



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA

**Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico de
Bióloga**

**Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la
Reserva Ecológica Manglares Churute**

AUTOR: Silvia Teresa Robles Barragán

TUTOR: Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.

CO-TUTOR: Ing. Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.

GUAYAQUIL, JUNIO, 2020



**ANEXO VI. – CERTIFICADO DEL DOCENTE-TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA**

Guayaquil, 28 de febrero de 2020

**Sra. Dialhy Coello, Mgs.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -**

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute de la estudiante Silvia Teresa Robles Barragán, indicando que ha cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado del porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que la estudiante Silvia Teresa Robles Barragán está apta para continuar el proceso de revisión final.

Atentamente,

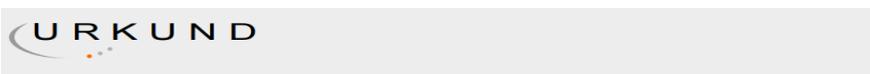
Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.
TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0908695364
FECHA: 28 de febrero de 2020



ANEXO VII. – CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado Blgo. Xavier Álvarez Montero, PhD, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por Silvia Teresa Robles Barragán, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Biólogo.

Se informa que el trabajo de titulación: Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio URKUND quedando el 0% de coincidencia.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis_Final_Silvia_Robles_02_03_20.docx (D64716645)
Submitted: 3/2/2020 2:07:00 PM
Submitted By: xavier.alvarezmo@ug.edu.ec
Significance: 0 %

Sources included in the report:

TESIS CARRERA DANIEL.docx (D53698608)

Instances where selected sources appear:

2



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico de Bióloga

Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute

AUTOR: Silvia Teresa Robles Barragán

TUTOR: Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D

COTUTOR: Ing. Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.

GUAYAQUIL, MES, AÑO

Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.

C.I.: 0908695364

FECHA: 28 de febrero de 2020



ANEXO VIII. – INFORME DEL DOCENTE REVISOR

Sra. Dialhy Coello, Mgs.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute de la estudiante Silvia Teresa Robles Barragán. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

El título tiene un máximo de 13 palabras.

La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.

El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.

La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.

Los soportes teóricos son de máximo 10 años.

La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

El trabajo es el resultado de una investigación.

El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.

El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.

El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que la estudiante Silvia Teresa Robles Barragán está apta para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya, MSc.
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. 0201316650
FECHA: 20 de abril de 2020



ANEXO XI. – FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA			
FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN			
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Robles Barragán Silvia Teresa		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Álvarez Montero Xavier Guillermo		
INSTITUCIÓN:	Universidad de Guayaquil		
UNIDAD/FACULTAD:	Facultad de Ciencias Naturales		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	Biología		
GRADO OBTENIDO:	Bióloga		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	junio, 2020	No. DE PÁGINAS:	49
ÁREAS TEMÁTICAS:	Desarrollo Biotecnológico, conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales.		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	ADN, ascomicetos marinos, ITS, LSU, TEF1- α .		
RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras):			
<p>Los ecosistemas de manglar por sus condiciones fisicoquímicas confieren un hábitat idóneo para el desarrollo de hongos, predominantemente el grupo de los ascomicetos marinos manglicolas que pueden encontrarse en material lignocelulósico de plantas de mangle. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos de la Reserva Ecológica Manglares Churute mediante el análisis de las secuencias de ADNr de las regiones ITS, LSU y TEF1-α, y evaluar el mejor método de extracción de ADN genómico fúngico por lisis celular mecánica. Los resultados demostraron que el mejor método de extracción de ADN fue el método combinado de lisis celular mecánica con mortero, vórtex y perlas de acero. Se identificó molecularmente tres ascomicetos, dos a nivel de especie correspondientes a <i>Verruculina enalia</i> y <i>Aigialus parvus</i> con porcentajes de similitud de identidad superiores a 99.00% con las tres regiones, presentando los mayores porcentajes con LSU, con valores de 99.88% y 100%, e ITS con 99.80% para <i>V. enalia</i>, mientras que para <i>A. parvus</i>, LSU e ITS presentaron valores de 100%. El aislado restante se logró identificar a nivel de género establecido como <i>Cladiophialophora</i> sp., únicamente con la región LSU, con porcentajes de identidad de 98.70% y 99.86%, con la región TEF1-α se obtuvo un porcentaje de 93.80% para el mismo género, mientras que con la región ITS no se pudo realizar el análisis debido a que la secuencia obtenida salió contaminada. Concluyendo que las tres regiones evaluadas permiten determinar la taxonomía y relaciones filogenéticas de ascomicetos.</p>			
ADJUNTO PDF:	X	SI	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0967417362	E-mail: silvia.roblesb@ug.edu.ec	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Universidad de Guayaquil		
	Teléfono: (04) 3080777 – 3080758		
	E-mail: info@fccnngye.com		



**ANEXO XII. – DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y DE AUTORIZACIÓN DE LICENCIA GRATUITA
INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES
ACADÉMICOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA**

LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA
CON FINES ACADÉMICOS

Yo, Silvia Teresa Robles Barragán con C.I. No. 0705627297, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute son de mi absoluta propiedad y responsabilidad, en conformidad al Artículo. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo la utilización de una licencia gratuita intransferible para el uso no comercial a favor de la Universidad de Guayaquil.

Silvia Teresa Robles Barragán

C.I. No. 0705627297



ANEXO XIII. – RESUMEN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA

**Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares
Churute**

Autor: Silvia Teresa Robles Barragán

Tutor: Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.

Co-tutor: Ing. Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.

Resumen

Los ecosistemas de manglar por sus condiciones fisicoquímicas confieren un hábitat idóneo para el desarrollo de hongos, predominantemente el grupo de los ascomicetos marinos manglícolas que pueden encontrarse en material lignocelulósico de plantas de mangle. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos de la Reserva Ecológica Manglares Churute mediante el análisis de las secuencias de ADN_r de las regiones ITS, LSU y TEF1- α , y evaluar el mejor método de extracción de ADN genómico fúngico por lisis celular mecánica. Los resultados demostraron que el mejor método de extracción de ADN fue el método combinado de lisis celular mecánica con mortero, vórtex y perlas de acero. Se identificó molecularmente tres ascomicetos, dos a nivel de especie correspondientes a *Verruculina enalia* y *Aigialus parvus* con porcentajes de similitud de identidad superiores a 99.00% con las tres regiones, presentando los mayores porcentajes con LSU, con valores de 99.88% y 100%, e ITS con 99.80% para *V. enalia*, mientras que para *A. parvus*, LSU e ITS presentaron valores de 100%. El aislado restante se logró identificar a nivel de género establecido como *Cladiophialophora* sp., únicamente con la región LSU, con porcentajes de identidad de 98.70% y 99.86%, con la región TEF1- α se obtuvo un porcentaje de 93.80% para el mismo género, mientras que con la región ITS no se pudo realizar el análisis debido a que la secuencia obtenida salió contaminada. Concluyendo que las tres regiones evaluadas permiten determinar la taxonomía y relaciones filogenéticas de ascomicetos.

Palabras claves: ADN, ascomicetos marinos, ITS, LSU, TEF1- α .



ANEXO XIV. – RESUMEN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES CARRERA DE BIOLOGÍA

Molecular characterization of three fungal isolates obtained from the Manglares Churute Ecological Reserve

Author: Silvia Teresa Robles Barragán

Advisor: Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.

Co-advisor: Ing. Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.

Abstract

Mangrove ecosystems, due to their physicochemical conditions, confer an ideal habitat for the development of fungi, predominantly the group of manglicolous marine ascomycetes, that can be found in lignocellulosic material of mangrove tree. The objective of the present investigation was to molecularly characterize three fungal isolates from the Churute Mangrove Ecological Reserve by analyzing the rDNA sequences of the ITS, LSU and TEF1- α regions, and to evaluate the best method of extraction of fungal genomic DNA by mechanical cellular lysis. The results demonstrated that the best method of DNA extraction was the combined method of mechanical cell lysis with mortar, vortex, and steel beads. Three ascomycetes were molecularly identified, two at the species level corresponding to *Verruculina enalia* and *Aigialus parvus* with percentages of identity similarity greater than 99.00% with the three regions, presenting the highest percentages with LSU, with values of 99.88% and 100%, and ITS with 99.80% for *V. enalia*, while for *A. parvus*, LSU and ITS presented values of 100%. The remaining isolate was identified at the genus level established as *Cladiophialophora* sp., Only with the LSU region, with identity percentages of 98.70% and 99.86%, with the TEF1- α region a percentage of 93.80% was obtained for the same genus. In contrast, with the ITS region the analysis could not be performed because the obtained sequence was contaminated. It was concluding that the three evaluated regions allow us to determine the taxonomy and phylogenetic relationships of ascomycetes.

Keywords: DNA, marine ascomycetes, ITS, LSU, TEF1- α .

© **Derechos de autor**

Silvia Teresa Robles Barragán

2020

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

En mi calidad de Tutor de este Trabajo de Titulación Certifico que, el presente trabajo ha sido elaborado por la señorita Silvia Teresa Robles Barragán por lo cual autorizo su presentación.

A handwritten signature in blue ink, reading "Xavier Álvarez M.", positioned above a horizontal line.

Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D.
Director del Trabajo de Titulación

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para nunca rendirme.

A mi familia por toda la confianza, apoyo y cariño brindado.

A Luis, por el apoyo incondicional.

La vida duele, pero más duele no vivirla.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil - Laboratorio de Biotecnología Microbiana - Área de Biotecnología de Ascomicetos Marinos, por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

A mi tutor Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D., por impartir sus conocimientos y ser la guía para el desarrollo de esta investigación, por impulsarme hacia el camino de la investigación y apoyarme personal y profesionalmente.

Al Ing. Efrén Santos Ordoñez, Ph.D., por bríndame sus conocimientos, guiarme y enseñarme las bases fundamentales en el área de biología molecular.

A la Blga. Nancy Saltos, MSc., por su valiosa colaboración.

A mis compañeros de laboratorio: Grace T., Anthony M., Ricardo T., Andrea M., Andrea C, Dayanna A.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. ANTECEDENTES	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Aislamiento y obtención de cultivos monospóricos de ascomicetos. ...	11
4.2. Condiciones de cultivo	11
4.3. Caracterización morfológica	13
4.4. Extracción del ADN genómico	13
4.4.1. Protocolo de extracción y purificación de ADN	13
4.4.2. Condiciones de amplificación para PCR	14
4.4.3. <i>Primers</i> utilizados	15
4.4.4. Espaciador transcrito interno (ITS)	17
4.4.5. Factor de elongación (TEF1- α)	17
4.4.6. Subunidad grande del ribosoma (LSU)	17
4.4.7. Electroforesis en Gel de agarosa	17
4.4.8. Análisis de secuencias	18
4.5. Caracterización molecular	18
4.5.1. Análisis filogenético	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Identificación morfológica	19
5.1.1. <i>Verruculina enalia</i>	20
5.1.2. <i>Aigialus parvus</i>	21

5.1.3. Especie no identificada	22
5.2. Análisis molecular	22
5.2.2. Extracción de ADN.....	22
5.2.3. Electroforesis en Gel de agarosa	24
5.2.4. Análisis de las secuencias	26
5.2.5. Análisis filogenético	27
6. DISCUSIÓN.....	30
7. CONCLUSIONES	33
8. RECOMENDACIONES	35
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
10. ANEXOS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Agar Extracto de Malta y Levadura (YM) (1000 mL).	12
Tabla 2. Composición del medio de cultivo Jugo Vegetal V8 (1000 mL).	12
Tabla 3. Composición del medio de Cultivo Papa Dextrosa (PD) (1000 mL). ..	12
Tabla 4. Primers utilizados en la amplificación de PCR para las regiones TEF1- α , LSU e ITS.	16
Tabla 5. Comparación de los métodos de extracción de ADN para determinar la concentración en ng μL^{-1} mediante la medición $A_{260/280}$ nm de absorbancia.	23
Tabla 6. Concentración de ADN de los tres aislados fúngicos obtenido de la extracción de ADN con método estándar en ng μL^{-1} a partir de la absorbancia.	24
Tabla 7. Secuencias del ADNr (ITS, LSU) y del factor de elongación (TEF1- α) utilizadas en los análisis filogenéticos, porcentajes de similitud y los números de acceso de GenBank.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** **a)** Ascosporas marrones maduras de *Verruculina enalia* con pequeñas verrugas (flecha roja), escala 20 μm (60X). **b)** *V. enalia* con su respectiva asca (flecha roja), escala 10 μm (40X). **c)** Crecimiento de *V. enalia* en medio de cultivo YM después de 8 días de crecimiento. **d)** Vista superior de crecimiento de *V. enalia* en medio de cultivo YM después de 21 días de crecimiento.20
- Figura 2.** **a)** Ascospora madura de *Aigialus parvus*, escala 20 μm (60X). **b)** Ascosporas de *A. parvus*, escala 10 μm (20X). **c)** Vista superior de la colonia de cultivada en YM Agar después de 8 días de crecimiento. **d)** Vista superior de la colonia *A. parvus* cultivada medio de cultivo V8 después de 20 días de crecimiento.21
- Figura 3.** **a)** Vista superior de colonia monospórica de especie no identificada cultivada en V8 Agar después de 9 días de crecimiento. **b)** Vista superior de colonia monospórica del aislado no identificado cultivado en V8 Agar después de 21 días de crecimiento.22
- Figura 4.** Amplificación de la región TEF1- α , para los 3 aislados, con los *primers* Ef1-983F - Ef1-2218R. Bandas con una altura aproximada de 1200 pb. **A)** Marcador de peso molecular (100 pb). **B)** Aislado 1. **C)** Aislado 2. **D)** Aislado 3. **E)** Control negativo.25
- Figura 5.** Amplificación de la región LSU, con los *primers* LR0R - LR5. Bandas de aproximadamente 1000-1200 pb. **A)** Aislado 1. **B)** Aislado 2. **C)** Aislado 3. **D)** Marcador de peso molecular (100 pb).25
- Figura 6.** Amplicones generados con las regiones LSU con los *primers* LR3R - LR7. Bandas de 1000-1200 pb, y la región ITS con los *primers* ITS1 - ITS4. Bandas de 700 pb. **A)** Aislado 1 con los *primers* LR3R - LR7. **B)** Aislado 2 con los *primers* LR3R - LR7. **C)** Aislado 3 con los *primers* LR3R - LR7. **D)** Control negativo. **E)** Aislado 1 con los *primers* ITS1 - ITS4. **F)** Aislado 2 con los *primers* ITS1 - ITS4. **G)** Control negativo. **H)** Marcador de peso molecular (100 pb).26

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. a)** Inoculación de micelio del cultivo monospórico en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). **b)** Crecimiento fúngico en Medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa.42
- Anexo 2.** Centrifugación del sobrenadante con acetato de amonio 5M en el proceso de extracción de ADN.42
- Anexo 3.** Muestras de ADN listas para la amplificación en el equipo termociclador.43
- Anexo 4. a)** Deposito de las muestras en el gel de Agarosa. **b)** Programa de electroforesis en gel de Agarosa.43
- Anexo 5.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1- α). *Ulospora bilgramii* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-TEF-consenso.44
- Anexo 6.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-LSU-consenso44
- Anexo 7.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-LSU-consenso.45
- Anexo 8.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas

- indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia-ITS-consenso*.....45
- Anexo 9.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1- α). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus-TEF-consenso*.46
- Anexo 10.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus-LSU-consenso*.....46
- Anexo 11.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus-LSU-consenso*.....47
- Anexo 12.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS). *Fissuroma aggregata* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus-ITS-consenso*.47
- Anexo 13.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1- α). *Fonsecaea pedrosoi* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta

investigación se representa como *Cladophialophora* sp-TEF-consenso.
.....48

Anexo 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Phialophora reptans* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Cladophialophora* sp-LSU-consenso.
.....48

Anexo 15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Phialophora reptans* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Cladophialophora* sp-LSU-consenso.
.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNr	ADN ribosómico.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico.
CETAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ITS	Espaciador transcrito interno.
LSU	Subunidad grande del ribosoma.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TEF1- α	Factor de elongación de traducción.
Tm	Temperatura de fusión.
Tris	Hidroximetil amino metano.
CM	Cultivos monospóricos.
pb	pares de bases.

