

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina



Estudio Experimental

Tratado de

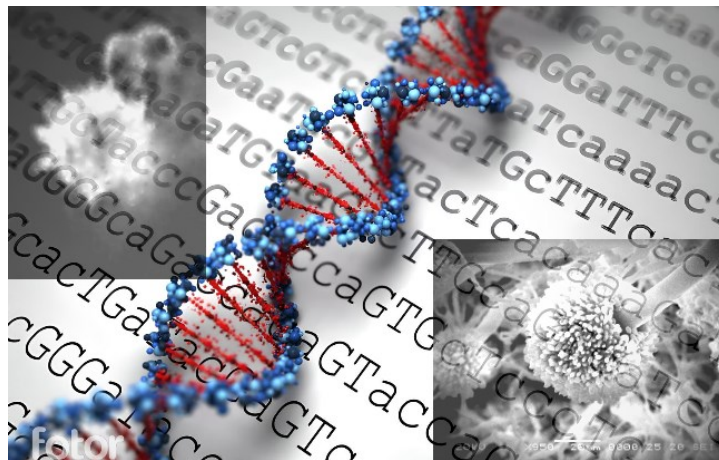
Microbiología

Caracterización morfológica y molecular gDNA

Aspergillus uessalvadorensis

Dr. Antonio Vásquez Hidalgo, PhD

Microbiólogo



Ciudad Universitaria, El Salvador. C.A. septiembre 2024/2025

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

M.Sc. Juan Rosa Quintanilla

VICERRECTOR ACADEMICO

Dra. Evelyn Beatriz Farfán Mata

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

M.Sc Roger Armando Arias Alvarado

SECRETARIO/A GENERAL

Lic. Pedro Rosalio Escobar Castaneda

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

DECANO

Dr. Saúl Diaz Peña

VICEDECANO

Lic. Franklin Arnulfo Méndez Duran

SECRETARIO

MSc. Roberto Carlos Hernández Marroquín

DIRECTOR ESCUELA DE MEDICINA

Dr. Douglas Alfredo Velasquez

DIRECTORA ESCUELA CIENCIAS DE LA SALUD

MSc Mónica Raquel Ventura

Facultad de medicina
Caracterización morfológica y molecular
g,q,c,ds,seqDNA
de
Aspergillus uessalvadorensis



Colaboración y agradecimiento:

COLABORADORES

- Dra Vianney de Abrego/ Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.
- Lic Marvin Stanley Rodríguez. / Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.
- Dra Sandy Ruiz. /UBM. México. PCR molecular
- MACROGEN, Inc. Public Biotechnology Company. South Korea./ Shubin Hong/ Jaewon Sim.

AGRADECIMIENTO

- Lic William Armando Merino. Master Biología Molecular. Docente del depto de Microbiología. Par evaluador
- Lic Gerardo Rivas. Técnico del preparador departamento de Microbiología.

Índice de contenidos.

Pag

Introducción	8
Capítulo I Características Fenotípicas y Genotípicas	9
Capitulo II gDNA y qDNA	191
Capitulo III Shotgun Metagenomic Sequencing Report DNA	203
Capitulo IV HN00223869 Raw Data	212
Capitulo V Fotografías característica fenotípica	227
Capítulo VI Microfotografías electrónicas	245
Capitulo VII Publicaciones de Aspergillus	254



Facultad de Medicina

DEDICADO A: NUESTRA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

A mis padres:

María Aura

Manuel Antonio

A mis hermanos (7)

A mis hijos con amor:

Allen Josué

Lilian Ivette

Astrid Marie

Introducción.

La tecnología que poseen los países del primer mundo supera en avances de investigación científica, han logrado cambios significativos en ciencias y tecnologías, debido al alto poder adquisitivo y de ingreso per cápita en sus macroeconomías, que destinan sus ingresos a educación, ciencias, fuerzas armadas, instituciones entre otros. Los países del tercer mundo y otros aun a pesar de no tener toda la infraestructura hacen avances en investigación científica en condiciones básicas en generar nuevos conocimientos. La pasión de las ciencias en biología en descubrir nuevos conocimientos que permitan el desarrollo de la infraestructura económica y científica del país han logrado aun a pesar con limitaciones de apoyo financiero hacen investigaciones de calidad en nuestra alma mater de la Universidad de El Salvador.

Se hace notar que cuando los países de bajo desarrollo logran producir grandes ideas que no se materializan en su totalidad en la práctica, tal es así que por ejemplo que al descubrir en el campo de la Biología una nueva especie se intenta demostrar por medio de estudios fenotípicos en cuanto a su morfología macro y microscópica y si se puede con ayuda de microscopias electrónica de barrido, pero no de secuenciación de tipo DNA en sus características genotípicas, lo que queda aún limitado. Para el caso si el investigador no públicó y revisado por pares evaluadores que siempre existen en las revistas como requisito, corre el riesgo de que otros “roben” su idea. Pero si logra publicarlo en revistas indexadas ha logrado en parte el reconocimiento de los derechos de propiedad intelectual, aun con el riesgo de otros investigadores de países de primer mundo logren demostrarlo por características genotípicas como secuenciación de tipo DNA y lo registre secuencia. Pero afortunadamente la SOCIEDAD TAXONOMICA por el momento no reconoce los estudios moleculares como descubridores porque no hay nomenclatura para ello, por lo que, si el investigador principal de origen publica su artículo bien documentado con estudios fenotípicos, aun sin tener la secuenciación, logra en cierta medida ser reconocido como autor principal del descubrimiento. Para finalizar se hace una motivación en general en entregarse a una mística de trabajo y que cumpla sus objetivos de realizar avances significativos en investigación en diversas áreas, orientados a la luz del método científico y que si una puerta se cierra abran otras abiertas a la disposición, de tal forma que no sea obstáculo para no investigar.

Dr. Antonio Vásquez Hidalgo, PhD

Capítulo I Características Fenotípicas y Genotípicas



Results for Job ID `clustalo-I20240921-232016-0325-18432718-p1m` [Copy](#) [Resubmission](#)

Tool Output | Alignments | Guide Tree | Phylogenetic Tree | Results Viewers | Result Files | Submission Details

Nightingale

COLOR SCHEME:

LEGEND: ARNDCQEGHILKMFPSTWYVBXZ

2 sequences

SEQELSALVADOR
SEQNEONIGER

41 20 41 60 80 100 120 140 160 180 61

```

C C T G G T A - - - - -
T C T G T A A G A T A T A A T A G G T G
    
```

Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Aspergillus uessalvadoriensis* en cepa orgánica descubierta en la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador. El Salvador. C.A. 2006- 2024

Dr. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, PhD

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

ORCID. ID <https://orcid.org/0000-0001-5643-8317>

Colaboradores:

-Dra Vianney de Abrego/ Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.

