


## Metabolitos secundarios Clusters en el ADN y su caracterización fenotípica y genotípica de *Aspergillus salvadorensis* en semillas de Nacascal. El Salvador. 2006/2024 \*

Antonio Vásquez Hidalgo \* 

Profesor de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador

### Resumen

Los metabolitos secundarios y las técnicas de ADN molecular de estudios fenotípico y genotípico permitieron la identificación de la muestra de *Aspergillus* enviada a MACROGEN SOUTH KOREA. **Objetivo:** Realizar la caracterización fenotípica y genotípica del género *Aspergillus* mediante el método de secuenciación de nueva generación (NGS). **Metodología:** El tipo de estudio es exploratorio y experimental. Se realizó en dos fases: primero en la recolección de semillas de *Caesalpinia coriaria* y segundo se realizó una caracterización macroscópica y microscópica inicial del aislamiento de *Aspergillus* en 2006, se realizó un acta notarial en 2007, estudios de microscopía simple y microscopía electrónica de barrido y PCR del hongo encontrado en México 2008 y publicado en la revista La Universidad en 2008, luego la extracción de ADNg, qPCR, ADNc se realizó en 2024 en MACROGEN INC. por Metagenome Shotgun Sequencing Reports. **Resultados:** Se extrajo el genoma del ADNg obteniendo una concentración máxima de 12.297 ng/ul, volumen 30 ul, cantidad total 0.369 y DIN 6.4 nivel máximo 8732 intensidad de muestra para 15000 pb, el qDNA cuántico se obtuvo a 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul y ADNc. A partir de la extracción de ADNg del TapeStation gDNA Screen, se obtuvo una concentración máxima de 12.297 ng/ul, volumen 30 ul, cantidad total 0.369 y DIN 6.4 nivel máximo 8732 intensidad de muestra para 15000 pb en control de calidad. Se obtuvieron qPCR 624 pb a una concentración de 103,24 nM y 41,87 ng/ul con la biblioteca de ADN TruSeq Nano (350\_META). Se utilizaron 33 kits de biblioteca de ADNc. El total, de bases obtenidas fueron 11.705.895.990 pb, el total, de lecturas fueron 77.522.490. Contenido de nucleótidos de GC % 49.7 y AT % 50.30, el contenido de base de GC fue 49.7% y AT fue 50.3, contenido de base métrica Q 20: 95.1 y Q 30: 88.3, calidad de datos del ciclo Q30 de alto valor. Se utilizaron los formatos FASTQ y FASTA para la codificación y secuenciación completa de pares de bases. Valor de datos sin procesar. 38.761.245 N, calidad del adaptador y recorte. (Calidad y ajuste del adaptador.) fue de 32.535.420, la eliminación de contaminantes fue de 30.961.740. A partir de la taxonomía Krona, se informó de *Aspergillus* variedades de especies. Conclusiones: Tiene varias vías metabólicas únicas que le permite producir colorantes específicos, esto sería una característica que podría justificar su clasificación como una nueva especie, ya que esta habilidad podría ser el resultado de una evolución local en respuesta a condiciones ambientales particulares. En estudios previos en 2006 se denominó la especie *salvadorensis*. Se encontraron 14 enzimas y metabolitos secundarios en la producción de pigmentos negros producidos por el hongo por estrés oxidativo.

### Palabras clave

*Aspergillus* sp, Nacascal, *salvadorensis*, estrés oxidativo

## 1.Introducción

El estudio inicial del hongo *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Antonio Micheli en su obra *Nova Plantarum*, nacida en Florencia, Italia, en 1697 [15]. Hoy en día, ha generado mucho interés no solo por sus implicaciones en la salud sino también en las industrias alimentaria, química y biológica. Se inició una investigación general sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel nacional conocida como la semilla de Nacascal, ampliamente utilizada en la cerámica y el curtido de cueros en la parte norte del país. Esta semilla tiene una particularidad inerte que requiere la presencia

de un hongo del género *Aspergillus* sp y el hongo devora la semilla como sustrato alimenticio perforándola hasta pulverizarla, para que pueda teñirse junto con las propiedades de la arcilla tiñe los vasos de color negro-marrón y curtido de la piel del ganado, los taninos cuando se fermentan pueden extraer ácido gálico y glucosa. Además, las vasijas dan la característica especial de la arcilla negra, lo que le da un aspecto colonial y hermoso a las vasijas. Al mirar las macetas, el tono marrón es del tanino de la semilla y el negro proviene del hongo más el hierro contenido en la arcilla le da el tono negro intenso. En general, las especies del género *Aspergillus* se encuentran como saprófitos depositados en material orgánico como plantas, semillas o suelo. Su temperatura es adaptativa, desde un mínimo de 5 °C hasta

60 °C en otras especies, aunque son raras, soportan temperaturas de más de 100 a 300 ° C. *Aspergillus* es actualmente un género amorfo, que comprende entre 260 y 837 especies [20, 23]. Tal es la diversidad de especies que con el uso de tecnologías modernas como la PCR. La secuenciación ha permitido facilitar su estudio en algunos casos, siempre y cuando se disponga de una base de datos secuencial adecuada y se disponga de los cebadores según especies para mezclar los pares de bases. La pigmentación de los hongos se debe a la síntesis de diversos tipos de pigmentos y moléculas cromóforas como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas entre otros. [22-33]. Los pigmentos de melanina tienen un papel principal en la protección de las esporas de hongos contra los aumentos de temperatura, la radiación y la desecación. [38] Las melaninas están presentes en la mayoría de los hongos y se encuentran en casi todos los hongos patógenos. [53] El hábitat natural de las especies de *Aspergillus* es el heno, las semillas y el compost. Justificación. Se realizó un estudio completo sobre la extracción e identificación de ADN del género *Aspergillus* para determinar qué tipo de especies circulan en nuestro país. La investigación comenzó en 2006 con estudios de fenotipado en los laboratorios del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, luego en 2008 en los laboratorios de microscopía electrónica de barrido de CENSALUD y luego en México resultados preliminares de PCR molecular, luego en 2024 en los laboratorios de MACROGEN INC en Corea del Sur el estudio completo de extracción, cuantificación y secuenciación de g,q,c,ds,seqDNA en su análisis molecular del género *Aspergillus* para determinar el tipo de especies nativas circulantes en la parte norte de nuestro país. Objetivo: Realizar la caracterización fenotípica y genotípica por el método de secuenciación de próxima generación del género *Aspergillus*.

## 2. Material y métodos

El tipo de estudio es exploratorio con un nivel de significancia del 95% y un error de estimación del 0,05%. Del hongo *Aspergillus*. 1. Caracterización. Su estudio se desarrolló en dos fases: I: Caracterización Fenotípica. Se recolectaron cinco lotes de semillas de *Caesalpinia coriaria* de la zona norte, purificación y selección de las semillas según su apariencia y color. Los inóculos se fabricaron

en placas y tubos de ensayo en medio de cultivo Sabouraud. El crecimiento se observó a las 48 horas en el laboratorio de Microbiología a 40x y 100x bajo un microscopio óptico simple durante semanas con una hoja de comparación. Se llevó al laboratorio para la observación de microscopía de barrido de *Aspergillus* mediante la toma de microfotografías electrónicas en CENSALUD. En México se realizó una PCR preliminar. Se completó la caracterización fenotípica. II: Caracterización genotípica. Tres muestras, una cepa pura en tubo de vidrio y dos muestras más, una muestra era ADN y la otra simple, fueron enviadas a Corea del Sur en los laboratorios de MACROGEN INC para la extracción, análisis e identificación de g,q,c,ds,seqDNA. Preparación de la suspensión de esporas y microcultivo. Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivo donde se identificaron los conidios o esporas donde se extrajeron por método simple bajo el microscopio y se volvieron a sembrar, la cual se utilizó para realizar el inóculo en el medio de cultivo Sabouraud en tubo y placa, el hongo se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al cual previamente se agregaron 50 ml del medio, incubado durante 48 horas a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se agitó cuidadosamente durante 5 min con la ayuda de un agitador magnético. También se pasó al tubo en Sabouraud y se agitó para homogeneizarlo y asegurar que las esporas estén bien suspendidas. Si las esporas tienden a asentarse, puede ser útil usar una batidora o agitar manualmente. El recuento de esporas se realizó con una cámara de Neubauer para la concentración adecuada requerida. [10]. Microcultivo: Se realizó en CENSALUD y consistió en preparar una cámara húmeda estéril: una placa de Petri, en cuyo fondo se coloca agua estéril y una varilla de vidrio en forma de V, sobre la que se coloca el portaobjetos, y encima de ella el bloque del medio de cultivo Sabouraud. La muestra se inocula en el bloque en cuatro cuadrantes, por medio del asa de platino en forma de L en el bloque del medio ya inoculado, se coloca un cubreobjetos y se incuba durante 7 días a 25°C. Una vez finalizado el período de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una hoja con una o dos gotas de Azul de Lactofenol y se observan las estructuras características de las especies aisladas bajo un microscopio con un objetivo de 100x. [12] 2. Área de muestreo y recolección. El hongo se aisló de semillas de nacacol de la zona norte. Las semillas de color marrón-negro fueron identificadas, recolectadas y almacenadas en bolsas herméticas para su posterior análisis a temperatura ambiente. No requiere medidas especiales para su transporte y conservación. 3. Caracterización morfológica de muestras de hongos. La caracterización morfológica se realizó en cultivos en Sabouraud y se incubó a 37° C durante 72 horas en tubos aeróbicos y

luego a temperatura ambiente x 7 días. Con simple observación microscópica sobre lactofenol azul de algodón a 10 x, 40 x y 100x, y luego sellado con un cubreobjetos. La visualización de las estructuras se realizó bajo un microscopio óptico. Se utilizó la afiliación taxonómica para determinar la base de datos en línea. 4. Aislamiento y purificación de muestras. La limpieza de semillas no se utilizó en el material vegetal. Se raspó y el material se retiró y depositó en medios de cultivo ASD (agar dextrosa Sabouraud) para su aislamiento y diferenciación. Las placas y tubos de cultivo se incubaron a temperatura durante una semana. Este proceso se repitió hasta obtener aislados puros. Las muestras previamente aisladas se inocularon en 150 mL de medio de cultivo líquido PW (peptona, agua y caldo nutritivo) en placa y tubos y se incubaron a 37 °C en 48 horas y a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C. La biomasa se secó a 42 °C durante dos días y se dejó a temperatura ambiente a 25 °C durante 3 semanas hasta su posterior análisis. 5. Método de ADN. En general, se utilizaron métodos para la secuenciación del ADN. Se utilizó el método de secuenciación de Sanger mediante el método de terminación de la cadena enzimática y la secuenciación automática. La secuenciación se lleva a cabo en tres pasos: 1. Realizar la síntesis de nuevos fragmentos de ADN. 2. Separar los fragmentos por electroforesis y finalmente 3. Identificar nucleótidos para determinar la secuencia. En términos de microbiología, el estudio molecular se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que han sido previamente amplificados, o secuenciando todo el ADN previamente fragmentado al azar. La secuenciación a través de *Illumina* se caracteriza básicamente por la ejecución de los siguientes procesos: a. La amplificación de fragmentos de ADN para la generación de clusters (colonias de un mismo fragmento) se realiza mediante el método PCR bridge. b. La detección de bases en la secuenciación se realiza a través de marcadores fluorescentes. Por lo tanto, la plataforma *Illumina* permite la secuenciación de fragmentos de ADN en ambos extremos. El fragmento se secuencia amplificado por ambos extremos en lugar de un solo extremo. Incluyendo tu ADNg, qDNA, dsDNA, cDNA y seqDNA y luego analizarlos en paquetes de computadora. [35] 6. Extracción de ADNg. Los genes de ADNg son actualmente una de las formas más estudiadas en el genoma fúngico, principalmente para la detección e identificación de especies a través de la biología molecular. En la preparación de la muestra anterior y su método de extracción tiene como objetivo principal que debe liberar el ADN intracelular, rompiendo la pared de la célula fúngica o micelio, la membrana celular y la membrana nuclear por calor a temperatura controlada por el termociclador u otra vía. Además, debe concentrar las moléculas diana de ADN que puedan estar presentes en