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grados centígrados.
L	litro.
g L ⁻¹	gramos litros.
min	minutos.
mg	miligramo.
mL	mililitro.
NaCl	Cloruro de Sodio.
ng	nanogramo.
ng mL ⁻¹	nanogramos microlitros.
nm	nanómetro
μL	microlitro.
μM	micromolar.
%	porcentaje.
‰	partes por mil.
mg mL ⁻¹	miligramos mililitros.
mM	milimolar.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio.
2X	solución dos veces concentrada.
rpm	revoluciones por minuto.

Caracterización molecular de tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute

Resumen

Los ecosistemas de manglar por sus condiciones fisicoquímicas confieren un hábitat idóneo para el desarrollo de hongos, predominantemente el grupo de los ascomicetos marinos manglicolas que pueden encontrarse en material lignocelulósico de plantas de mangle. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos de la Reserva Ecológica Manglares Churute mediante el análisis de las secuencias de ADN_r de las regiones ITS, LSU y TEF1- α , y evaluar el mejor método de extracción de ADN genómico fúngico por lisis celular mecánica. Los resultados demostraron que el mejor método de extracción de ADN fue el método combinado de lisis celular mecánica con mortero, vórtex y perlas de acero. Se identificó molecularmente tres ascomicetos, dos a nivel de especie correspondientes a *Verruculina enalia* y *Aigialus parvus* con porcentajes de similitud de identidad superiores a 99.00% con las tres regiones, presentando los mayores porcentajes con LSU, con valores de 99.88% y 100%, e ITS con 99.80% para *V. enalia*, mientras que para *A. parvus*, LSU e ITS presentaron valores de 100%. El aislado restante se logró identificar a nivel de género establecido como *Cladiophialophora* sp., únicamente con la región LSU, con porcentajes de identidad de 98.70% y 99.86%, con la región TEF1- α se obtuvo un porcentaje de 93.80% para el mismo género, mientras que con la región ITS no se pudo realizar el análisis debido a que la secuencia obtenida salió contaminada. Concluyendo que las tres regiones evaluadas permiten determinar la taxonomía y relaciones filogenéticas de ascomicetos.

Palabras claves: ADN, ascomicetos marinos, ITS, LSU, TEF1- α .

Molecular characterization of three fungal isolates obtained from the Manglares Churute Ecological Reserve

Abstract

Mangrove ecosystems, due to their physicochemical conditions, confer an ideal habitat for the development of fungi, predominantly the group of manglicolous marine ascomycetes, that can be found in lignocellulosic material of mangrove tree. The objective of the present investigation was to molecularly characterize three fungal isolates from the Churute Mangrove Ecological Reserve by analyzing the rDNA sequences of the ITS, LSU and TEF1- α regions, and to evaluate the best method of extraction of fungal genomic DNA by mechanical cellular lysis. The results demonstrated that the best method of DNA extraction was the combined method of mechanical cell lysis with mortar, vortex, and steel beads. Three ascomycetes were molecularly identified, two at the species level corresponding to *Verruculina enalia* and *Aigialus parvus* with percentages of identity similarity greater than 99.00% with the three regions, presenting the highest percentages with LSU, with values of 99.88% and 100%, and ITS with 99.80% for *V. enalia*, while for *A. parvus*, LSU and ITS presented values of 100%. The remaining isolate was identified at the genus level established as *Cladiophialophora* sp., Only with the LSU region, with identity percentages of 98.70% and 99.86%, with the TEF1- α region a percentage of 93.80% was obtained for the same genus. In contrast, with the ITS region the analysis could not be performed because the obtained sequence was contaminated. It was concluding that the three evaluated regions allow us to determine the taxonomy and phylogenetic relationships of ascomycetes.

Keywords: DNA, marine ascomycetes, ITS, LSU, TEF1- α .

1. INTRODUCCIÓN

El ecosistema de manglar se encuentra en zonas costeras, tropicales y subtropicales, presenta altos niveles de salinidad, mareas constantes, vientos fuertes y temperaturas altas, que le confieren un carácter dinámico y complejo, que provee condiciones favorables para el desarrollo de una variedad de microorganismos, como bacterias y hongos (Nambiar & Raveendran, 2009).

Los manglares son el hábitat idóneo para la comunidad de hongos marinos de manglar. Estos hongos pueden dividirse en saprofitos, simbioses o parásitos. O como hongos inferiores que comprenden los oomicetos y los thraustochytridios, y hongos superiores, como los ascomicetos y basidiomicetos (Deshmukh, Gupta, Prakash, & Sudhakara Reddy, 2018).

Los hongos marinos de manglar pueden encontrarse en material lignocelulósico, como sustratos leñosos, restos vegetales, raíces, hojas y tallos de plantas de mangle (Nambiar & Raveendran, 2009). De los hongos marinos, los ascomicetos son el grupo predominante, debido a que han desarrollado ciertas modificaciones fisiológicas (apéndices en sus esporas, para la fijación al sustrato o mantenerse suspendidos), como mecanismo de adaptación a un hábitat diferente, que les han permitido desarrollarse con éxito dentro de este ecosistema (Kohlmeyer & Volkman K, 1987). También pueden encontrarse ascomicetos facultativos que pueden ser fitopatógenos o patógenos humanos oportunistas (Das, Lee, & Jung, 2019).

Los ascomicetos marinos manglicolas, tienen un rol fundamental dentro de los manglares, porque son la base de la cadena trófica dentro del ecosistema, debido a su sistema enzimático, capaz de degradar el material lignocelulósico, lo que influye directamente en el ciclo de los nutrientes, por la gran producción de detritos orgánicos (Kohlmeyer, J., 1968), que son aprovechados por otros microorganismos para su desarrollo y que a su vez proporcionan los nutrientes necesarios para otros microorganismos incapaces de degradar el material lignocelulósico (Odum & Heald, 1975).

Las condiciones únicas del ecosistema de manglar, influyen en la fisiología y morfología de los microorganismos que lo habitan, estimulando mecanismos de

adaptación y defensa a estas condiciones, como la producción de una variada gama de metabolitos secundarios que se clasifican según su actividad biológica (Debbab, Aly, & Proksch, 2013).

Entre los microorganismos productores de metabolitos secundarios, el grupo de los ascomicetos marinos, así como los ascomicetos manglícolas, se consideran de mayor importancia científica, por la producción de abundantes moléculas con importantes actividades biológicas, como consecuencia de la adaptación a las condiciones medioambientales del ecosistema de manglar (Deshmukh *et al.*, 2018). Estas moléculas presentan diversas aplicaciones industriales, especialmente biotecnológicas, y se pueden clasificar como citotóxicas, antitumorales, antimicrobianas, antifúngicas, etc., (Debbab *et al.*, 2013).

Debido a esto en la actualidad la comunidad científica se ha enfocado en las búsquedas de nuevos productos naturales obtenidos a partir de hongos marinos, microorganismos que han tomado mayor importancia en los últimos años, por su elevada actividad farmacológica (Fathurohman, Pratita, Khusnul, Yuliana, & Suhartati, 2019). Resaltando la necesidad de conocer su identificación taxonómica, diversidad, distribución y ecología, para el entendimiento de su relación con la biota y los parámetros ambientales que influyen en su metabolismo, que a su vez repercuten en la producción de moléculas bioactivas (Xu *et al.*, 2015; Azevedo & Quecine, 2017).

Anteriormente los datos morfológicos de estructuras reproductivas sexuales y asexuales, así como la forma de crecimiento en el medio (forma de colina, color de micelio, etc.), era la base fundamental para la identificación taxonómica de casi todos los hongos (Liew, Guo, Ranghoo, Goh, & Hyde, 1998). En la actualidad aún se utilizan estos métodos, aunque de manera general solo hasta nivel de familia, y especialmente para entender cómo dichas estructuras cambian a través del tiempo, pero no siempre dan resultados exactos en la identificación a nivel de especie, porque las características fenotípicas suelen ser muy variables en los diferentes medios de cultivo, pueden tener un crecimiento de estructuras de esporulación muy similares entre especie o pueden no presentar esporulación, impidiendo su correcta identificación (Hyde *et al.*, 2013).

Las deficiencias de la identificación morfológica llevó al uso de técnicas de identificación molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en ADN mediante el uso de marcadores moleculares fúngicos (Hyde *et al.*, 2013).

Debido a que el estudio de hongos de manglar ha tomado mayor relevancia en los últimos años por considerarse una potencial fuente de compuestos bioactivos de importancia biotecnológica, la técnica reacción en cadena de la polimerasa es muy empleada con el propósito de determinar la diversidad, taxonomía y relaciones filogenéticas de las comunidades de hongos endófitos, presentes en diversos tejidos foliares, tallos y raíces de plantas de manglar (Loganathachetti, Poosakkannu, & Muthuraman, 2017).

En la última década se han incrementado el uso de genes como marcadores moleculares utilizados en la identificación, taxonomía y sistemática fúngica. siendo así los marcadores moleculares más utilizados para este fin el espaciador transcrito interno nuclear (ITS) de los genes de ARN ribosómico, regiones como el gen de la subunidad grande del ribosoma nuclear 28S (LSU), o intrones de ciertos genes que codifican proteínas como las ARN polimeras, la subunidad grande de ARN polimerasa II (RPB1), segunda subunidad grande de ARN polimerasa II (RPB2) (Dizkiric & Kalmer, 2019), β -tubulina, γ -actina y factor de elongación EF-1 α (TEF1- α) que pueden utilizarse solas o combinadas para determinar la taxonomía y relaciones filogenéticas (Singh & Gupta, 2017).

Por lo anterior descrito, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute, a partir de la obtención de cultivos monospóricos, además de su caracterización morfológica, y estandarizar un protocolo de extracción de ADN genómico para ascomicetos marinos manglícolas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos obtenidos de la Reserva Ecológica Manglares Churute.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener tres aislados monospóricos de ascomicetos provenientes del manglar de la Reserva Ecológica Manglares Churute.
- Implementar un protocolo de extracción de ADN genómico fúngico de alta calidad.
- Caracterizar molecularmente tres aislados fúngicos, mediante análisis bioinformáticos de las secuencias del ITS, LSU y TEF1- α .

3. ANTECEDENTES

El uso de técnicas de biología molecular para la identificación, clasificación taxonómica y sistemática fúngica empezó al inicio de la década de los 90, con los primeros trabajos realizados a partir de información de ADN, donde utilizaron herramientas moleculares para comparar secuencias de ADN de hongos a partir del porcentaje de similitud de homología (De Bertoldi, Lepidi, & Nuti, 1973; Kuninaga & Yokosawa, 1985), especialmente de la región del ARN ribosómico nuclear (ARNr), de toda la región del espaciador transcrito interno (ITS1, 5,8S, ITS2) y la subunidad grande del ribosoma (LSU-26S 28S) con la descripción e implementación de *primers* específicos para cada región, para establecer relaciones filogenéticas en diferentes niveles taxonómicos superiores e inferiores (Bruns, White, & Taylor, 1991; Seifert, Wingfield, & Wingfield, 1995; Dizkiric & Kalmer, 2019).

Además de los genes ribosómicos nucleares también se han propuesto para la identificación, clasificación taxonómica y relaciones filogenéticas de hongos los genes codificadores de proteínas, la subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB1), segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB2), factor de elongación de traducción (TEF1- α) y beta-tubulina (Dizkiric & Kalmer, 2019).

La región ITS del ADN ribosómico nuclear, se ha convertido en el marcador molecular por excelencia para la identificación fúngica molecular y sistemática de una manera rápida y precisa, contando con 90000 secuencias almacenadas en bases de datos públicas (Schoch *et al.*, 2012). Esta región presenta una variación intraespecífica elevada, se amplifica fácilmente incluso con bajas concentraciones de ADN, por tales motivos es considerada el código de barras y el marcador estándar para los hongos, permitiendo llegar hasta una identificación de especie (Gherbawy & Voigt, 2010; Nilsson, 2011).

Aunque los ITS se han declarado los marcadores moleculares más utilizados en sistemática fúngica, existen otras regiones como el gen de la subunidad grande del ribosoma nuclear 28S (LSU) que se encuentra ubicado cerca de la región ITS y ha sido ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas entre

hongos. Aunque su uso en Ascomycetos ha demostrado tener menor poder de identificación y diferenciación que en Basidiomycetos (Dizkiric & Kalmer, 2019).