-Lic Marvin Stanley Rodríguez. / Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.

-Dra Sandy Ruiz. /UBM. México.

-MACROGEN, Inc. Public Biotechnology Company. South Korea./ Yubin Hong/ Jaewon Sim.

Correspondence: Antonio Vásquez, antonio.vasquez@ues.edu.sv

Resumen: la caracterización morfológica y las técnicas moleculares de ADN permitieron la identificación de la muestra de *Aspergillus* enviada a MACROGEN KOREA DEL SUR. **Objetivo:** Realizar caracterización fenotípica y genotípica por el método Next-Generation Sequencing al género *Aspergillus*. **Metodología:** El tipo de estudio es exploratorio de corte experimental. Se llevó a cabo 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 los años 2006, se llevó a acta notarial 2007, estudios de microscopía simple y microscopía electrónica de barrido y PCR del hongo encontrado en Mexico 2008 y publicado en revista La Universidad en 2008, luego se realizó la extracción de gDNA, qPCR, cADN en 2024 en MACROGEN INC. por Metagenome Shotgun Sequencing Reports. **Resultados:** Se extrajo el genoma gDNA 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 quantum qDNA se obtuvieron los 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul y cDNA. De la extracción de gADN 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. qPCR se obtuvieron los 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul con la librería TruSeq Nano DNA (350_META).cDNA librería se utilizaron 33 kits de librerías. Total, de bases obtenidas fueron 11,705,895,990 pb, total, de lecturas fueron 77,522,490. Contenido de nucleótidos GC % 49.7 y AT % 50.30, contenido de bases GC fue 49.7% y AT fue 50.3, Contenido de bases métricas Q 20 :95.1 y Q 30: 88.3, Calidad de datos por ciclos Q30 valor alto. Se utilizaron formatos FASTQ y FASTA para codificación y secuenciación de pares de bases completa. Raw data Valor. 38,761.245 n, calidad y recorte del adaptador. (Quality and adapter trim.) fue 32,535,420, Eliminación de contaminantes fue de 30,961,740, Control de calidad o qcPassed de 79.88 indica que fue aceptado como buen desempeño del proceso. De la taxonomía Krona se reportó *Aspergillus neoniger*, Heatmaps especie reportan neoniger. **Conclusiones:** Se encontró por el método de secuenciación NGS *Aspergillus neoniger*, pero en estudios anteriores del año 2006 se denominó de la especie *uessalvadoriensis*.

Palabras clave. *Aspergillus sp, Nacascot, uessalvadoriensis, neoniger*

INTRODUCCION

El estudio inicial del hongo *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano **Antonio Micheli** en su obra *Nova Plantarum* quien nació en Florencia, Italia, en 1697 (Cruz, 2023). En la actualidad, ha generado mucho interés no solo por sus implicaciones en la salud sino también en las industrias alimentaria, química y biológica. Se inician investigaciones generales sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel nacional conocida como la semilla de Nacascal, muy utilizada en alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país. Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita de 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 de negro-café las vasijas y curtido de la piel del ganado, Los taninos al fermentarse pueden extraerse 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 observar las vasijas el tono café es del tanino de la semilla y el negro proviene del hongo mas hierro que contiene 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 raras soportan temperaturas de más de 100 a 300 °C. Actualmente el *Aspergillus* es un género amorfo, que comprende entre 260 y 837 especies (Geiser, 2007, Hawksworth, 2011) 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 tenga los primers según especies a mezclar los pares de bases. La pigmentación de los hongos se debe a la síntesis de varios tipos de pigmentos y moléculas cromóforos como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas entre otros. (Gmoser, 2017). Los pigmentos de melaninas tienen una función principal en la protección de las esporas de los hongos contra los aumentos de temperatura, la radiación y la desecación. (Nitiu,2022) Las melaninas están presentes en la mayoría de los hongos, encontrándose en casi todos los hongos patógenos. (Vega,2021) El hábitat natural de las especies de *Aspergillus* es el heno, 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 fenotípicos 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 en 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,seqADN en su análisis molecular del género *Aspergillus* para determinar el tipo de especie autóctona que circulan en la zona norte de nuestro país.

Objetivo: Objetivo: Realizar caracterización fenotípica y genotípica. por el método Next-Generation Sequencing del género *Aspergillus*.

Hipótesis: H₁. La caracterización fenotípica y genotípica del ADN ayuda a identificar especies de microorganismos en el medio ambiente. H₂ La caracterización fenotípica y genotípica del ADN no ayuda a identificar especies de microorganismos en el medio ambiente.

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*. Se desarrolló su estudio en dos fases: **I: Caracterización Fenotípica.** Se recolectaron cinco lotes de semillas de *Caesalpinia coriaria* de la zona norte, se realizó purificación y selección de las semillas de acuerdo a su apariencia y color. A continuación, los inóculos se elaboraron 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 en microscopio óptico simple a lo largo de semanas llevando hoja de cotejo. Se llevó al laboratorio para la observación por microscopía de barrido del *Aspergillus* tomando microfotografías electrónicas en CENSALUD. En México se hizo un 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 de ADN y la otra

simple, se enviaron a Corea del Sur en los laboratorios de MACROGEN INC para la extracción, análisis e identificación de g,q,c,ds,seqADN.

1. Preparación de la suspensión de esporas y microcultivo. Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivo en donde se identificaron las conidias o esporas en donde se extrajeron por método simple bajo el microscopio y se sembraron de nuevo, la cual se utilizó para realizar los inóculos en el medio de cultivo Sabouraud en tubo y placa, el hongo se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al que previamente se le agregaron 50 ml del medio, se incubó durante 48 hrs a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente durante 5 min con la ayuda de un agitador magnético. Se paso también al tubo en Saboraud y se agito para una homogeneización para asegurar que las esporas estén bien suspendidas. Si las esporas tienden a sedimentarse, puede ser útil utilizar un mezclador o agitar manualmente. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer para una concentración adecuada se requiera. (Bustillo, 2010). **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 ésta se coloca el portaobjeto, y sobre éste el bloque del medio de cultivo Saboraud. La muestra se inocula sobre el bloque en cuatro cuadrantes, mediante el asa de platino en forma de L sobre el bloque del medio ya inoculado se coloca una laminilla cubreobjetos e incuba por 7 días a 25°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una lámina con una o dos gotas de Azul Lactofenol y se observa al microscopio con objetivo 100x las estructuras características de la especie aislada. (Casas, 2010)

2. Área de muestreo y recolección. El hongo se aisló a partir de semillas de nacascal de la zona norte. Las semillas café-negras 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 fúngicas. La caracterización morfológica se realizó en cultivos en Saboraud e incubadas a 37° C por 72 horas en aerobiosis en tubos y luego a temperatura ambiente x 7 días. Con observación microscópica simple en lactofenol azul de algodón a 10 x, 40 x y 100x, y luego se selló con un cubreobjetos. La visualización de las estructuras se llevó a cabo bajo un microscopio óptico. Para determinar la afiliación taxonómica se utilizó la base de datos en línea.