pequeñas cantidades y debe purificarse eliminando trazas de contaminantes, proteínas, restos de ARN extraño, sin degradar el ácido nucleico. Para la ruptura de células fúngicas se puede realizar por diferentes métodos: como el químico, el enzimático o el mecánico [39], que son los más comunes, pero dependerá del laboratorio en su método de extracción. [35] 7. Técnica de qPCR. Llamado ADN cuantitativo medido por fluorometría que captura nucleótidos. Después de haber cumplido con los requisitos para la extracción de ADNg en el control de calidad, el ADNc se fragmentó y cuantificó degradándolo. El método de control de calidad del ADN en MACROGEN fue: 1. Cantidad de ADN: Realizado por el QuantiFluor Método del sistema dsDNA utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo. Macrogen cuantifica el material genómico de partida mediante la cuantificación basada en fluorescencia, utilizando tintes específicos de ADN bicatenario, este método cuantifica el dsDNA con mayor precisión que el espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Las especies del género *Aspergillus* spp en su evolución genómica han sido variables en su tamaño, en el que tienen un rango promedio de tamaño de genoma de 27 a 39 Mb o más y un número promedio de genes entre 9000 a 14000 genes. El que tiene el tamaño más grande es *A. sojae* 39.5 y el que tiene el mayor número de genes es *A. niger* con 14,165. [5-8] 8. Calidad por ciclo. El término Calidad por Ciclo se refiere a la evaluación de la calidad de las lecturas de secuenciación en función de cada ciclo de secuenciación. El proceso de secuenciación se lleva a cabo en ciclos. Durante cada ciclo, se agrega una base al fragmento de ADN y se detecta la base incorporada. Se secuencia base por base en una serie de ciclos. En cada ciclo, se incorpora una base (A, T, C o G) a la cadena de ADN y un fluoróforo o señal óptica detecta la base agregada. Este proceso se repite varias veces, y en cada ciclo se detecta y registra de forma específica. [35]

#### Calidad del ciclo de secuenciación y bioinformática

Herramientas La precisión de la secuenciación se evaluó por ciclo, y cada ciclo representaba la incorporación de una sola base (A, T, C o G), detectada por señales fluorescentes. La secuenciación ciclo por ciclo garantizó una alta precisión. Para identificar genes asociados con enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, MACROGEN utilizó: i. EggNOG: Categoriza grupos ortólogos (COG) ii. MetaCyc: Detalla las vías metabólicas, las enzimas, los compuestos y las reacciones iii. UniRef: Agrupa secuencias de proteínas de UniProt, incluidas las isoformas iv. KEGG: Anota las funciones de los genes en los sistemas biológicos Estas bases de datos ayudaron a clasificar los genes y las vías identificadas en *Aspergillus salvadorensis*, contribuyendo a una comprensión

más profunda de su potencial biológico.

### 3. Resultados y análisis.

#### 3.1 La extracción del tinte negro.



**Foto 1.** Cultivo en placa y tubo de *Aspergillus salvadorensis*

En la Foto 1. Por lo general, la melanina, producida por el hongo *Aspergillus* en condiciones de laboratorio, es un procedimiento metódico que comienza con el cultivo del microorganismo. Dado que este pigmento es inherentemente insoluble en muchos disolventes, se requieren pasos específicos para su manipulación y tratamiento. El proceso comienza con el cultivo de *Aspergillus*, donde el hongo se siembra en un medio de agar Sabouraud, que proporciona nutrientes esenciales como fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (peptonas o sales). El cultivo se cultiva en condiciones controladas, a temperatura ambiente o ligeramente superior (aproximadamente 25–30°C) y con alta humedad. Este entorno estimula la producción de grandes cantidades de melanina, especialmente si el hongo está sujeto a factores estresantes ambientales como cambios de pH o radiación UV. Una vez que el hongo ha crecido y sintetizado la melanina en el medio, se recolecta y prepara la biomasa. La biomasa de *Aspergillus*, que contiene el pigmento, se separa del medio de cultivo líquido mediante métodos como la centrifugación o la filtración. Esta biomasa fúngica debe lavarse con agua destilada para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo que pueda interferir con la extracción. Opcionalmente, la biomasa se puede secar a baja temperatura (40-50°C) en un horno para facilitar la etapa de extracción. La extracción de melanina es el paso crucial debido a la insolubilidad del pigmento. El método más común se basa en la solubilidad de la melanina en soluciones alcalinas. La biomasa se mezcla con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1-2% y se calienta suavemente (a aproximadamente 60-80°C) durante varias horas. Esto permite que la melanina se disuelva en el álcali. La solución resultante se filtra para separar la biomasa insoluble, y el filtrado, que contiene el pigmento disuelto, se neutraliza con un ácido como el

ácido clorhídrico (HCl) hasta que se cierra un pH to 7 se alcanza. Esta acidificación provoca la precipitación de melanina, que posteriormente se recupera por filtración y se seca. Alternativamente, se pueden emplear otros métodos de extracción. Si la extracción alcalina es insuficiente, se pueden utilizar disolventes orgánicos como etanol o metanol; En este caso, la biomasa se mezcla con el disolvente, se agita con un ligero calentamiento y se filtra el pigmento, permitiendo que el disolvente se evapore para obtener la melanina seca. El ácido clorhídrico concentrado también se usa a veces junto con el calentamiento para disolver y extraer la melanina, que luego se precipita y se separa. Después de la extracción, la melanina puede someterse a una purificación de pigmentos. Dependiendo del nivel de pureza requerido para su uso final, se pueden aplicar técnicas como precipitación adicional, diálisis para eliminar impurezas y otros metabolitos fúngicos, o cromatografía en columna. Finalmente, el pigmento extraído y purificado pasa por secado y almacenamiento. Se obtiene un polvo de melanina seco utilizando un liofilizador o un horno de baja temperatura (40-50°C). Este pigmento seco debe almacenarse en condiciones oscuras y secas para evitar su descomposición o pérdida de color debido a la exposición a la luz o la humedad. En resumen, el protocolo de extracción de melanina de *Aspergillus* implica el cultivo controlado del hongo, la recolección de la biomasa y, predominantemente, la extracción del pigmento mediante el uso de soluciones alcalinas (NaOH), aunque se pueden emplear otros disolventes como etanol o metanol. El proceso concluye con la purificación, secado y almacenamiento del tinte, pasos que se pueden ajustar para optimizar la extracción según las necesidades de la aplicación.

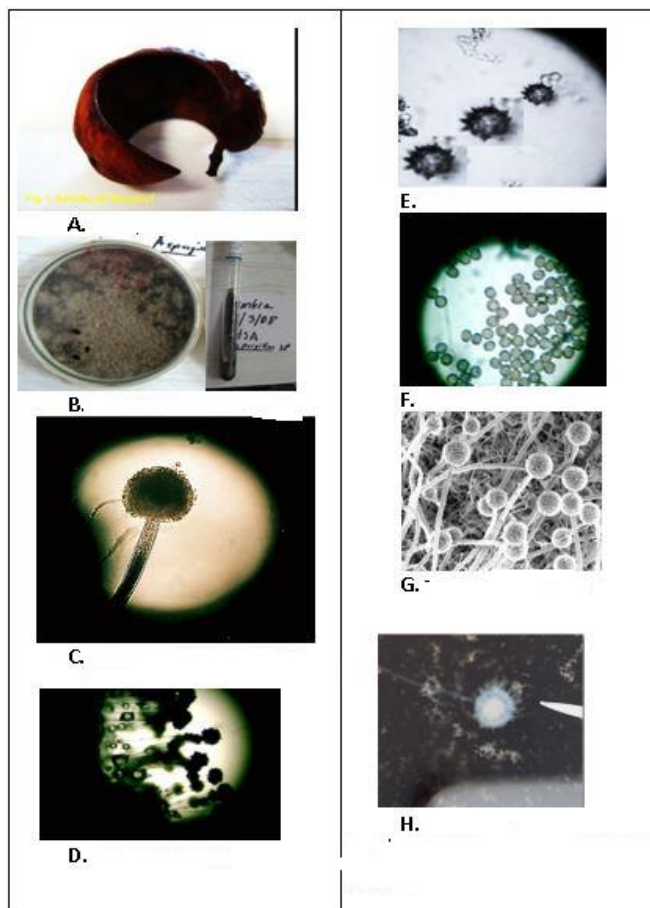
#### 3.2. Caracterización fenotípica de *Aspergillus* de El Salvador.

Del árbol llamado NACASCOL cuyo nombre científico es *Caesalpinia coriaria*, de la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia*, una planta leguminosa con un tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo, cada una con más de 10 folíolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, Las semillas son de aproximadamente 3 a 4 cm de largo, ápice redondeado, semillas marrones de aspecto negro, de las cuales crece un hongo cuyo parecido es con un posible *Aspergillus sp.* El árbol *Caesalpinia coriaria* contiene taninos, triterpenos, glucósidos y flavonoides. El hongo se reproduce exclusivamente en las semillas del árbol de Nacascal, a partir de las cuales se prepara para la extracción y preparación del tinte y luego se cultiva in vitro para la producción del tinte por artesanos salvadoreños. [51]. El hongo que se encuentra en las semillas se

