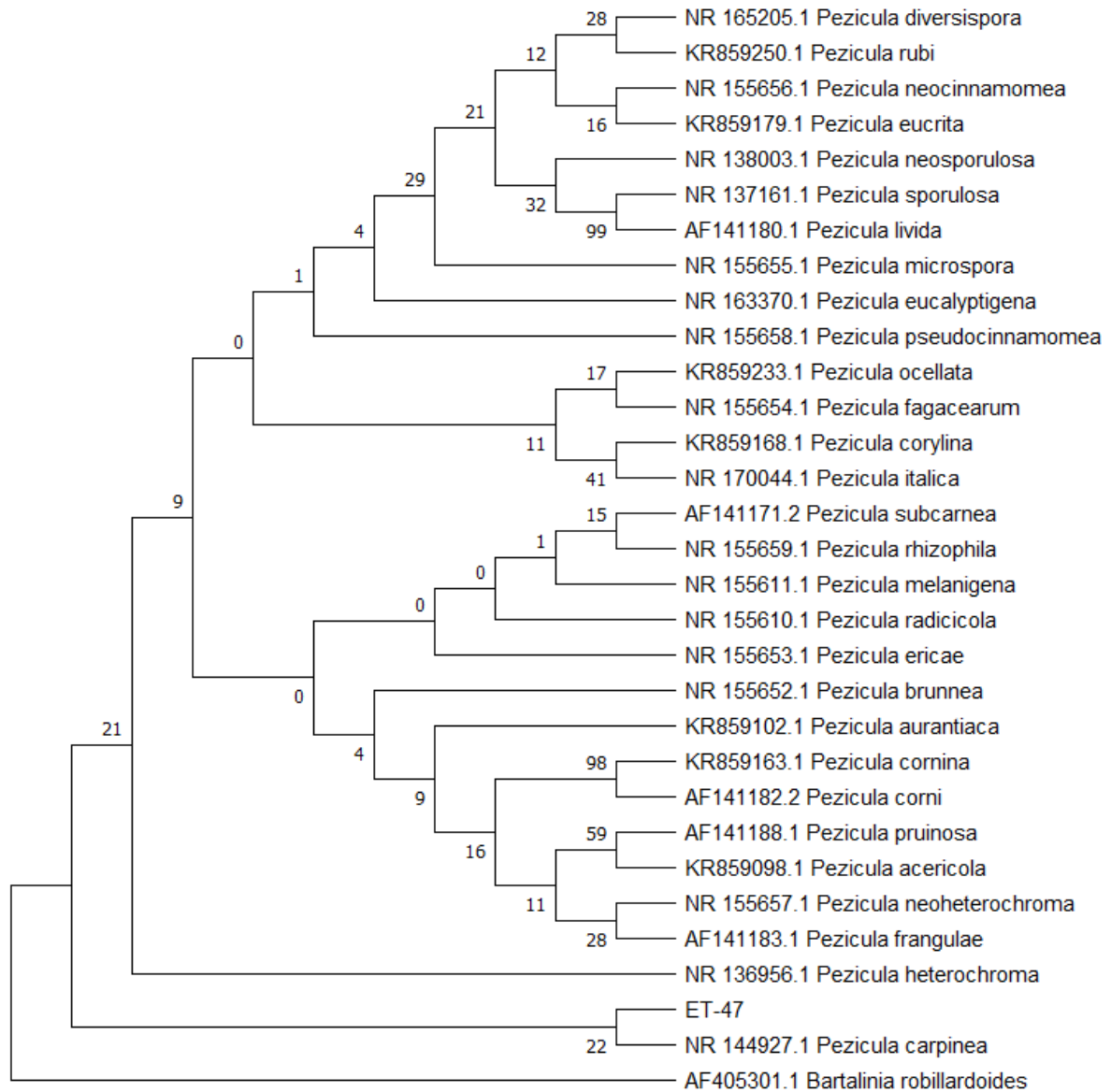
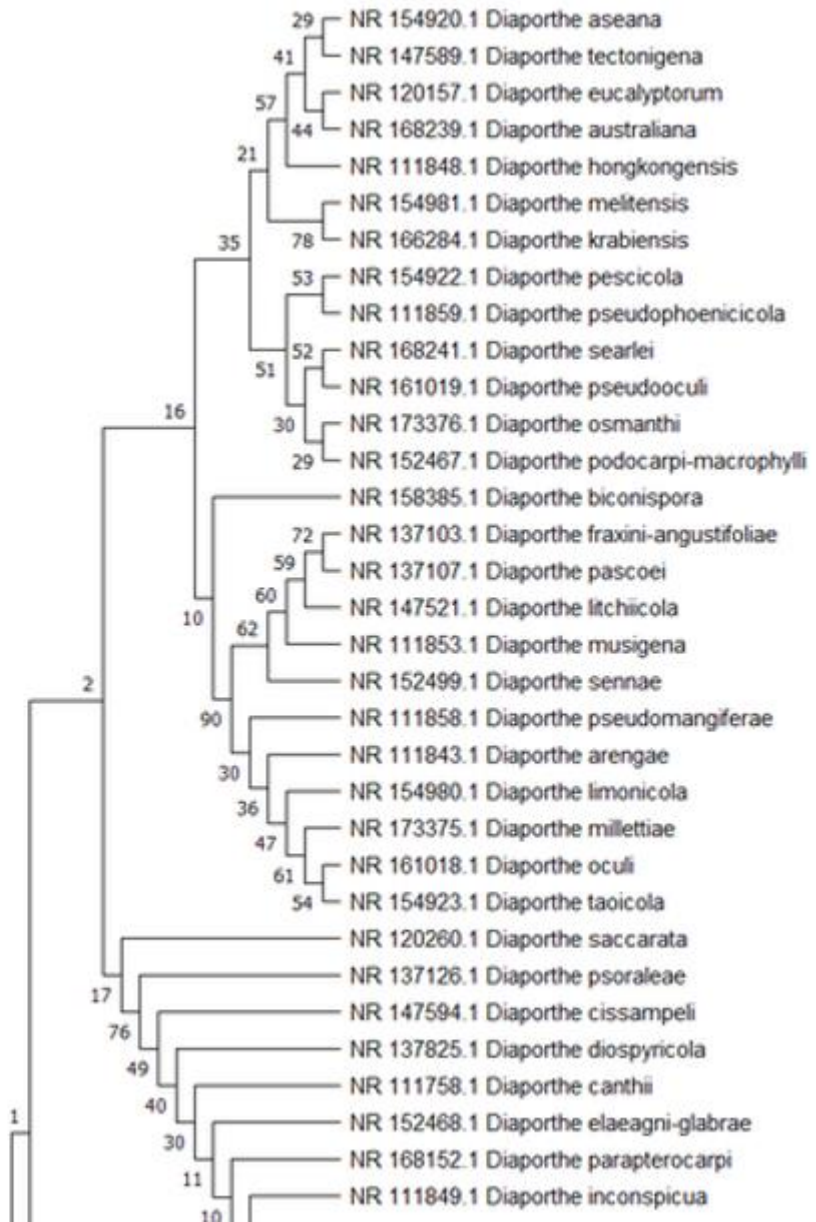
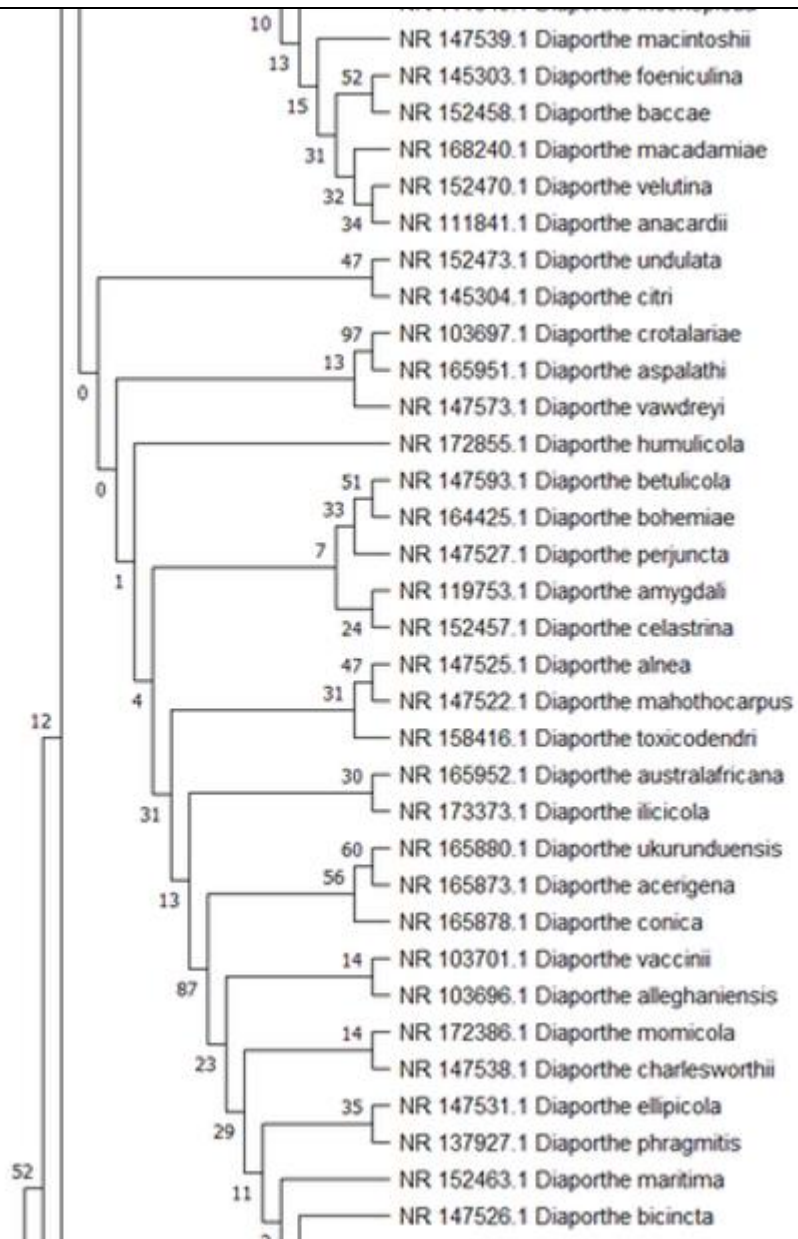