4. Aislamiento y purificación de muestras. En el material vegetal no se utilizó la limpieza de semillas. Se raspó y el material se retiró y se 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 de nutrientes) 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 ADN. En general, se utilizaron métodos para la secuenciación del ADN. Se utilizó el método de la secuenciación de Sanger por 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 los nucleótidos para determinar la secuencia. En cuanto a la microbiología, el estudio molecular se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que hayan sido previamente amplificados, o secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria. La secuenciación a través de *Illumina* se caracteriza básicamente por la ejecución de los siguientes procesos: a. La amplificación de los fragmentos de ADN para la generación de clústeres (colonias del mismo fragmento) se realiza mediante el método de PCR puente. b. La detección de bases en la secuenciación se realiza a través de marcadores fluorescentes. Por lo tanto, la plataforma *Illumina* permite la secuenciación por fragmento de ADN en ambos extremos. El fragmento se secuencia amplificado por ambos extremos en lugar de un solo extremo. Incluyendo gDNA, qDNA, dsDNA, cDNA y seqADN para luego analizarlos en paquetes informáticos. (MACROGEN.2024)

6. Extracción gADN. Los genes de gADN son actualmente una de las formas más estudiadas en el genoma de los hongos, 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 el calor a temperatura controlada por el termociclador u otra forma. Además, debe concentrar las moléculas diana del 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 (Palomares, 2007), que son los más comunes, pero dependerá del laboratorio en su método de extracción. En MACROGEN INC se extrajo de la siguiente manera: “Cantidad de ADN: Realizado por el método del sistema QuantiFluor® dsDNA utilizando la microplaca multimodo Victor Nivo. Lector. Macrogen cuantifica el material genómico inicial mediante el uso de cuantificación basada en fluorescencia, utiliza tintes específicos de ADN de doble cadena, este método cuantifica dsDNA con mayor precisión que el espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Evaluación del estado del ADN: se utiliza el Bioanalyzer 2100 (o el 4200 TapeStation). Verifique la integridad del ADN genómico utilizando un bioanalizador Agilent, Technologies 2100 (o 4200 TapeStation). El número de integridad del ADN (DIN) determina el grado de fragmentación de una muestra de ADN genómico midiendo la distribución de señales de varios tamaños. 2100 instrumento Bioanalizador (Agilent, Parte# G2939BA) 4200 Sistema TapeStation (Agilent, Parte# G2991BA)3. Verificación del tamaño del ADN para secuenciación de lectura larga. Tamaño promedio (BP): Macrogen utilizó el sistema de pulso Femto para determinar el tamaño real. En general, los pasos utilizados fueron 22 en total. Procariota/ Eucariota Powerprotocolo del kit de ADN Powersoil Pro Transfer una cierta cantidad de célula ($\geq 1 \times 10^9$) a un tubo de 1,5 ml. (AXYGEN) A. Placa - Raspe aproximadamente 10 ~ 20ul de muestra B. Pellet - Pellet completamente derretido por vórtice y gire hacia abajo para usar aproximadamente 30ul ~ 50ul.- Demasiadas muestras resultarán en una lisis deficiente y un ADN insuficiente. Centrífuga 2 min a velocidad máxima.3-1. Procariota: Después de eliminar el sobrenadante, agregue 50 mM de EDTA 500ul, tampón de lisozima 100ul, lisozima 10ul y afloje mediante pipeteo.3-2. Eucariota: Después de eliminar el sobrenadante, agregue 50 mM de EDTA 500ul, lyticase 20ul y afloje mediante pipeteo. Incubar 30 minutos ~ 120 minutos a 37 ° C. Centrífuga 3 min a velocidad máxima. Retire todo el sobrenadante excepto el pellet. - Úselo cuando el pellet esté blando y sea difícil eliminar el sobrenadante. (dividido en varios tubos)- Si se agregan demasiadas muestras durante el paso 1, el pellet no se separará bien. En este caso, retire y use solo el sobrenadante tanto como sea posible. Añada 800 µl de solución CD1 al tubo PowerBead Pro. Transfiera todas las muestras al tubo PowerBead Pro. Asegure los tubos PowerBead Pro horizontalmente con un soporte de tubo adaptador de vórtice y el vórtice a la velocidad máxima durante 10 minutos. Tubos de centrifuga a 15.000xg durante 1 min. Transfiera el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Añadir 200 µl de solución CD2 y vórtice durante 5 s. (Antes de transferir el sobrenadante, añadir la solución CD2 al tubo limpio). Tubos de centrifuga a 15.000xg

durante 1 min. Evitando el pellet, transfiera hasta 700 µl de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Añadir 600 µl de solución CD3 y vértice durante 5 s (Antes de transferir el sobrenadante, añadir la solución CD3 al tubo limpio.)-Centrífuga: cargue 650 µl del lisado en una columna de centrifugación MB y centrifugue a 15,000 xg durante 1 min. Deseche el flujo. Repita el paso 10 hasta que se haya procesado toda la muestra. Agregue 500 µl de solución EA. Centrifugar durante 1 min a 15,000xg. Descarte el flujo a través. Añadir 500 µl de solución C5. Centrifuga durante 1 min a 15.000xg. Descarte el flujo a través. -Vacío-10. Coloque la columna de pin MB en la aspiradora.11. Coloque las muestras en columna y opere la bomba.12. Agregue 500 µl de solución EA y haga funcionar la bomba.13. Agregue 500 µl de solución C5 y haga funcionar la bomba. Transfiera la columna al tubo de recolección vacío y centrifugue a velocidad máxima durante 1 min. (para que se seque) Transfiera la columna al tubo de 1,5 ml y agregue 30-100 µl de solución C6. Centrifuga a velocidad máxima 1 min para elución". (MACRÓGEN, 2024)