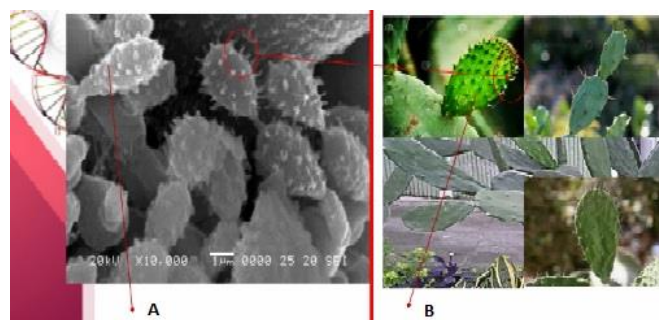
describe de la siguiente manera: Esterigmas. La cabeza de los conidios es negra, conidióforo liso de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de largo con conidios moderados o esporas internas de 1 a 3 micras, de color marrón a negro. Es un hongo filamentos hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Características macroscópicas: Cuando se cultivan en medio especial de Saboraud, producen una coloración negra con producción de pigmento en la trompa en la región posterior de las trompas en 7 días. En el cultivo de agar Saboraud en placa y tubo: la colonia su micelio es blanco con aspecto columnar y luego se vuelve negro. La textura de las colonias, parecen algodón o terciopelo, no hay esclerotes. El reverso de la colonia es negro o negro pigmentado dependiendo del agente oxidante, baja altura del micelio, apariencia de la colonia es negra polvoriento. Es un hongo filamentos. Características microscópicas: El conidióforo de *Aspergillus* tiene tres partes distintas: una vesícula globosa terminal con un filido uniseriado sin metal, un estípote tubular y la célula del pie que une el conidióforo con el micelio. Los conidióforos son de paredes lisas y rugosas y se agrupan para formar una masa compacta, hialina o pigmentada y miden de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. En su interior se observan cientos de esporas o conidios. La espora es esférica e irregular, aseptada, ameropora, coloreada y oscura del tipo feospora columnar. La vesícula es globosa con 52-66  $\mu\text{m}$  de diámetro con una longitud de estípote de 100-300  $\mu\text{m}$ , un ancho de estípote de 2-2  $\mu\text{m}$ , ornamentación irregular y produce filalidas a su alrededor. Los filalidos son monoseriados, las ramas primarias miden 30  $\mu\text{m}$  de largo, cortas y 8 micras de largo, de las que brotan los conidios, que son globosos y rugosos de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color marrón marrón o marrón a negro. El diámetro de la colonia es de 9-10  $\mu\text{m}$ , los conidios son columnares y tienen una longitud de 3-5  $\mu\text{m}$  y un ancho de 1,96-2  $\mu\text{m}$ . Cabezas de conidios lisos con una pared redonda e irregular, dispuestas en una columna; estípotes lisos, pronunciados, de paredes delgadas, de color marrón a negro; no se observa columela; hay abundantes conidios que se desprenden de la cabeza; Tiene una fila de filalidas. El esporangio es una estructura peridial globosa simple, el esterigma es negro. Los conidios marrones maduros son esféricos con abundantes proyecciones espinosas en toda la periferia; y los centrales son pocos, formando espículas en número mayor que diez. Los conidios tienen un aspecto esférico en forma de mazo con espículas, de los extremos emergen largos filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una cáscara sólida. Las esporas asexuales inmaduras son esféricas, de paredes delgadas, incoloras, de gran tamaño, que luego se rellenan para formar masas marrones internas. El conidióforo es largo, liso, uniseriado, con abundantes

esporas. En general, la espora es alargada e irregular, aseptada, ameroporous, colored, and dark of the type feospora, grande, con un diámetro de 1 a 3  $\mu\text{m}$ ; Las hifas no son septadas con micelio continuo. La cabeza no es radiada, es columnar, es uniserial, de la que se desprenden los conidios, crece a temperatura ambiente de 37°C. Los conidios / esporas asexuales inmaduros son irregulares con una pared delgada e incolora de gran tamaño, que luego se rellenan formando masas internas marrones, la apariencia de la colonia es de color negro polvoriento. El micelio es corto o aplanado y delgado y negro a medida que envejece. Esta especie de *Aspergillus* encontrada, se sugiere que dada su caracterización morfológica es otra encontrada en El Salvador deducida por la clasificación taxonómica internacional. Al comparar tanto el *niger* como la especie descubierta, la vesícula de la especie *niger* está irradiada con conidios redondos y la otra descubierta tiene la forma de un mazo alargado sin irradiación. A 100x se puede observar que los conidios del *niger* son redondos con paredes gruesas y un centro liso biseriado, con métula y radiado [46]. El de la nueva especie tiene espículas que salen de la armadura. Se pueden observar ambos conidios, en los que se destaca que los conidios de la nueva especie no están teñidos con lactofenol azul algodón y los de *niger* sí [51]. *Aspergillus* tiene reproducción asexual porque tiene formación de conidios, al principio el micelio es blanco y luego después de semanas a temperatura ambiente cambia a negro, con aumento progresivo de la esporulación marrón. Estos crecen en los extremos de los filalidos. Debido a la presencia de pigmentos, se ve de color negro. El hongo del género *Aspergillus spp* tiene la particularidad de ser productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos. [43-14]. Las hifas continúan su camino en un conididóforo que en su extremo terminal termina en una cabeza conidial globosa de la que emergen los filidos y las esporas o conidios se desprenden para volver a su ciclo. Cada hifa, en su extremo, forma cabezas conidiales globosas que pueden producir más de 500.000 conidios. [31]. Estos conidios a 100x tienen una apariencia áspera como pectorales, pared gruesa con espículas marrones que se proyectan hacia afuera, rellenas y enteras que no están coloreadas con lactofenol azul algodón. Desde la base de las hifas, cada conidio es empujado hacia el interior del conididóforo hasta el final hasta llegar a la vesícula donde se acumula, ejerciendo un efecto mecánico de presión hacia el exterior desde donde emerge de los filidos hacia el exterior, esto es constante una y otra vez. Las hifas son estructuras cilíndricas filamentosas que forman el cuerpo de los hongos multicelulares. Están formados

por una fila de células alargadas envueltas por una pared celular quitinosa. Las células que lo componen pueden o no estar separadas entre sí por una pared celular transversal llamada septos. Estos conidios se consideran infecciosos y constituyen el punto de partida para el desarrollo del micelio del hongo. Las hifas uniseriadas suelen ser transparentes donde las esporas son visibles. Es un hongo que produce micotoxinas que son consideradas como metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos que producen aflatoxinas B1 y M1 que son cancerígenas, otros también lo asocian con micotoxinas u ocratoxinas que son metabolitos secundarios de las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*. [9, 40, 11, 34] principalmente *Aspergillus flavus* con aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y *Asperillus parasiticus* ambos relacionados con aspergiloma pulmonar o absceso pulmonar o también varios cánceres de hígado, riñón, páncreas, colorrectal. [9-47-48-50]. El hongo en estudio produce micotoxinas y péptidos bioactivos relacionados con las enfermedades pulmonares de la aspergilosis. El crecimiento en el tubo con Saboraud después de semanas se vuelve negro aterciopelado y plano. En una placa de Petri, cuando la colonia es vieja, las cadenas de conidios se desprenden de la cabeza, asemejándose a una caída brusca, exponiendo solo la vesícula biliar rodeada por un halo casi negro. Cuando se observa bajo un microscopio de 40x, se observan más de 20-30 abundantes conidios marrones por campo que no están teñidos con lactofenol azul de algodón. Como tiene más de 1 a 2 meses en Agar saboraud, se seca con el medio y toda la colonia se encoge, por lo que el hongo no esporula sino que libera la espora. Pero los conidios son viables, por lo que si se realiza un cultivo puro en una nueva resiembra, el hongo vuelve a crecer en condiciones óptimas. En la placa de Petri, el crecimiento es similar, excepto que al principio el micelio es blanco y luego se vuelve negro. No se observan esclerotes, que es característico del *Níger*, pero en nuestro caso no ocurre. Con el tiempo, más de un mes, se vuelve negro aterciopelado. La Figura 1 muestra la caracterización fenotípica descrita anteriormente.



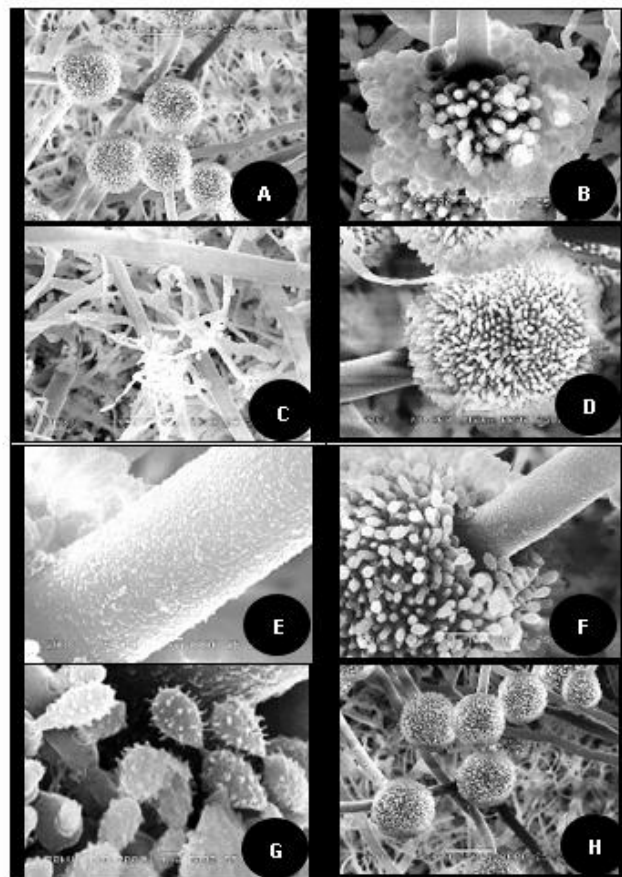
**Figura 1.** *Aspergillus salvadorensis*. Caracterización fenotípica. A. seem Nacascol, B. cultivo y tubo Saboraud, C. *Aspergillus* cabezas conidiales 100x, D. Microcultivo cabeza conidial 100x, E. Conidios 100x, expandidos, F. Conidia 100x, G. conidiophorus y vesículas cabezas conidiales.



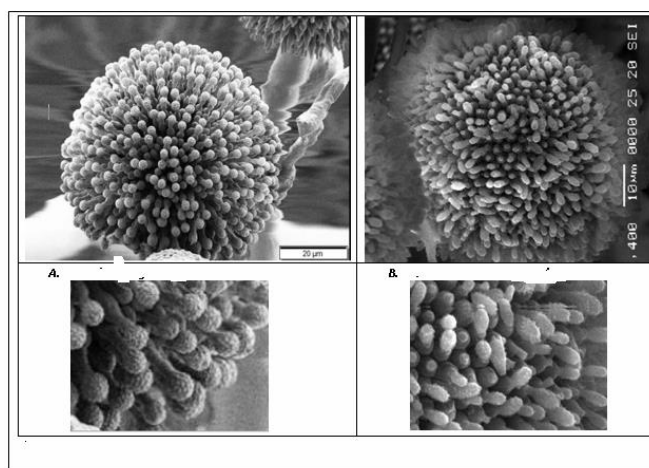
**Figura 2.** Comparación de especies con planta de cactus natural. *Aspergillus salvadorensis*.