Otro marcador molecular generalmente utilizado en hongos es el gen del factor de elongación (TEF1- α) es un gen altamente conservado y brinda información hasta nivel de especie para una gran variedad de hongos, especialmente del grupo de ascomycetos, y a través del tiempo ha sido muy utilizado tanto para taxonomía y filogenética de varios hongos (Hasegawa, Ota, Hattori, & Kikuchi, 2010). El TEF1- α actualmente se ha declarado como el segundo código de barras en hongos por presentar una resolución en muchos casos mayor que el marcador ITS (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017).

A partir de estas investigaciones, los métodos moleculares mediante la secuenciación del ADN y el empleo de marcadores moleculares fúngicos han sido utilizados como una herramienta básica en el área de micología para establecer clasificaciones taxonómicas y relaciones filogenéticas, permitiendo llegar a una identificación a niveles de orden, género e incluso de especie, hasta convertirse en herramientas imprescindibles para estudios de clasificación sistemática fúngica (Bridge, Spooner, & Roberts, 2005).

Aunque a nivel mundial el estudio de hongos ha tomado mayor relevancia, el estudio orientado a hongos marinos específicamente de manglar está siendo cada vez más explorado, porque han sido una importante fuente de obtención de una gran variedad de hongos microscópicos, tanto endófitos, saprobios y patógenos, que han demostrado tener importantes aplicaciones biotecnológicas, encontrándose en estructuras desde raíces, tallos, hojas o material vegetal en descomposición, impulsando cada vez más el estudio de este tipo de ecosistemas y las especies de hongos ahí presentes (Loganathachetti, Poosakkannu, & Muthuraman, 2017).

Las primeras investigaciones de hongos endófitos en manglares fueron realizadas por Schmit & Shearer, (2003), donde realizaron un estudio de comunidades fúngicas asociados a plantas de mangle y lograron reportar un total de 625 aislados fúngicos, divididos en 278 ascomycetos, 30 basidiomycetos y 14 oomicetos. Este estudio concluyó que los bosques de manglar son puntos de

interés para el descubrimiento de una variedad de hongos marinos, principalmente debido a que sus tejidos, como ramas y raíces que se encuentran sumergidas en el agua durante un periodo permanente o temporal por efecto de las mareas, asumiendo que los hongos endofitos ayudan a la planta a soportar dichas condiciones de estrés ambiental.

Hyde *et al.*, (2013), realizaron un estudio acerca del proceso y los componentes empleados en estudios moleculares, dirigida a principiantes que deseaban dedicarse a desarrollar dichas metodologías, ya que un estudio taxonómico está compuesto por varios pasos. Debido a que el uso de métodos moleculares había tomado mayor relevancia en estudios dentro del área de micología, para la clasificación sistemática, taxonómica, y el entendimiento de la ecología fúngica, Los autores lograron detallar todos los aspectos a considerar y los pasos de laboratorio a seguir y finalmente la interpretación de datos, para lograr obtener desde ADN de buena calidad, las secuencias y posterior identificación de los hongos.

Mirhendi *et al.*, (2015) evaluaron la capacidad de identificación molecular a nivel de especie del gen TEF1- α como un nuevo marcador molecular en la identificación de una variedad de hongos patógenos humanos en comparación con el marcador molecular ITS, amplificando las regiones TEF1- α mediante la técnica de PCR y comparando las secuencias obtenidas con las depositadas en el GenBank. Este estudio concluyó que el gen del factor de elongación se amplificó exitosamente en todos los aislados presentando un gran porcentaje de resolución entre especies, demostrando que la especificidad y poder de resolución del gen TEF1- α era mayor que la región ITS.

Hamzah *et al.*, (2018) realizaron un estudio de hongos del tejido foliar de mangle, realizando una identificación morfológica complementada con la identificación molecular, amplificando la región del gen del ARN ribosómico nuclear del ITS con el uso de los *primers* ITS1-F e ITS4 y comparando por homología las secuencias obtenidas con la herramienta BLAST de la base de datos GenBank-NIH. En total reportaron 305 aislados, de ellos 101 fueron sometidos al método de identificación molecular usando la región ITS, logrando amplificar 78 muestras

pertencientes mayormente a la división Ascomycota, con 75 ascomicetos y 3 basidiomicetos, con un porcentaje de similitud desde 91.00% y 100%.

Kumar *et al.*, (2019) realizaron un estudio de las comunidades fúngicas asociadas a residuos lignocelulósicos de mangle, en el cual reportaron una nueva especie de hongos ascomicetos perteneciente al género *Rhytidhysterion* que se ha descrito como patógeno humano causando micosis subcutáneas en personas con trastornos de inmunodeficiencia a partir de la comparación de secuencias obtenidas con otras especies aceptadas dentro de ese género, mediante el uso de estructuras morfológicas y análisis molecular de varios genes del ADN ribosomal (LSU) con la pareja de *primers* (LROR y LR5), la región del ITS con los *primers* (ITS5 & ITS4), y la región TEF1- α con los *primers* (EF1-983F y EF1-2218R).

Badali *et al.*, (2009) reportaron una nueva especie de *Cladophialophora* obtenido de restos lignocelulósicos del ambiente utilizando las secuencias del ITS y TEF1- α . La secuencia generada y comparada con secuencias presentes en la base de datos GenBank presentó un elevado porcentaje de similitud con especies del género, Los árboles filogenéticos con las dos secuencias se basaron en el método de Neighbor-joining, validado con el método de máxima parsimonia, considerando valores superiores a 80%, que demostraron que la secuencia estudiada se agrupó dentro del clado del género *Cladophialophora*, con valores de bootstrap de 81% con ITS cercano a *C. devriesii*, considerándose su pariente más cercano, al igual que con TEF1- α que la relaciona con la misma especie.

Feng *et al.*, (2013) aislaron de tejidos vegetales del suelo de manglar una nueva especie de *Cladophialophora*, con el análisis filogenético de ITS con los *primers* ITS1 e ITS4 el cual se realizó por la complejidad de identificación morfológica debido a estructuras similares a otra especie del género. Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el programa MEGA v.5.05 con el método Neighbor-joining y un valor bootstrap de 500 repeticiones considerándose solo por encima del 70%, donde obtuvieron que la secuencia obtenida difería a las de las especies del género *Cladophialophora* existentes en bases de datos públicas,

presentando un porcentaje del 86% con *C. chaetospira* representando la especie más cercana filogenéticamente.

Obase, Douhan, Matsuda, & Smith, (2015) aislaron y describieron a partir del suelo dos nuevas especies de *Cladophialophora* empleando las secuencias del ITS y LSU, debido a que han sido mayormente secuenciadas para el género y sus taxones más cercanos, especialmente el ITS, al contrario de la región TEF1- α que presenta pocas especies secuenciadas para el género. A partir del análisis filogenético pudieron describir los dos aislados como dos especies nuevas porque sus secuencias difirieron con todas las especies reportadas para *Cladophialophora*, y otros géneros más cercanos, además difirieron filogenéticamente entre ellas a pesar de presentar estructuras morfológicas similares entre sí.

A nivel nacional los estudios de hongos marinos manglicolas son escasos. En Ecuador solo existen tres estudios orientados a la presencia de hongos marinos. Pero estos trabajos se han basado únicamente en descripciones morfológicas de las estructuras reproductoras; así tenemos los trabajos realizados por Kohlmeyer & Volkman K, (1987), en las islas Galápagos, donde reportaron 32 aislados fúngicos, pertenecientes a 26 especies de ascomicetos, un basidiomiceto y cinco deuteromicetes. Este estudio además determinó que los aislados encontrados a lo largo de las costas de las islas eran especies que ya han sido reportadas en otras zonas geográficas.

Álvarez, (2011), evaluó por primera vez la diversidad y caracterización taxonómica de los hongos marinos lignícolas del manglar de Palmar, y reportó siete especies y un género de ascomicetos correspondiente a tres teleomorfos y cuatro anamorfos con su respectiva descripción y clasificación taxonómica.

Álvarez, Tamayo, Moscoso, Robles, & Almeida, (2019), en un estudio realizado en la Reserva Ecológica Manglares Churute reportaron 12 especies de ascomicetos marinos manglicolas, seis teleomorfos y seis anamorfos, que ya han sido reportadas para otras regiones del mundo. Siendo el segundo reporte de ascomicetos marinos en hábitat de manglar en la costa ecuatoriana, resaltando que en Ecuador a pesar de presentar diversos ecosistemas de

manglar los estudios enfocados en ascomicetos marinos eran inexistentes hace unos años, pero han tomado mayor importancia en la actualidad por sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

Sin embargo, debido a los escasos trabajos enfocados en la identificación molecular de hongos marinos en Ecuador, surge la necesidad de conocer la identidad exacta de estos organismos, superando el paso principal que es lograr un aislamiento y purificación de ADN de buena calidad y concentración, por eso es importante establecer protocolos para la extracción de ADN e identificación genética de estos.

Por los motivos antes expuestos Saltos, (2012) evaluó tres protocolos de extracción de ADN genómico, con diferencias principales en la parte de la lisis celular, en un ascomiceto marino manglícola y posteriormente validó los protocolos en otros tres aislados, para establecer el mejor protocolo para la extracción de ADN genómico en ascomicetos marinos en Ecuador, para poder realizar estudios moleculares, como la PCR. Este estudio determinó que con los tres protocolos se logró obtener altas concentraciones de ADN, de las cuatro cepas de ascomicetos marinos evaluados, pero estandarizó un protocolo como el más aplicable debido a la obtención de una concentración más alta de ADN.

Los resultados aquí descritos sugieren que mediante el uso de LSU, el TEF1- α e ITS se puede caracterizar molecularmente al grupo de los ascomicetos marinos manglícolas, como complemento de una previa identificación morfológica, con el fin de determinar la identidad exacta de los hongos marinos desde nivel de familia, género y especie y de esta manera conocer el componente fúngico presente en una zona de estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento y obtención de cultivos monospóricos de ascomicetos.

La obtención de los aislados se realizó a partir de material lignocelulósico proveniente del manglar de la Reserva Ecológica Manglares Churute acorde a lo descrito por Goh & Hanlin, (1997). Una vez localizados los cuerpos fructíferos se procedió a la extracción de las ascosporas o conidios bajo condiciones asépticas, para su caracterización morfológica y obtención de cultivos monospóricos (CM). Los CM se obtuvieron a partir de una suspensión de esporas inoculada en medio de cultivo Papa Dextrosa agar (PDA) (Farmacopeas USP/EP/JP.) suplementado con sulfato de estreptomina (250 mg mL^{-1}) y penicilina (250 mg mL^{-1}). Los cultivos se observaron bajo el microscopio cada 24h en busca de esporas germinadas, una vez localizadas se trasladaron a Placas de Petri con PDA para su posterior evaluación.

4.2. Condiciones de cultivo

Los aislados se cultivaron de forma rutinaria en los medios de cultivos Agar Extracto de malta y levadura (YM) y Jugo Vegetal V8 (V8) (Tabla 1 y 2) ajustados a pH 8,2, salinidad de 20 ‰, e incubados a 30°C. La obtención de micelio para la caracterización molecular se realizó mediante la inoculación de micelio del cultivo monospórico (Anexo 1) a un volumen final de 250 mL de Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Tabla 3), con agitación constante a 120 rpm, suplementado con dos antibacterianos penicilina y estreptomina ($0,0125 \text{ g L}^{-1}$), y condiciones de crecimiento controladas por un periodo de 10 días.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Agar Extracto de Malta y Levadura (YM) (1000 mL).

Reactivo	Cantidad
Agua de mar	1000 mL
Extracto de levadura	4 g L ⁻¹
Extracto de malta	12 g L ⁻¹
Dextrosa	4 g L ⁻¹
Sulfato de estreptomicina	250 mg mL ⁻¹
Penicilina	250 mg mL ⁻¹

Tabla 2. Composición del medio de cultivo Jugo Vegetal V8 (1000 mL).

Reactivo	Cantidad
Jugo vegetal V8	150 mL
Agua de mar	850 mL
Extracto de levadura	850 g L ⁻¹
Sulfato de estreptomicina	250 mg mL ⁻¹
Penicilina	250 mg mL ⁻¹

Tabla 3. Composición del medio de Cultivo Papa Dextrosa (PD) (1000 mL).

Reactivo	Cantidad
Extracto de papa	500 mL
Dextrosa	20 mg mL ⁻¹
Agua de mar	500 mL
Sulfato de estreptomicina	250 mg mL ⁻¹
Penicilina	250 mL ⁻¹

4.3. Caracterización morfológica

La identificación morfológica de los aislados fúngicos consistió en la observación de estructuras de reproducción como tamaño, forma y color de las ascosporas o conidios, mediante el uso de claves taxonómicas Kohlmeyer & Kohlmeyer, (1979); Jones, Sakayaroj, Suetrong, Somrithipol, & Pang, (2009). La visualización de estructuras se realizó en las instalaciones del área de Plancton del Instituto Nacional de Pesca (INP) mediante el empleo de un microscopio óptico (Leica) y la medición de estas se realizó empleando el Software Digital Image System.

4.4. Extracción del ADN genómico

El ADN genómico total se aisló utilizando el protocolo desarrollado por Morin, Vallaey, Hendrickx, Natalie, & Wilmotte, (2010) aplicando el método tradicional SDS (dodecilsulfato de sodio) y proteinasa K con ciertas modificaciones. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de ADN por lisis celular mecánica: 1) sonicación, 2) mortero, 3) perlas de acero y 4) un método combinado (mortero, perlas de acero y vórtex). Los resultados para cada método se obtuvieron en base a sus concentraciones en ng/ μ L y valores de espectrofotometría según sus absorbancias a partir de los cuales se seleccionó el método 4 como el más adecuado (Tabla 5).

4.4.1. Protocolo de extracción y purificación de ADN

- Se colectó el micelio fresco de cada aislado mediante filtración con gasa a partir del medio de cultivo puro Caldo Papa Dextrosa y se secó con papel filtro.
- Se pesó aproximadamente 30-50 mg de micelio fresco de cada muestra y se lo depositó en un tubo Eppendorf de 2 mL.
- El micelio filtrado y pesado se trituró aplicando el método estandarizado anteriormente mencionado (manualmente con mortero más perlas de acero y aplicando vórtex máximo por 30 segundos).
- La muestra triturada fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. A cada tubo se le adicionó 500 μ L de tampón de lisis TES (Tris 100 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM y SDS al 2%).