7. Técnica de qPCR. Llamado DNA cuantitativo medido por fluorometría que capta los nucleótidos. Después de haber cumplido con los requisitos de extracción de gADN en el control de calidad, el qADN se fragmentó y cuantificó degradándolo. El método de control de calidad del ADN en MACROGEN fueron: 1. Cantidad de ADN: Realizado por el método QuantiFluor® dsDNA System utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo. Macrogen cuantifica el material genómico de partida mediante el uso de cuantificación basada en fluorescencia. utiliza 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 genero *Aspergillus spp* en su evolución genómica a sido variable en su tamaño, en la que tienen un rango promedio de tamaño de genoma de 27 a 39 Mb o mas y un numero de genes promedio entre 9000 a 14000 genes. El que tiene mayor tamaño es *A. sojae* 39.5 y el que tiene mayor número de genes es *A.niger* con 14,165 . (Gibbons, 2013). Generalmente, el tamaño del genoma bacteriano suele estar en el rango de 1 a 5 Mb, el tamaño del genoma de las bacterias oscila típicamente entre 1 y 10 millones de pares de bases. La mayoría de los virus tienen genomas que oscilan entre unos pocos kilobases a unas pocas decenas de kilobases que son los de menor tamaño, lo que equivale a menos de 0.1 Mb. Esto depende del tipo de virus, no hay un número único de pares de bases para todos los virus. En general, el tamaño del genoma de los hongos se encuentra típicamente en el rango de unos pocos megabases (Mb) a más de 100 Mb. Algunos hongos filamentosos pueden tener genomas de cientos de millones de pares de bases. Así por ejemplo el genoma de *Aspergillus niger* tiene aproximadamente 30-40 millones de pares de bases y consta de alrededor de 8,000-10,000 genes. Hoy el tamaño de un

genoma se mide directamente por *electroforésis* (técnica para separar fragmentos de ADN) en pares de bases (pb) y sus múltiplos Kilobases (Kb ó Kpb) de 1.000 pares de bases, y Megabases (Mb ó Mpb) de 1.000.000 pb.

8. cADN library y dsDNA. El cADN llamado también ADN complementario forma de ADN que se sintetiza a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de retro transcripción. La construcción de las librerías en MACROGEN toma un promedio de 4-5 semanas. Resumen del flujo de trabajo en su construcción: 1. Pedido de cebadores de amplicón: el protocolo incluye las secuencias de pares de cebadores para la región V3 y V4 que crean un solo amplicón de aproximadamente ~ 460 pb. El protocolo también incluye secuencias de adaptadores de voladizo que se deben anexar a las secuencias del par de cebadores para que sean compatibles con los adaptadores de índice y secuenciación de *Illumina*. *Illumina* no vende estos cebadores. Deben ser solicitados a un tercero. 2 preparar la biblioteca: el protocolo describe los pasos para amplificar la región V3 y V4 y, mediante una PCR de ciclo limitado, agregar adaptadores de secuenciación de *Illumina* y códigos de barras de doble índice al objetivo del amplicón. Utilizando el complemento completo de los índices Nextera XT, se pueden agrupar hasta 96 bibliotecas para la secuenciación. 3 secuencia en MiSeq: mediante lecturas emparejadas de 300 pb y reactivos MiSeqv3, los extremos de cada lectura se superponen para generar lecturas completas de alta calidad de la región V3 y V4 en una sola ejecución de 65 horas. La producción de MiSeqrun es de aproximadamente > 20 millones de lecturas y, suponiendo 96 muestras indexadas, puede generar > 100.000 lecturas por muestra, comúnmente reconocidas como suficientes para estudios metagenómicos. 4. Analice en MSR o BaseSpace: el flujo de trabajo de Metagenomics es una opción de análisis secundaria integrada en MiSeqReporter (software en el sistema) o disponible en BaseSpace (software basado en la nube). El flujo de trabajo de metagenómica realiza una clasificación taxonómica utilizando la base de datos Greengenes, mostrando la clasificación a nivel de género o especie en un formato gráfico. Este protocolo se puede utilizar para secuenciar regiones alternativas del gen 16S rRNA y para otras secuencias de amplicones específicos de interés. Cuando se utiliza este protocolo para la secuenciación de amplicones que no sea ARNr 16S, utilice la opción Generar FASTQWorkflow (análisis secundario). Para obtener más información, consulte Flujo de trabajo de metagenómica de MiSeqReporter. Es una colección de secuencias de ADN generadas a partir de la secuencia de ARN mensajero (ARNm). Estas bibliotecas contienen solo ADN codificante de genes, excluyendo las

secuencias de ADN que no codifican. Se trata, por tanto, de una colección de clones, cada uno de los cuales contiene un vector en el que se ha insertado un fragmento de ADN derivado del total de ADN o ARN de la célula o tejido. Estos clones contienen todas las secuencias existentes en la fuente original de ADN, es decir, deben contener muestras de todo el ADN del organismo o muestra de estudio. Es posible buscar en la biblioteca un clon con un fragmento de ADN de interés utilizando métodos de detección sensibles capaces de detectar este fragmento entre millones de clones diferentes. Una biblioteca de ADN es una colección de fragmentos de ADN que se han clonado en vectores para que se puedan identificar y aislar los fragmentos de ADN que les interesan para su posterior estudio. Básicamente, hay dos tipos de bibliotecas: bibliotecas de ADN genómico y bibliotecas de cADN. Las bibliotecas de ADN genómico contienen grandes fragmentos de ADN en bacteriófagos o cromosomas artificiales derivados de bacterias o P1 (BAC y PAC). Las bibliotecas de cADN generalmente contienen fragmentos mucho más pequeños que las bibliotecas de ADN genómico y por lo general, se clonan en vectores de plásmidos. En resumen, aislamos el genoma completo, luego hacemos un corte en segmentos con enzimas de restricción para obtener el ADN de inserción, luego lo vinculamos al vector e introducimos la célula al huésped y finalmente lo analizamos y almacenamos. La preparación de la biblioteca de secuenciación se realiza de forma automatizada. Es una forma de ADN que se sintetiza a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de retrotranscripción. Este proceso se lleva a cabo utilizando una enzima llamada transcriptasa inversa o proteasa, que convierte el ARNm en cDNA. Al crear cDNA a partir de ARNm, se puede estudiar qué genes están activos en una célula en un momento dado y en qué cantidad, ya que el cDNA refleja el perfil de expresión génica de la célula. **El dsDNA** o ADN de doble hebra, sirve para la calidad que forma parte esencial para obtener resultados precisos en la secuenciación. En el proceso de secuenciación, es fundamental que el ADN esté intacto y en forma de doble hebra para que las plataformas de secuenciación puedan leer correctamente la información genética. dsDNA en MacroGen se refiere al tipo de ADN que la empresa utiliza en sus procesos de secuenciación y análisis, asegurando que la muestra sea adecuada para estos procedimientos. File Size se refiere al tamaño del archivo en bytes para generar, almacenar y compartir archivos de datos relacionados con la secuenciación, como archivos de lectura (reads) o resultados de análisis. **FASTQ** es un formato de archivo utilizado para almacenar lecturas de secuenciación de ADN junto con su calidad. Es un formato común en bioinformática, especialmente en el análisis de datos de secuenciación de próxima generación (NGS). Cada entrada en un archivo FASTQ generalmente contiene cuatro líneas en comandos en simbología de ejecución en su