En la Figura 2. Comparación de las especies con conidios de espículas con la planta de cactus natural que también observó espículas. Estos le dan resistencia al calor y proporcionan humedad. Pueden sobrevivir a temperaturas superiores a 60-100 °C o más. Las espinas o espículas lo protegen del calor al proporcionar humedad. En la Figura 3. Por el método de microscopía electrónica de barrido de laboratorio, se encontró que

dos semanas después del cultivo, los conidios emergen de los filalidos uniseriados en la columna de vesículas. Hubo un rápido crecimiento de la esporulación en cinco minutos, en una hora había millones de esporas en 10 campos. Se observa el conidióforo hialino rugoso con una cabeza ogli e hifas, en la Figura C se observa un alargamiento de las hifas acumuladas con filamento y ramificación. Hay conidios en forma de raqueta Figura G. Este *Aspergillus* está en condiciones de favorecer las altas temperaturas ya que la humedad relativa detiene el crecimiento de hongos que producen estas toxinas como aflatoxinas, cuando se expone al calor crece y es resistente al calor. Los hongos están formados por una pared compuesta por un 80% de carbohidratos que constituye el 30% del peso seco, esta pared es rígida lo que permite protegerla. Su composición química se basa en proteínas y glicoproteínas en un 10%, lípidos en un 8%, minerales como calcio, magnesio y fósforo. Tienen componentes de quitina, quitosanos, peptidoglicanos y mananos. En el laboratorio, la quitina se ablanda con hidróxido de potasio al 40% para su estudio morfológico. [18]. Los hongos no tienen celulosa en la mayoría de ellos, a diferencia de los vegetales. *Aspergillus* tiene un ciclo biológico muy simple, en el que se forman esporas para la reproducción y después de la germinación se forman hifas, que serán las formas invasivas del hongo. Las esporas se encuentran en la angiospora, por lo que tienen una alta tasa de esporulación y por lo tanto su concentración en el ambiente es alta. El tamaño de las esporas o conidios es de 0,2 a 3,5 micras. [1-4]. El alvéolo pulmonar es un saco que mide aproximadamente de 0,2 a 0,5 mm de diámetro, es más pequeño que los alvéolos por lo que se pueden inhalar fácilmente. Resisten altas temperaturas debido a su caparazón duro, algunos contienen melanina que los protege del calor y pueden viajar kilómetros de distancia a otras áreas y colonizar. Crecen rápidamente en menos de 5 días y ya han madurado. En la Figura 4 se muestran las cabezas de las especies *A.niger* y *A.salvadorensis*, en las que se observan las diferencias de *A.niger*, su cabeza es redonda, radiada y biserializada con metula, mientras que *A.salvadorensis* tienen la forma de un mazo columnar alargado en su extremo uniserial, sin cétula. Múltiples especies y variedades del género *Aspergillus* circulan por todo el mundo, Rapper y Fennell califican alrededor de 900 especies de *Aspergillus se conocen*, que en 18 grupos, de los cuales solo 12 están relacionados con enfermedades humanas: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus* et al. (Alcalá, 2018), (Ruiz, 2018) En general, el género *Aspergillus* tiene entre 30-40 megabases (Mb), lo que equivale a unos 30-40 millones de pares de bases (pb) para ser considerados en una secuenciación. [2-12-49].



**Figura 3.** *Aspergillus salvadorensis* Microfotografía electrónica de barrido. Cortesía de CENSALUD por el Dr. Vianney de Abrego. A. Morfología *Aspergillus*, B. vesícula, C: Zapata, alargamiento de hifas con filamento y ramificación D. Cabeza de conidios, E. codióforo rugoso, F. vesícula globosa y filáida, G. conidios, H. cabeza de conidiales columnares y conidióforos.



**Figura 4.** Cabezas: vesícula globosa radial de la especie *A. niger* y vesícula globosa columnar de *A. salvadorensis*.

### 3.3. Caracterización genotípica

PCR preliminar

En la Figura 5. Se observa la PCR de la muestra de la especie, en la que destaca en primer lugar que es del género *Aspergillus spp.* En el gel de agarosa, los productos de PCR o amplicones se representan mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases. Se observan varias muestras y se destacan varias especies comparables a la muestra de estudio.

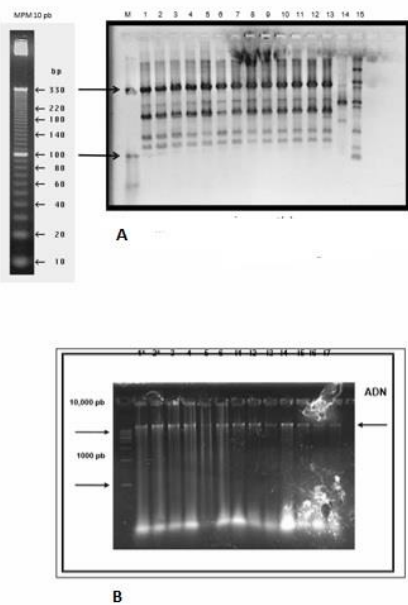


Figura 5. Muestra de PCR de diferentes especies. El Salvador. *Aspergillus salvadorensis* Fuente: Instituto de Biología Molecular. México.

#### PCR

Extracción de ADNg.

Extracción de ADNg *Aspergillus*

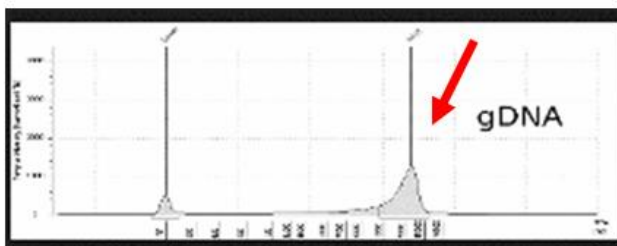


Figura 6. Extracción de ADNg de *Aspergillus sp* MACROGEN INC. 2024.

Análisis. En la Figura 6. Se observó la extracción de ADNg de la cinta de cribado de ADNg de TapeStation, obteniendo una concentración máxima de 12.297 ng/ul, volumen 30 ul, cantidad total 0,369 y DIN 6.4 nivel

máximo 8732 intensidad de muestra para 15000 pb en control de calidad. Esto indica que la secuenciación e identificación del hongo puede continuar. En la primera curva, la muestra de su carga fue insuficiente. Se refiere al ADN extraído de células o micelio, que contiene la información genética completa de un organismo en función de la cantidad, calidad o características del ADN total extraído de una muestra antes de la secuenciación. Los cebadores deben diseñarse especialmente para garantizar una alta especificidad y generar amplicones que varían en tamaño de 100 a 150 pb. Una concentración alta: Indica una buena cantidad de ADN extraído, que es esencial para la secuenciación. Si no hay suficiente ADN, la calidad de la secuenciación puede verse comprometida. Baja concentración: Puede indicar problemas con la extracción o que la muestra tiene una baja cantidad de ADN. El ADNg genómico es el ADN que contiene la información genética completa de un organismo, incluidos todos los genes y regiones reguladoras presentes en su genoma.

Técnica de qPCR.

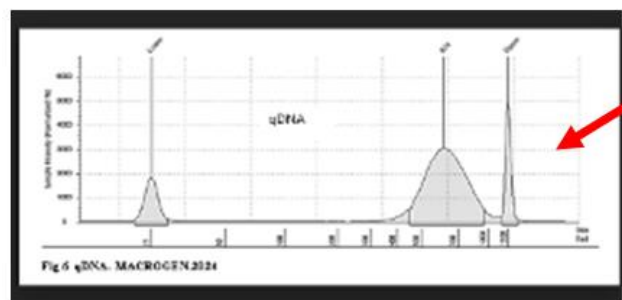


Figura 7. ADNq. *Aspergillus salvadorensis* MACROGEN INC. 2024.

En la Figura 7. Se observa a partir de la muestra enviada desde El Salvador de la qPCR LightCycle, se obtuvieron 624 pb a una concentración de 103,24 nM y 41,87 ng/ul con la biblioteca TruSeq Nano DNA (350\_META), lo que indica que la prueba pasa a la siguiente etapa, que es la construcción con 32 kits de biblioteca que van de 5 a 10 nM en la plataforma NovaSeq. Se refiere a la calidad e indica una preparación de ADN que ha sido tratada y analizada que cumple con ciertos estándares de pureza y calidad, lo cual es esencial para aplicaciones en biología molecular, como la secuenciación de ADN o la PCR. Esto implica el aislamiento de ADN de alta calidad utilizando métodos como la espectrofotometría o la electroforesis en gel. Indica que a altas concentraciones: Las muestras de ADN >10 ng/μL son ideales para la secuenciación, ya que aseguran que haya suficiente material genético para generar lecturas precisas. Por otro lado, a bajas concentraciones: pueden requerir concentración

adicional o repetir la extracción para garantizar suficiente ADN para el análisis. Para secuenciar un hongo, el número de pares de bases necesarios para secuenciar hongos puede variar según el objetivo del estudio y el tipo de secuenciación que se utilice. Para obtener una cobertura adecuada de todo el genoma de un hongo, generalmente es necesario secuenciar millones de pares de bases. La cantidad exacta depende del tamaño del genoma del hongo en cuestión. Por ejemplo, los genomas de hongos pueden variar desde unas pocas megabases hasta más de 100 Mb de megabases. Si desea secuenciar regiones específicas o ciertos genes, la cantidad de pares de bases requeridos será mucho menor. Esto podría ser del orden de miles o millones de pares de bases, dependiendo del número de regiones de interés. En otras palabras, es ADN cuantificado. [37-21].

#### 1) cDNA librerías

Se utilizaron 33 kits de estanterías. Se refiere a evaluar la calidad y representatividad de la biblioteca de ADNc preparada para la secuenciación. Esta técnica se usa a menudo para crear una copia de ADN complementaria de ARNm de un organismo específico. También se refiere a la visualización de la cantidad y/o calidad de ADN bicatenario extraído de una muestra para su posterior análisis, como la secuenciación. Si los fragmentos son cortos: es una indicación de degradación del ARN o preparación ineficiente de la biblioteca. Si los fragmentos son largos: indica problemas en la fragmentación del ARN durante la preparación. Es decir, se refiere al ADN complementario. Este tipo de ADN se genera a partir de ARN mensajero (ARNm) a través de un proceso llamado transcripción inversa. El ADNc se utiliza para crear una biblioteca de secuenciación. Los fragmentos de ADNc se preparan agregando adaptadores a sus extremos. Estos adaptadores permiten que los fragmentos se unan a la superficie del flujo celular y se amplifiquen durante el proceso de secuenciación.

#### 2) dsDNA

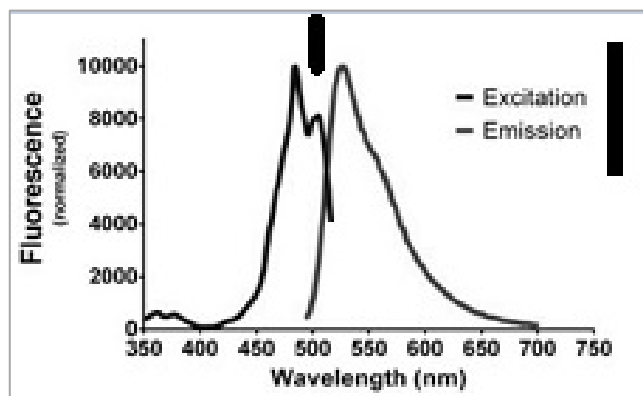


Figura 8. Extracción de dsDNA.

Se refiere al ADN bicatenario, si tiene una concentración alta: Un valor alto en el gráfico indica una buena cantidad de ADN bicatenario, lo cual es ideal para la secuenciación. Por ejemplo, las concentraciones superiores a 10 ng/μL generalmente se consideran adecuadas para la mayoría de las técnicas de secuenciación. Si es baja concentración: indica problemas con la extracción de ADN y puede requerir concentraciones adicionales. Es decir, el ADN bicatenario se desnaturaliza en ADN monocatenario para permitir la lectura de secuencias de nucleótidos. Durante la secuenciación, estos fragmentos de ADN se amplifican y leen para determinar la secuencia de nucleótidos correcta. En MacroGen son los archivos FASTQ los que contienen las secuencias de nucleótidos leídas directamente de la máquina de secuenciación, acompañadas de información de calidad.

