



**UNIVERSIDAD DE ESPECIALIDADES ESPÍRITU SANTO**

**FACULTAD DE ARTES LIBERALES ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES**

Identificación morfológica y molecular de hongos aislados de lesiones, en manglares del género *Rhizophora*, del Parque Histórico Guayaquil.

**TRABAJO DE TITULACIÓN QUE SE PRESENTA COMO REQUISITO PREVIO  
A OPTAR EL GRADO DE INGENIERÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL**

**NOMBRE DEL ESTUDIANTE:** Katheryn Dayane Sacheri Viteri.

**NOMBRE DEL TUTOR:** Natalia Molina Moreira, Ph.D.

**CO – TUTOR:** Derly Andrade Molina, Ph. D.

**SAMBORONDÓN, JULIO DEL 2019**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

## **ACTA DE CALIFICACIÓN**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida para llegar a este momento, a mis padres por confiar siempre en mí, mis abuelitos por siempre ser mi modelo a seguir, a mi familia y amigos por apoyarme en todo.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar quiero agradecer de antemano a Dios por permitirme llegar a cumplir una meta más en mi vida y por haberme guiado en estudiar esta carrera la cual la llegué a amar desde el primer momento en que supe de ella, Ingeniería Ambiental.

A mis padres por siempre confiar en mí y darme ese ejemplo a seguir y nunca darme por vencida, a mi familia por permanecer junto a mí.

Agradezco a la Universidad de Especialidades Espíritu Santo por abrirme las puertas durante estos cinco años de estudio, por prestarme sus instalaciones de los laboratorios de medicina y ambiental para poder llevar a cabo mi tesis y por haberme permitido conocer personas sensacionales.

Quiero agradecer a la Dra. Andrade por tenerme mucha paciencia, saber entenderme, por confiar en mí, mis capacidades y regalarme de su tiempo para saber guiarme durante esta dura etapa. También quiero agradecer a la Dra. Molina quien supo confiar en mis habilidades y a la Dra. Diez por habernos guiado a mí y a mis compañeros durante esta etapa.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos por siempre apoyarme y motivarme a lo largo de la carrera a Mishelle por siempre estar presente a lo largo de la carrera y tenerme paciencia, finalmente quiero agradecer especialmente a Brunny por ser una amiga incondicional ya que después de todo este tiempo de la carrera, siempre estuvimos juntas en esto. De ante mano gracias a todos los que supieron confiar en mí para lograr este objetivo.

## ÍNDICE

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	<b>2</b>
<b>ACTA DE CALIFICACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>6</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>15</b>
<i>Área de estudio</i> .....	<i>15</i>
<i>Colecta de muestras con lesiones de hongos</i> .....	<i>15</i>
<i>Aislamiento y purificación de hongos</i> .....	<i>16</i>
<i>Inoculación de hongos en medio líquido</i> .....	<i>16</i>
<i>Extracción de ADN</i> .....	<i>16</i>
<i>Amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	<i>18</i>
<i>Análisis de secuencias</i> .....	<i>19</i>
<i>Caracterización morfológica de hongos filamentosos</i> .....	<i>19</i>
<b>Resultados</b> .....	<b>20</b>
<i>Hongos cultivados y purificados de las lesiones en las especies de manglares del género Rhizophora del Parque Histórico Guayaquil</i> .....	<i>20</i>
<i>Caracterización morfológica de hongos cultivados asociados al manglar del género Rhizophora</i> .....	<i>21</i>
<i>Identificación a nivel molecular especie/género de los hongos cultivables asociados al manglar del género Rhizophora</i> .....	<i>34</i>
<b>Discusión</b> .....	<b>40</b>
<i>Aspergillus sp</i> .....	<i>40</i>
<i>Aspergillus niger</i> .....	<i>41</i>
<i>Aspergillus aculeatus</i> .....	<i>43</i>
<i>Absidia sp</i> .....	<i>43</i>
<i>Chrysonilia sp</i> .....	<i>44</i>
<i>Chrysosporium sp</i> .....	<i>44</i>
<i>Trichoderma sp</i> .....	<i>45</i>
<b>Conclusión</b> .....	<b>48</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>49</b>

## Resumen

Los manglares constituyen el segundo ecosistema marino más importante después de los arrecifes de coral. La distribución de las especies de plantas de manglar está fuertemente influenciada por la temperatura, la humedad y las corrientes a gran escala, por tanto son plantas que están expuestas a altas condiciones de estrés. El ecosistema de manglar es hábitat de gran diversidad de macroorganismos y microorganismos como los hongos. En la presente investigación se aislaron e identificaron hongos filamentosos aislados de ramas y propágulos de manglar pertenecientes del género *Rhizophora*, del Parque Histórico Guayaquil. Para el aislamiento se utilizó los medios de cultivos comerciales. Para la identificación morfológica se utilizó claves taxonómicas teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas, mientras que para la identificación molecular se utilizó la región ITS (Internal Transcribed Spacer). Como resultados, se identificaron las siguientes especies: *Aspergillus niger* y *Aspergillus aculeatus*, pertenecientes al género *Aspergillus*, también se identificaron hongos pertenecientes a los géneros: *Absidia*, *Chrysonilia*, *Chrysosporium* y *Trichoderma*. Algunos de estos géneros pueden ser usados en la biorremediación de metales pesados, fermentación de alimentos, mejoramiento de los mecanismos de resistencia al estrés abiótico, mejorar el crecimiento en las plantas y como productos fúngicos, mientras que otros pueden causar enfermedades e infecciones en los humanos y las plantas.

**Palabras claves:** Manglares, hongos filamentosos, identificación morfológica, identificación molecular, biorremediación, fermentación, enfermedades, infecciones.

## Abstract

Mangroves are the second most important marine ecosystem after coral reefs. The distribution of mangrove plants species is strongly influenced by temperature, humidity and large scale currents, because of that they are plants that are exposed to high stress conditions. The mangrove ecosystem is the habitat of a big diversity of microorganisms and microorganisms such as fungi. In the present investigation, filamentous fungi were isolated from branches and mangrove propagules belonging to the genus *Rhizophora*, from the Guayaquil Historical Park, they were isolated and identified. For the isolation was used the commercial culture media. For the morphological identification, were used taxonomic keys taking into account their macroscopic and microscopic characteristics, while for the molecular identification was use the ITS (Internal Transcribed Spacer ) region. As results, were identified: *Aspergillus niger* and *Aspegillus aculeatus*, belonging to the genus *Aspergillus*, were also identified fungi belonging to the genders: *Absidia*, *Chrysonilia*, *Chrysosporium* and *Trichoderma*. Some of this genders can be used in the bioremediation of heavy metals, fermentations of food, improvement of mechanisms of resistance to abiotic stress, improve growth in plants and as fungal products, while others can cause diseases and infections in humans and plants.

**Keyword:** Mangroves, filamentous fungi, morphological identification, molecular identification, bioremediation, fermentation, diseases, infections.

## Introducción

Los manglares son árboles o arbustos localizados en las zonas costeras de regiones tropicales y subtropicales, su distribución depende del intervalo de las mareas, el declive topográfico, la salinidad del agua y suelo (Díaz Gaxiola, 2011). Los manglares son considerados ecosistemas de alta importancia económica y ecológica a nivel mundial ya que cubren el 70% de las regiones costeras y comprenden individuos distribuidas en 8 familias, 12 géneros y 80 especies (Rodríguez, et al., 2013; Molina Moreira *et al.*, 2015).

Ecuador es un país megadiverso donde se han registrado 148,230.23 hectáreas de mangle distribuidas en las provincias de: Esmeraldas con 24,270 hectáreas donde crecen los manglares más altos del mundo (~50 m), Manabí 2,583 hectáreas, El Oro 16,158 hectáreas y Guayas 105, 219 hectáreas, Adicionalmente en las islas Galápagos se han reportado 1000 km<sup>2</sup> de mangles según cifras proporcionadas por el Parque Nacional Galápagos y Fundación Charles Darwin (2004). En la provincia del Guayas se encuentran ocho especies de manglar: *Rhizophora mangle*, *Rhizophora x harrisonii*, *Rhizophora racemosa*, *Conocarpus erectus*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, *Talipariti tilaceum* y *Annona glabra*. Cinco de estas especies están presentes en un bosque de manglar remanente dentro del Parque Histórico Guayaquil, cantón Samborondón (en adelante Parque Histórico). Las ciudades costeras se han desarrollado sobre ecosistema de manglares, quedando remanentes de estos bosques dentro de áreas urbanas, por lo que deberían ser protegidos ya que brindan servicios ambientales y paisaje, mejorando la calidad de vida (Molina Moreira et al, 2015., Cusme & Molina-Moreira, 2018).

El manglar tiene un gran valor económico, ecológico, ambiental, tradicional y social, son plantas con alta capacidad para fijar carbono, son zonas de amortiguamiento costeras, evitan inundaciones, funcionan como hábitats para especies migratorias y residentes de aves s terrestres y acuáticas, las dos terceras partes de peces de los mares usan el manglar como refugio. los manglares son cunarios para varias especies de

crustáceos, alevines, moluscos, y camarones, estos últimos son dependientes del manglar ya que en el estadio de post-larvas se refugian para crecer y desarrollarse durante varios meses hasta llegar a su fase juvenil y, posteriormente migrar al mar para así poder completar su ciclo de vida otorgándoles refugio y alimento. En el manglar se desarrollan actividades pesqueras artesanales que proporcionan alimento y un sustento económico de las poblaciones humanas que viven en la costa. Del manglar se obtienen recursos como leña y carbón para la construcción de viviendas y cercos o fabricación de herramientas para la pesca y actividades ecoturísticas (Idrovo Borja et al., 2013; Castillo, 2011).

Los manglares crecen en condiciones ambientales peculiares y estresantes tales como, alta concentración de humedad, variaciones de marea, ambiente violento y alto flujo de una gran variedad de microorganismos incluyendo hongos que colonizan diferentes estratos del árbol (Kathiresan et al., 2013). Estas condiciones han provocado que estas plantas desarrollen estrategias fisiológicas y asociaciones ecológicas para protegerse de factores destructivos (Bandaranayake, W.M, 2002., Lumbreras-Martínez et al., 2018). Últimamente ha resurgido el interés por el estudio de los hongos presentes en manglar, ya que debido a su gran capacidad metabólica presentan alto potencial biotecnológico.

Los hongos que habitan en los bosques de manglar son saprófitos, simbioses o parásitos ya sean filamentosos y levaduriformes (Jiménez, 2008).

Los hongos levaduriformes o levaduras son microorganismos unicelulares, no tiene formación de filamentos, sus células se multiplican por gemación dejando pequeños brotes para dar lugar a las células hijas (Kuhar *et al*, 2013). Los hongos filamentosos son microorganismos aerobios facultativos que se reproducen mediante esporas de manera natural, por vía sexual o asexual. Los hongos heterótrofos obtienen su energía a partir de degradación de materia orgánica. La estructura fúngica está compuesta por un talo o micelio el cual está constituido por filamentos o hifas (Cifuentes & Espinosa, 2008).

Se conocen más de 201 hongos filamentosos de 139 géneros en *Rhizophora*. Un tercio del total de los hongos marinos son registrados en *Rhizophora*, comprendiendo:

**Tabla 1.** División de hongos marinos registrados en *Rhizophora* spp

División	# de especies	# de géneros
<b>Ascomycetos</b>	126	85
<b>Basidiomicetos</b>	5	3
<b>Anamórficos</b>	70	51
<b>Celometes</b>	10	9
<b>Hifomicetos</b>	60	42

Las especies de hongos comúnmente aislados de manglar corresponden a la división Ascomycota o Basidiomycota (Photita, W *et al.*, 2001, Wanderley, C *et al.*, 2012).

En muchos casos los bosques de manglar forman monocultivos naturales de alta densidad donde los árboles están expuestos a patógenos; sin embargo, los registros fitopatógenos en ecosistemas de manglar son raros, por ejemplo: los hongos dominantes que colonizan el manglar son pertenecientes a *Ascomycota*, pero se sabe muy poco sobre los hongos patógenos de las especies de manglar, aunque se conoce que algunas especies parasitarias de manglar son causantes de su muerte (Fan *et al.*, 2015). Esto es relevante para conocer el panorama de las especies de hongos parásitos presentes en especies de mangle del género *Rhizophora*.