programación, que se obtienen las lecturas de ADN, que se almacenan en archivos FASTQ para su posterior procesamiento, análisis y alineación contra genomas de referencia. (MACROGEN.2024)

9. seqDNA. Es la secuenciación del DNA que identifica la secuencia de nucleótidos en una muestra de ADN. MacroGen, utiliza para la secuenciación NGS (Next Generation Sequencing) apoyado con Illumina, que es una tecnología que nos permite segmentar DNA en fragmentos y secuenciarlos. Estos fragmentos se ensamblan posteriormente gracias al análisis bioinformático permitiendo conocer la secuencia de todo el genoma. Para la secuenciación primero se realiza una lisis celular, para que se libere el DNA, luego se hacen 2 síntesis de cadenas, una amplificación del cDNA y por último la amplificación de las librerías. Los resultados se dan entre 4 a 5 semanas para una secuenciación masiva, que en muchas veces depende del tipo de muestra a estudiar en tamaño de bases. (MACROGEN.2024)

10. Puntuación de calidad de Phred. Es una medida utilizada en bioinformática para evaluar la calidad de las secuencias de ADN obtenidas a través de métodos de secuenciación, como la secuenciación de nueva generación (NGS). Esta puntuación se introduce en archivos de secuenciación, como los formatos FASTQ, y cada base de la secuencia tiene una puntuación correspondiente que indica la confianza de que la base leída es correcta, se calcula utilizando la siguiente fórmula: $[Q = -10 \log_{10} P]$.

11. Análisis bioinformático. En el mercado existen secuenciadores masivos que permiten leer en paralelo millones a miles de millones de secuencias o fragmentos del ADN (*reads*) tal como MACROGEN usa esta tecnología, que anteriormente era laboratorial paso a uno computacional, en el campo de la bioinformática. Básicamente, el proceso para obtener las secuencias genómicas a partir de datos de NGS se compone de dos fases. La primera fase basados en la secuenciación, como la extracción de los ácidos nucleicos y la preparación de la librería y añadir adaptadores con secuencias conocidas para después poder identificar el origen de las secuencias. La segunda fase en computadora comprende el preprocesamiento, ensamblaje de los reads y el análisis de las secuencias ensambladas mediante herramientas bioinformáticas. La elección de la plataforma utilizada para secuenciar los datos NGS va a condicionar la fase de análisis, ya que cada tecnología presenta unas características específicas, como el tipo de read (Single End, Paired End, Mate Paired), errores de secuenciación o cobertura.

12. Deliverables. Utilizan el FASTQ para lecturas y md5sum in linux systems programs. Esta técnica se emplea para la purificación y separación de ADN, asegurando que las muestras estén libres de contaminantes y en condiciones óptimas para los procesos de secuenciación. El procedimiento seqDNA generalmente incluye etapas de lisis celular, purificación y concentración del ADN. Esto permite obtener ADN de alta calidad. Utilizan MD5sum que es un comando utilizado para calcular y verificar el valor hash MD5 de un archivo y asegurarse de que los archivos de datos genéticos no se corrompan durante la transferencia o almacenamiento. (MACROGEN.2024)

13. Lista de descargas o download list. Es una sección en el portal de usuario de Macrogen donde se encuentran todos los archivos de datos secuenciados solicitados. Esta lista incluye lecturas crudas (Raw Reads): Datos de secuenciación sin procesar, como los archivos en formato FASTQ: Archivos que han sido analizados y pueden incluir alineamientos, ensamblajes y resultados de análisis (por ejemplo, archivos en formato BAM, VCF, etc.). e informes relacionados con secuencias. Se puede seleccionar y descargar los archivos desde esta lista. Su propósito sea una herramienta clave para acceder, gestionar y descargar los datos de secuenciación que se ha solicitado, permitiendo trabajar con los resultados del proyecto de manera eficiente.

14. Calidad por ciclo. El término Quality by Cycle o 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 realiza en ciclos. Durante cada ciclo, se añade 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, una base (A, T, C o G) se incorpora en la cadena de ADN, y un fluoróforo o una señal óptica detecta la base añadida. Este proceso se repite múltiples veces, y en cada ciclo se detecta y se registra en una base.

15. Síntesis Reporte Secuenciación del genoma.MACROGEN/Plataforma Illumina.

Flujo de trabajo experimental. MACROGEN. Korea del Sur. Se refiere al proceso de preparación de las muestras biológicas (como ADN, ARN o proteínas) antes de que se realicen análisis genéticos, como la secuenciación. La preparación de muestras suele implicar varios pasos, que son: Extracción: que consiste en aislar el material genético de las células u otros tejidos. Purificación: Eliminar contaminantes y asegurar que el ADN o ARN extraído es de alta calidad. Cuantificación: Medir la concentración y calidad del material genético, utilizando técnicas como la espectrofotometría. Fragmentación: Dividir el ADN o ARN en fragmentos de tamaño adecuado para posteriores análisis. Amplificación: En algunos casos, puede ser necesario amplificar la muestra para obtener suficiente