- Se agregó 12,56 μL de Proteinasa K (20 mg mL^{-1}), se encubó los tubos a 37°C durante 30 minutos.
- Luego se adicionó 140 μL de NaCl 5 M y 1/10 volumen de CTAB al 10%, y se colocó en un baño termostático a 65°C durante 10 minutos.
- Se adicionó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se colocó los tubos en hielo durante 5 min, luego se centrifugó a (10 min, 4°C , 14000 rpm), luego se retiró el sobrenadante y se lo pasó a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL.
- Al sobrenadante obtenido se le adicionó 225 μL de acetato de amonio 5M, se colocó en hielo por cinco minutos y luego se centrifugó a (10 min, 4°C , 14000 rpm) (Anexo 2).
- Al sobrenadante se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol y luego cada tubo se colocó a -20°C durante 30 minutos o 24 horas.
- Luego de las 24 horas se centrifugó durante (20 min, 4°C , 14000 rpm), se eliminó el sobrenadante y al pellet obtenido se lo lavó con 1 mL de etanol frío al 70%, y posteriormente se centrifugó nuevamente por (5 min, 4°C , 14000 rpm) y se descartó una vez más el sobrenadante.
- El pellet se dejó secar entre 10 a 15 minutos dentro de la cámara de flujo laminar.
- El ADN obtenido se resuspendió en 200 μL de agua ultra pura.
- El ADN fue cuantificado mediante el quipo NanoDrop (Thermo Scientific™).
- Los valores obtenidos de la calidad de ADN a partir de sus absorbancias por espectrofotometría en NanoDrop se observan en medida de concentración en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ en relación a las absorbancias $A_{260 \text{ nm}}$, $A_{280 \text{ nm}}$, $260/280 \text{ nm}$ y $260/230 \text{ nm}$.

4.4.2. Condiciones de amplificación para PCR

Se amplificaron dos regiones de genes del ADN ribosomal nuclear (LSU e ITS) y un gen codificador de proteínas (TEF1- α).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μL que contenía, 25 μL de GoTaq (2X), 2,5 μL de cada *primer* (10mM), 1 μL de ADN genómico y

19 μL de agua ultrapura. En todos los ensayos se utilizó reacciones sin ADN como control negativo.

- Se mezcló todos los elementos necesarios para la amplificación por PCR para cada muestra.
- A cada muestra se le adicionó 25 μL de GoTaq® Green Master Mix (2X), que contenía ADN polimerasa Taq polimerasa, dNTP y MgCl_2 .
- Se agregó 2,5 μL de los *primers* Forward y Reverse (10 μM) previamente descritos para las diferentes reacciones.
- Se adicionó 19 μL agua desionizada y finalmente 1 μL de ADN genómico de cada muestra por separado con un volumen final de 20 μL .
- La amplificación del ADN se realizó en el equipo de amplificación termociclador MultiGene™ OptiMax (Anexo 3).

4.4.3. *Primers* utilizados

Se utilizaron cuatro parejas de *primers* (Tabla 4) para los análisis de las secuencias de ADN del espaciador transcrito interno (ITS), del gen que codifica para el factor de elongación (TEF1- α) y de la ARN de la subunidad grande del ribosoma (LSU).

Tabla 4. *Primers* utilizados en la amplificación de PCR para las regiones TEF1- α , LSU e ITS.

Primers	Secuencia (5' a 3')	Gen	Referencia	Temperatura de fusión T_m (C°)	Tamaño esperado del amplicón (pb)
Ef1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGA YTTYAT	TEF1- α	Rehner & Buckley, 2005	61.2 °C	1200-1700
Ef1-2218R	ATGACACCRCRGCRCRGTGTG	TEF1- α	Rehner & Buckley, 2005	60.9 °C	1200-1700
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	LSU	Vilgalys & Hester, 1990	52.4 °C	1200-1500
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	LSU	Vilgalys & Hester, 1990	51.1 °C	1200-1500
LR3R	GTCTTGAAACACGGACC	LSU	Vilgalys & Hester, 1990	50.6 °C	1200-1500
LR7	TACTACCACCAAGATCT	LSU	Vilgalys & Hester, 1990	45.6 °C	1200-1500
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	White <i>et al.</i> , 1990	65 °C	500-750
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	White <i>et al.</i> , 1990	58 °C	500-750

Las condiciones específicas para cada pareja de *primers* de los diferentes genes fueron las siguientes:

4.4.4. Espaciador transcrito interno (ITS)

Las regiones ITS se amplificaron utilizando los *primers* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Las amplificaciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos de 1) desnaturalización 95 °C durante 30 segundos, 2) hibridación (55 °C durante 30 segundos), y 3) extensión (72 °C durante 1.30 minutos).

4.4.5. Factor de elongación (TEF1- α)

La región del factor de elongación de traducción (TEF1- α) se amplificó utilizando los *primers* Ef1-983F (GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT y Ef1-2218R (ATGACACCRACRGCACRGTYTG) (Rehner & Buckley, 2005). Las amplificaciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de PCR fueron las mismas que las de la región ITS.

4.4.6. Subunidad grande del ribosoma (LSU)

La región de la subunidad grande del ribosoma (LSU) se amplificó utilizando dos parejas de *primers*, LROR (ACCCGCTGAACTTAAGC) y LR5 (TCCTGAGGGAACTTCG); LR3R (GTCTTGAAACACGGACC) y LR7 (TACTACCACCAAGATCT) (Vilgalys & Hester, 1990). Para los *primers* LR0R/LR5 las condiciones de amplificación de PCR fueron las mismas que las anteriores. Mientras que para los *primers* LR3R/LR7 las condiciones de PCR se realizó una variación en la etapa de hibridación con una temperatura de 59 °C durante 30 segundos, en lugar de 55 °C.

4.4.7. Electroforesis en Gel de agarosa

Luego del proceso de amplificación por PCR, los amplicones se analizaron mediante la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa con concentración al 1% (Anexo 4), utilizando SYBR Safe (Invitrogen) como fluoróforo. Se tomó la foto del gel mediante el equipo Fotodocumentador (Omega

Fluor plus) para visualizarlo. Una vez analizados los productos de PCR se enviaron a secuenciar comercialmente (Macrogen USA).

4.4.8. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas para las tres regiones se analizaron independientemente; se alinearon, y compararon mediante homología con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el programa informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias se procesaron mediante el programa Geneious Prime (<http://www.geneious.com>) en donde se realizó una secuencia consenso por cada secuencia de PCR proveniente del mismo aislado fúngico y marcador molecular. Todas las secuencias con cada juego de *primers* se analizaron y compararon por homología con BLASTn.

4.5. Caracterización molecular

Para la confirmación de especies de los aislados identificados morfológicamente se realizó la secuenciación y posterior análisis filogenético de los genes del espaciador transcrito interno (ITS), del factor de elongación (TEF1- α), y de la ARN de la subunidad grande del ribosoma (LSU), como se describe a continuación.

4.5.1. Análisis filogenético

Para la elaboración de árboles filogenéticos de las secuencias consenso se empleó el método Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), utilizando el método estadístico Maximun Likelihood, a partir de todas las secuencias alineadas por MUSCLE utilizando el programa MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018), mediante los modelos Tamura-Nei, Kimura-2 parámetros, Tamura-3 parámetros (dependiendo del mejor modelo analizado por MEGA X), y el método bootstrap (técnica estadística que genera un número elevado de pseudoréplicas del alineamiento original) con 1000 repeticiones para comprobar la máxima verosimilitud de todas las ramas (clados) producidas.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación morfológica

A partir de la identificación morfológica con las claves descritas anteriormente se identificó presuntamente dos de los aislados fúngicos tanto a nivel de género como especie, mientras que para el último aislado solo se describió las características de su colonia y forma de crecimiento en el medio de cultivo, debido a la ausencia de registros fotográficos. Para la caracterización morfológica y molecular los aislados fueron enumerados por aislados 1, 2 y 3 para *Verruculina enalia*, *Aigialus parvus* y especie no identificada respectivamente.

5.1.1. *Verruculina enalia*

Tiene ascosporas elipsoidales, oblicuamente uniseriadas, con un solo septo, con constricción en el mismo; con pequeñas verrugas y de coloración café oscuro, de 17–22 x 8.5–10 μm (Figura 1).

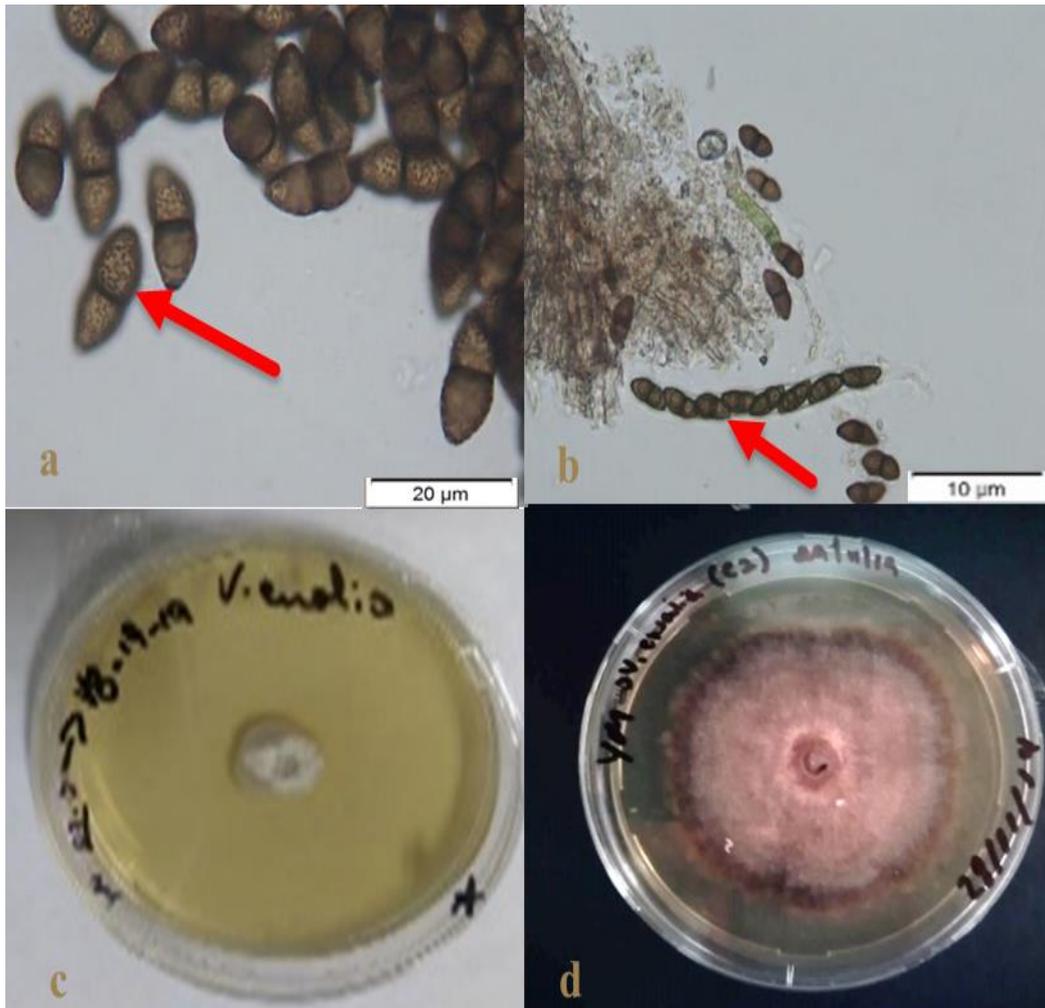


Figura 1. **a)** Ascosporas marrones maduras de *Verruculina enalia* con pequeñas verrugas (flecha roja), escala 20 μm (60X). **b)** *V. enalia* con su respectiva asca (flecha roja), escala 10 μm (40X). **c)** Crecimiento de *V. enalia* en medio de cultivo YM después de 8 días de crecimiento. **d)** Vista superior de crecimiento de *V. enalia* en medio de cultivo YM después de 21 días de crecimiento.

5.1.2. *Aigialus parvus*

Presenta ascosporas elipsoidales a ampliamente fusiformes, ligeramente contraída en los septos, coloración marrón oscuro, con células apicales hialinas a marrón claro, células subapicales cubiertas por una vaina gelatinosa, de 44-74 x 19-27 μm . Con más de 8 septos transversales, ocasionalmente 9 y rara vez 12 (Figura 2).

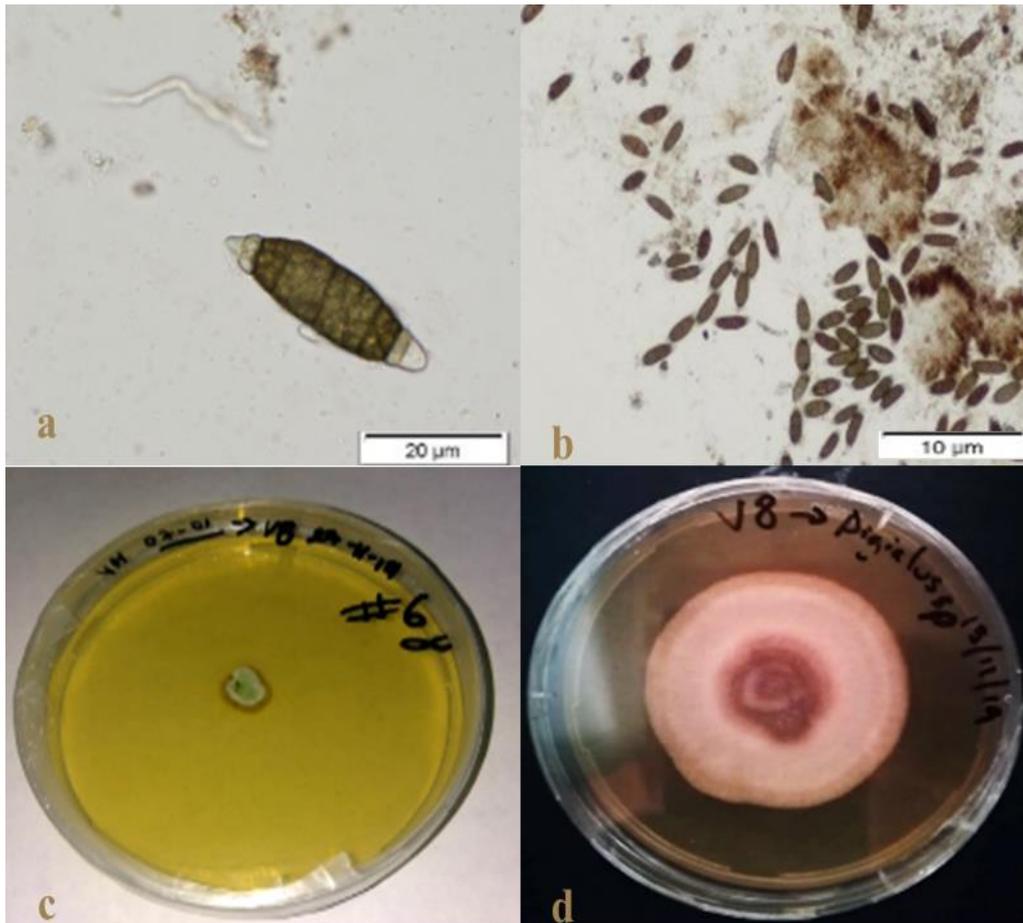


Figura 2. a) Ascospora madura de *Aigialus parvus*, escala 20 μm (60X). b) Ascosporas de *A. parvus*, escala 10 μm (20X). c) Vista superior de la colonia de *A. parvus* cultivada en YM Agar después de 8 días de crecimiento. d) Vista superior de la colonia *A. parvus* cultivada medio de cultivo V8 después de 20 días de crecimiento.