3) Bases totales de un genoma: bp. Se reporta un valor de 11.705.895.990 pb. Este valor indica que en el contexto del ADN se refiere a la cantidad total de nucleótidos (o bases nitrogenadas) presentes en una muestra de ADN. En este caso, podría indicar la cantidad total de bases en picomoles, o alguna otra medida cuantitativa, que están presentes en la muestra que se está analizando. Es decir, contar cuántas guaninas, citoquinas y adenina y timinas hay en la muestra. Es decir, 5.735.889.035,1 eran GC que contienen este número de nucleótidos que contienen la base nitrogenada GC y 5.852.947.995 eran AT, es decir, existe este número de nucleótidos que contiene la base nitrogenada AT. En porcentaje, el total de bases secuenciadas en Gb expresado como porcentaje fue de 11,7, es decir, la cantidad total de nucleótidos o bases nitrogenadas presentes en la muestra de ADN. En su efecto, 11.7 la cantidad total de picomoles presentes en la muestra analizada.

4) Lecturas totales: Valor. 77,522,490. Esto podría indicar que se han registrado un total de 77.522 lecturas. Se producen 77.522.490 lecturas y las bases de lectura total son de 11,7 Gbp. En otras palabras, el 66% de las lecturas de ADN es la proporción de secuencias que se leyeron con éxito de los fragmentos de ADN que se han secuenciado y luego ensamblado o alineado para reconstruir toda la secuencia. Este porcentaje también indica que se ha secuenciado correctamente y ha generado datos de calidad y el 34% restante podría corresponder a lecturas fallidas o de baja calidad o que no se pudieron alinear o ensamblar correctamente.

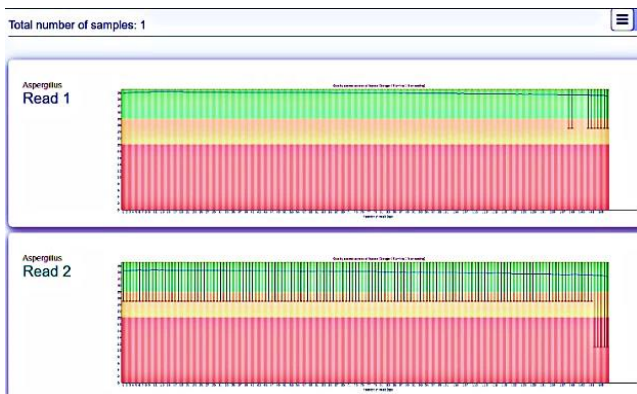
5) GC/AT Contenido: tiene un % de GC 49.7 y un % de AT de 50.30. Indica que hay un 49,7% de guanina-citoquina y un 50,30% de adenina-timina.

6) Contenido de GC: tiene un valor (%) de 49,7% que sugiere un equilibrio considerable entre los pares de bases GC y AT, lo que puede influir en la

estabilidad y las propiedades de la secuencia de ADN. Porcentaje de GC: 50%. Indica que el 50% de las bases en la secuencia de ADN son guanina o citosina, mientras que el 50% restante es adenina o timina. Este porcentaje es una medida del equilibrio entre estos dos tipos de pares de bases en una secuencia.

- 7) Contenido de AT: El valor "55.0 AT %" se refiere al porcentaje de contenido de pares de bases de adenina-timina (AT) en una secuencia de ADN. Es decir, la composición del ADN, las bases adenina (A) y timina (T), se emparejan entre sí mediante dos enlaces de hidrógeno. El contenido de AT en una secuencia de ADN se refiere a la proporción de bases de adenina y timina en comparación con las bases de guanina y citosina. Un porcentaje de AT del 50,0% AT% significa que el 50% de las bases en la secuencia de ADN son adenina o timina, mientras que el 50% restante corresponde a guanina o en general, un porcentaje de 50,0% de AT en una secuencia de ADN indica que la mayor parte de la secuencia está formada por pares de bases adenina-timina, con un equilibrio en los pares de bases.
- 8) Las métricas Q20 y Q30: su valor es Q 20 95.1 y Q 30 88.3. Un valor Q de 20 de 95.1 indica que tiene una puntuación alta, lo cual es bueno, porque si fuera bajo indicaría baja calidad lo que no sucedió.

*Calidad por ciclo:*



**Figura 9.** Calidad de los datos del ciclo de macrogenes.

En la **Figura 9**, la lectura 1 lectura 2 indica el grado de identificación en cada uno de estos ciclos. Se representa

comúnmente en un gráfico donde el eje X muestra los ciclos en posiciones de la secuencia, y el eje Y muestra una medida de calidad, a menudo en forma de una puntuación de calidad como el valor Q. Es un análisis de calidad realizado por FASTQC para lecturas sin procesar del genoma de *Aspergillus*. En la parte superior se refiere a la calidad. En la parte inferior se observa en la dirección 5' a 3' y viceversa en la dirección opuesta. El eje X son las bases y el eje Y es el valor de Q30. Los colores representan calidad, por lo que el verde indica alta calidad, el amarillo indica calidad intermedia y el rosa de baja calidad. Un valor de alta calidad por ciclo sugiere que la secuenciación es precisa y que las bases en ese ciclo específico están correctamente identificadas. Un valor bajo podría indicar problemas con la lectura en ese momento, como errores de secuenciación o problemas con la muestra.

- 1) Datos brutos. Informan un valor. 38,761,245 n es el número de lecturas o fragmentos de ADN que se generaron durante el experimento.
- 2) Calidad del adaptador y recorte. (Calidad y ajuste del adaptador). Informan de un valor de 32.535.420 de que se quitaron los adaptadores no deseados.
- 3) Eliminación de contaminantes. (Eliminación de contaminantes). Informan un valor de 30,961,740. Se refiere a 30,961,740 como un valor alto que se identificó como contaminante y se eliminó inmediatamente durante el proceso de secuenciación. Estos contaminantes pueden incluir secuencias no deseadas, como ADN de bacterias, virus o incluso fragmentos de ADN humano no deseados si está trabajando con una muestra de otro organismo. La eliminación de contaminantes es un paso crucial en el análisis de datos de secuenciación para garantizar que los resultados sean precisos y reflejen solo las secuencias de interés. Esto ayuda a mejorar la calidad y la fiabilidad de los datos finales utilizados en estudios posteriores.
- 4) Control de calidad de la lectura previa. (QC aprobado leído). Reportan un valor de 79,88 indicando que fue aceptado como un buen desempeño del proceso.

*Análisis taxonómico: - Taxonomía Krona:*

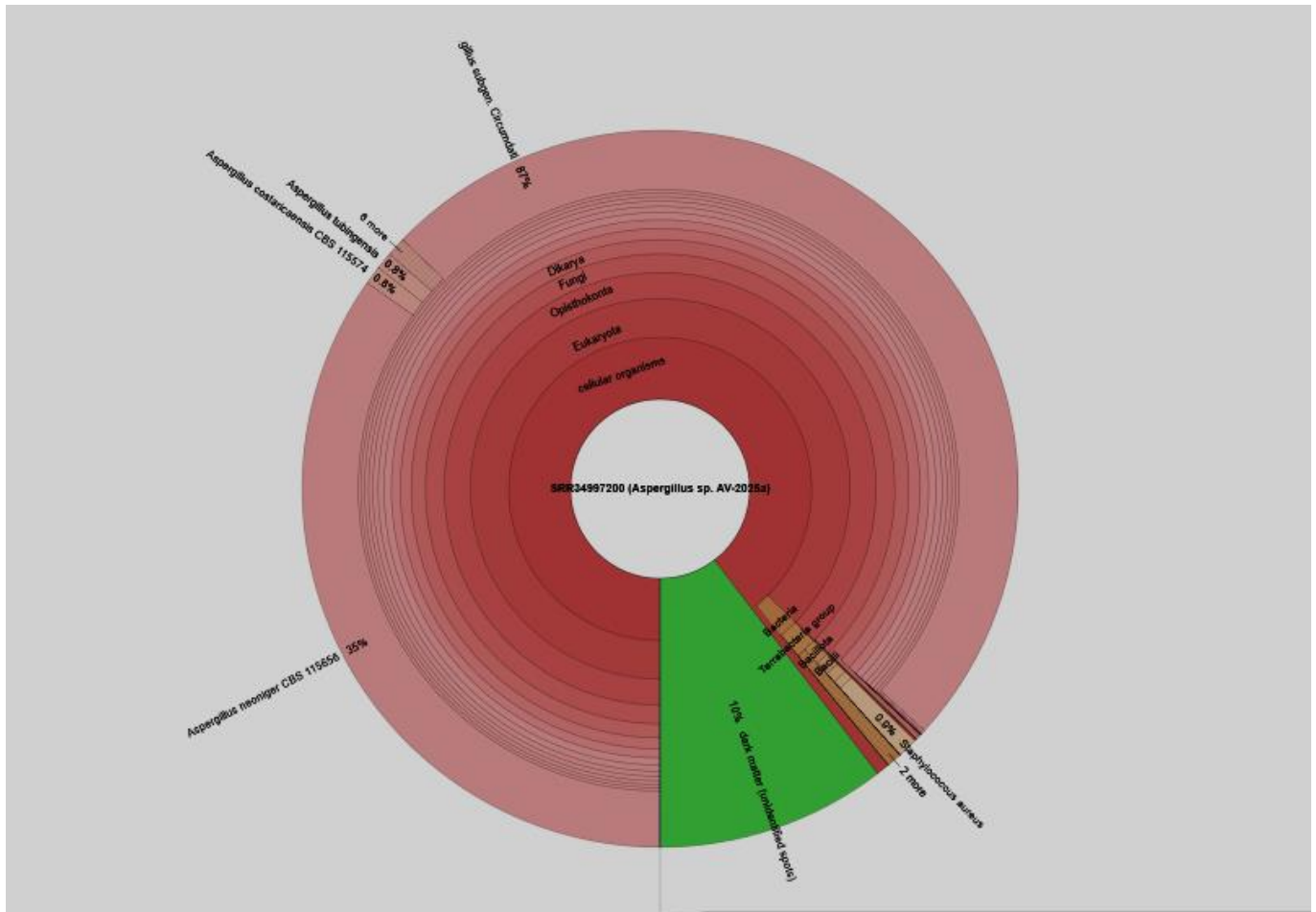


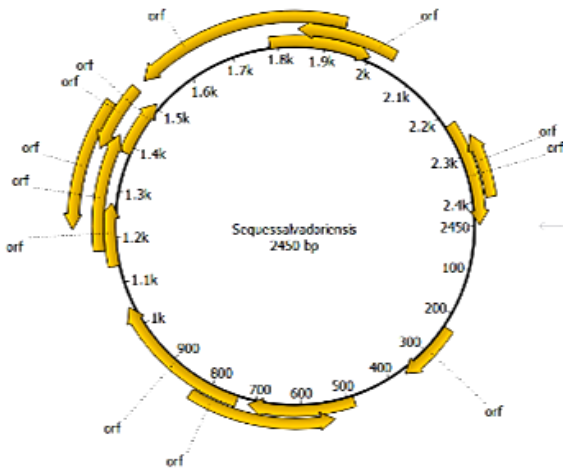
Figura 10. Taxonomía Krona del análisis taxonómico. GenBank 2025

Análisis en [Figura 10](#) : 89,60%, lecturas identificadas, 10,40% lecturas no identificadas, organismos celulares: 89,60%, eucariotas: 87,40%, opisthokonta: 87,34%, hongos: 87,29% *Aspergillus* subgen. *Circumdati*: 86,79%, *Aspergillus neoniger* CBS 115656: 34,75%, Metazoos: 0,01%, Bacterias: 1,64%, Virus: <0,01%.