material para el análisis. Los adaptadores, se refiere a un proceso en el que se añaden adaptadores de secuenciación a los fragmentos de ADN. Los adaptadores son oligonucleótidos que se unen a los extremos de los fragmentos de ADN. Su función es reconocer el ADN, permitir la amplificación, insertar códigos que permitan su identificación. Proceso final de preparación de la biblioteca o librerías de ADN o ARN antes de la secuenciación. Durante la secuenciación de genomas, transcriptomas o amplicones, se requiere que las muestras de ADN o ARN sean procesadas para crear una biblioteca o library que contenga fragmentos de estas moléculas, los cuales son esenciales para el análisis posterior. La generación de clústeres utilizando amplificación por puente (bridge amplification), esto se refiere a un proceso utilizado en la secuenciación de ADN y en la preparación de bibliotecas de ADN. Aquí las moléculas de ADN son clonadas en una superficie sólida (como una placa de flujo) para formar clústeres clonales. Cada clúster contiene miles de copias de una sola molécula de ADN, lo que permite una lectura más precisa y sensible de la secuencia de ADN. La secuenciación por síntesis, es una de las metodologías utilizadas en la secuenciación de ADN, esta tecnología permite la lectura de las bases del ADN mediante un proceso en el que se sintetizan las cadenas de ADN y se identifican las bases incorporadas en cada ciclo de síntesis. El proceso básico de secuenciación por síntesis generalmente incluye los siguientes pasos: Preparación de la muestra: El ADN que se va a secuenciar se fragmenta y se prepara mediante la adición de adaptadores que son necesarios para la amplificación y el posterior análisis. Amplificación: Las secuencias de ADN se amplifican, a menudo utilizando técnicas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para obtener suficientes copias para el análisis. Secuenciación: En esta etapa, cada ciclo de síntesis implica la adición de nucleótidos marcados (cada uno con un fluoróforo diferente). A medida que se añaden nucleótidos, se genera una señal fluorescente que es capturada por un equipo de lectura. La intensidad de la fluorescencia indica qué base (A, T, C o G) se ha incorporado a la cadena en ese ciclo. Análisis de datos: Después de completar los ciclos de síntesis, los datos generados se analizan para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN. Por último, generación de datos en bruto, se refiere a la producción de datos iniciales que resultan de la secuenciación de ADN. Estos datos brutos son las lecturas directas obtenidas a partir de las muestras biológicas antes de que se realicen procesos de análisis, filtrado o interpretación. Los datos en crudo típicamente incluyen: Lecturas de secuenciación: Las secuencias nucleotídicas asignadas a cada fragmento de ADN secuenciado. Calidad de las lecturas: Información sobre la calidad de las secuencias obtenidas, lo que indica la fiabilidad de los datos. Archivos en formatos específicos: Como FASTQ, que contienen tanto las lecturas como sus correspondientes puntajes de calidad. (MACROGEN,2024). Las muestras se

preparan de acuerdo con el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El flujo de trabajo que se ilustra a continuación muestra el método común de preparación de bibliotecas basado en la ligadura. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Primero se extrae el ADN para proceder a la construcción de una biblioteca. La fragmentación del ADN se realiza en orden de 5' a 3' combinando las fragmentaciones y el ligando y amplificado con un cebador de PCR para complementar la construcción final de la biblioteca. La secuencia se lleva a cabo mediante tecnología de síntesis y se realiza una generación de datos.

Paso 1. Preparación de la biblioteca. Preparación de la muestra El ADN/ARN se extrae primero de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptadores 5' y 3'. Alternativamente, la marcación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca.

Construcción final de la biblioteca. A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recorta hasta los extremos de cada adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. Generación de clústeres mediante amplificación de puentes. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en grupos clonales distintos a través de la amplificación de puentes. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación.

Llamada Secuenciación Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) La tecnología SBS de Illumina utiliza un método basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras molde de ADN. Dado que todos los dNTP reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitivas y homopolímeros. Los sistemas químicos de cuatro, dos y un canal que utilizan química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de

análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos. El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada de bases, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ utilizando bcl2fastq, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas. Los pasos previos a la preparación de la biblioteca incluyen la extracción, cuantificación y fragmentación del ADN, mientras que las evaluaciones de la calidad, la cuantificación y la estandarización de la biblioteca son pasos posteriores a la preparación de la biblioteca. El kit de preparación de ADN de Illumina ofrece una cobertura genómica constante y una calidad de datos, desde la secuenciación del genoma completo (WGS) hasta pequeños plásmidos microbianos. Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. En general, los pasos básicos para hacer las bibliotecas consisten en preparar el ARN o el ADN para el análisis de NGS son: 1) Fragmentación, 2) Fijación de adaptadores e índices a los extremos de los fragmentos complementarios a las plataformas Illumina®, y 3) En algunos casos, selección de fragmentos específicos para refinar el tamaño de la biblioteca, eliminando adaptadores u otros artefactos de la preparación de la biblioteca. El kit de preparación de ADN de Illumina cuenta con un flujo de trabajo optimizado que combina la extracción, cuantificación y fragmentación de ADN, así como la normalización de bibliotecas, para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas más rápido y flexible del conjunto de soluciones de Illumina. La química de etiquetado con bolas admite una amplia gama de cantidades de entrada de ADN, diversos tipos de muestras y muchas aplicaciones diferentes, incluida la secuenciación del genoma humano completo, la metagenómica ambiental, la investigación de plantas y animales, la elaboración de perfiles tumorales.

2. Generación de clústeres. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puentes. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación.

3. Secuenciación. La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de ADN molde. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de la secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitivas y homopolímeros. La tecnología de secuenciación de

próxima generación (NGS) utiliza colores para la identificación de bases. Las bibliotecas de NGS son compatibles con la plataforma Illumina a través de una biblioteca de cebos llamados Agilent SureSelect personalizada, una plataforma comúnmente utilizada para la secuenciación clínica dirigida. Cada fragmento termina con una etiqueta fluorescente, que se distingue por diferentes colores correspondientes a los nucleótidos A, C, G y T, la prueba detecta sustituciones de ADN, pequeñas inserciones y deleciones, y variaciones en el número de copias ubicadas en las secuencias codificantes, por ejemplo, como el uso de colores para. A = Adenina (azul) T = Timina (yellow) G = Guanina (verde) C = Citosina (carmín) o escoger Verde, amarillo, naranja, rojo. La NGS hacen facilitando estos fragmentos se disciernen tras la separación por electroforesis capilar, de ahí que también se conozca como secuenciación por electroforesis capilar (CES). El estudio exhaustivo de todas las especies presentes en una muestra mixta, donde la NGS puede identificar especies utilizando la secuenciación de amplicones 16S o profundizar en genomas completos con la secuenciación de meta-escoqueta. El método para la técnica de análisis de fragmentos: Los fragmentos de ADN se marcarán con colorantes fluorescentes durante la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador. Se pueden detectar múltiples tintes fluorescentes de diferentes colores en una muestra (Multiplex). Uno de los colores del tinte se utiliza para un estándar de tamaño etiquetado presente en cada muestra. El estándar de tamaño se utiliza para extrapolar los tamaños de los pares de bases de los picos del producto de muestra. Los fragmentos se separarán por tamaño mediante electroforesis capilar. Los datos se analizan mediante un software para determinar el tamaño y el genotipo. Paso 4. **Análisis. Generación de datos brutos:**