5.1.3. Especie no identificada

El aislado 3 no presentó registros fotográficos de sus estructuras de reproducción. Su descripción morfológica se basó en la observación de sus características de crecimiento. Colonia de forma circular cremosa con coloración café oscura a negra, esporulación moderada y conidios pigmentados oscuros (Figura 3).

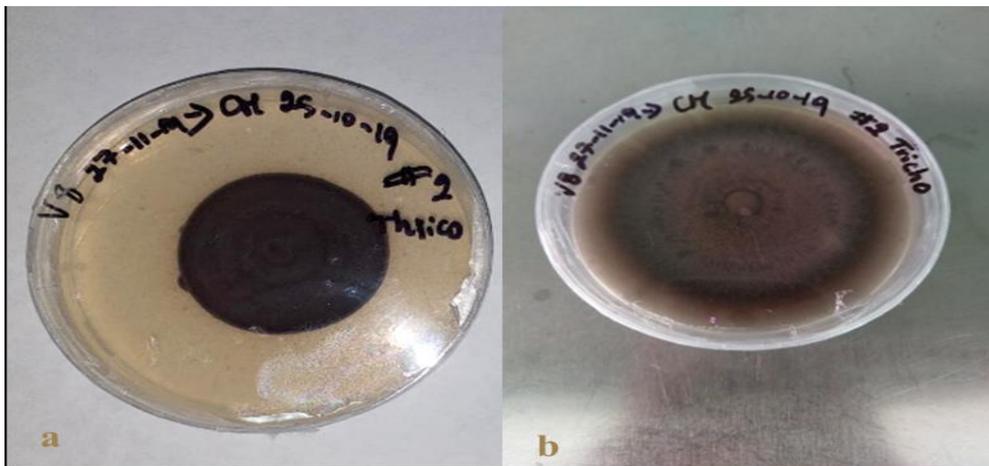


Figura 3. a) Vista superior de colonia monospórica de especie no identificada cultivada en V8 Agar después de 9 días de crecimiento. b) Vista superior de colonia monospórica del aislado no identificado cultivado en V8 Agar después de 21 días de crecimiento.

5.2. Análisis molecular

5.2.2. Extracción de ADN

Respecto al aislamiento de ADN, se logró extraer ADN genómico de los tres aislados fúngicos con una concentración y calidad adecuada para la amplificación. Los cuatro métodos evaluados presentaron resultados medianamente diferentes en cuanto a pureza y concentración. Todos los métodos se basaron en lisis celular mecánica, pero el método de aislamiento de

ADN que combinó tres métodos físicos aplicando trituración con mortero, agitación con perlas de acero y vórtex presentó mejores rendimientos en cuanto a calidad y concentración. Con los cuatro métodos evaluados se obtuvieron valores de concentración en ng/μL de 624,0 – 181,2 – 189,5 y 241,5, con el rango de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀ se obtuvo valores de 2,12 – 2,08 – 2,12 – 2,07, para los métodos 1, 2, 3 y 4 respectivamente (Tabla 5). Los tres primeros protocolos indican ADN contaminado con ARN, mientras que el cuarto es el que más se mantiene dentro del rango de pureza aceptable, el cual fue estandarizado para la extracción de ADN genómico de los tres aislados fúngicos. El método estandarizado presentó valores de concentración de 30,1 – 8,4 – 13,4. Con el rango A_{260/280} nm se obtuvo valores de 1,98, 1,61, 1,73 respectivamente, cuyos valores se mantienen dentro del rango de pureza aceptable de ADN (ratio de 1.8). Por otro lado, ratios de A₂₆₀/A₂₃₀ se comprendieron valores de 3,19- 3,01 - 2,49, para para los aislados (1, 2 y 3), respectivamente (Tabla 6), siendo lo ideal valores superiores a 2,0.

Tabla 5. Comparación de los métodos de extracción de ADN para determinar la concentración en ng uL⁻¹ mediante la medición A_{260/280} nm de absorbancia.

Método de extracción	Concentración de ácidos nucleicos	Unidad de concentración	A260 nm	A280 nm	260/280 nm	260/230 nm
Sonicación	624,0	ng uL ⁻¹	12,481	5,879	2,12	2,59
Mortero	191,2	ng uL ⁻¹	3,824	1,841	2,08	4,51
Perlas de acero	188,5	ng uL ⁻¹	3,770	3,824	2,12	4,74
Mortero, vórtex con perlas de acero	241,5	ng uL ⁻¹	4,830	2,337	2,07	3,00
Agua	-2,2	ng uL ⁻¹	-2,2	0,043	7,75	0.07

Tabla 6. Concentración de ADN de los tres aislados fúngicos obtenido de la extracción de ADN con método estándar en ng uL⁻¹ a partir de la absorbancia.

Aislado fúngico	Método de extracción	Concentración de ácidos nucleicos	Unidad	A260 nm	A280 nm	260/280 nm	260/230 nm
1	Mortero, vórtex con perlas de acero	30,1	ng uL ⁻¹	0,602	0,304	1,98	3,19
2	Mortero, vórtex con perlas de acero	8,4	ng uL ⁻¹	0,169	0,104	1,61	3,01
3	Mortero, vórtex con perlas de acero	13,4	ng uL ⁻¹	0,268	0,155	1,73	2,49

5.2.3. Electroforesis en Gel de agarosa

El ADN extraído de los aislados (1, 2 y 3) con el protocolo estandarizado se amplificó para las tres regiones. La región TEF1- α amplificada con los *primers* Ef1-983F - Ef1-2218R (Figura 4), obtuvo bandas de aproximadamente 1200 pb. La región LSU con los *primers* LROR - LR5 (Figura 5), se amplificó presentando bandas de aproximadamente 1000 pb para los aislados 1 y 2, mientras que para el aislado 3 las bandas fueron de una altura aproximada de 1200 pb. La región LSU con los *primers* LR3R - LR7 (Figura 6) se logró amplificar obteniendo bandas de tamaños similares para los tres aislados. La región ITS se amplificó con los *primers* ITS1 – ITS4 (Figura 6), obteniendo bandas de aproximadamente 700 pb para el aislado 1 y 2, mientras que para el aislado tres la región ITS no se realizó electroforesis en gel de agarosa y se envió directamente a secuenciar, donde se obtuvo una secuencia contaminada, impidiendo su uso en este análisis.

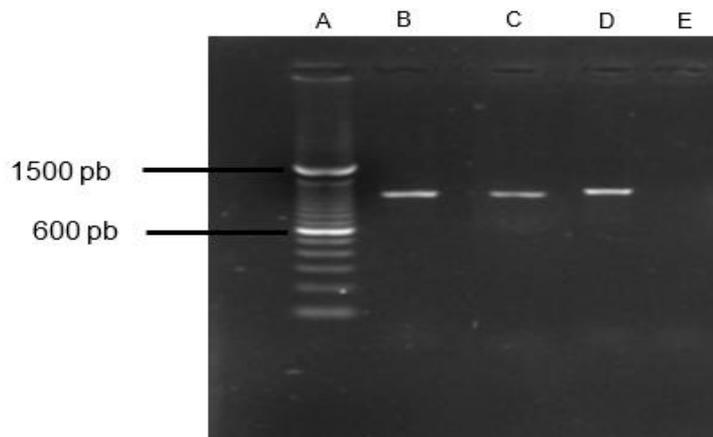


Figura 4. Amplificación de la región TEF1- α , para los 3 aislados, con los *primers* Ef1-983F - Ef1-2218R. Bandas con una altura aproximada de 1200 pb. **A)** Marcador de peso molecular (100 pb). **B)** Aislado 1. **C)** Aislado 2. **D)** Aislado 3. **E)** Control negativo.

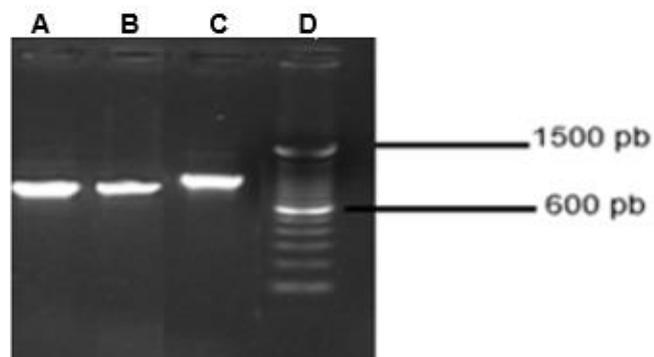


Figura 5. Amplificación de la región LSU, con los *primers* LR0R - LR5. Bandas de aproximadamente 1000-1200 pb. **A)** Aislado 1. **B)** Aislado 2. **C)** Aislado 3. **D)** Marcador de peso molecular (100 pb).

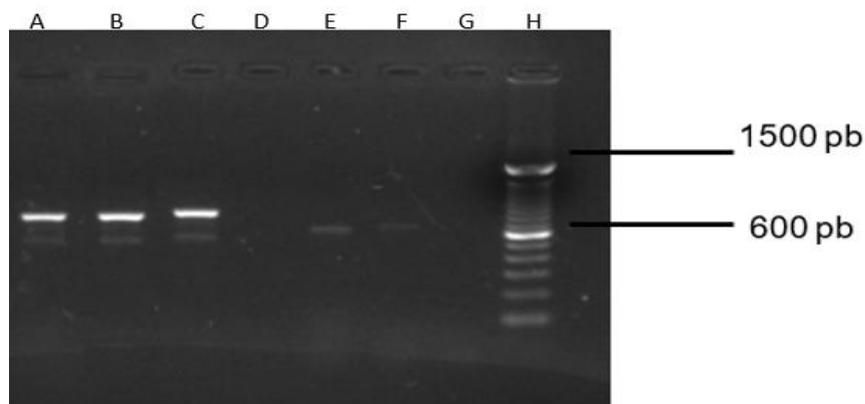


Figura 6. Amplicones generados con las regiones LSU con los *primers* LR3R - LR7. Bandas de 1000-1200 pb, y la región ITS con los *primers* ITS1 – ITS4. Bandas de 700 pb. **A)** Aislado 1 con los *primers* LR3R - LR7. **B)** Aislado 2 con los *primers* LR3R - LR7. **C)** Aislado 3 con los *primers* LR3R - LR7. **D)** Control negativo. **E)** Aislado 1 con los *primers* ITS1 – ITS4. **F)** Aislado 2 con los *primers* ITS1 – ITS4. **G)** Control negativo. **H)** Marcador de peso molecular (100 pb).

5.2.4. Análisis de las secuencias

Los resultados del proceso de identificación molecular evidenciaron que los dos aislados identificados morfológicamente (aislados 1 y 2, Tabla 7) coincidieron con su identificación molecular con las tres regiones utilizadas, y el aislado restante se pudo identificar molecularmente a nivel de género sólo con el análisis de la secuencia LSU (aislado 3, Tabla 7).

Para el aislado de *Verruculina enalia* se confirmó que sí correspondía a esa misma especie mostrando un porcentaje de similitud con TEF1- α , LSU (con las dos parejas de *primers*) e ITS de 99.78%, 99.88, 100% y 99.80%, respectivamente, con *Verruculina enalia*.

Aigialus parvus, coincidió con la especie identificada morfológicamente, presentando un porcentaje de similitud de identidad con TEF1- α con un valor de 99.88%, y con LSU (con dos parejas de *primers*) e ITS un valor de 100% para las dos regiones respectivamente, con *Aigialus parvus*, confirmando la descripción previamente establecida en base a sus caracteres morfológicos.

El aislado no identificado morfológicamente se pudo identificar con el marcador molecular LSU (dos parejas de *primers*) y TEF1- α , aunque este último con menor porcentaje. Su identificación correspondió a un ascomiceto facultativo del género *Cladophialophora* identificado como *Cladophialophora* sp., obteniendo con LSU porcentajes de similitud de 98.70% y 99.86%, siendo considerablemente el mejor resultado con la pareja de *primers* LR3R-LR7. Para la región TEF1- α se obtuvo un valor de 93.80% con una especie del género *Cladophialophora*, dato insuficiente para ofrecer una correcta identificación únicamente por homología con las secuencias existentes en la base de datos GenBank del NIH. La secuencia obtenida con ITS presentó contaminación por lo que no se utilizó en este análisis.

Los resultados obtenidos por homología de secuencias se respaldaron con el análisis filogenético de cada región utilizada para los tres organismos fúngicos identificados. Obteniendo para cada aislado, un árbol con la región TEF1- α , dos para la región LSU y uno con ITS a excepción del aislado 3 del cual no se pudo analizar filogenéticamente con la última región.