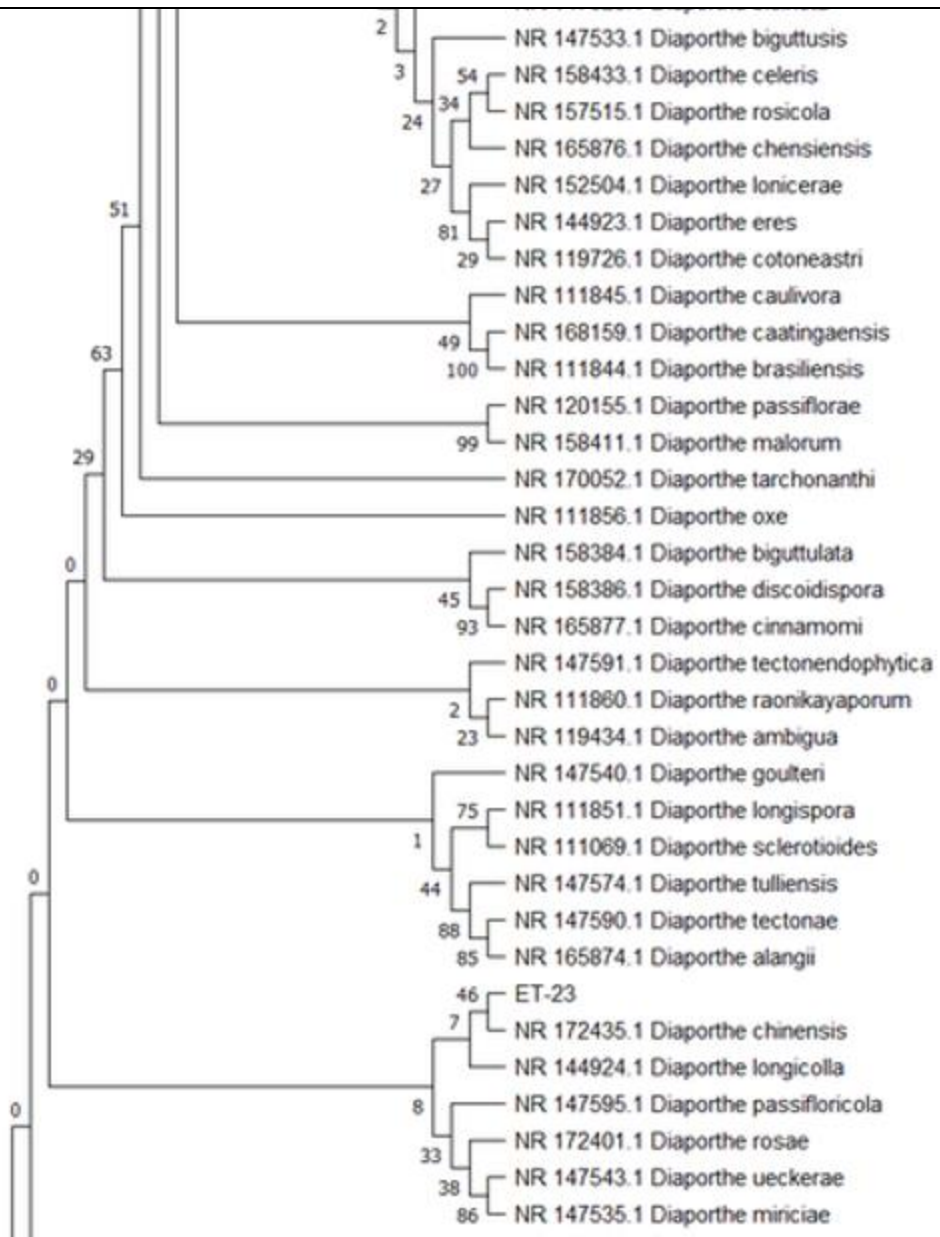


Figura A3. Reconstrucción de árbol filogenético con 30 especies para el género *Pezicula* mediante el método Maximum Likelihood con un bootstrap de 1000 repeticiones bajo el modelo de sustitución Kimura 2-parameter y Gamma Distributed (G).