Los géneros más comunes de hongos que existen en *Rhizophora* spp. son: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrocephalum*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Phyllosticta*, *Trichoderma* y *Verticillium* (Sarma, 2012), sin embargo son pocos los estudios que muestren sus utilidades en el medio.

Los hongos parásitos son patógenos, son de gran relevancia ya que causan enfermedades que han ido creciendo internacionalmente, estos son los patógenos de las plantas más importantes ya que han causado gran pérdida de cultivos, en cuanto las bacterias y los virus son menos importantes como patógenos de plantas (Sadava & Purves,

2009). Los hongos patógenos se caracterizan por una notable flexibilidad genética, la cual facilita que su evolución y adaptación al huésped o al entorno sea rápida, por lo que ocasionando infecciones en las estructuras de su huésped (Perez-Nadales et al., 2014). Algunos efectos que causan los hongos fitopatógenos en las plantas de manglar son las deformaciones, la debilitación de tallos y raíces, retrasando el crecimiento de los árboles e incluso causándoles hasta la muerte (Universidad Nacional de Colombia et al., 2017).

No todos los hongos son patógenos, existen hongos endófitos que son aquellos que se encuentran en las plantas sin causarles síntomas aparentes de enfermedades, son considerados de gran importancia ya que el hongos es capaz de producir metabolitos bioactivos, para modificar los mecanismos de defensa de su hospede en este caso las plantas permitiendo que ambos puedan subsistir en el medio (Sánchez *et al.*, 2013).

Los hongos son capaces de acumular metales en sus compartimentos celulares por esta razón pueden ser usados en biorremediación de áreas contaminadas, las células en la biosorción de iones metálicos ofrecen una alternativa de bajo costo en comparación con los métodos de descontaminación tradicionales, se ha logrado identificar que existen hongos filamentosos del género *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor* y *Rhizopus*, estos tienen la capacidad de adsorción/absorción de iones de metales en forma libre o inmovilizarlos (Cardoso et al., 2010).

El género *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y su pequeño tamaño les permite permanecer en el ambiente durante un largo periodo de tiempo (Abarca, 2000), pueden habitar en diferentes tipos de ambientes como en diversos términos de sustrato para el estilo de vida fúngica, varía mucho la relación con la temperatura, las disponibilidad de agua y la dinámica de los sistemas biofísicos, crecen en plantas, las diversas especies de este género son capaces de ser utilizadas y adaptadas a una amplia gama de condiciones ambientales (Paulussen et al., 2016).

Las cepas pertenecientes a las especies *A.niger* y *A. oryzae* han sido utilizado por más de dos milenios en las fabricación y fermentación de alimentos, la producción de micotoxinas hace que sea patógeno para los humanos y animales, sin embargo durante la fabricación de alimentos la producción de micotoxinas no es un peligro para la salud por ejemplo la levadura para el pan puede ser considerado también un patógeno pero se la sigue utilizando (Frisvad et al., 2018).

*Aspergillus niger* produce compuestos de mucho interés para las industrias farmacéuticas y alimenticias, es el principal producto de ácido cítrico, puede estar asociado con una alta concentración de glucosa y oxígeno disuelto en el medio líquido, sin embargo no se han registrados factores ambientales y fisiológicos que producen esta acumulación (Ocampo et al., 2013). También es la especie responsable de la descomposición de cosecha de fruta fresca como las uvas, fresas, mangos, manzanas, peras, higos, mangos y melones (Pitt & Hocking, 2009).

Durante varios años se usaron métodos tradicionales basados en las características morfológicas y preferencias de hospedero para poder determinar las especies de hongos presentes en plantas. Sin embargo, esto ha cambiado durante la última década ya que los hongos presentan una inherente plasticidad fenotípica entre géneros y una alta inestabilidad de las características morfológicas. En la actualidad se utilizan técnicas moleculares para el estudio del genoma de un individuo o una población (Rodríguez,G, F, 2007., FAO, 2010), permitiendo discriminar con más claridad la identidad de los microorganismos. La aplicación de marcadores moleculares en la taxonomía de hongos permite aclarar las relaciones entre distintos taxones que se encuentran relacionados y que complementan los estudios morfológicos. En este sentido, los marcadores moleculares son usados para determinar la identidad de una población de patógenos o de saprófitos de un huésped en particular (Bailey & Jeger, 1992). Los ITS son uno de los fragmentos más utilizados en la actualidad para establecer relaciones filogenéticas entre eucariotas, debido a

que esta región muestra variación a nivel de especies, y su característica de multicopia, sitios altamente conservados que lo hace fácil de amplificar en todos los hongos. La actual y creciente disponibilidad de secuencias de ITS que pueden ser usadas para futuros estudios ha aumentado su valor y su uso (Bruns & Shefferson; 2004).

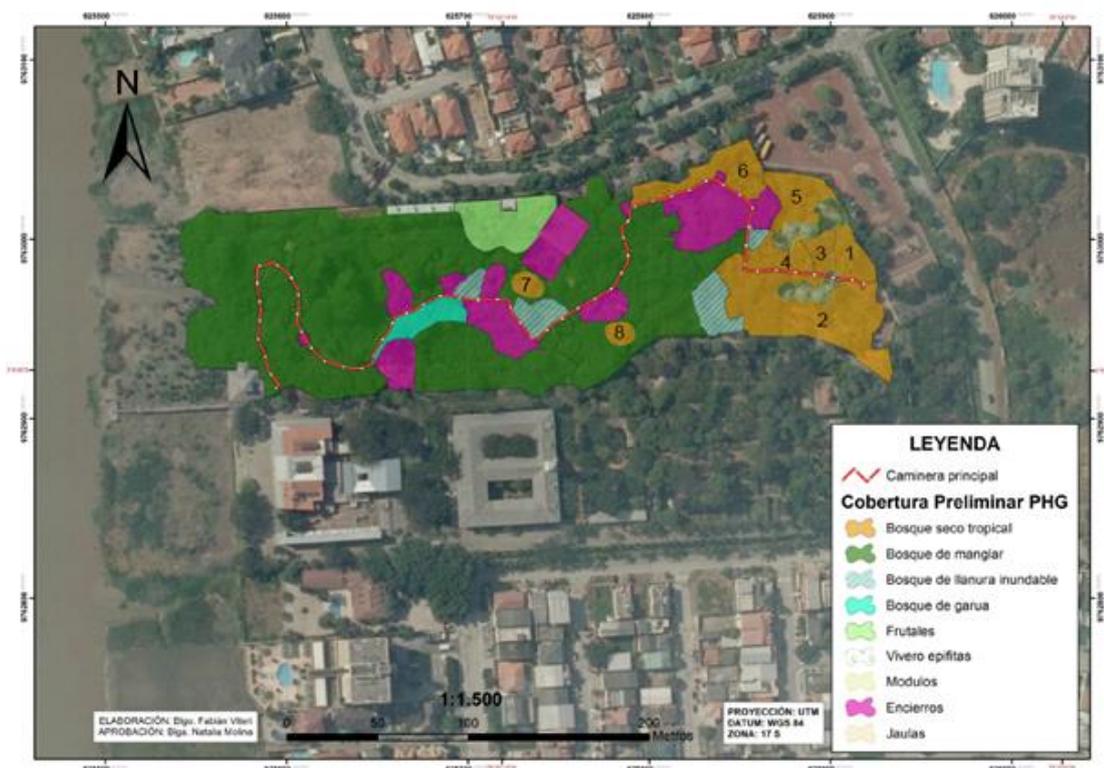
La caracterización molecular explora polimorfismos en determinadas secuencias de ADN para medir la variabilidad genética a nivel poblacional. El proceso consiste en la toma de muestra sobre el material biológico, extracción del ADN de las muestras, análisis de datos y mantenimiento de una base de datos de información genética molecular (FAO, 2010). La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es determinar el orden de nucleótidos y la orientación en una molécula de ADN, el desarrollo de esta técnica ha ido creciendo significando mucho para el campo de la investigación y los descubrimientos biológicos (Rojas, 2018). El método de secuenciación se basa en conocer el orden de los nucleótidos con la finalidad de diferenciar entre todas las moléculas de ADN que forman el material genético de los seres vivos (Márquez *et al.*, 2010).

Considerando la importancia de los hongos presentes en ecosistemas de manglar y la ausencia de estudios de hongos presentes de mangle en Ecuador, este trabajo propone identificar morfológica y molecularmente a hongos aislados de lesiones presentes en los manglares del género *Rhizophora* del Parque Histórico Guayaquil. Los resultados exploratorios de esta investigación, abrirán las puertas a más estudios acerca de los hongos que pueden ser usados en el medio ambiente como protectores para sus hospederos o saber si son hongos patógenos que causan la muerte en los manglares.

## Materiales y Métodos

### Área de estudio

Se realizará en el Parque Histórico Guayaquil



**Figura 1.** Mapa del Parque Histórico Guayaquil (Viteri & Molina-Moreira, 2017).

Los materiales y métodos descritos a continuación se realizaron en los laboratorios de medicina y ambiental de la Universidad de Especialidades Espíritu Santo.

### Colecta de muestras con lesiones de hongos

Las muestras de plantas con sintomatología asociada a la presencia de hongos (presencia de cuerpos fructíferos o lesiones en ramas y propágulos). Se colectaron en bolsas herméticas. Se trataron TANTAS lesiones en propágulos y Tantas lesiones en hojas, las cuales se procesaron en el laboratorio de la facultad de Ingeniería ambiental de la Universidad Espíritu Santo (Wier *et al.*, 2000).

### ***Aislamiento y purificación de hongos***

Las muestras se procesaron bajo condiciones de asepsia, realizando desinfección del material con 1% de hipoclorito de sodio y cortando un fragmento de la lesión con un bisturí estéril. Los segmentos del tejido se depositaron en medios de cultivos comerciales SB (Saboraud dextrose agar, OXOID) y BHIA (Brain heart infusion agar, CRITERION). La preparación de medios de cultivos se realizó de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante. El medio de cultivo se suplementó con 15ug/ml de cloranfenicol. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para favorecer el desarrollo de los hongos. Después de observar crecimiento de micelio se procedió a continuar con el proceso de purificación realizando repiques de las colonias fúngicas en crecimiento.

### ***Inoculación de hongos en medio líquido***

Una vez obtenidos los hongos puros, se los inocularon en 150 mL de medio de cultivo líquido PW (Peptona wáter, CRITERION) y NB (Nutrient Broth, CRITERION) suplementado con 15ng/ml de cloranfenicol. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 15 a 20 días, con el fin de incrementar la cantidad de micelio para ser filtrado y realizar la extracción de ADN. El micelio se filtró utilizando papel filtro estéril y unidades de filtración para eliminar el exceso de medio de cultivo líquido. El material fúngico se secó a 42°C durante 2 días y posteriormente se almacenó a -80°C para su posterior uso.

### ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN es el paso principal para la gran mayoría de análisis genéticos, ya que con una cantidad específica de ADN, es posible amplificar genes específicos in vitro a través de la reacción en cadena de la polimerasa (Gonzalez, 2003).

Inicialmente, el material fúngico se mezcla con lisozima (10ug/ml) r con vortex durante 1 minuto, para favorecer que ayuda en la lisis celular. La mezcla se colocó en un

bloque térmico durante toda la noche. Este proceso se repitió por 2 días hasta que la muestra fue digerida en su totalidad.

La extracción de ADN se llevó a cabo usando el Kit de extracción PowerSoil® SoilDNAisolation kits (Qiagen, Carlsbad, USA) con algunas modificaciones: los hongos previamente secados y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  se transfirieron a los tubos “Powerbead tubes”, este material se mezcla por vortex durante 3 min. Posteriormente se Agregaron 60 uL de buffer C1.y se realizó un vortex vigoroso por 3 min. se Adiciona 20 uL de proteinasa K y se mezcló con vortex vigoroso por 1 min con cinco repeticiones . La mezcla se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. se rescató el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf y se agregó 250 uL de buffer C2, luego se realizó un vortex por 5 seg y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Se realizó centrifugación a temperatura ambiente a 8,000 rpm por 1 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, subsecuentemente se agregaron 200 uL de solución C3, se realizó un vortex por 1 min y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Se realizó la centrifugación a 8,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 1 mL de la solución C4, esta mezcla se pasó a las columnas y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Finalizada la transferencia de toda la mezcla en las columnas, se agregaron 500 uL de solución C5.y se centrifugó a 8,000 rmp por 1 min. Finalmente, se agregaron 100 uL de agua ultra pura en el centro de la columna para eluir el material genético, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. El ADN se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA) 1X suplementado con SyBR green nucleic (Invitrogen) comparando la banda de intensidad y peso molecular de ADN con un marcador de 100 pares de bases (TrackiIt de invitrogen). Las condiciones de la electroforesis se realizaron: a 100 volt, 35 miliamperios.

### Amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en realizar varias copias de fragmentos de ADN utilizando la polimerasa donde se lleva a cabo tres pasos: desnaturalización, anillamiento y extensión (Saltos, 2012).

Posterior a la extracción de ADN, los hongos se identificaron a nivel de género y/o especie a partir de la amplificación de las regiones intergénicas del ADNr usando los cebadores universales ITS1 (Internal transcribed spacers I) y el cebador ITS4 (Internal transcribed spacers 4) a (Tabla 2) descrita por (White et al, 1990). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final 30  $\mu$ l siguiendo la mezcla descrita en la Tabla 3. El programa de amplificación comenzó con desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 50 seg, 50°C por 50 seg, extensión de 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.

**Tabla 2.** Cebadores para la extracción de ADN y su temperatura de reacción.

<b>Primer para la amplificación del ADN ribosomal</b>		
<b>Nuclear, ITS</b>		
ADNr	Secuencia de cebador <sup>a</sup>	Tm (°C) <sup>c</sup>
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	65
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Ci ([inicial])</b>	<b>Cf ([final])</b>	<b>Vrx (Vol por reacción)</b>
<b>Agua</b>	-	-	19 $\mu$ L
<b>Buffer PCR</b>	10X	1X	3 $\mu$ L

<b>dNTP's</b>	2.5mM	0.25mM	3 uL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50mM	2.5mM	1.5 uL
<b>Primer</b>	100uM	2uM	0.6 uL
<b>TaqPol</b>	5U	1/25 U	0.3 uL
<b>ADN</b>	100ng	15ng	2 uL

### ***Análisis de secuencias***

Los amplicones purificados se enviaron a secuenciar en la compañía Macrogen (Corea del Sur) en la dirección 5'-3' y 3'-5'. Las secuencias que se generaron fueron editadas en el software Geneious para obtener la secuencia consenso, para verificar la calidad de la secuencia, la validez de las secuencias y la identidad se confirmó mediante el algoritmos de alineación Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En lo que se refiere al análisis filogenético se procedió a realizar el alineamiento múltiple con el algoritmo Clustal W se realizó mediante el software Geneious Prime (<https://www.geneious.com>). El soporte de los dendrogramas se realizó mediante el software MEGA 7, el soporte de la topología se realizó con bootstrap de 5000 iteraciones y eliminando los espacios (gaps) (Felsenstein, 1985).

### **Caracterización morfológica de hongos filamentosos**

la caracterización morfológica se realizó en cultivos de hongos con evidente generación de sistemas reproductivos o cepas con más de 20 días de tiempo de cultivo. con un fragmento de una cinta se toca el micelio y se deposita en una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos, posteriormente se sella con un cubreobjetos. la visualización se realizó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E100 y cámara integrada digital. Para la descripción de estructuras se utilizó la base de datos de Mycobank (<http://mycobank.org>) y con ayuda de claves taxonómicas de (Hoog *et al.*, 2000).

## Resultados

### *Hongos cultivados y purificados de las lesiones en las especies de manglares del género Rhizophora del Parque Histórico Guayaquil*

Se purificaron un total de 13 hongos procedentes de tallos y propágulos del género *Rhizophora*, mostrando un halo seco el cual es una característica de sintomatología fúngica (Figura 1). Se encontró un mayor porcentaje de hongos provenientes de ramas (69%) y un menor porcentaje provenientes de propágulos (31%). Siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos en los medios de cultivo SB y BHIA ( Los hongos purificados se codificaron como se muestran en las Tablas (4 y 5):

A)



B)

**Figura 1.** Lesiones asociadas a sintomatología fúngica presentes en tallos (A) y Propágulos (B) en manglares del género *Rhizophora*.

**Tabla 4.** Hongos provenientes de ramas

Origen	Código
Ramas	KCR 1.5
	KCR 1.2.1
	KCR 3.2

	KCR 4.3
	KCR 4.1.1
	KCR 4.1 SP
	KCR 14
	KCR 15.1
	KCR 18

**Tabla 5.** Hongos aislados de propágulos

Origen	Código
<b>Propágulos</b>	KCR 6.3.1
	KCR 6.1.1
	KCR 7.3
	KCR 7.2.1

Caracterización morfológica de hongos cultivados asociados al manglar del género *Rhizophora*.

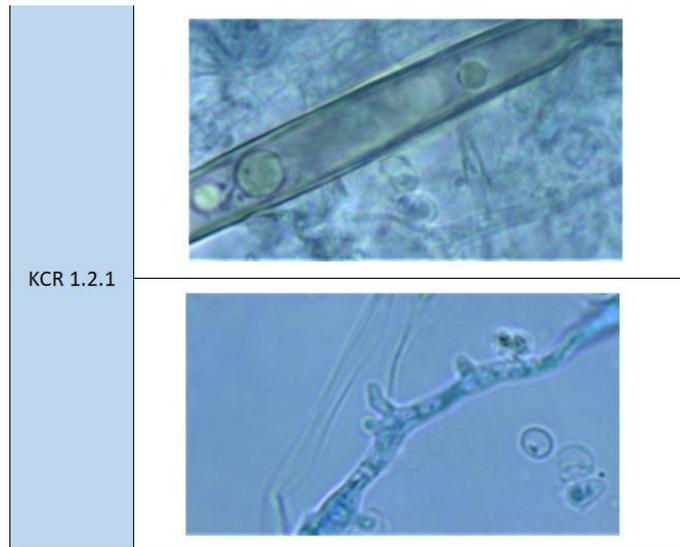
De los 13 hongos purificados, se identificaron 13 hongos a nivel morfológico. Se realizó el seguimiento del crecimiento de los hongos durante 20 días para describir las características a nivel macroscópico y microscópico e identificarlos mediante el uso de claves taxonómicas de Mycobank (<http://mycobank.org>) (Hoog et al., 2000), Los resultados se describen a continuación:

**(KCR 1.2.1) *Absidia* sp.**

**Taxonomía:** Fungi, Zygomycota, Zygomycetes, Mucorales, *Absidia*.

**Características macroscópicas:** Micelio aéreo hialino muy ramificado (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Produce estolones arqueados con rizoides y esporangióforos de longitud determinada, esporangióforos surgiendo a lo largo de los estolones, esporangios pequeños (Figura 3).



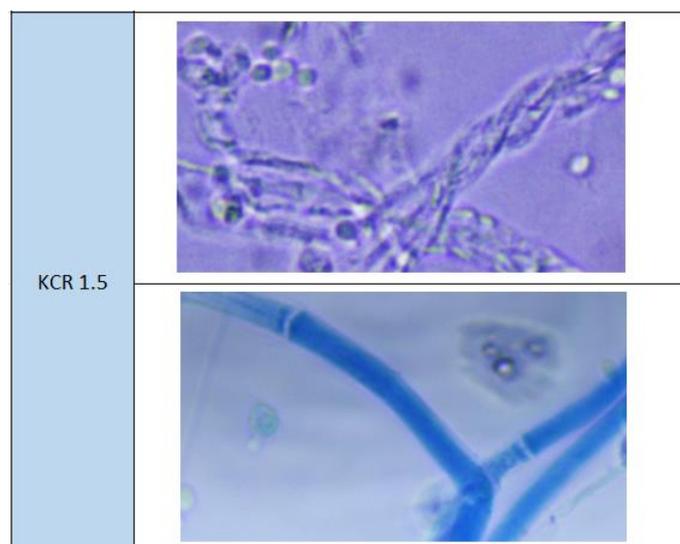
**Figura 3.** *Absidia sp.*

**(KCR 1.5) *Trichoderma sp.***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae, *Trichoderma*

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas luego tornan a verdes, comenzando por el borde de la colonia debido a la abundante esporulación (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas septadas, filiales cortas, en la parte terminal conidios circulares (Figura 7).



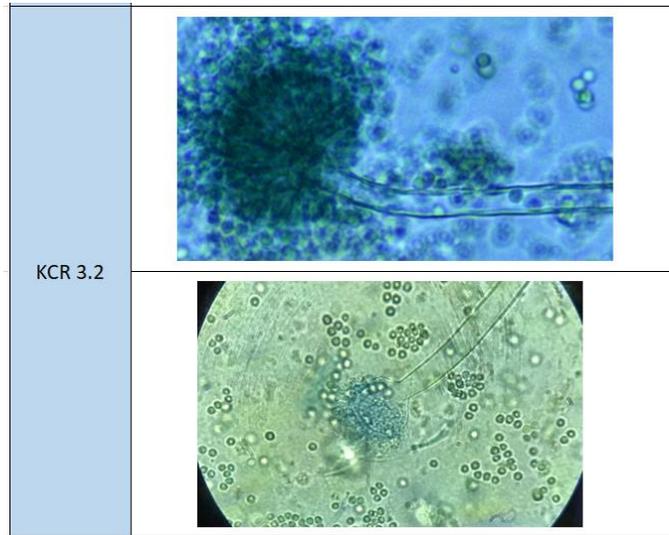
**Figura 4.** *Trichoderma*

**(KCR 3.2) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilaes de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 5).



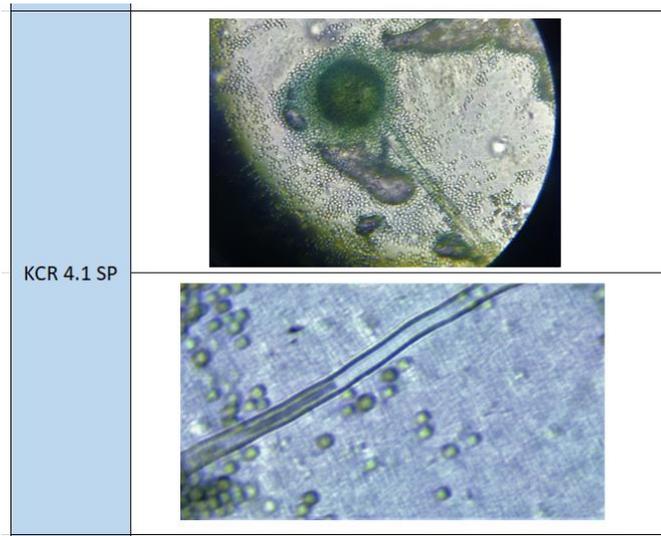
**Figura 5.** *Aspergillus sp.*

**(KCR 4.1SP) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilaes de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 6).



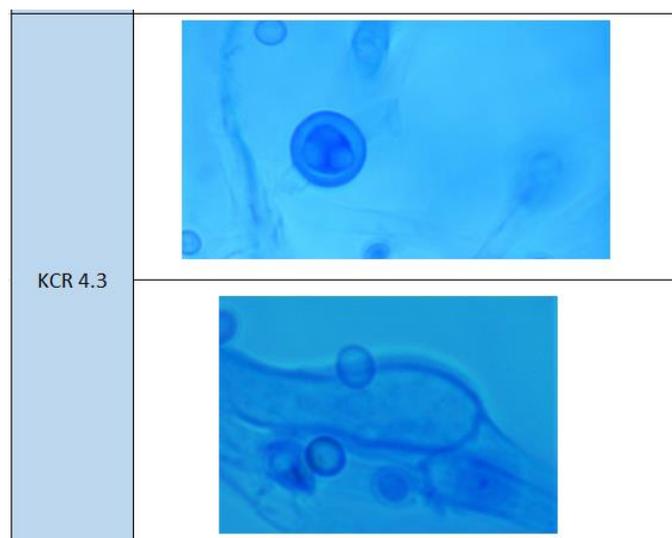
**Figura 6.** *Aspergillus sp.*

**(KCR 4.3) *Trichoderma sp.***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae, Trichoderma.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas luego tornan a verdes, comenzando por el borde de la colonia debido a la abundante esporulación (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas septadas, filiales cortas, en la parte terminal conidios circulares (Figura 7).