5.2.5. Análisis filogenético

Para el aislado 1, el análisis filogenético a partir de las secuencias consenso con las regiones TEF1- α , LSU e ITS presentaron resultados similares. Con TEF1- α agrupó las secuencias de *V. enalia* o sinónimos (*Didymosphaeria enalia*) en un mismo clado, (Anexo 5, círculos rojos, 99% bootstrap). Con la región LSU con los *primers* LR03-LR5, la secuencia consenso se agrupó con secuencias de *V. enalia* o sinónimos (*Didymosphaeria enalia*) dentro de un mismo clado (Anexo 6, círculos rojos, 100% bootstrap), y con los *primers* LR3R-LR7, se agrupó con una secuencia de la misma especie dentro de un único clado (Anexo 7, círculos rojos, 100% bootstrap). Con ITS está íntimamente relacionada con varias especies correspondientes a *V. enalia* (o sinónimos), representado en (Anexo 8, círculos rojos, 100% bootstrap).

Para el aislado 2, identificado morfológicamente como *Aigialus parvus* el conjunto de datos de las secuencias de los tres marcadores evaluados respaldó

la identificación morfológica, obteniendo con las tres regiones análisis filogenéticos similares.

El árbol filogenético partir de la secuencia consenso del TEF1- α agrupó la secuencia del aislado *A. parvus*, con secuencias correspondientes a *A. parvus* (Anexo 9, círculos rojos, 96% bootstrap). A partir de la secuencia consenso de la región LSU con la pareja de *primers* LR0R-LR5 se agrupó en un único clado con varias secuencias correspondientes a la especie *A. parvus* (Anexo 10, círculos rojos, 99% bootstrap), resultados similares con la segunda pareja de *primers* LR3R-LR7, donde la secuencia consenso se agrupó con secuencias *A. parvus* (Anexo 11. círculos rojos, 100% bootstrap). Con el ITS el árbol filogenético obtenido agrupó estrechamente la secuencia consenso dentro de un único clado con secuencias pertenecientes a *A. parvus* (Anexo 12, círculos rojos, 100% bootstrap).

Aunque el aislado 3 no se logró identificar morfológicamente, el análisis filogenético con la secuencia consenso a partir de la región LSU con las dos parejas de *primers* produjo dos árboles filogenéticos muy similares, donde agruparon la secuencia dentro del género *Cladophialophora*, aunque se haya relacionado de manera más cercana con *C. mycetomatis*, las presentó como ramas separadas, permitiendo así únicamente alcanzar una identificación a nivel de género denominada en el presente estudio como *Cladophialophora* sp., (Anexo 14 y 15, círculos rojos, 96% y 91% bootstrap). Con la región TEF1- α se relacionó con el mismo género (Anexo 13, círculo rojo, 52% bootstrap), pero más cercana a *C. immunda*. A partir de la región ITS no se pudo realizar el análisis debido a que la secuencia obtenida presentó contaminación.

Tabla 7. Secuencias del ADNr (ITS, LSU) y del factor de elongación (TEF1- α) utilizadas en los análisis filogenéticos, porcentajes de similitud y los números de acceso de GenBank.

Identificación morfológica	Similitud molecular	TEF1- α (Ef1-983F-, Ef1-2218R)**		ADNr de LSU (LR0R-, LR5)**		ADNr de LSU (LR3R-, LR7)**		ITS (ITS1-, ITS4)**	
		% similitud	# accesoión	% similitud	# accesoión	% similitud	# accesoión	% similitud	# accesoión
<i>Verruculina enalia</i>	<i>Verruculina enalia</i>	99.78%	MK360092.1	99.88%	MK347988.1	100.00%	AY016363.1	99.80%	KX710217.1
<i>Aigialus parvus</i>	<i>Aigialus parvus</i>	99.88%	GU349064.1	100.00%	GU301795.1	100.00%	GU479779.1	100.00%	MK028712.1
No identificada	<i>Cladophialophora</i> sp.	93.80%	XM_016388514.1	98.70%	NG_058960.1	99.86%	NG_058960.1	***	***

***Primers* usados

***Secuencia contaminada

6. DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó con el objetivo de identificar molecularmente tres aislados fúngicos obtenidos de material lignocelulósico de plantas de mangle, como complemento de una identificación morfológica con el propósito de tener mayor conocimiento acerca de las posibles especies presentes en el ecosistema de manglar, además de establecer un protocolo de extracción de ADN simple y económico orientado a este tipo de microorganismos.

El ADN obtenido con el protocolo optimizado en este trabajo permitió la amplificación por PCR. Los tres protocolos restantes presentaron valores considerados no aceptables, probablemente debido a la presencia de contaminantes como proteínas o a un exceso de muestra utilizada, lo que a su vez genera una lisis celular incompleta, interfiriendo en los resultados (Tripathy, Maharana, & Ithape, 2017). Estos resultados indican que una buena extracción y pureza de ADN es el paso primordial para obtener secuencias mediante PCR de buena calidad que ofrezcan mejores resultados para la caracterización molecular ya que los posibles contaminantes presentes en el ADN aislado podrían inhibir la PCR e interferir en los resultados.

Además, se evaluó la eficiencia de tres marcadores moleculares como ITS, LSU y TEF1- α , para la identificación molecular y el análisis filogenético de los aislados fúngicos, utilizando cuatro parejas de *primers*, uno para cada región a excepción de los LSU que se utilizó dos pares de *primers* para determinar la especificidad de los mismos; para ITS (ITS 1-ITS4), para LSU (LR0R-LR5) y (LR3R-LR7), y para TEF1- α (Ef1-983F- Ef1-2218R).

Las tres regiones evaluadas permitieron identificar a los aislados fúngicos, los cuales correspondieron a la división Ascomycota, y dos al orden Pleosporales, resultados similares se observaron en el estudio realizado por Hamzah *et al.*, (2018), en el cual mediante análisis del ITS clasificaron el 96% de los aislados obtenidos dentro de la división Ascomycota y en el orden Pleosporales como uno de los ordenes predominantes, concluyendo que el phylum Ascomycota es el grupo predominante de hongos endofitos de manglar y que la region ITS es eficiente para la identificación taxonomica de hongos de manglar.

Resultados que a la vez que coinciden con los expuestos por Kumar *et al.*, (2019) donde identificaron una nueva especie de ascomiceto asociada a residuos lignocelulósicos de mangle mediante el análisis molecular de las regiones LSU, ITS y TEF1- α con los mismos *primers* empleados para esta investigación, excepto para ITS que utilizaron ITS5 & ITS4, obteniendo como resultado la identificación de una nueva especie de ascomiceto marino manglicola validada con las tres regiones y su identificación morfológica.

De los hongos identificados dos correspondieron a ascomicetos marinos manglicolas, como *V. enalia* y *A. parvus*, con las tres regiones, aunque LSU con las dos parejas de *primers* presentó mayor resolución, lo que coincide con la investigación de Jones *et al.*, (2009), donde caracterizaron una variedad de ascomicetos marinos a partir de la región LSU con los *primers* LR0R y LR7 reportando entre ellos las especies antes mencionadas. El aislado restante, correspondió al género *Cladophialophora*, que son hongos que pueden encontrarse en diversos sustratos y en asociación con plantas. Lo que coincide con la investigación realizada por Feng *et al.*, (2013), donde reportaron especies de *Cladophialophora* aisladas de material lignocelulósico de plantas presentes en hábitat de manglar.

Los análisis filogenéticos evidenciaron que el aislado 3 era diferente de las secuencias de otras especies de *Cladophialophora*. La región LSU lo agrupó dentro del género *Cladophialophora* cercano a *C. mycetomatis*, mientras que TEF1- α lo agrupó en el mismo género, pero no lo relacionó con este, debido a que su secuencia no se encuentra en la base de datos de hongos, lo que se verificó buscando directamente la secuencia con la región TEF1- α en la base de datos GenBank, donde se pudo evidenciar que no ha sido secuenciado dicha región para este microorganismo. Datos que coinciden con el trabajo realizado por Obase *et al.*, (2015) donde identificaron dos especies del género utilizando las regiones LSU e ITS, debido a la ausencia de secuencias existentes en bases de datos con la región TEF1- α para muchas especies de este grupo taxonómico.

Lo que a su vez concuerda con lo expuesto por Das, Lee, & Jung, (2019), donde identificaron una nueva especie de *Cladophialophora* en base a sus estructuras

morfológicas y con el uso de las regiones ITS con los *primers* ITS1-ITS4, y con la región LSU con la pareja de *primers* LROR/LR5, concluyendo que estas regiones presentan un gran poder de resolución para el género.

Sin embargo, para los dos aislados restantes TEF1- α permitió la identificación a nivel taxonómico de especie, obteniendo porcentajes de identidad de 99.78% para *V. enalia* y 99.88% para *A. parvus*, siendo porcentajes elevados y relativamente similares a pesar de pertenecer a géneros diferentes. Lo que coincide con (Suetrong, Schoch, Spatafora, & Sakayaroj, 2009), donde realizaron un estudio de hongos marinos a partir del análisis filogenético utilizando las regiones LSU con (LR0R-LR7) y TEF1- α con (Ef1-983F-Ef1-2218R), reportando en su mayoría ascomicetos.

Los resultados obtenidos con los tres marcadores moleculares y sus respectivas parejas de *primers* ofrecieron una resolución suficiente para la identificación y análisis filogenético de ascomicetos a nivel de género y especie para los dos aislados identificados morfológicamente, y a nivel de género para el tercer aislado. Además, demuestran que las regiones TEF1- α , LSU e ITS son marcadores eficientes para la identificación molecular de Ascomicetos, aunque LSU e ITS presentan considerablemente un mejor poder de resolución, el marcador TEF1- α podría ser más evaluado para este grupo de hongos, especialmente por la baja cantidad de secuencias para ciertos grupos fúngicos.

Para Ecuador los dos primeros aislados identificados molecularmente coinciden con los datos reportados previamente por Kohlmeyer & Volkmann K, (1987), que reportaron *V. enalia* y; Álvarez *et al.*, (2019), donde reportaron varias especies de ascomicetos incluyendo *V. enalia* y una especie del género *Aigialus*, aunque únicamente identificadas a nivel morfológico. Sin embargo, el tercer aislado identificado como *Cladophialophora* sp., se puede considerar como el primer reporte de este género en el ecosistema de manglar del país.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados indican que el sistema de identificación tradicional mediante estructuras morfológicas sigue siendo una parte esencial para la identificación taxonómica de hongos marinos, especialmente a niveles de género, sin embargo, a niveles inferiores como especie se debería complementar empleando métodos moleculares que confirmen la identidad morfológica.
- Se concluyó que el método de extracción de ADN tradicional SDS por lisis celular mecánica aplicado para ascomicetos marinos es un procedimiento simple y eficiente para el aislamiento de ADN genómico de calidad adecuada para la amplificación y secuenciación.
- Las tres regiones utilizadas ITS, LSU y TEF1- α se pudieron amplificar con la PCR y secuenciar posteriormente, a pesar de no haberse utilizado *primers* específicos para los organismos estudiados.
- Los resultados obtenidos demuestran que es recomendable el uso de varios genes para obtener una identificación taxonómica y filogenética más confiable y exacta de hongos, en lugar de trabajar con una única región porque es probable que un gen tenga menor poder de resolución molecular a niveles taxonómicos inferiores, aunque sean buenos marcadores a niveles superiores a familia, datos que se podrían complementar con el análisis y comparación de las secuencias con las de los genes adicionales, debido a que los datos obtenidos a partir de la secuenciación de una única región deben analizarse rigurosamente para no generar resultados erróneos.
- A partir de los resultados obtenidos se concluye que las regiones de ADNr como ITS, LSU y TEF1- α son buenos marcadores moleculares para determinar la taxonomía y relaciones filogenéticas de ascomicetos provenientes de material lignocelulósico de manglar.
- Los ecosistemas de manglar son el hábitat idóneo para una gran diversidad de especies de hongos marinos, especialmente de ascomicetos marinos manglicolas que son un grupo extenso de microorganismos fúngicos. En este estudio se logró identificar molecularmente tres especies de ascomicetos obtenidos de material lignocelulósico de mangle y en base a los resultados

obtenidos se estima que mediante el empleo de técnicas moleculares y la evaluación de varios marcadores moleculares fúngicos se podría llegar a aislar e identificar especies reportadas previamente para este tipo de ecosistema en otras regiones del mundo o encontrar nuevas especies, principalmente porque a pesar de ser una zona muy extensa este tipo de ecosistema es un hábitat que sigue siendo poco explorado en el estudio de hongos marinos y se considera que aún falta mucho por estudiar.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar el análisis filogenético de diversos marcadores moleculares complementados que permitan confirmar la identificación taxonómica de aislados fúngicos a niveles taxonómicos inferiores como género y especie.
- Evaluar otras parejas de *primers* para la amplificación del marcador TEF1- α para determinar si la región no presenta una resolución muy elevada de identificación, para este grupo de organismos fúngicos o si los *primers* no presentaban una elevada especificidad.
- Diseñar *primers* específicos para la amplificación de ADN genómico de aislados fúngicos marinos manglicolas.
- Realizar un análisis filogenético combinado de varias secuencias para obtener resultados más confiables en el proceso de identificación taxonómica molecular.
- Complementar en mayor medida el análisis morfológico de hongos con análisis moleculares, para conocer con exactitud la identidad de estos organismos y evitar errores de identificación para poder realizar futuros estudios o la búsqueda de compuestos bioactivos con capacidad biotecnológica.
- Evaluar otras regiones, como los marcadores genéricos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en hongos para corroborar la información obtenida con las regiones del ADNr, ya que son buenos indicadores de diversidad genética y evolución filogenética en hongos.
- Investigar la diversidad hongos marinos en la Reserva Ecológica Manglares Churute y la variedad de ecosistemas de manglar presentes en Ecuador.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, X. (2011). *Aislamiento e identificación de hongos marinos del manglar de Palmar-Provincia de Santa Elena, y establecimiento del banco de cepas fúngicas.*
- Álvarez, X., Tamayo, R., Moscoso, A., Robles, S., & Almeida, D. (2019). Nuevos registros de ascomicetos marinos manglicolas para el Ecuador. *Manglares de América*, 62–71.
- Azevedo, J. de, & Quecine, M. (2017). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. In J. L. de Azevedo & M. C. Quecine (Eds.), *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (5–6). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2>
- Badali, H., Carvalho, V. O., Vicente, V., Attili-Angelis, D., Kwiatkowski, I. B., Van Den Ende, A. H. G., & de Hoog, G. S. (2009). *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. *Medical Mycology*, 47(1), 51–62. <https://doi.org/10.1080/13693780802291452>
- Bridge, P. D., Spooner, B. M., & Roberts, P. J. (2005). The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. *Advances in Botanical Research*, 42(04), 33–67. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)42002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)42002-9)
- Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22(1), 525–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.002521>
- Das, K., Lee, S. Y., & Jung, H. Y. (2019). *Cladophialophora lanosa* sp. nov., a New Species Isolated from Soil. *Mycobiology*, 47(2), 173–179. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1611242>
- De Bertoldi, M., Lepidi, A. A., & Nuti, M. P. (1973). Significance of DNA base composition in classification of *Humicola* and related genera. *Transactions of the British Mycological Society*, 60(1), 77–85. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(73\)80062-2](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(73)80062-2)
- Debbab, A., Aly, A. H., & Proksch, P. (2013). Mangrove derived fungal