1. Estadísticas de datos sin procesar. Informe el número total de bases, lecturas, GC (%), Q20 (%) y Q30 (%) se calculan para las 20 muestras o más. Calcular bases totales (bp) : Número total de bases secuenciadas. Total, de lecturas: Número total de lecturas. Para la secuenciación de extremos emparejados de Illumina, este valor se refiere a la suma de read1 y read 2. El GC: Expresado generalmente como porcentaje, representa la cantidad de pares Guanina-Citosina en la molécula de ADN o genoma que está siendo investigado, en forma similar con AT que expresa la cantidad de pares de Adenina Timina en su molécula de ADN. En genética, GC, Contenido GC o Porcentaje GC (contenido de guanina y citosina) es una característica del genoma de un organismo o de cualquier pedazo de ADN o ARN. G y C denotan guanina y citosina, respectivamente. Expresado generalmente como porcentaje, representa la cantidad de pares Guanina-Citosina en la molécula de ADN o genoma que está siendo investigado. La fracción restante de cualquier molécula de ADN contendrá bases A (adenina) y T (timina), de forma que el contenido GC da también el contenido AT. Paso 2. **Descarga**

de datos. Sobre el análisis detallado de resultados de control de calidad y análisis taxonómico. Paso **3. Estadísticas de control de calidad.** Resumen de datos del informe (datos brutos, calidad, eliminación de contaminantes). Hecho en gráfico de barras y estadística de datos (nombre de la muestra, datos sin procesar, calidad, eliminación de contaminantes, lectura pasada de QC elaborado en un tablero. Paso **4. Análisis de la taxonomía.** A partir de la muestra enviada, se analiza la composición biológica o diversidad alfa y beta microbiana. Paso **5. Método.** Qué es un análisis de flujo de trabajo o diagrama de flujo donde se sintetizan los pasos a realizar para realizar un análisis de la muestra en particular. Paso **6. Entregables.** Los datos de este pedido se entregarán a través de archivos pdf u otros. Hay muchos archivos compresores, archivos de texto que contienen la suma md5 de los entregables. **El apéndice** tiene preguntas frecuentes de comprobación de md5 en un sistema Windows. y descripción del archivo de resultados. Su archivo de lista de entregables de gran tamaño en formato Windows y FASTQ Phred Quality Score Q se calcula con $-10\log_{10}$. La puntuación de calidad de Phred expresa numéricamente la precisión de cada nucleótido. Paso **7. Cuantificación: Los secuenciadores** pueden manejar una amplia gama de concentraciones de ADN, sin embargo, con cantidades muy bajas de ADN, la calidad de los datos se verá significativamente afectada. El uso de la absorbancia UV para cuantificar soluciones de ADN diluidas tiende a dar resultados muy inexactos. Una buena manera de cuantificar el ADN es ejecutar una alícuota en un minigel y comparar la intensidad con el control de una concentración conocida. También hay escaleras de concentración que están disponibles comercialmente. Para cada reacción, proporcione 10 ng/100 bases y al menos 20 ng/ μl de solución en agua desionizada, proporcione al menos 10 μl para cualquier posible resecuenciación. Se recomienda la medición con electroforesis en lugar de las mediciones basadas en espectrofotómetros. Paso **8. La preparación de los cebadores** debe proporcionarse en agua desionizada a la concentración requerida. Suministre cebadores a una concentración de (10 pmole/ μl = 60 ng/ μl) en agua desionizada a un volumen superior a 20 μl . Los cebadores suministrados por los clientes deben ser desalados o purificados. (MACRÓGEN, 2024)

Resultados y Análisis.

A. Caracterización fenotípica del *Aspergillus* de El Salvador.

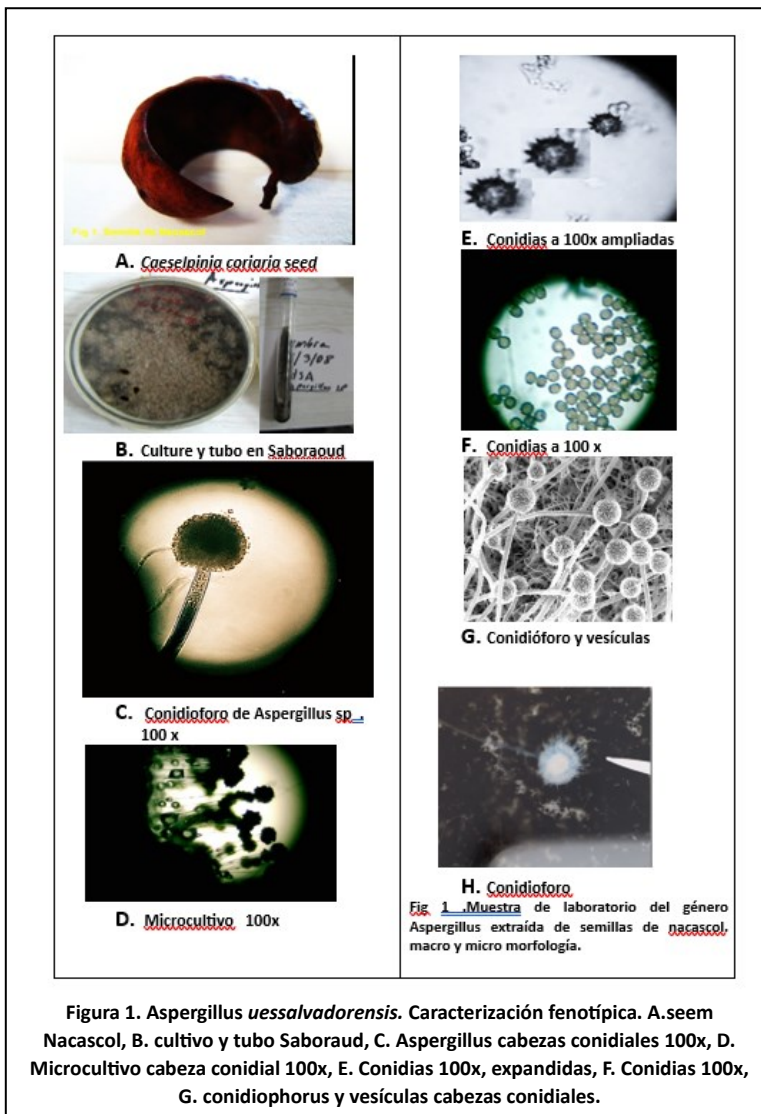
Del árbol llamado NACASCOL cuyo nombre científico es *Caesalpinia coriaria*, de la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia*, una planta leguminosa con un tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo, cada una con más de 10 folíolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, Las semillas miden aproximadamente de 3 a 4 cm, ápice redondeado, semillas de color marrón con apariencia negra, de las cuales crece un hongo cuyo parecido es a un posible *Aspergillus sp.* El árbol *Caesalpinia coriaria* contiene taninos, triterpenos, glucósidos y flavonoides. El hongo se reproduce exclusivamente en las semillas del árbol 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 los artesanos salvadoreños. (Vásquez, 2010). 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 μm de largo con conidios moderados o esporas internas de 1 a 3 micras, de color marrón a negro. Es un hongo filamentoso hialino, saprófito, perteneciente al filo Ascomycota.