En la vista Krona de la [Figura 10](#) generada por GenBank, se presenta un gráfico de anillos (sunburst), el cual es producido por Krona, una herramienta interactiva utilizada comúnmente para visualizar datos metagenómicos o taxonómicos, como aquellos provenientes de un análisis de secuencias de GenBank o del SRA (Sequence Read Archive). El análisis corresponde al experimento con ID SRR34997200, donde el organismo predominante es un hongo del género *Aspergillus*, específicamente la cepa AV-2025a. Los colores en el gráfico tienen el siguiente significado: Rojo: Representa la mayor parte de las secuencias asignadas a organismos celulares, principalmente dentro del dominio Eukaryota (eucariotas). Verde: Secuencias asignadas a otros dominios o grupos, posiblemente bacterias, arqueas o

secuencias no clasificadas. Azul (pequeño segmento): Indica secuencias asignadas a virus, con una muy baja abundancia (0.00001%). El gráfico se expande en niveles desde el centro hacia afuera, siguiendo una jerarquía taxonómica que abarca organismos celulares, Eukaryota, Opisthokonta, Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes del género *Aspergillus*. Dentro del grupo *Aspergillus*, el 35% de las secuencias se asignan a la especie *Aspergillus neoniger* CBS 115655, con un total de 9.9 Gbases. Este resultado se debe a que el alineamiento se realizó con datos preprocesados y no con datos crudos. Aunque la muestra presenta fragmentos muy similares a *A. neoniger*, un análisis más profundo revela que se trata de una entidad genética distinta. Este tipo de resultado es común cuando se describe una nueva especie, ya que inicialmente puede parecer estrechamente relacionada con una especie conocida, pero la comparación genómica demuestra diferencias significativas entre *A. salvadorensis* y *A. neoniger*. En este caso, la similitud del 38% sugiere que, aunque las secuencias más cortas coinciden con *A. neoniger* (lo que explica el 99% de coincidencia





**Figura 13.** Gráfico ORF de la secuencia *Sequesalvadoriensis* de 2450 pb.

En la **Figura 13** hay un gráfico circular ORF (Open Reading Frame) que implica interpretar la representación gráfica de los marcos de lectura en un contexto biológico, generalmente en estudios genómicos. Estructura circular: El gráfico suele ser circular y los resultados son ADN circular, que representa la secuencia de ADN. Los puntos o segmentos del círculo corresponden a diferentes regiones del ADN. Marcos de lectura: Busque marcos de lectura abiertos, que estén marcados y presentados como líneas o bloques. Cada ORF representa una posible secuencia codificante para una proteína. Dirección: Observe la dirección de los ORF. Pueden estar en la cadena directa (5' a 3') o en la cadena complementaria (3' a 5'). Esto indica cómo se transcriben y traducen. Tamaño: Los ORF de diferentes longitudes pueden indicar diferentes potenciales de codificación. Generalmente, es más probable que un ORF más largo codifique una proteína funcional. En un gráfico circular de ORF, "1.7k" generalmente se refiere a la longitud de un marco de lectura abierto (ORF) que mide 1,700 pares de bases (pb) de longitud. La "k" significa "kilo", que en este caso significa mil. Esto implica que el ORF en cuestión podría codificar una proteína, y su longitud es relevante para comprender su función potencial. Un ORF de 1,7k es relativamente largo y podría ser indicativo de un gen que codifica una proteína de tamaño significativo. En un gráfico circular ORF, las flechas suelen tener significados específicos relacionados con la información genética representada. Según la dirección de transcripción: Las flechas indican la dirección en la que el ADN se transcribe a ARN. Normalmente, apuntan de 5' a 3', que es la dirección en la que se sintetiza el ARN. Orientación génica: Pueden mostrar si el gen está en la cadena de sentido o en la cadena complementaria (antisentido). Una flecha hacia afuera en el círculo indica un gen en la hebra directa, mientras que una flecha hacia adentro puede representar un gen en la hebra complementaria. Señales de

promotor o terminador: Algunas flechas pueden apuntar a la ubicación de los promotores o terminadores, que son elementos reguladores que controlan la transcripción de genes. Relación entre ORF: En gráficos más complejos, las flechas pueden conectar diferentes ORF o genes, indicando relaciones funcionales o reguladoras entre ellos. En un gráfico ORF circular, las flechas que apuntan a la izquierda o a la derecha generalmente indican la dirección de transcripción de los marcos de lectura abiertos (ORF). Aquí hay más sobre lo que significa: Flechas derechas: Indican que el ORF correspondiente se encuentra en la hebra de ADN en la dirección 5' a 3', lo que significa que se está transcribiendo de esa hebra. Esto se considera el sentido o la cadena directa. Flechas a la izquierda: Indican que el ORF está en la cadena complementaria, transcrita en la dirección 3' a 5'. Esta cadena se conoce como antisentido. En resumen, la dirección de las flechas proporciona información sobre cómo se sintetiza el ARN a partir del ADN y la orientación de los genes en el genoma se orienta en la dirección opuesta a otros genes en la misma región del genoma.

### 3.4 Nueva especie del Genero *Aspergillus*.

De la secuencia a analizar del ADN de *Aspergillus salvadorensis*, proporcionada por MACROGEN INC Korea del Sur es: (una cadena circular simple del total 67M spots, 9.9G bases y 4.3Gb). Se tiene:

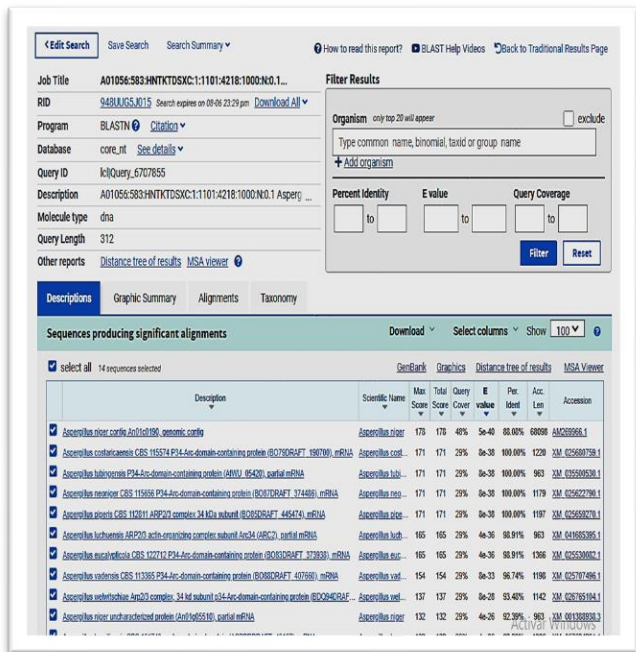
```

SRR3494884.1 AB1856:583:HNTKDSXC:1:1181:4218:1888:N:0:1 length=312
ACGGACGTTAAGCATGATCAAAATATGATGCATGCAGGAGACTCTGTGAAAGTGCATTTGTATGTAGTTCG
AAATTATTGGGTTACCTCTATCTCTAATCTAGCTCTTGACAGATCACCGAAACAACTACCCATACA
TTTGTCTTTTATGCTGGATTCTAAGTAAGCATGTTGACCTGGCTGCAAAATGACAGGAAAGCTA
CTTAGATGCTTTGATGCTGTAATGGAAGTAATCACGGAAAATCTGGATGTGGGAAATGTTCTCATAGCG
CGCTGTGGGTCAGGTGGCGATGTGCTGG
  
```

**Fig 14.** Secuenciación DNA del *Aspergillus salvadorensis*.

En la **Figura 14** se presenta un análisis básico de la secuencia: 1. Longitud: La secuencia tiene 310 pares de bases (pb). 2. Contenido de bases: El cálculo del contenido de bases (A, T, G, C) y el porcentaje de GC es el siguiente: A: 82 (26.6%), T: 82 (26.6%), G: 76 (24.7%), C: 69 (22.1%), con un contenido de GC del 46.8%. Este valor es típico de varias especies de *Aspergillus*. Región probable: ITS (Espaciador Transcrito Interno). Se realizó una comparación con bases de datos de ITS (como UNITE o NCBI BLAST) utilizando herramientas como BLASTn para verificar si la secuencia coincide con otras regiones ITS conocidas de *Aspergillus salvadorensis* o especies relacionadas. Las regiones ITS se encuentran entre los genes ribosomales 18S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – 28S. Para determinar si corresponde a ITS1 o ITS2, se busca la presencia de sitios conservados en 5.8S o 18S. La

secuencia muestra una alta similitud con secuencias típicas de ITS completa, lo que sugiere que probablemente abarca ITS1 + 5.8S + ITS2. La longitud de 310 pb es compatible con un fragmento ITS completo. Los trinucleótidos más comunes son: TGC, GAA, GAT y GTG. La secuencia GGAA se repite dos veces, lo que puede ser útil para el diseño de sondas o primers. Las especies más cercanas serían *A. neoniger* y *A. niger*, entre otras.



**Fig 15.** Cuadro referencia de similitudes con la secuencia del *A. salvadorensis*. FUENTE. MIH. BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

En la **Fig 15**. Se trata de una búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en la que se muestran las coincidencias (hits) entre tu secuencia consulta y las secuencias almacenadas en una base de datos. Se encontró que las especies más próximas son *A. neoniger* con un Total Score 171 – indica buena similitud global entre tu consulta y este hit. Query Cover con un 29% -solo ~29% de la secuencia fue alineada con mRNA se considera baja, a coincidencia probablemente corresponde a una región local fortuita con similitud, no a una identificación taxonómica sólida basada en ITS y con *niger* un 48%, Per: identidad el 100% en la región alineada, E-vakue 8e-38 es significativo no se trata de alineamiento casual. En conclusión: No hay evidencia fuerte de que la secuencia ITS de *Aspergillus salvadorensis* corresponda realmente a un gen codificante como ese mRNA de *A. neoniger*. La coincidencia puede deberse a regiones conservadas entre especies de *Aspergillus salvadorensis* y *A. neoniger*—o simplemente un fragmento con homología fortuita. Por lo tanto la secuencia de identidad del *A. salvadorensis* no es 100 %, entre el 29 al 48 %, siendo *A. neoniger* y *A. niger* los mas cercanos pero no representativos. Un ADN idéntico no siempre se traduce

en una morfología idéntica. En ocasiones, las variaciones en la forma y características de los organismos no surgen de diferencias en su ADN, sino de cómo se expresa ese ADN. Factores ambientales como la dieta, el clima o las interacciones sociales pueden influir en la activación o desactivación de ciertos genes, lo que lleva a la aparición de características morfológicas distintas. Este fenómeno puede resultar en la formación de una nueva especie, a pesar de que las especies involucradas tengan un 100% de similitud genética.