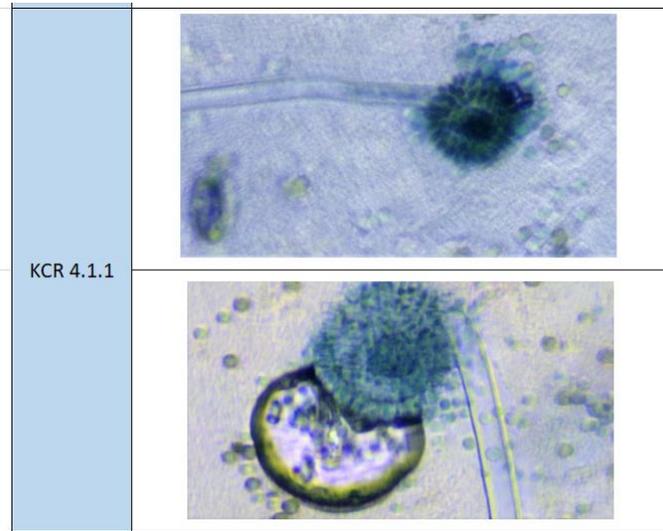
**Figura 7.** *Trichoderma.*

**(KCR 4.1.1) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilares de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 8).



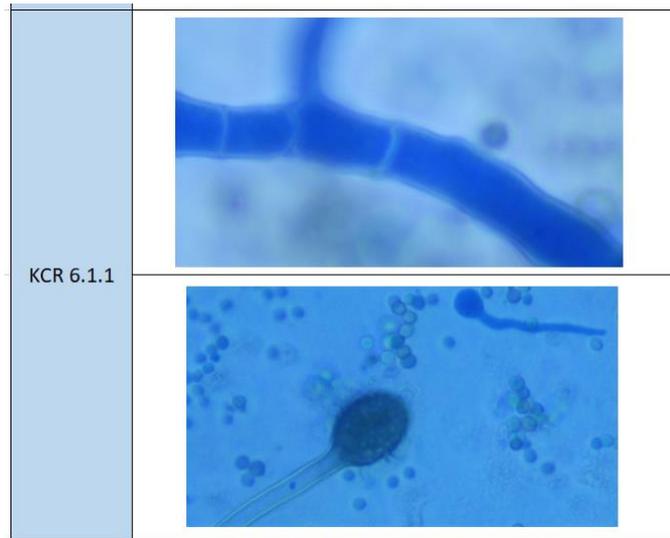
**Figura 8.** *Aspergillus* sp.

**(KCR 6.1.1) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilares de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6)

**Características microscópicas:** Hifas septadas, vesícula esférica, conidios esféricos. (Figura 9).



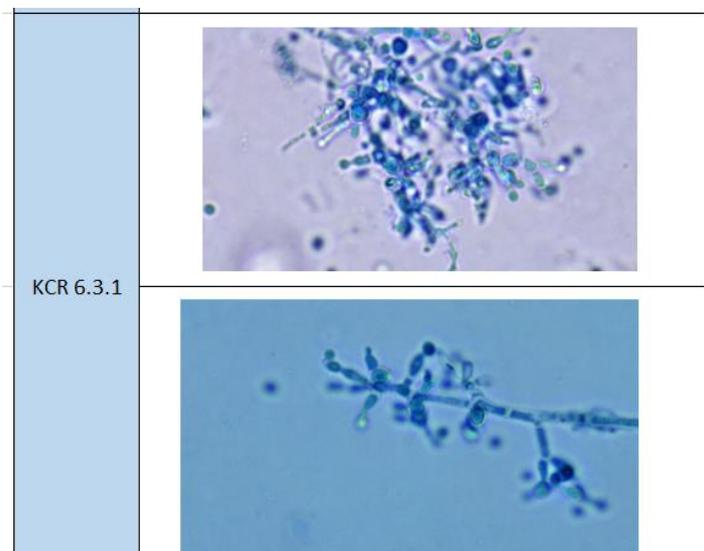
**Figura 9.** *Aspergillus sp.*

**(KCR 6.3.1) *Chryrosilia***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Euscomycetes, Sordariales, Sordariaceae, *Chryrosilia*

**Características macroscópicas:** Colonias color salmon, micelio hialino ramificado (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas septadas (Figura 10).



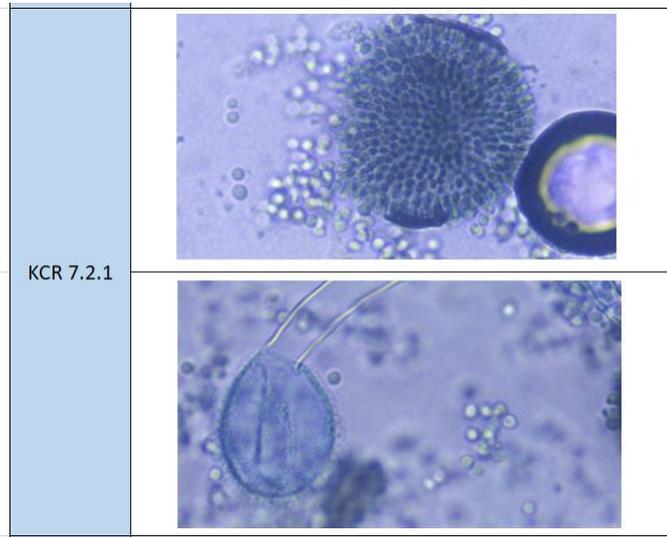
**Figura 10.** *Chrysonilia sp.*

**(KCR 7.2.1) *Aspergillus*.**

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergílares de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 11).



KCR 7.2.1

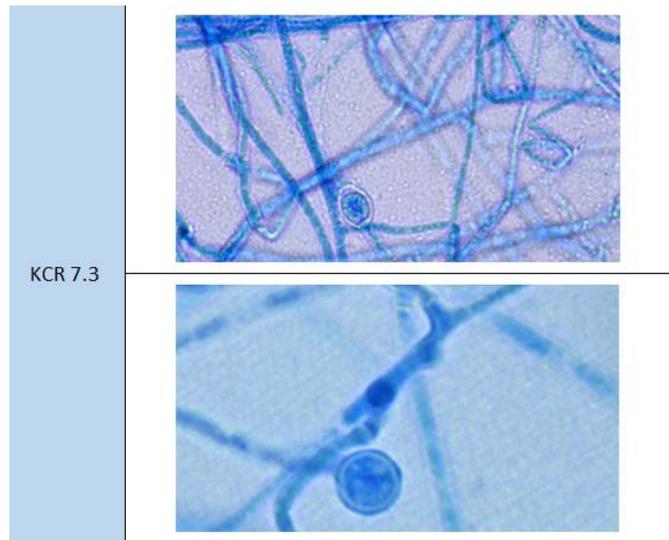
**Figura 11.** *Aspergillus* sp.

**(KCR 7.3) *Chrysosporium***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Euascomycetes, Onygenales, Onygenaceae, *Chrysosporium*.

**Características macroscópicas:** Colonias blancas algodonosas (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas planas septadas, no produce cuerpos fructíferos, esporulación pobre, conidias largas, contiene hifas fértiles (Figura 12).



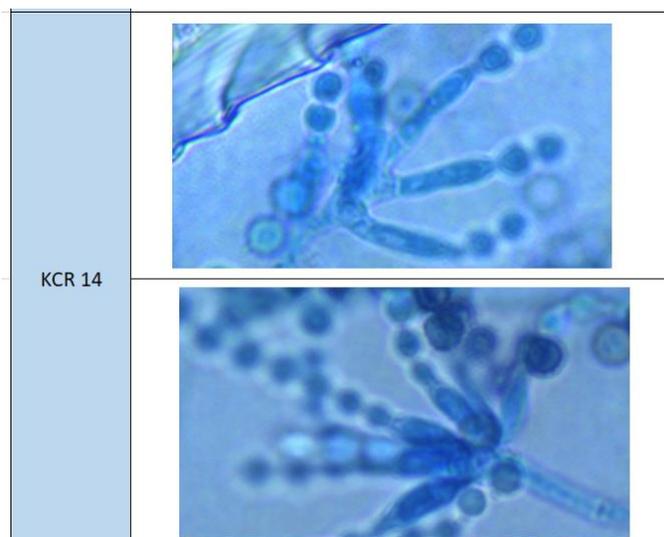
**Figura 12.** *Chrysosporium sp.*

**(KCR 14) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilaes de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula cubierta por ramas largas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 13).



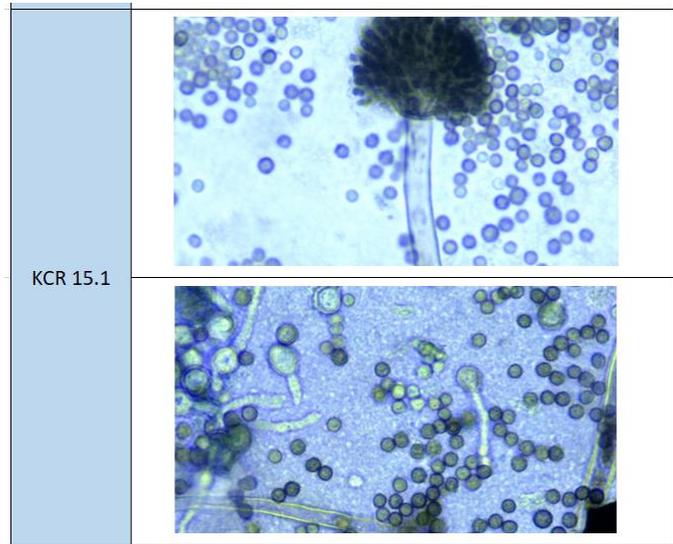
**Figura 13.** *Aspergillus sp.*

**(KCR 15.1) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilaes de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios esféricos (Figura 14).



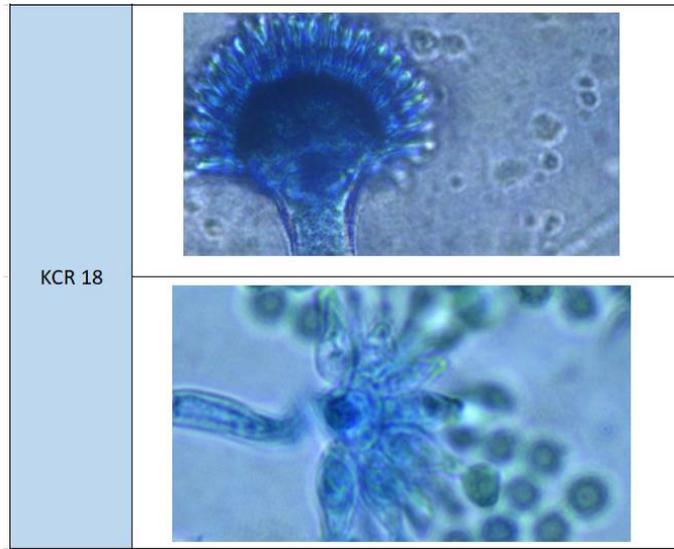
**Figura 14.** *Aspergillus sp.*

**(KCR 18) *Aspergillus***

**Taxonomía:** Fungi, Ascomycota, Eurotiales, Trichocomaceae, *Aspergillus*.

**Características macroscópicas:** Colonias inicialmente blancas, con la maduración de las cabezas aspergilaes de tornan negras, micelio parcialmente sumergido (Tabla 6).