- endophytes - A chemical and biological perception. *Fungal Diversity*, 61(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0243-8>
- Deshmukh, S. K., Gupta, M. K., Prakash, V., & Sudhakara Reddy, M. (2018). Mangrove-associated fungi: A novel source of potential anticancer compounds. *Journal of Fungi*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/jof4030101>
- Dizkirci, A., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, (3), 463–474. <https://doi.org/10.1127/nova>
- Fathurohman, M., Pratita, A., Khusnul, Yuliana, A., & Suhartati, R. (2019). The Molecular Identification of Sea Fungus Isolates from Mangrove Litter as Antimicrobials Potential. *Journal of Physics: Conference Series*, 1179, 012171. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1179/1/012171>
- Feng, P. Y., de Hoog, G. S., Najafzadeh, M. J., Gerrits van den Ende, A. H. G., Stielow, J. B., Badali, H., ... Vicente, V. A. (2013). Cladophialophora abundans, a novel species of Chaetothyriales isolated from the natural environment. *Mycological Progress*, 13(2), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0924-4>
- Goh, T.K., & Hanlin, R. T. (1997). Nuclear divisions in the ascus and ascospores of *Melanospora zamiae*, 101, 1511-1512.
- Gherbawy, Y., & Voigt, K. (2010). Molecular Identification of Fungi. In *Molecular Identification of Fungi* (Springer). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8>
- Hamzah, T. N. T., Lee, S. Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I., & Mohamed, R. (2018). Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01707>
- Hasegawa, E., Ota, Y., Hattori, T., & Kikuchi, T. (2010). Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. *Mycologia*, 102(4), 898–910. <https://doi.org/10.3852/09-238>

- Hyde, K., Udayanga, D., Manamgoda, D., Tedersoo, L., Larsson, E., Abarenkov, K., ... Nilsson, R. (2013). Incorporating molecular data in fungal systematics: a guide for aspiring researchers. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 3(1), 1–32. <https://doi.org/10.5943/cream/3/1/1>
- Jones, E. B. J., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Somrithipol, S., & Pang, L. K. (2009). Classification of marine ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 35, 1–187.
- Kohlmeyer, J., & E., Kohlmeyer. (1979). Key to the Filamentous Higher Marine Fungi. *Marine Mycology. The Higher Fungi.*(pp 198-199)
- Kohlmeyer, J. (1968). Marine Fungi from the Tropics. *Mycologia*. 60 (2), (pp 252-270).
- Kohlmeyer, J., & Volkmann-Kohlmeyer, B. (1987). Marine fungi from Aldabra, the Galapagos, and other tropical islands. *Canadian Journal of Botany*, 65(3), (pp 571–582). <https://doi.org/10.1139/b87-07>
- Kumar, V., Cheewangkoon, R., Thambugala, K. M., Jones, G. E. B., Brahmanage, R. S., Doilom, M., ... Hyde, K. D. (2019). *Rhytidhysterium mangrovei* (Hysteriaceae), a new species from mangroves in Phetchaburi Province, Thailand. *Phytotaxa*, 401(3), 166–178. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.401.3.2>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuninaga, S., & Yokosawa, R. (1985). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuehn. VII. Genetic relatedness between AG-BI and other anastomosis groups. *Japanese Journal of Phytopathology*, 51(2), 133–138. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.51.133>
- Liew, E. C. Y., Guo, L. D., Ranghoo, V. M., Goh, T. K., & Hyde, K. D. (1998). Molecular approaches to assessing fungal diversity in the natural environment. *Fungal Diversity*, 1, 1–17.

- Loganathachetti, D., Poosakkannu, A., & Muthuraman, S. (2017). Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09281-3>
- Mirhendi, H., Makimura, K., De Hoog, G. S., Rezaei-Matehkolaei, A., Najafzadeh, M. J., Umeda, Y., & Ahmadi, B. (2015). Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Medical Mycology*, 53(3), 215–224. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu088>
- Morin, N., Vallaey, T., Hendrickx, L., Natalie, L., & Wilmotte, A. (2010). An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. 80, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.012>
- Nambiar, G. R., & Raveendran, K. (2009). Manglicolous Marine Fungi on *Avicennia* and *Rhizophora* along Kerala Coast (India). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 4(1), 48–51.
- Nilsson, R. H. (2011). Molecular Identification of Fungi: Rationale, Philosophical Concerns, and the UNITE Database. *The Open Applied Informatics Journal*, 5(1), 81–86. <https://doi.org/10.2174/1874136301105010081>
- Obase, K., Douhan, G. W., Matsuda, Y., & Smith, M. E. (2015). *Cladophialophora floridana* and *Cladophialophora tortuosa*, new species isolated from sclerotia of *Cenococcum geophilum* in forest soils of Florida, USA. *Mycoscience*, 57(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.07.005>
- Odum, W. E., & Heald, E. J. (1975). *Mangrove Forests and Aquatic Productivity*. (3), 129–136. https://doi.org/10.1007/978-3-642-86011-9_5
- 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*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84–98.

<https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>

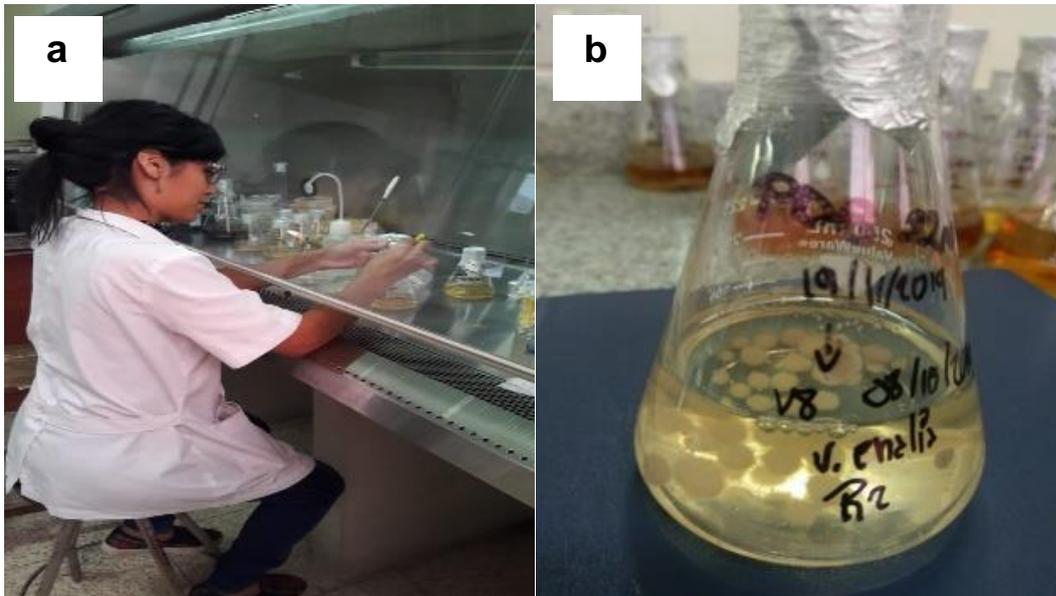
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwarthia grandispora*.
- Schmit J.P, Shearer C.A. (2003) A checklist of mangrove associated fungi, their geographical distribution and known host plants. *Mycotaxon* (85), 423–4771.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Seifert, K. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (1995). A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 760–767. <https://doi.org/10.1139/b95-320>
- Singh, B. P., & Gupta, V. K. (2017). Molecular Markers for the Identification and Diversity Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). *Molecular Markers in Mycology*. In *Fungal Biology*, (pp. 193-194) <https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4>
- Suetrong, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., & Sakayaroj, J. (2009). Molecular systematics of the marine Dothideomycetes Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Studia in Mycology*, 64, 155–173. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.09>
- Tripathy, S. K., Maharana, M., & Ithape, D. M. (2017). Exploring Rapid and Efficient Protocol for Isolation of Fungal DNA Exploring Rapid and Efficient Protocol for Isolation of Fungal DNA, 6(3), 951–960. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.113>
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid Genetic Identification and Mapping of

Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4246.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. 315–322.

Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Marine Drugs*, 13(6), 3479–3513. <https://doi.org/10.3390/md13063479>

10. ANEXOS



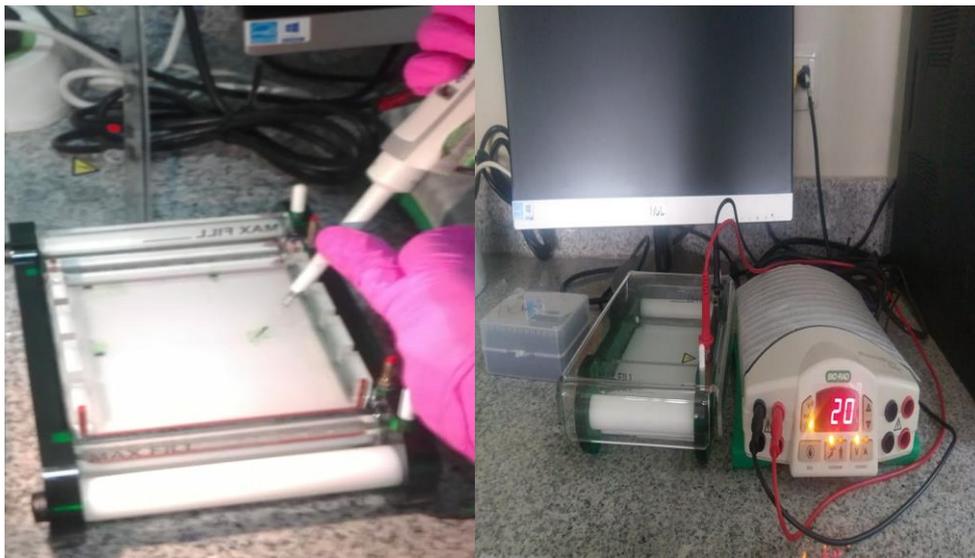
Anexo 1. a) Inoculación de micelio del cultivo monospórico en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). **b)** Crecimiento fúngico en Medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa.



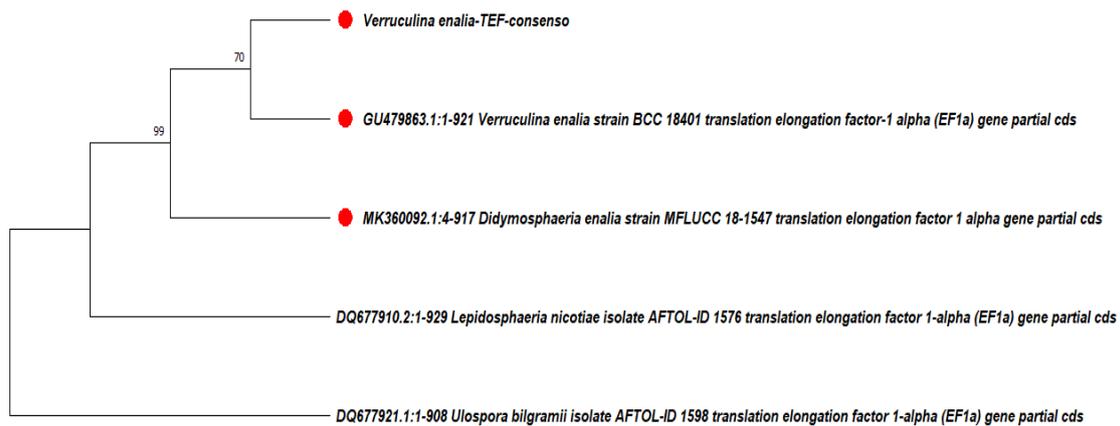
Anexo 2. Centrifugación del sobrenadante con acetato de amonio 5M en el proceso de extracción de ADN.



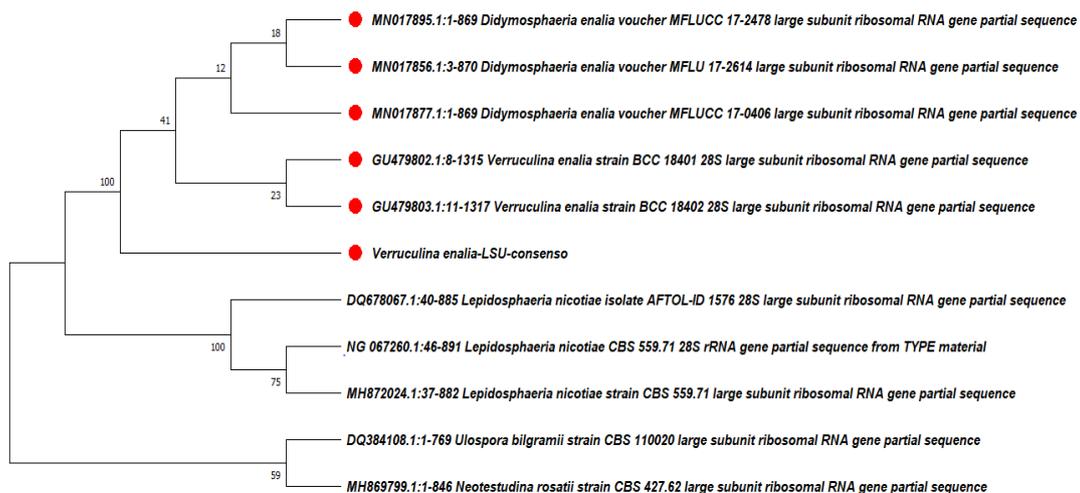
Anexo 3. Muestras de ADN listas para la amplificación en el equipo termociclador.