En el género *Aspergillus*, se han observado casos de especies crípticas, en las que varias especies presentan una similitud genética casi total o incluso idéntica, pero se diferencian en aspectos morfológicos o ecológicos. Estas diferencias pueden incluir: Variaciones morfológicas, como el tamaño o forma de las esporas, o el color de las colonias. Diferencias en el comportamiento de crecimiento, donde algunas especies crecen más rápido o prefieren ciertos sustratos. Capacidades patógenas distintas, con algunas especies mostrando mayor virulencia o una habilidad diferente para producir micotoxinas. Aunque dos cepas de *Aspergillus* compartan un 100% de similitud genética, es posible que existan diferencias en la expresión génica. Por ejemplo, ciertos genes responsables de la producción de micotoxinas o de la resistencia a antifúngicos pueden estar expresados de manera diferente o producir colorantes, lo que puede justificar la separación de estas cepas en especies distintas, aunque sus genomas sean casi idénticos. Si las cepas de una especie no pueden cruzarse con otras o muestran diferencias en su capacidad para producir micotoxinas o adaptarse a distintos entornos, esto puede ser una razón para clasificarlas como una nueva especie. En el caso de *Aspergillus salvadorensis*, su aislamiento en un entorno específico, como ciertos sustratos o climas de El Salvador, podría haber inducido adaptaciones únicas que no son tan evidentes a nivel genético, pero sí en las características morfológicas o funcionales. Además, si esta especie tiene un comportamiento reproductivo distinto o prefiere hábitats diferentes al de otras especies cercanas, esto refuerza la idea de que podría ser una nueva especie, incluso si su ADN es casi idéntico al de otras especies. *Aspergillus salvadorensis* La capacidad de producir colorantes es una propiedad metabólica interesante, ya que no todas las especies de *Aspergillus* tienen esta capacidad. Los colorantes producidos por hongos, especialmente en fungos industriales, pueden tener aplicaciones en la industria alimentaria, textil, cosmética o biotecnología. Si *A. salvadorensis* tiene una vía metabólica única que le permite producir colorantes específicos, esto sería una característica que podría justificar su clasificación como una nueva especie, ya

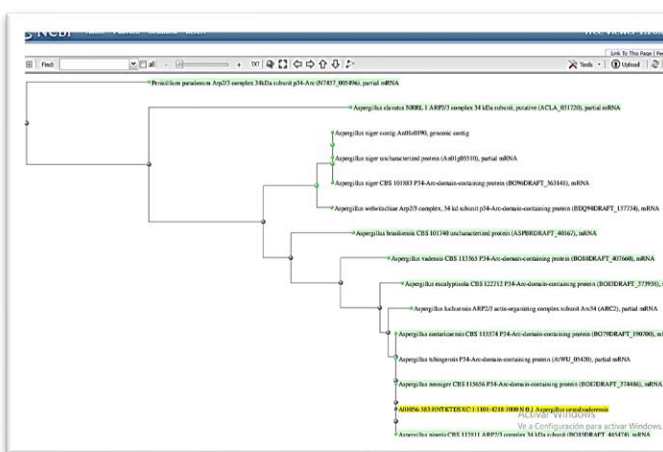
que esta habilidad podría ser el resultado de una evolución local en respuesta a condiciones ambientales particulares. El hecho de que *Aspergillus uessalvadorensis* se haya identificado en El Salvador sugiere que esta especie ha evolucionado para adaptarse a las condiciones ambientales específicas de la región, lo que refuerza la idea de que las especies pueden surgir debido a presiones selectivas locales. Varios factores ecológicos podrían haber influido en este proceso de adaptación, como: Clima y humedad: Las condiciones tropicales de El Salvador, con su alta humedad y temperaturas cálidas, crean un entorno ideal para el crecimiento de hongos como *Aspergillus*. Estas condiciones podrían haber favorecido el desarrollo de características únicas en la especie. Disponibilidad de nutrientes: La presencia de sustratos orgánicos, como los residuos agrícolas en la región, podría proporcionar una fuente rica de nutrientes para este hongo. Este factor podría haber influido en la habilidad del hongo para producir colorantes o otros compuestos metabólicos distintivos. Interacciones ecológicas: *A. uessalvadorensis* también podría haber desarrollado adaptaciones para interactuar con otros elementos de su ecosistema local, como plantas, animales o otros microorganismos, lo que lo hace aún más específico a su entorno. En resumen, la capacidad de *Aspergillus salvadorensis* para generar colorantes, sumada a su adaptación a las condiciones particulares de El Salvador, podría ser un factor crucial que lo distingue de otras especies del género, a pesar de la similitud genética. Este conjunto de características, tanto morfológicas como ecológicas, podría justificar su clasificación como una especie distinta. La evolución local y las presiones selectivas en El Salvador han inducido cambios que no solo se reflejan en su ADN, sino también en su comportamiento y funciones metabólicas. Este caso es un claro ejemplo de cómo la genética y la ecología pueden trabajar en conjunto para dar lugar a nuevas especies, incluso cuando la base genética es muy similar.

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

En la **Figura 16** se observa que la posición de *Aspergillus salvadorensis* en el árbol filogenético indica que está estrechamente relacionado con un subgrupo de especies del género *Aspergillus*, como *Aspergillus costarricensis*, *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus neoniger*, debido a que comparten un nodo de ramificación común, lo que sugiere un ancestro común más reciente. Al analizar las principales diferencias a nivel molecular entre *Aspergillus neoniger* y *Aspergillus salvadorensis*, se destacan aspectos relacionados con su genética de biosíntesis de toxinas, su taxonomía filogenética y su homología genética. *A. salvadorensis* es un miembro característico de la sección Flavi, con genes especializados en la producción de aflatoxinas, mientras que *A. neoniger* pertenece a la sección Nigri y presenta genes orientados hacia otras funciones metabólicas, como la producción de ocratoxinas. *Aspergillus salvadorensis* es una especie de hongo que forma parte del género *Aspergillus*, conocido por su capacidad para producir micotoxinas. Fue identificada en 2006, y su nombre hace referencia a El Salvador. Este descubrimiento ocurrió en el marco de una investigación sobre hongos productores de colorantes y más tarde en cultivos agrícolas, destacando su potencial impacto en la salud humana y animal debido a la producción de aflatoxinas, que son sustancias tóxicas producidas por algunas especies de *Aspergillus*. El hallazgo fue relevante porque amplió el conocimiento sobre las especies de *Aspergillus* en América Central y también porque subrayó su potencial como contaminante en productos agrícolas.

#### 4. Discusión

Se han descrito enfermedades del género *Aspergillus* en pacientes con defensas bajas, siendo la Aspergilosis pulmonar la más relevante. [1-2-3-6-19-28-41-42-47]. La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue inventada por Kary Mullis en 1983. El uso de PCR para el diagnóstico de *Aspergillus* se ha informado desde principios de la década de 1990. [19-27-36-44-48-55]. En 2006 se estableció la Iniciativa Europea de PCR de *Aspergillus*, en la que propuso protocolos estandarizados para la evaluación clínica generalizada de la PCR de *Aspergillus* de manera rápida y oportuna en los criterios diagnósticos de la enfermedad. Otra espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa; Una vez obtenidos estos iones, se separan según su masa y carga, y finalmente se detectan mediante un dispositivo espectrómetro de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight). [54]. Las técnicas modernas de secuenciación



**Fig 16.** Árbol filogenético. Fuente: MIH. BLAST

son de segunda y tercera generación. La segunda generación produce una gran cantidad de lecturas cortas de 25-400 pb de secuencias de ADN. En esta generación se destaca la empresa Illumina Inc, actualmente es la empresa que ofrece servicios de calidad y el estricto control en sus procedimientos es la vanguardia de este siglo. El concepto detrás de la tecnología NGS es similar a las técnicas de secuenciación de Sanger. El principio original del método de Sanger es el uso de desoxinucleótidos como terminadores de la cadena de ADN, donde evita una mayor replicación. Por lo tanto, se divide en cuatro reacciones de secuencias separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar que son: dATP, dGTP, dCTP, dTTP y ADN polimerasa. Terminan la elongación de la hebra, lo que permite la fragmentación del ADN de varios tamaños de longitud. [45]. En cambio, la tecnología de Illumina utiliza el método de secuenciación de síntesis, lo que permite la lectura paralela de millones de fragmentos al detectar las bases individuales a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento. Su método consiste en ciclos secuenciales de síntesis. Durante cada ciclo, los nucleótidos se identifican mediante excitación de fluoróforos, creando una imagen de un terminador reversible marcado con fluorescencia a medida que se agrega cada dNTP, y luego se separan para su entrada en la siguiente base. Al final, se obtiene una secuenciación base por base con datos de alta precisión y alta calidad. La secuenciación de tercera generación (TGS) son las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos (TGS), que permiten extensiones de hasta 2,3 Mb y no requieren amplificación previa. [25] Existe una tecnología Single Molecule, Real-time (SMRT) que permite incorporar lecturas de unos 60.000 pares de bases (pb), que ofrece una ventaja de trazar variaciones estructurales o que presentan dificultades en la amplificación de ciertas áreas del genoma de un estudio en particular. Su desventaja es que tiene la limitación de que se requiere una gran cantidad de ADN para poder secuenciar y obtener un resultado confiable. [21-5-52]. En otros estudios se reporta que el tamaño de los genomas es variado entre las diversas especies de *Aspergillus spp*, estas varían entre 28.81 y 33.289 kb, su diferencia de tamaño es de 323 a 4.479 kb. El número de genes varía entre 9630 y 12074 [49] en nuestro caso fue de 15000 pb. En definitiva, tras la extracción del ADNg en control de calidad, se realiza una qPCR en la que una máquina de qPCR mide la intensidad de la fluorescencia emitida por la sonda en cada ciclo. También se conoce como PCR cuantitativa en tiempo real, o qPCR, que es un método estándar para cuantificar los niveles de expresión génica en una muestra. En nuestro estudio, se utilizó una sonda fluorescente. Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) tienen poca sensibilidad en el propio ensayo

de PCR, que utiliza técnicas como la selección de genes con múltiples copias por genoma para determinar la cantidad total de ADN analizado. [26-44-30] Otros estudios informan que se han utilizado métodos basados en biología molecular para caracterizar y diferenciar el género *Aspergillus*, como el análisis de las secuencias que codifican los genes de los ARN ribosómicos eucariotas 18S, 5.8S y 28 [32]. En nuestro caso, se utilizó la extracción de ADN como método de tipificación molecular. La técnica RAPD se ha utilizado en estudios de determinación genética, para distinguir entre cepas de una especie, así como en análisis taxonómicos y evolutivos [16-24-29]. *Aspergillus* es filamentoso compuesto por cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuestos a la levadura, que se componen de una sola célula redonda. [13]. *Aspergillus* puede causar múltiples procesos patológicos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran: Debido al pequeño tamaño de sus conidios, permite su aspiración, provocando infección en el pulmón y senos paranasales; su capacidad para crecer rápidamente a 37°C, lo que lo hace ideal para afectar a los humanos; su capacidad para adherirse a las superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos. Para estudiar un hongo en particular, se pueden utilizar muestras orgánicas o estudios de metabolitos específicos de hongos para diferenciar las diferentes especies del género *Aspergillus*. [17]. La tecnología de secuenciación de Illumina, actualmente una secuenciación por síntesis (SBS), es una tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS). La tecnología NGS de Illumina utiliza un enfoque fundamentalmente diferente del método clásico de terminación de cadena de Sanger. La última tecnología SBS de Illumina utiliza la química XLEAP-SBS. Se crea una imagen de un terminador reversible marcado con fluorescencia a medida que se agrega cada dNTP y luego se corta para permitir la adición de la siguiente base. La combinación de inserciones cortas y lecturas más largas aumenta la capacidad de caracterizar completamente cualquier genoma. Los secuenciadores Illumina tienen una secuenciación de mayor calidad. Química XLEAP-SBS en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 están cuidadosamente diseñados para permitirle obtener más información en su laboratorio, con 14 configuraciones y longitudes de lectura de 1 × 50 pb a 2 × 300 pb, realiza 1.8 mil millones de lecturas de un solo extremo por ejecución para impulsar las aplicaciones más intensivas en datos en su secuenciador, estas lecturas de un solo extremo por ejecución 100 millones-1.8 mil millones Longitud máxima de lectura 2 × 300 bps. Realiza hasta 384 combinaciones duales únicas (UD) y 96 combinaciones combinatorias duales (CD). procesa 1-500 ng de ADN para genomas