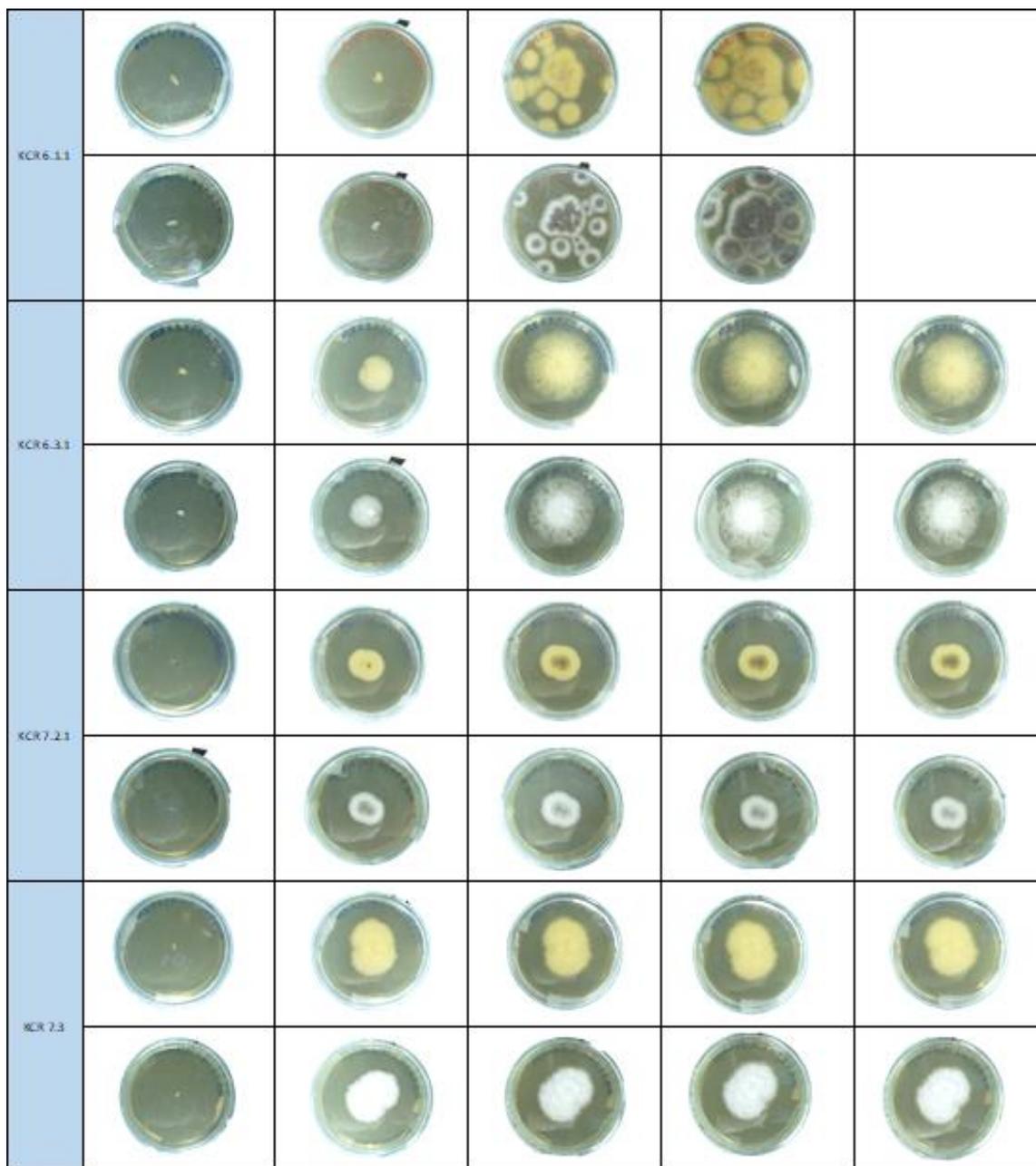
**Características microscópicas:** Hifas lisas, vesícula esférica cubierta por ramas cortas, siempre llevan fialides, conidios catenados (Figura 15).

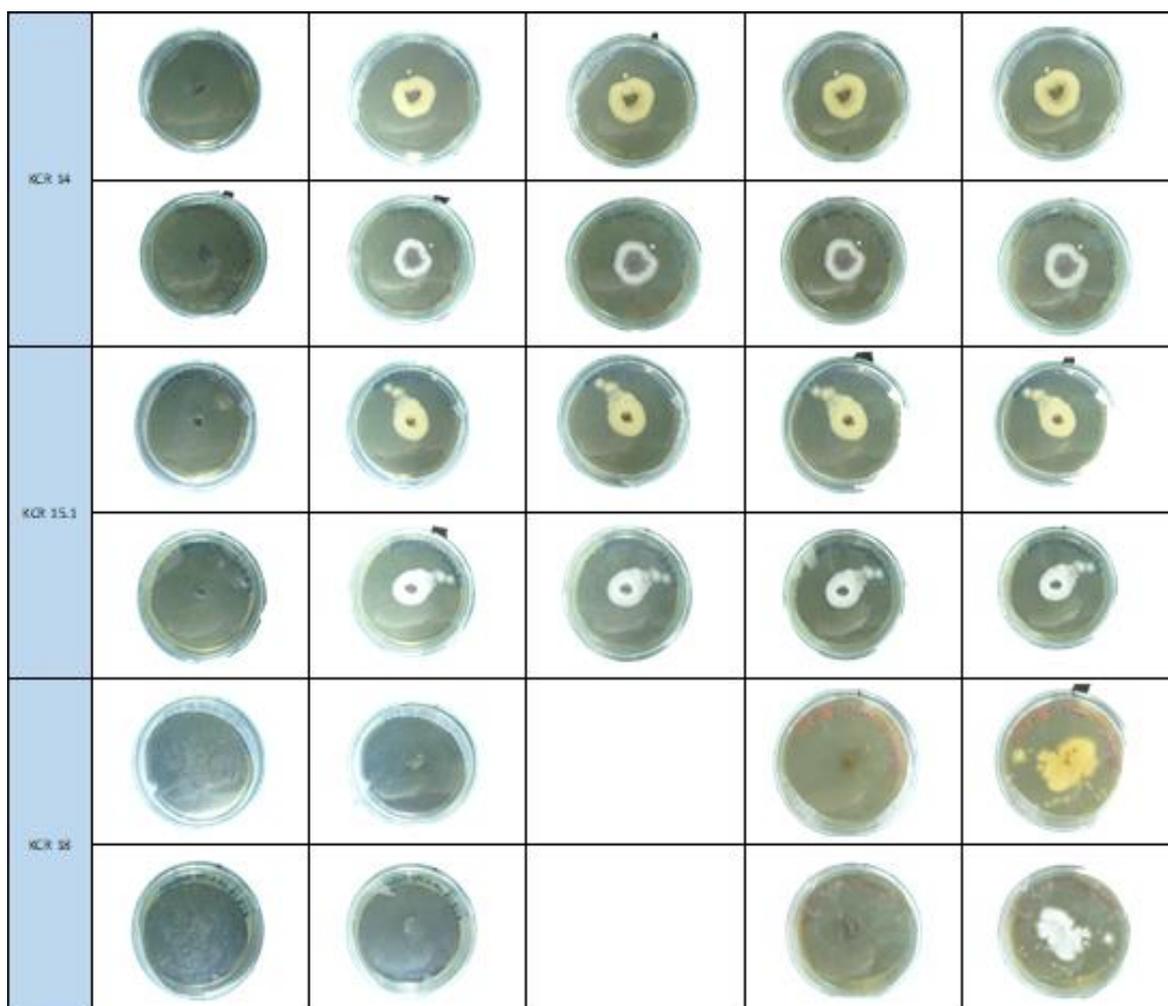


**Figura 15.** *Aspergillus sp.*

**Tabla 6.** Fotos de hongos crecimiento durante 14 días.

Hongos	Día 1	Día 4	Día 8	Día 10	Día 14
KCR 1.5					
KCR 1.21					
KCR 3.2					
KCR 4.15P					
KCR 4.11					
KCR 4.3					





***Identificación a nivel molecular especie/género de los hongos cultivables asociados al manglar del género *Rhizophora****

Mediante la técnica de PCR se realizó la amplificación de la región ADNr ITS usando los cebadores ITS1 y ITS4 (Anexo 1). Los resultados permitieron identificar un total de 8 hongos a nivel molecular de los géneros *Absidia*, *Aspergillus* y *Trichoderma* (Tabla 7), las cinco cepas restantes se lograron identificar a nivel de género analizando las características morfológicas.

**Tabla 7.** Blast realizado a las secuencias de la extracción de ADN.

Hongos	Descripción	Máx. puntaje	Puntaje total	Consulta cubierta	Valor E.
KCR 1.2.1	<i>Absidia sp.</i>	156	156	100%	2,00E-34
KCR 3.2	<i>Aspergillus niger</i>	1064	1224	100%	0.0
KCR 4.1SP	<i>Aspergillus niger</i>	1048	1208	100%	0.0
KCR 15.1	<i>Aspergillus niger</i>	1027	1178	100%	0.0
KCR 4.1.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	874	874	100%	0.0
KCR 7.2.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	1031	1031	100%	0.0
KCR 14	<i>Aspergillus aculeatus</i>	946	946	83%	0.0
KCR 6.1.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	695	695	64%	0.0

El análisis filogenético para las especies de hongos identificadas incluyó varias secuencias de hongos depositadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), seleccionando las especies que presentaron altos niveles de identidad y dos hongos que no tuvieron relación filogenética (utilizados como grupos externos de análisis).

El alineamiento final de la secuencia consenso de la cepa KCR 1.2.1 (*Absidia sp.*) incluyó 44 secuencias de especies diferentes del género *Absidia*. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Es decir se permitieron menos de 5% de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición. Hubo un total de 103 posiciones en el conjunto de datos final. Hubo un total de variación de T 28.0; de C 22.3; A 32.2 y G 17.5 (Figura 15).

El alineamiento final de la secuencia consenso de las cepas KCR 3.2; KCR 4.1SP y KCR 15.1. (*Aspergillus niger*), incluyó 33 secuencias de especies diferentes del género *Aspergillus*. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Es decir se permitieron menos de 5% de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición. Hubo un total de 414 posiciones en el conjunto de datos final. Hubo un total de variación de T 21.9; de C 30.6; A 18.0 y G 29.5 (Figura 16).

El alineamiento final de la secuencia consenso de las cepas KCR 4.1.1; KCR 14; KCR 7.2.1 y KCR 6.1.1 (*Aspergillus aculeatus*), incluyó 29 secuencias de especies diferentes del género *Aspergillus*. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Es decir se permitieron menos de 5% de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición. Hubo un total de 360 posiciones en el conjunto de datos final. Hubo una variación de T de 19.5; de C 32.1; A 18.9 y G 29.5 (Figura 17).