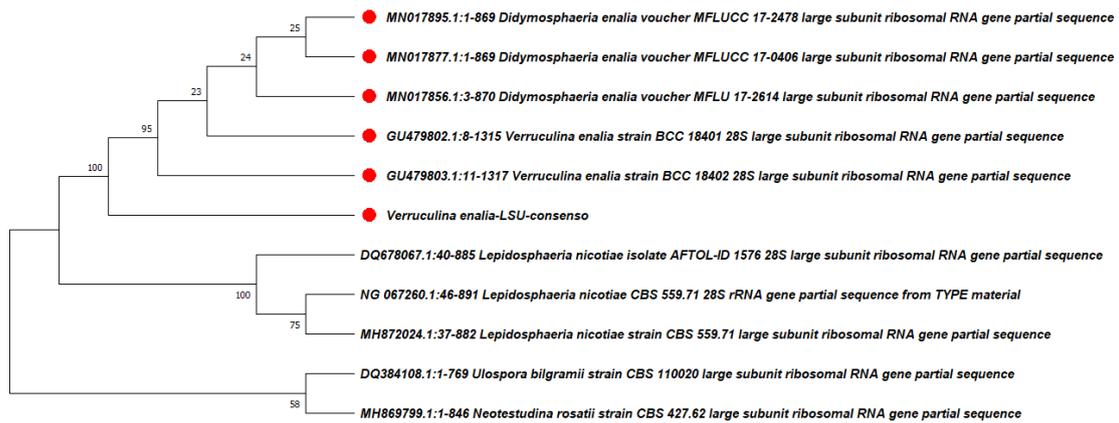
Anexo 4. a) Deposito de las muestras en el gel de Agarosa. **b)** Programa de electroforesis en gel de Agarosa.



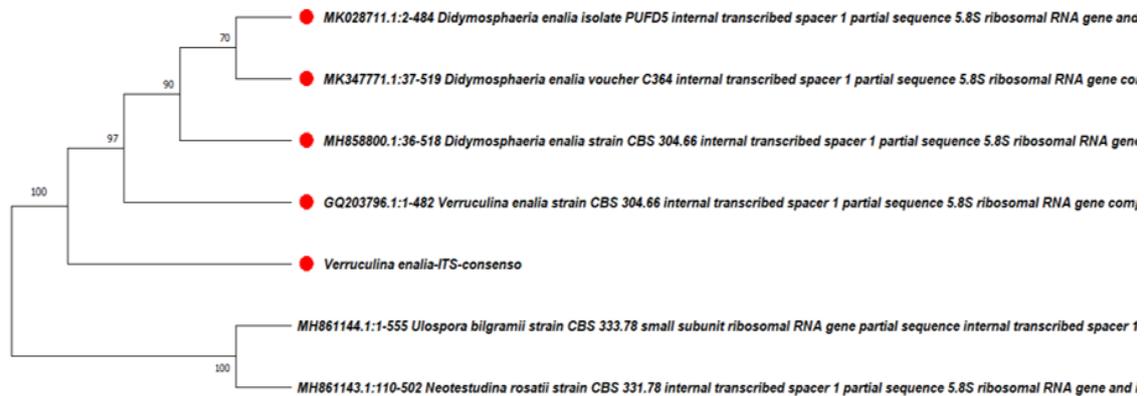
Anexo 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1- α). *Ulospora bilgramii* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-TEF-consenso.



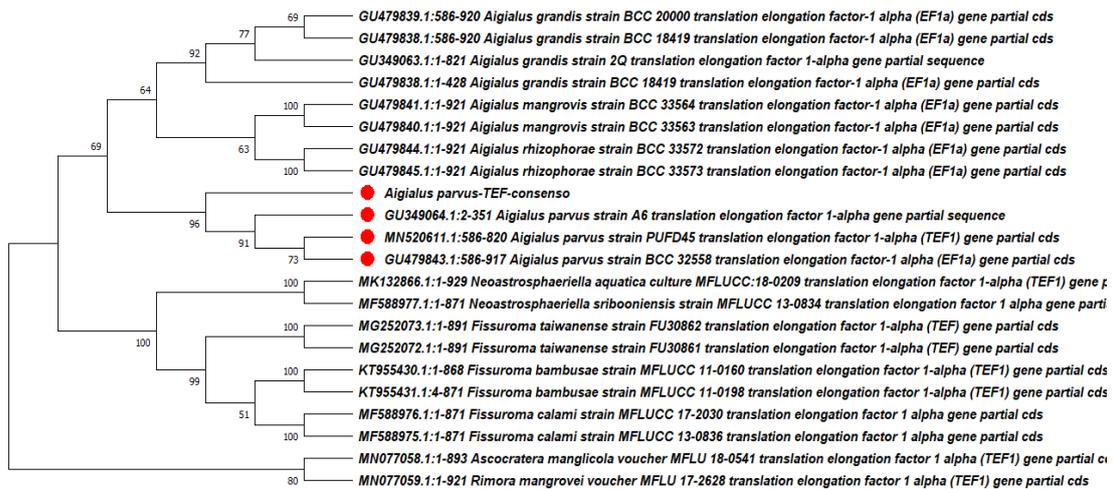
Anexo 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-LSU-consenso



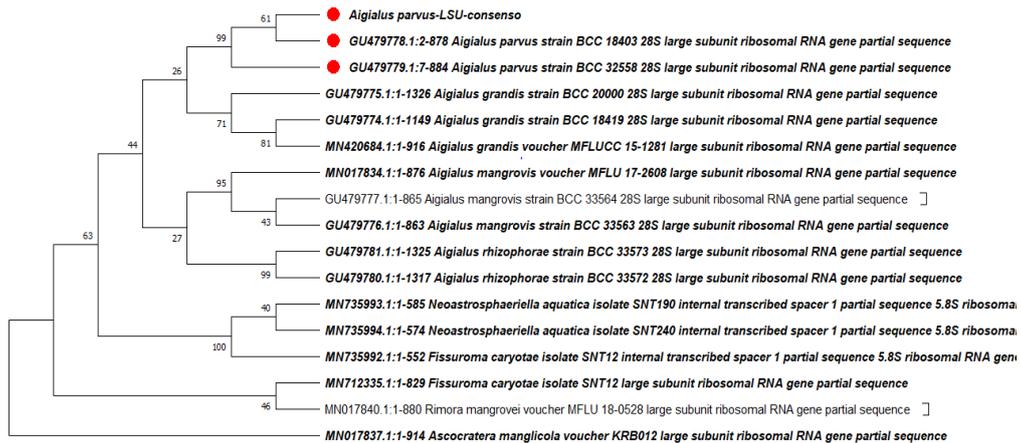
Anexo 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-LSU-consenso.



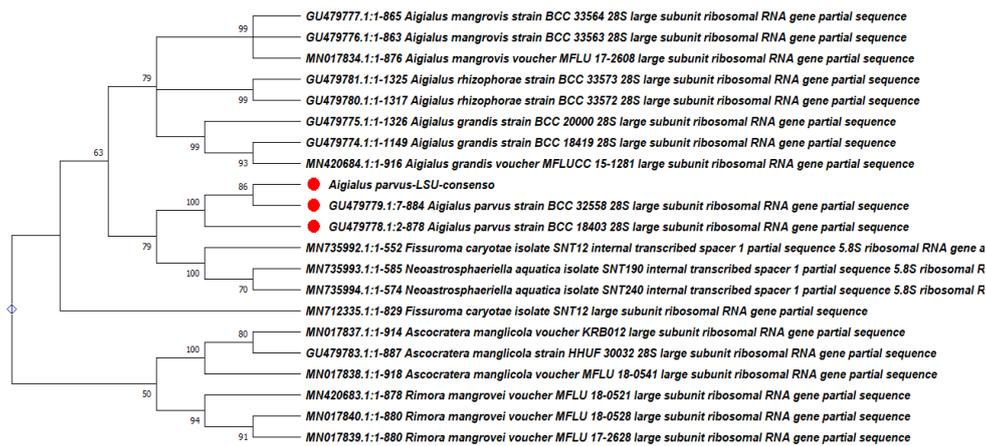
Anexo 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS). *Ulospora bilgramii* y *Neotestudina rosatii* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Verruculina enalia*-ITS-consenso.



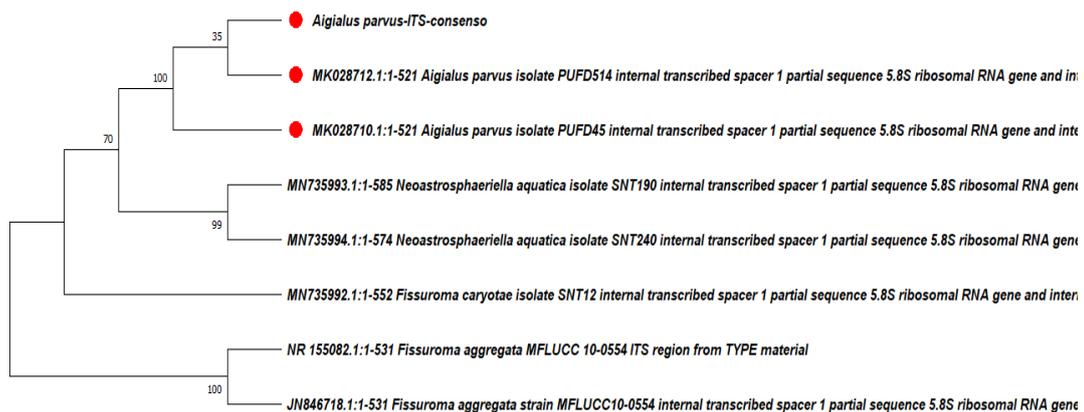
Anexo 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1-α). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus*-TEF-consenso.



Anexo 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus*-LSU-consenso.



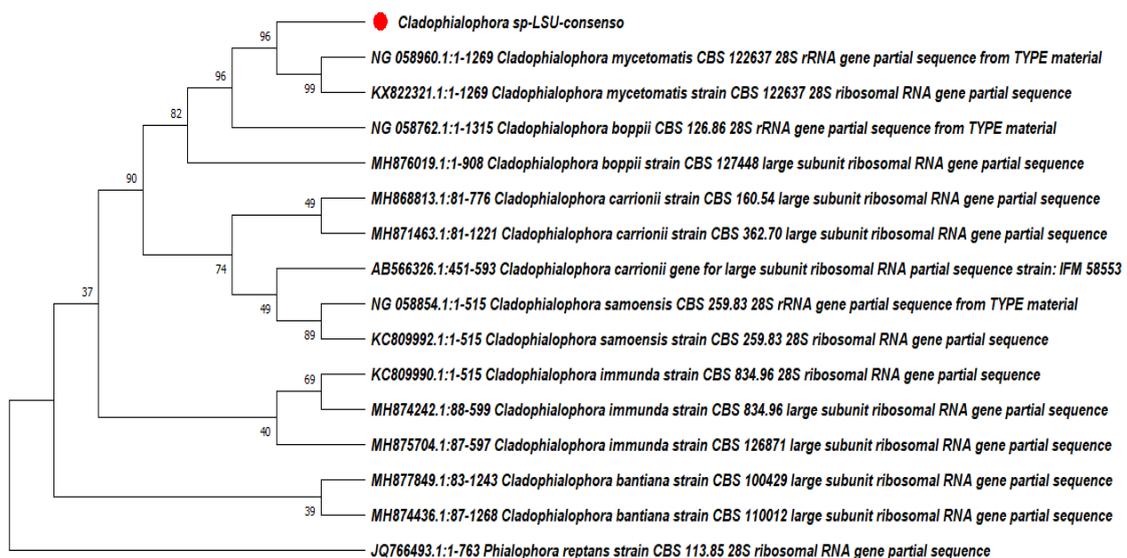
Anexo 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Rimora mangrovei* y *Ascocratera manglicola* se utilizaron como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus*-LSU-consenso.



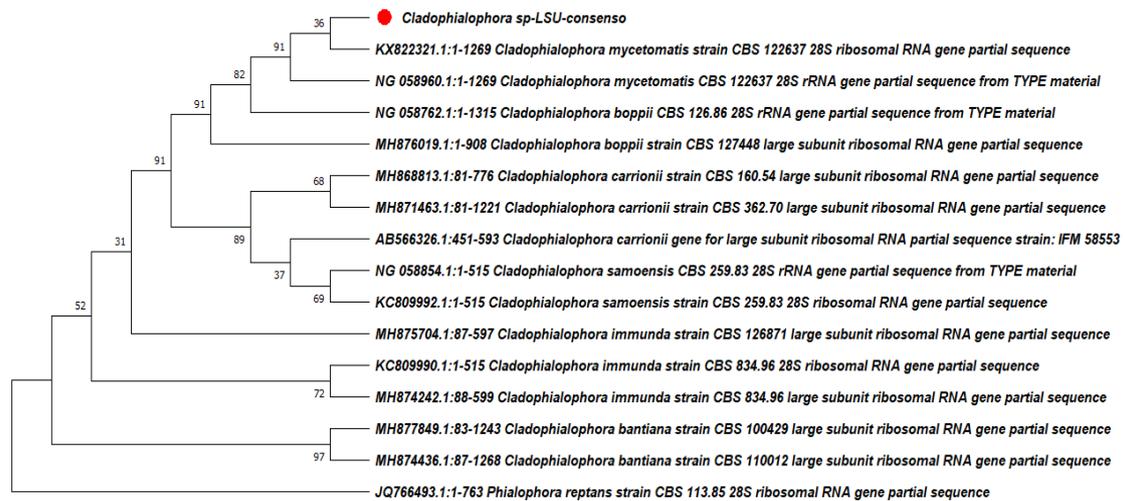
Anexo 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS). *Fissuroma aggregata* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Aigialus parvus*-ITS-consenso.



Anexo 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del factor de elongación (TEF1- α). *Fonsecaea pedrosoi* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Cladophialophora* sp-TEF-consenso.



Anexo 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Phialophora reptans* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidas para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Cladophialophora* sp-LSU-consenso.



Anexo 15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia de la subunidad grande del ribosoma (LSU). *Phialophora reptans* se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap obtenidos para 1000 réplicas. La cepa aislada en esta investigación se representa como *Cladophialophora sp.-LSU-consenso*.