pequeños o 100-500 ng de ADN para genomas grandes. Tamaño de inserción objetivo ~350 pb. La secuenciación metagenómica basada en NGS puede detectar miembros de la comunidad microbiana de muy baja abundancia que podrían pasarse por alto o que son demasiado costosos para identificarlos con otros métodos. El sistema Miseq hace que las lecturas individuales máximas por ejecución sean de 25 millones y la longitud máxima de lectura de 2 × 300 pb. [25] En nuestro estudio, se utilizó esta técnica de Illumina más el Informe de Secuenciación Metagenómica de escopeta llamado Informe de Secuenciación Metagenómica de Escopeta como se describió anteriormente.

## 5. Conclusiones

Esta investigación identificó 14 enzimas y metabolitos secundarios asociados con la biosíntesis de pigmentos negros en especies de *Aspergillus*, particularmente en condiciones de estrés oxidativo. Estos incluyen: NADPH-proteína ferrihemo reductasa, NADPH-quinona oxidoreductasa subunidades A, B, C, D, F, NADH-quinona oxidoreductasa subunidades G, H, I, URATO OXIDASA, Dihidrolipoamida deshidrogenasa (dependiente de FMN), NADH-azoreductasa, FMN reductasas dependientes de NADP (COGO431, COGO655), NADP oxidoreductasa, oxidoreductasa dependiente de coenzima F420. Estos componentes enzimáticos están involucrados en reacciones redox y se regulan al alza como respuesta celular al estrés oxidativo.

Los estudios para demostrar una especie en particular se basaron en la caracterización fenotípica y genotípica para la identificación taxonómica de la muestra de estudio, en la que ambos métodos se complementaron entre sí. Una nueva subespecie de hongo del género *Aspergillus* se encontró en las semillas de nacascal que son nativas de nuestro país y que se encuentran en la parte norte del país. Concluyendo que la taxonomía de la descripción será: Dominio: Eukaryota, Reino: Hongos, División: Ascomycota, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Género: *Aspergillus*, Especie: *Aspergillus salvadorensis*. Lo que se llamará en el futuro nombre científico binomial: *Aspergillus salvadorensis* A. Vásquez 2006. Del género *Aspergillus* y especie deriva el acrónimo *ues* que significa Universidad de El Salvador junto con *salvadorensis* del país El Salvador.

## Abreviaturas

**UES:** Universidad de El Salvador

**MACROGEN:** Macroscopic Phenotype of Gene

**MERK:** Merck Sharp and Dohme

**CENSALUD:** Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

## Gratitud y reconocimiento

A autoridades de la Universidad de El Salvador y de la Facultad de Medicina de la UES por su apoyo moral, a Master William Armando Merino de Biología Molecular como par evaluadores y Gerardo Rivas como apoyo técnico.

## Colaboradores

MACROGEN, Inc. Empresa pública de biotecnología. Corea del Sur./ Yubin Hong/ Jaewon Sim.-Dra Vianney de Abrego/ Laboratorio de Biología Molecular CENSALUD UES.-Lic Marvin Stanley Rodríguez. / Laboratorio de Biología Molecular CENSALUD UES.-Dra Sandy Ruiz. /UBM. México.

## Contribuciones de los autores

Antonio Vásquez Hidalgo es el único autor. El autor leyó y aprobó el manuscrito final.

## Conflictos de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses.

## Referencias

- [1] Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micología*; 17: S79-S84.
- [2] Alcala, L et all. (2018). *Aspergillus* y Aspergilosis. Disponible en <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/5610/4915>
- [3] Arenas. R. *Micología Médica Ilustrada*. (2003). 2ª edición, Interamericana. Mc Graw Hill. México.
- [4] Atlas Virtual de Micología Medica. (2006). Depto de Microbiología. Universidad de Panamá.
- [5] Baker. S. (2006). *Aspergillus* Níger genomics: past, present and into the future. *Medical Micology* September, 44, 517-521.
- [6] Bille, G. et al. (1998). *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. *Clinic. Microbiology Infect.* 4: 700-716.
- [7] Bogdanov, K. V., & Ignat'eva, S. M. (2009). *Klinicheskaiia laboratornaia diagnostika*, (10), 42–44.

- [8] Broad Institute.(2007). *Aspergillus Comparative Database*.
- [9] Bolet, M. et all. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd* v.24 n.1 Ciudad de la Habana.
- [10] Bustillo, Alex. (2010). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3594.5128>
- [11] Cao W, et all, (2022). Aflatoxin B1: metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicol Mech Methods*.
- [12] Casas, R. (2010) *Micología General*. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Caracas. Online.
- [13] Conant, S. et al. (1972). *Micología*. 3ª edición. Interamericana. México.
- [14] Couri, S. et al. (2006). Digital Image processing a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3TSB8 solid state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy* vol 224. pt. pp 290-297.
- [15] Cruz, R. (2023) Micheli y el género *Aspergillus*. *Rev. chil. infectol.* [online]. 2023, vol. 40, n. 2, pp. 169-171.
- [16] Demeke, T and R. P. Adams. ( 1994). The UBe of PCR-RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution., p. 179-191.
- [17] Frisvad, J. (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins, *Studies in Mycology*, Volume 59, Pages 31-37.
- [18] Garraway, M. (1984). *Fungal Nutrition and Physiology*". John Wiley & Sons, Inc. (Canada), 22-48.
- [19] Gassiot C. et al. (2000) *Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia*. *Acta Medica*. 9(1-2): 67-72.
- [20] Geiser et al. 2007 Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1–10.
- [21] Gibbons JG, Rokas A.(2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol*Jan; 21(1): 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.005> Epub 2012 Oct 17
- [22] Gmoser, J. A. et all. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol. Biotechnol*.
- [23] Hawksworth DL (2011). Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Medical Mycology* 49: S70–S76.
- [24] Horn, P., and A. Rafalski. (1992). Non-Destructive RAPD Genetic Diagnostic of Microspore-Derived Brassica Embryos. *Plant Molecular Biology Reporter* 10285-293.
- [25] Illumina, "An introduction to Next-Generation Sequencing Technology." [www.illumina.com/technology/nextgeneration-sequencing.html](http://www.illumina.com/technology/nextgeneration-sequencing.html) (accessed Oct. 03, 2022).
- [26] *Journal microbiology*, (2005). *Microbiology Aspergillus sp*.
- [27] Kilich, M. (2006). Identification of clinically relevant *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44, 5127-5131.
- [28] Klingspor, L et all. (2009). *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Medical Mycology*, 47, S241 S247.
- [29] Lee, J. (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *Journal of clinical Microbiology*.
- [30] Labbox, (2024). Introducción a la técnica de qPCR. Online. <https://labbox.es/>
- [31] Lifeder. (18 de agosto de 2023). *Aspergillus*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/aspergillus/>
- [32] Loredó, A. (1997), Tesis, Análisis genético de *Aspergillus* spp y su implicación en la identificación de hongos alatoxicogenicos.
- [33] Loeffler, J, et all. (2000). Comparison between Plasma and Whole Blood Specimens for Detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
- [34] Marchese S, et all.(2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*.
- [35] Macrogen, Inc. /Shaun Seonwoo Lee. /Public Biotechnology Company. South Korea. (2024). <https://dna.macrogen.com/>
- [36] Martínez-Soriano, J. (1993). Detection of *Brucella abortus* by means of the Polymerase Chain Reaction. *Bioquímica* 18: 10-16.57.
- [37] MERK (2024). qPCR. Online. <https://www.merckmillipore.com/GT/es/life-science>

- research/genomic-analysis/dna-preparation lon-  
ing/PCR/qPCR/7Rub.qB.GXwAAAFEdVIXHZkB,  
nav?Referre-  
rURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- [38] Nitiu, D. (2022). Pigmentos sintetizados por hongos negros y su impacto en el deterioro del patrimonio documental en papel. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 57: 169-184.
- [39] Palomares, J. (2007). *Revista Iberoamericana de Micología* - ISBN: 978-84-611-8776-8.
- [40] Rapaer Kb et al. The genus *Aspergillus*. (1998) *Tratado de Micología Medica*. 3a edic. pp 668-703.
- [41] Rippon. JW. (1990). *Tratado de Micología Medica*. 3ª edición Interamericana. Mc Graw Hill México.
- [42] Ruiz, I, (2018). Pulmonary aspergillosis. *Rev.Med.Electrón.* vol. 40 no. 4.
- [43] Salazar, C et all. (2012). Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. *Hechos Microbiol.* 3(2); 93-96.
- [44] Sabino, R. (2020). *Fungi Journal of Brief Report Molecular Detection of Aspergillus: Application of a Real-Time PCR Multiplex Assay in Tissue Samples.*
- [45] Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*
- [46] Samson, R. et all (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *studies in mycology* 78: 141–173.
- [47] Sarria C. et al. (2005) *Aspergillosis*. Servicio clínico de Medicina Interna. Madrid.
- [48] Schaberciter-Gurtner et al. (2006). Molecular diagnosis of *Aspergillus* and *Candida* infections. *J. clinic Microb.* <https://doi.org/10.1128/jcm-01344-06>
- [49] The *Aspergillus* Website. (2007) Fungal Resec trust. <https://fungalinfectiontrust.org/what-we-do/the-aspergillus-website/>
- [50] UNAM, (2013). Asocian diversos tipos de cáncer con alimentos contaminados por aflatoxinas. *Boletín UNAM-DGCS*-420.
- [51] Vásquez H., A. (2010). Extracto acuoso de colorante negro natural a partir de las semillas de nacazol. *La Universidad* (10-11). pp. 113-118. ISSN 0041-8242.
- [52] Valderrama, J et all. (2020). Métodos de secuenciación: tercera generación. *Encuentros en biología*. Vol XIII.
- [53] Vega, G. (2021). La pared celular de hongos patógenos: su importancia en la supervivencia del hongo y el establecimiento de las infecciones fúngicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*
- [54] Vidal, M. (2018). Tesis. Ampliación y validación de una nueva base de datos para la identificación de *Aspergillus* spp. mediante EM MALDI-TOF.
- [55] White, L, et all. (2010). *Aspergillus* PCR: One Step Closer to Standardization. *Journal of clinical microbiology.*