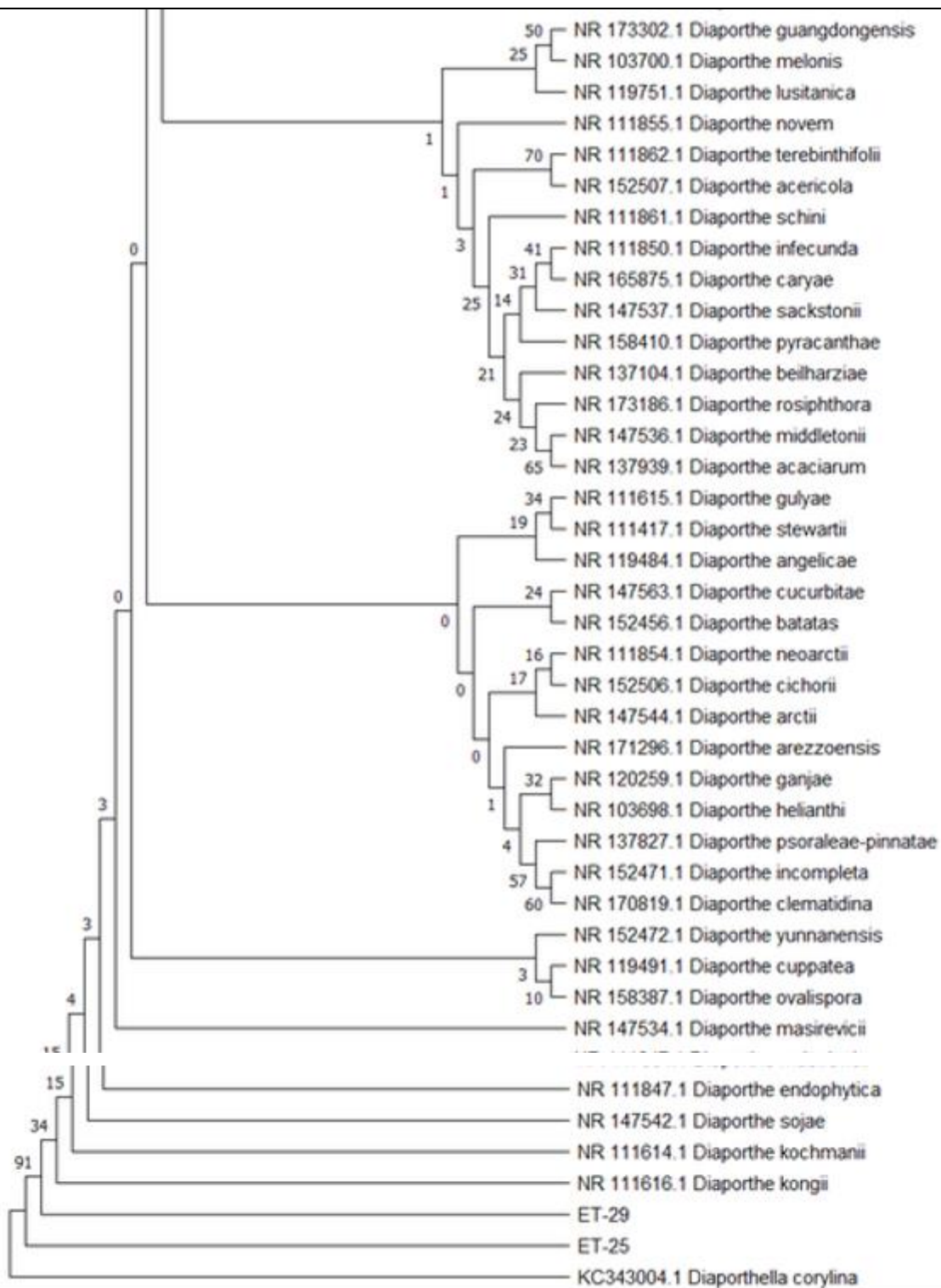


Figura A4. Reconstrucción de árbol filogenético con 136 especies para el género *Diaporthe* mediante el método Maximum Likelihood con un bootstrap de 1000 repeticiones bajo el modelo de sustitución Tamura-Nei y Distribución Gamma con Sitios Invariantes (G+I).