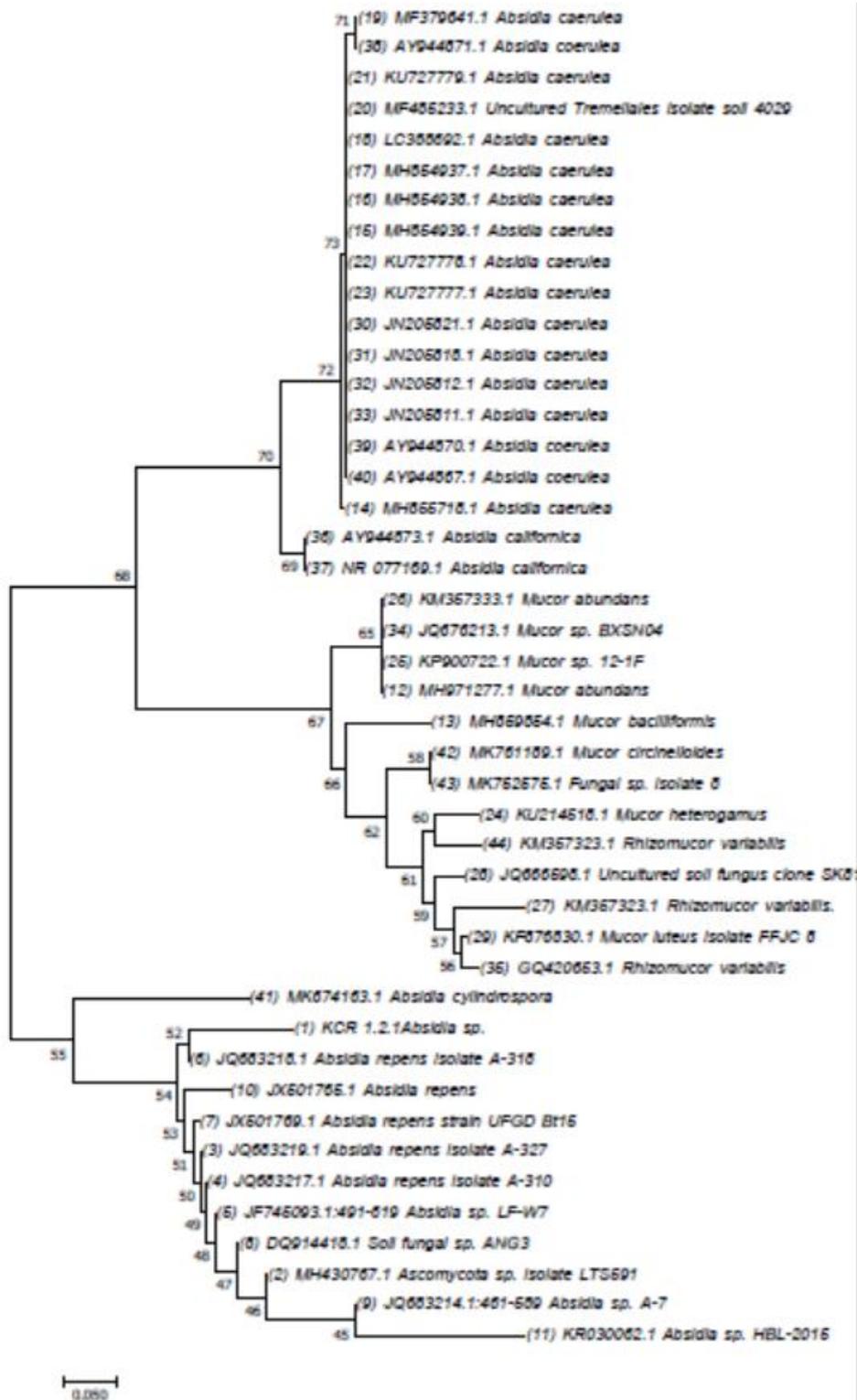
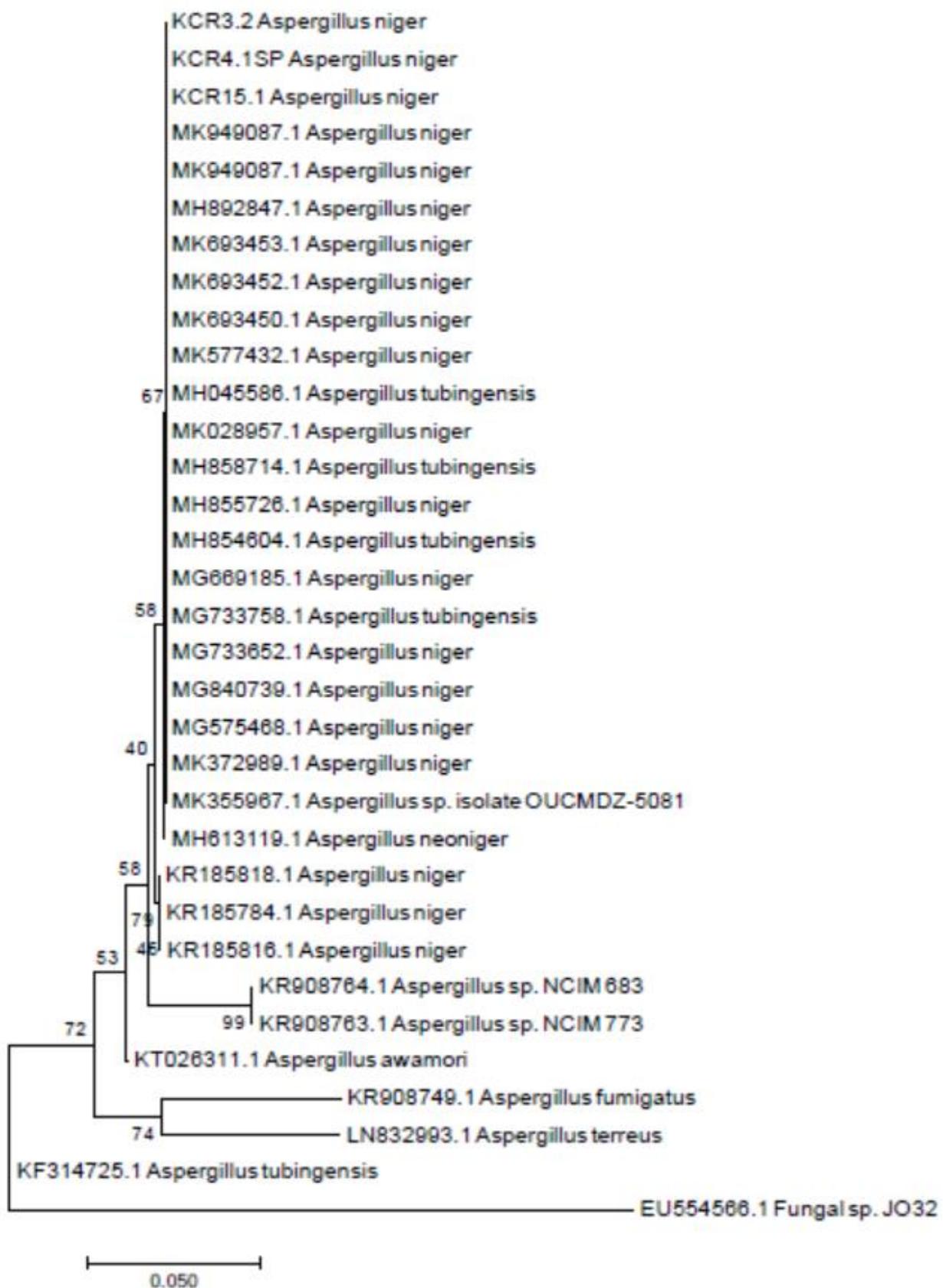
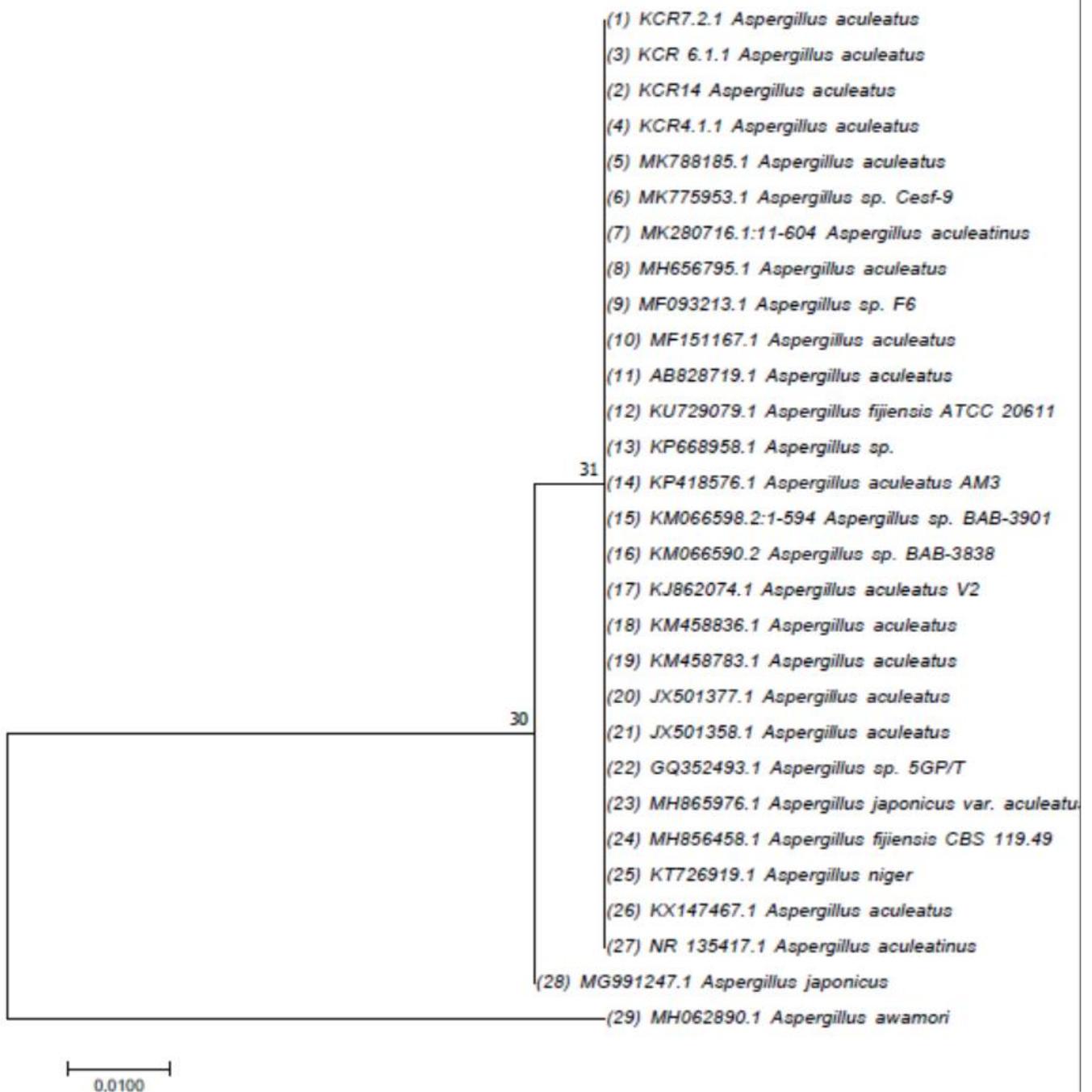


Figura 15. Dendrograma del género *Absidia*.



**Figura 16.** Dendrograma de la especie *Aspergillus niger*.



**Figura 17.** Dendrograma de la especie *Aspergillus aculeatus*.

## **Discusión**

Los hongos saprofitos son aquellos que absorben nutrientes a partir de residuos orgánicos. También se consideran mutualistas por que viven asociados a otros organismos donde se benefician mutuamente, en cuanto a los parásitos son aquellos que absorben los nutrientes de organismos vivos. Algunos hongos tienen requerimientos nutricionales especializados, por ejemplo los hongos filamentosos tienen hifas que les permite absorber los nutrientes de las plantas, algunos de ellos no solo absorben sus nutrientes, sino que también pueden enfermar o hasta causar la muerte a sus huéspedes, a estos hongos se los llama patógenos (Sadava & Purves, 2009).

En el Ecuador los conocimientos y reportes asociados acerca de los hongos que existen en el manglar, es por ello que los resultados de la presente investigación se aisló e identificó 13 hongos asociados a ramas y propágulos de los manglares del género *Rhizohpora*, que mostraban síntomas de lesiones asociadas con hongos, de los cuales ocho se identificaron molecularmente.

La mayoría de hongos identificados en la presente investigación pertenecen a las divisiones Ascomycota y Zygomycota y a géneros como: *Aspergillus*, *Absidia*, *Chyrosilia*, *Chrysosporium* y *Trichoderma*. Algunos de estos géneros coinciden con el estudio realizado en 1981 por Kuthubuthen dónde identificó los géneros: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrocephalum*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Phyllosticta*, *Trichoderma* and *Verticilium* (Sarma, 2012).

### ***Aspergillus sp.***

Este género es caracterizado por producir micotoxinas y metabolitos secundarios que son importantes en la degradación de materia orgánica y como mecanismos de defensa hacia otros microorganismos (Ávila & Quito, 2019).

Se debe tomar en cuenta que algunas especies de *Aspergillus* son patógenos como por ejemplo *A. fumigatus* es la especie más responsable de las infecciones en personas y

plantas, con un 90% seguida por *A. flavus* y *A. niger*, las cepas patógenas de *Aspergillus* son inhaladas por humanos y animales, pueden ser eliminados por el sistemas inmunológico neutrófilos y macrófagos, sin embargo *Aspergillus* puede provocar una gran variedad de reacciones alérgicas y enfermedades infecciosas a individuos inmunocomprometidos (Paulussen et al., 2016).

En cuanto a sus aplicaciones, las especies de *Aspergillus* tienen varias utilidades en la biotecnología y en numerosos aspectos de la biología y ecología, tienen una capacidad para la generación de energía, se han realizado análisis bioinformáticos de los genomas de algunas especies de *Aspergillus*, en donde se ha descubierto duplicaciones de genes que codifican enzimas que están involucradas en el flujo metabólico, implicados en el ciclo del ácido cítrico y glucólisis (Paulussen et al., 2016). Con base estos análisis realizados se podría llegar a expandir el uso en diferentes campos como por ejemplo en la ingeniería ambiental ya que algunos investigadores han realizado pruebas y muestran que algunas especies de *Aspergillus* también se han usado en procesos de biorremediación.

La especie *A. niger* se logró reducir Cr (VI) en seis días, por otro lado se realizó un ensayo de biodegradación de petróleo bajo condiciones controladas en laboratorios, utilizando especies de hongos autóctonas aisladas de ambientes contaminados por hidrocarburos, las especies que se usaron fueron *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*, que fueron inoculadas en bioreactores con suelos contaminados de petróleo crudo, se obtuvo un porcentaje de 85% de remoción con el tratamiento en el que se combinaron las tres especies, los metales que pueden llegar a tolerar el género *Aspergillus*, son: Cromo, Níquel, Cadmio, Zinc, Cobre, Plomo, Manganeso, Mercurio, Estroncio y Arsénico (Ávila & Quito, 2019).

### ***Aspergillus niger***

*A. niger* es utilizado para la obtención de enzimas a nivel industrial como la:  $\alpha$ -Amilasa, amiloglucosidasa, catalasa, celulasa,  $\alpha$ -Galactosidasa,  $\beta$ Galactosidasa,  $\beta$ -

Gluconasa, glucoamilasa, glucosa aerodeshidrogenasa, glucosa oxidasa,  $\alpha$ -Glucosidasa,  $\alpha$ -D-Glucosidasa,  $\beta$ -Glucosidasa, hemicelulasa, hesperidinas, invertasa, lipasa, pectinasa, pitasa, proteasa y tanasa, los procesos de producción de ácido cítrico se lleva a cabo por la fermentación en estado sólido, fermentación sumergida y fermentación en superficie (López et al., 2006).

En cuanto su uso en el medio ambiente, se utiliza para la eliminación de iones de metales pesados tóxicos que se encuentran en las aguas residuales, se ha llevado a diversos estudios en el cual se utilizan técnicas de biorremediación para eliminar los iones de metales pesados del agua, uno de los estudios tiene como potencial *Aspergillus niger* para eliminar el plomo, cadmio y el cobre, la eliminación de los iones de plomo, cadmio y cobre por la biomasa de *A. niger* pretratada tuvo una mayor eliminación que la que se usó carbón activado granular, cuando el plomo, cadmio y cobre se presentan juntos su extracción es menor que cuando están presentes de forma individual, en la investigación se demostró que la biomasa de *A. niger* pretratada puede utilizarse en cinco ciclos de biosorción, tiene un alto potencial para ser utilizado en futuros estudios en la eliminación de los iones de metales pesados en agua residuales (Kapoor et al., 1999). Sin embargo en el 2010 se realizó la extracción de la quitina del micelio de *A. niger* para evaluar la floculación y coagulación de las aguas del río Meléndez las cuales iban a ser tratadas usando la quitina de esta especie de hongo (Balanta, 2010).

Hasta el momento no se han reportado más artículos de los cuales *A. niger* haya sido utilizado en biosorción de iones de metales, sin embargo se debe dar más investigación en este campo para poder aprovechar el potencial de las especies de hongos que nos pueden ofrecer, para poder remediar los ecosistemas que están siendo degradados por actividades antropogénicas.

### ***Aspergillus aculeatus***

*Aspergillus aculeatus* es otra de las especies que se identificaron en la presente investigación es un hongo resistente al cadmio, puede llegar a colonizar las raíces de las plantas, mejorar la calidad del césped por su contenido en clorofila, facilita el crecimiento de las plantas y puede solubilizar las formas naturales del fósforo, *A. aculeatus* es tolerante a ambientes salinos y también es un indicador importante al estrés salino (Li et al., 2017), produce varias enzimas que degradan la celulosa y la hemicelulosa extracelulares, *A. aculeatus* tiene un alto potencial para producir proteínas útiles, la fructosiltransferasa de *A. aculeatus* muestra un alto potencial para la industria de producción de fructooligosacáridos prebióticos (Vis et al., 1991). A pesar de que no existen muchas investigaciones realizadas, *A. aculeatus* y *A. niger* se muestran que son especies hermanas, sin embargo se debe dar más investigación a *A. aculeatus* para poder definir sus principales usos como especie.

### ***Absidia sp.***

*Absidia sp* es otro de los géneros identificados en la presente investigación pertenece al orden Zygomycetes, este género comprende hongos que crecen en diferentes hábitats, que son capaces de colonizar sustratos que ya están ocupados por otros microorganismos, logrando un alto niveles de capacidad competitiva en la producción de antibióticos extracelulares, pueden residir con temperaturas que oscilan entre 20 y 42 °C, algunas de las especies son importantes en la biotecnología ya que son usadas en la biotransformación de los esteroides o como productores de componentes similares a las reninas, mientras que las especies que crecen en altas temperaturas son relevancia clínica (Hoffmann et al., 2007), algunas especies de este género son patógenos para los humanos, pueden causar infecciones pulmonares y es uno de los principales causantes del aborto micótico en el ganado bovino (Hoog et al., 2000).

Un estudio realizado acerca de la diversidad de hongos que existen en el suelo del manglar donde se encontró que el género *Aspergillus* es el más representativo en el manglar, las especies con alta frecuencia fueron: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, las especies con baja

frecuencia encontradas fueron: *Acromonium spp*, *Penicillium spp*, *Rhizopus spp* y *Absidia spp* (Khalil et al., 2013).

#### ***Chrysonilia sp.***

Este género pertenece a la familia Sordariaceae, incluye tres especies *C. sitophila*, *C. crassa* y *C. tetrasperma*. A pesar de que no existe mucha información acerca de este género, existe artículos relacionados a una de las especies de este género, la *Chrysonilia sitophila*, es una de las más reconocidas durante mucho tiempo, se la conoce como “moho rojo de pan” tiene una propagación cosmopolita, saprófita, se la puede encontrar en plantas muertas o en descomposición, también puede estar presente en los hogares como en las alfombras y en el polvo de los colchones, puede llegar a contaminar el pan, pasteles y diversos vegetales, se reporta un gran número en el que señala el crecimiento de *C. sitophila* en café, productos de panadería o plantas de procesamiento de madera, se considera un contaminante sin patogenicidad, sin embargo puede tener implicaciones para desencadenar una enfermedad asmática, pero no se considera un alérgico significativo (Raputean et al., 2018).

Como se lo menciona anteriormente este género se lo puede encontrar en plantas muertas o en descomposición, este hongo fue encontrado en las muestras de propágulos en descomposición, sin embargo no se puede deducir que es un género patógeno ya que no existen estudios donde se hayan realizado pruebas de patogenicidad, por lo que se debe tener en cuenta en futuras investigación para saber más acerca de este género y sus especies.

#### ***Chrysosporium sp.***

La mayoría de las especies de este género son hongos queratinofílicos, viven en restos de pelos y plumas en el suelo (Hoog et al., 2000). La rinosinusitis crónica es uno de los problemas de salud más comunes en la rinología, donde se obtuvo un resultado raro de sinusitis fúngica alérgica causada por especies de *Chrysosporium sp*, el hongo fue aislado, recolectado de los senos paranasales, las infecciones causadas por este género son muy

raras, los reportes de que causa sinusitis en humanos son raros, *Chrysosporium sp* es un género poco conocido donde existen pocos reportes de infección causada por especies de *Chrysosporium sp* (Kamath et al., 2015).

Existe un reporte muy reciente que trata sobre la infección cutánea, esto es extremadamente raro y poco diagnosticado, se presentó abscesos cutáneos recurrentes, la histopatología del absceso identificó conidios de paredes gruesas e hifas fúngicas septadas, en el cultivo de hongos creció especies de *Chrysosporium sp*, existen más de 60 especies de este hongo saprófito donde se lo puede encontrar comúnmente aislado del suelo, material vegetal, excremento, aves y restos de pelos y plumas en el suelo (Dincy et al., 2019). Este género de hongo fue aislado de los propágulos del manglar por lo que se pudo haber adquirido ya que los propágulos se encontraron en el suelo que estuvo contaminado por *Chrysosporium sp*, sin embargo no existen muchos reportes en donde muestre que este género puede ser patógenos en humanos o plantas.

#### ***Trichoderma sp.***

La mayoría de especies de este género son transmitidas por el suelo. Los casos en los humanos se limitan a pacientes severamente debilitados o emergen una complicación de la diálisis (Hoog et al., 2000). Son hongos cosmopolitas conocidos por su potencial de control biológico, las especies de *Trichoderma sp* utilizan pocos mecanismos para controlar los hongos patógenos de las plantas, sus principales mecanismos pueden contener antibiosis, producción de enzimas líticas (Anees et al., 2019). Debido su gran secreción de varias cantidades de enzimas en el medio de cultivo, resultan rentables en las fermentaciones a gran escala, alguna especies de *Trichoderma sp*. son utilizadas para separar isómeros ópticos en la producción de mentol ya que producen lactonas que son utilizadas ampliamente en la industria como saborizantes y se caracterizan por su agradable sabor y olor (Arias & Piñeros, 2008).

Varias especies de *Trichoderma sp.* se han usado con éxito para el control biológico de patógenos que son transmitidos por el suelo, los mecanismos que usan los hongos como agentes de control biológico contra patógenos de plantas incluye la competencia por nutrientes, resistencia sistémica inducida, microparasitismo, producción de antibióticos y enzimas líticas extracelulares, estas especies también producen compuestos volátiles orgánicos y no volátiles como: polifenoles, flavonoides, terpenos, pirones, sesquiterpenos, cetonas, tioésteres, ciclohexanos y alcoholes, varios estudios realizados han demostrado que su producción de estos metabolitos secundarios están relacionados con el crecimiento del micelio y la germinación de varias esporas de muchos patógenos de plantas, sin embargo el antagonismo resulta muy a menudo de mecanismos responsables de una interacción antimicrobiana (Tchameni *et al.*, 2019).

Las especies de hongos de este género son endófitos, tienen la habilidad para mejorar las plantas, sus capacidades fotosintéticas y también mejor sus mecanismos de resistencia al estrés abiótico, los efectos de estos hongos se enfocan en la fotosíntesis, a pesar de que son pocas las cepas de hongos que tienen estas capacidades, pero la mayor parte de los estudios describe las ventajas, la primera vez que se identificaron que tenían capacidades inesperadas para controlar las plantas, también se decía que estos hongos podrían ser parásitos de otros hongos produciendo sustancias antibióticas, durante los siguientes años se fue demostrando que estos hongos controlaban una amplia gama de plagas y enfermedades en las plantas, se observó en la inoculación de las plantas con estos hongos que además de controlar las enfermedades, su crecimiento fue más rápido que las no tratadas. Hoy en día existen productos fúngicos tratados con *Trichoderma* para el control de plagas, enfermedades y para el crecimiento de las plantas que ya se han comercializado (Harman *et al.*, 2019).

Se han hongos de este género de ambientes estuarinos ricos en lignocelulósicos, su adaptación en estos ecosistemas se debe a su capacidad de sintetizar metabolitos

antimicrobianos como los antibióticos, son de gran interés económico e industrial, su parasitismo y su competencia por el espacio, oxígeno y nutrientes ha despertado mucho el interés de investigadores, los artículos científicos que han usado estos microorganismos, como se lo menciona anteriormente han sido usados para el control los fitopatógenos debido a sus biomoléculas productoras, la especie de biocontrol más investigada de este género es *Trichoderma harzianum* seguido por *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* y *T. pseudokoningii*. Son agentes de control biológico contra patógenos transmitidos por el suelo como: *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia spp.* que afectan a cultivos de granos, la capacidad de producir sustancias fungitoxicas, puede variar según las especies y el aislamiento de la misma, algunas cepas producen metabolitos antimicrobianos, mientras que otras actúan como promotores de desarrollo de plantas (Filizola et al., 2019).

En la actualidad las medidas de control de plagas todavía se siguen llevando a cabo con el uso de agroquímicos, teniendo un costo significativo y causando varios problemas como la emergencia de patógenos resistentes y ambientes contaminados (Filizola et al., 2019), por lo que el uso de estos microorganismos como controladores biológicos es una alternativa para producir una agricultura más sostenible, contribuyendo con la conservación del medio ambiente, siendo menos costoso y una técnica sencilla y limpia, las pruebas in vitro realizadas son el principal fundamento en donde evalúa el potencial y la viabilidad del biocontrol de microorganismos.

Es necesario investigar más acerca de las características de cada especie de este género e identificarlas taxonómicamente para poder conocer más acerca de cada especie y sus utilidades, los hongos del género *Trichoderma* identificados en la presente investigación fueron de origen en ramas y en los propágulos, según lo descrito anteriormente, algunas especies de este género pueden ser usadas para el rápido crecimiento de plantas y como biocontroladores para la protección contra los patógenos y enfermedades, sin embargo se deben realizar la identificación de las especies de este género obtenidas en la investigación

para poder investigarlas un poco más y realizar pruebas de inoculación y observar si estas especies se pueden usar para el beneficio de las plantas o son fitopatógenos.

En cuanto a los demás géneros descritos se debe tener en cuenta que es una ventaja, su amplia distribución en el ambiente, del género *Aspergillus*, es considerado uno de los fitopatógenos más frecuentes, ya que tiene la capacidad de producir toxinas que alteran el metabolismo de las plantas (Ávila & Quito, 2019). Los reportes acerca del género *Absidia* se encuentran en menor cantidad en la naturaleza, sin embargo se debe tener presente que estas especies pueden ser usadas en la biorremediación de ecosistemas contaminados por metales pesados, por otro lado se debe realizar más investigaciones acerca de los géneros *Chrysonilia* y *Chrysopurium*.

Se sugiere a un futuro un estudio de los genomas de las especies identificadas en la presente investigación para conocer más de sus mecanismos y resistencias a los metales, para poderles dar un mayor uso en cuanto a la biorremediación de ecosistemas degradados por metales pesados, en cuanto al uso de las enzimas de las especies del género *Trichoderma* se sugiere seguir realizando más experimentos con ellas para observar qué otros mecanismos pueden realizar y así beneficiar a las plantas sin necesidad de uso de productos químicos y así reducir la contaminación.

## **Conclusión**

El análisis de las ramas y propágulos de los manglares del género *Rhizophora* del Parque Histórico Guayaquil, tuvo como resultado la identificación de 13 hongos filamentosos, donde se determinó que existen hongos como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus* y *Absidia sp*, que pueden ayudar a la biorremediación de ambientes contaminados por hidrocarburos también se encontraron hongos pertenecientes a los géneros: *Chrysonilia* y *Chrysosporium* de los cuales se tiene muy poca información, otro género reportado fue *Trichoderma* donde la mayoría de sus especies son usadas como controladores biológicos y tiene habilidades para mejorar las capacidades de la fotosíntesis en las plantas, mejorando

su crecimiento, especies de este género son muy estudiados debido a su alto potencial metabólico y por ende son de interés económico e industrial ya que pueden producir mentos y productos fúngicos siendo una alternativa para poder tener una agricultura sostenible.

No se tiene conocimiento alguno de que estos hongos son patógenos para los manglares o puedan causar su muerte ya que para aquello se necesita realizar pruebas de fitopatogenicidad, sin embargo sugiere realizar más investigaciones acerca las especies y géneros de la presente investigación a nivel molecular, ya que en algunos de ellos existe poca información relacionada con su uso o lo que las enfermedades que llegar a desarrollarse en el manglar.

### **Referencias Bibliográficas**

Ahmed M. A. Khalil, Hussein H. El-sheikh and Mahmoud H. Sultan. 2013. Distribution of Fungi in Mangrove Soil of Coastal Areas at Nabq and Ras Mohammed Protectorates. Recuperado de: <https://www.ijcmas.com/vol-2-12/Ahmed%20M.%20A.%20Khalil,%20et%20al.pdf>

Bohórquez, J. C. C., & Moreira, N. M. (2017). Evaluación del Bosque Seco Tropical del Parque Histórico Guayaquil. *INVESTIGATIO RESEARCH REVIEW*, 0(9), 1-27.

Carlos Andrés López Ríos, Alejandro Zuluaga Meneses, Sara Natalia Herrera Penagos, Angela Adriana Ruiz Colorado & Victoria Isabel Medina de Pérez. 2006. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO CON *Aspergillus niger* NRRL 2270 A PARTIR DE SUERO DE LECHE. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a04v73n150.pdf>

Cardoso, A., Marques, A., Campos Marinho, P. H., Shiosaki, R. K., & Campos Takaki, G. M. (2010). Influence of the heavy metals on chitosan production by *Absidia corymbifera* UCP 0134. *Microorganisms in Industry and Environment*, 176-180. [https://doi.org/10.1142/9789814322119\\_0039](https://doi.org/10.1142/9789814322119_0039)

- Cervantes Gonzalez Jorge Luis, 2003. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. Obtenido de:  
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n4/v14n4cc03.pdf>
- Cifuentes, E. L. A., & Espinosa, P. A. P. (s. f.).  *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS DE MUESTRAS DE SUELO DE LOS PARAMOS DE GUASCA Y CRUZ VERDE*. 204.
- Díaz Gaxiola, J. M. (2011). Una revisión sobre los manglares: Características, problemáticas y su marco jurídico. Importancia de los manglares, el daño de los efectos antropogénicos y su marco jurídico: caso sistema lagunar de Topolobampo. *Ra Ximhai*, 355-370. <https://doi.org/10.35197/rx.07.03.2011.05.jd>
- Dincy, P. C., Meera, T., Susanne, P. A., & Promila, R. M. (2019). Disseminated cutaneous chrysosporium infection. *Tropical Doctor*, 0049475519845779.  
<https://doi.org/10.1177/0049475519845779>
- Filizola, P. R. B., Luna, M. A. C., de Souza, A. F., Coelho, I. L., Laranjeira, D., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Biodiversity and phylogeny of novel Trichoderma isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against Fusarium strains. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>
- Frisvad, J. C., Møller, L. L. H., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: Update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9354-1>
- G.S de Hoog, J. Guarro, J. Gené & M.J. Figueras. 2000. ATLAS OF CLINICAL FUNGI 2NT EDITION. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, 2000.

- Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2019). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of Applied Microbiology*, jam.14368. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>
- Hoffmann, K., Discher, S., & Voigt, K. (2007). Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov. *Mycological Research*, 111(10), 1169-1183. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.07.002>
- Kamath, P. M., Prasad, V., Shenoy, V. S., Mukundan, A., & Shenoy, S. (2015). *Chrysosporium*: An Uncommon Fungus in Chronic Rhinosinusitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 9(3), MD01-MD02. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11676.5688>
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., & Cullimore, D. R. (1999). Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 70(1), 95-104. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00192-8)
- Li X, Han S, Wang G, Liu X, Amombo E, Xie Y and Fu J (2017) The Fungus *Aspergillus aculeatus* Enhances Salt-Stress Tolerance, Metabolite Accumulation, and Improves Forage Quality in Perennial Ryegrass. *Front. Microbiol.* 8:1664.doi: 10.3389/fmicb.2017.01664
- Lourdes Abarca, 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals (Microbiologia), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. Recuperado de: <https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>

Laura Margarita Márquez Valdelamar, Alejandra Serrato Díaz & René Cerritos Flores.

2011. Secuenciación de fragmentos de ADN. Recuperado de:

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/secuenciacion.pdf>

Mahuku, G. S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 71

Molina-Moreira, M. N. (2017). *Evaluación de las Especies del Manglar establecidas en el Parque Histórico Guayaquil*. Recuperado de

[http://www.academia.edu/36300014/Evaluaci%C3%B3n\\_de\\_las\\_Especies\\_del\\_Manglar\\_establecidas\\_en\\_el\\_Parque\\_Hist%C3%B3rico\\_Guayaquil\\_2017](http://www.academia.edu/36300014/Evaluaci%C3%B3n_de_las_Especies_del_Manglar_establecidas_en_el_Parque_Hist%C3%B3rico_Guayaquil_2017)

Nancy Saltos Rosero. (2012). Extracción de AND genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*. Recuperado de:

<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20gen%C3%B3mico%20y%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20regi%C3%B3n%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos%2C%20Nancy.pdf>

Norphanphoun, C., Raspé, O., Jeewon, R., Wen, T.-C., & Hyde, K. D. (2018).

Morphological and phylogenetic characterisation of novel *Cytospora* species associated with mangroves. *MycoKeys*, 38, 93-120.

<https://doi.org/10.3897/mycokeys.38.28011>

Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez- Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain,

D., ... Lievens, B. (2016). Ecology of aspergillosis: Insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 296-322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>

Perez-Nadales, E., Almeida Nogueira, M. F., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M.,

Grund, E., ... Wendland, J. (2014). Fungal model systems and the elucidation of

pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 42-67.

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>

Photita W., Lumyong S., Lumyong P., Hyde K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycol. Res.* 2001;105:1508–1513.

Perez-Nadales, E., Almeida Nogueira, M. F., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., ... Wendland, J. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 42-67.

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>

Percy Rojas. 2018. Métodos de secuenciación de ADN. Obtenido de:

[https://www.researchgate.net/publication/326557298\\_Metodos\\_de\\_Secuenciacion\\_de\\_ADN](https://www.researchgate.net/publication/326557298_Metodos_de_Secuenciacion_de_ADN)

Reyes-Ocampo, I.; González-Brambila, M.; López-Isunza, F. UN ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE *Aspergillus niger* CRECIENDO SOBRE UN SUSTRATO SÓLIDO. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 12, núm. 1, 2013, pp. 41-56 Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Distrito Federal, México. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62028007005>

Rodríguez, M., Troche C., Vázquez, A., Márquez, J., Vázquez, B., Valderrama, L., Velázquez, S., Cruz, M., Ressler, R., Uribe, A., Cerdeira, S., Acosta, J., Díaz, J., Jiménez, R., Fueyo, L. & Galindo, C. (2013). Manglares de México/ Extensión, distribución y monitoreo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F.

Rosa Elvira Sánchez - Fernández, Brenda Lorena Sánchez - Ortiz, Yunueth Karina Monserrat Sandoval-Espinosa, Álvaro Ulloa-Benítez, Beatriz Armendáriz-Guillén, Marbella Claudia García-Méndez y Martha Lydia Macías-Rubalcava. Hongos

endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina.

Sadava, D., & Purves, W. H. (2009). *Vida / Life: La ciencia de la biología / The Science of Biology*. Ed. Médica Panamericana.

Sarma, Vemuri Venkateswara. «Diversity and Distribution of Marine Fungi on Rhizophora spp. in Mangroves». En *Biology of Marine Fungi*, editado por Chandralata Raghukumar, 53:243-75. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_13).

Sanka Loganathachetti, D., Poosakkannu, A., & Muthuraman, S. (2017). Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09281-3>

Swofford, D.L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Versión: 4. Sinauer Associates, Sunderland, EEUU. 1998.

Sosa-Rodriguez, Sánchez-Nieves y M. Melgarejo, 2009. Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v38n1/v38n1a03.pdf>

Trierveiler-Pereira, L., Baltazar, J. M., & Loguercio-Leite, C. (2008). Santa Catarina Island mangroves 2 - First report of *Cytospora rhizophorae* from Brazil. *Mycotaxon*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301580349>

Tchameni, S. N., Cotârleț, M., Ghinea, I. O., Bedine, M. A. B., Sameza, M. L., Borda, D., ... Dinică, R. M. (2019). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00089-x>

- Universidad Nacional de Colombia, Mira Martínez, J. D., Betancur Valencia, S.,  
Universidad Nacional de Colombia, Urrego Giraldo, L. E., & Universidad Nacional  
de Colombia. (2017). Relación entre la infección por agallas, las variables  
estructurales y la anatomía de la madera de *Rhizophora mangle* L., en el golfo de  
Urabá (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 39(106), 41-52.  
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a04>
- Van de Vis, J. W., Searle-van Leeuwen, M. J. F., Siliha, H. A., Kormelink, F. J. M., &  
Voragen, A. G. J. (1991). Purification and characterization of Endo-1,4- $\beta$ -D-  
galactanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*: Use in combination  
with arabinanases from *Aspergillus niger* in enzymic conversion of potato  
arabinogalactan. *Carbohydrate Polymers*, 16(2), 167-187.  
[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90101-H](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90101-H)
- Wier, A. M., Tattar, T. A., & Klekowski, E. J. (2000). Disease of Red Mangrove  
(*Rhizophora mangle*) in Southwest Puerto Rico Caused by *Cytospora rhizophorae*1.  
*BIOTROPICA*, 32(2), 299. [https://doi.org/10.1646/0006-3606\(2000\)032\[0299:DORMRM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1646/0006-3606(2000)032[0299:DORMRM]2.0.CO;2)
- Wanderley Costa, I. P., Maia, L. C., & Cavalcanti, M. A. (2012). Diversity of leaf  
endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Brazilian journal of  
microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(3),  
1165–1173. doi:10.1590/S1517-838220120003000044
- Yessenia del Carmen González Muñoz, 2003. Caracterización morfológica y molecular de  
genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación  
Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica. Recuperado de:  
<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0156e/A0156e.pdf>