Características macroscópicas: Cuando se cultivan en medio especial de Saboraud producen una coloración negra con producción de pigmento en el tubo en la región posterior en los tubos antes de 7 días. En placa y tubo Cultivo de agar Saboraud: la colonia su micelio es blanco con un aspecto columnar y luego se vuelve negro. La textura de las colonias, parecen de algodón o terciopelo, no hay esclerotes. El reverso de la colonia es negro o negro pigmentado dependiendo del agente oxidante, altura del micelio bajo, apariencia de la colonia es negro polvoriento. Es un hongo filamentoso.

Características microscópicas: El conidióforo de *Aspergillus* tiene tres partes bien diferenciadas: vesícula globosa terminal con fiálide uniseriada sin metúla, estípote tubular y célula del pie que une el conidióforo con el micelio. Los conidióforos son de paredes lisas y rugosas y se agrupan formando una masa compacta, hialina o pigmentada y miden de 3 a 5 μm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. En su interior se observan cientos de esporas o conidios. La espora es esférica e irregular, aseptada, ameroporosa, coloreada y oscura del tipo feospora columnar. La vesícula es globosa con 52-66 μm de diámetro con una longitud de estípote de 100-300 μm , un ancho de estípote de 2-2 μm , ornamentación irregular y produce fiálides a su alrededor. Las fiálides son monoseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo, son cortas y miden 8 micras de longitud, de las que brotan los conidios, que son globosos y rugosos de 4 a 5 μm de diámetro, de color café marrón o marrón a negro. El diámetro de la colonia es de 9-10 μm , los conidios son columnares y tienen una longitud de 3-5 μm y un ancho de 1,96-2 μm . Cabezas de conidios lisos con una pared redonda e irregular, dispuestos en columna; estípotes de paredes delgadas lisos y pronunciados, de color marrón a negro; no se observa columela; hay abundantes conidios que se desprenden de la cabeza; Tiene una fila de

filídides. El esporangio es una estructura peridial globosa simple, el esterigma es negro. Los conidios marrones maduros son esféricos con proyecciones en forma de espinas en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas, formando espículas en número mayor de diez. Los conidios tienen un aspecto esférico en forma de mazo con espículas, de los extremos emergen filamentos largos 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 llenan formando masas marrones internas. El conidióforo es largo, liso, uniseriado, con abundantes esporas. En general, la espora es alargada e irregular, aseptada, ameroporosa, coloreada y oscura del tipo feospora, de gran tamaño, cuyo diámetro es de 1 a 3 μm ; 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 llenan formando masas internas de color marrón, la apariencia de la colonia es de color negro polvoriento. El micelio es corto o aplanado y delgado y de color 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 la especie *niger* como la descubierta, la vesícula de la especie *niger* está irradiada su cabeza con conidios redondos y la otra descubierta tiene forma de mazo alargada sin irradiación. A 100x se puede observar que los conidios del *niger* son redondos con paredes gruesas y centro liso biseriada, con metula y radiada ((Samson, 2014). y 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 se tiñen con lactofenol azul algodón y los de *niger* sí (Vásquez, 2010). El *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 filídides. 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. (Salazar, 2012) . Las hifas siguen su camino en un conidióforo que en su extremo terminal termina en una cabeza conidial globosa de la que emergen los filídides y se desprenden las esporas o conidios para volver a su ciclo. Cada hifa, en su extremo, forma cabezas conidiales globosas que pueden producir más de 500.000 conidios.

(Lifeder, 2023). Estos conidios a 100x tienen una apariencia rugosa 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 conidióforo hacia el extremo hasta llegar a la vesícula donde se acumulan, ejerciendo un efecto mecánico de presión hacia el exterior desde donde emergen de los fálidos hacia el exterior, esto es constante una y otra vez. Las hifas son estructuras cilíndricas filamentosas que forman el cuerpo de los hongos pluricelulares. 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 que constituyen el punto de partida para el desarrollo del micelio del hongo. Las hifas uniseriada 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*. (Bolet,2005), (Raeper, 1998),(Cao, 2022), (Marchese,2018) principalmente *Aspergillus flavus* con aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y *Aspergillus parasiticus* ambos relacionados con Aspergiloma Pulmonar o Absceso Pulmonar o también diversos cánceres a hígado, riñón, páncreas, colorrectal. (UNAM,2013). El hongo en estudio produce micotoxinas y péptidos bioactivos relacionados con las enfermedades pulmonares Aspergilosis. El crecimiento en el tubo con Saboraud después de semanas se vuelve plano de color negro aterciopelado. 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 rodeada por un halo casi negro. Cuando se observa bajo un microscopio de 40 x, se observan más de 20-30 conidios marrones abundantes por campo que no se tiñen con lactofenol azul 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 *niger*, pero en nuestro caso no ocurre. Con el tiempo, más de un mes, se vuelve negro aterciopelado. En la Figura 1 se muestra la caracterización fenotípica anteriormente descrita.



Fig 2 . Comparación de especies con planta de cactus natural. *Aspergillus uessalvadoriensis*

En la Fig. 2. La comparación de la especie con conidios espículas con la planta natural de cactus que también se observan espículas. Estos le confieren resistencia al calor y aportan humedad. Pueden sobrevivir a temperaturas superiores a 60-100 °C o más. Las espinas o espículas le protegen contra del calor proporcionándole humedad. En la fig. 3. Por el método de microscopía electrónica de barrido en laboratorio, se encontró que dos semanas después del cultivo, los conidios emergen de las fiálides uniseriadas en columna de la vesícula. Hubo un rápido crecimiento de esporulación a los cinco minutos, a una hora había millones de esporas en 10 campos. Se observa el conidióforo hialino rugoso con cabeza conidal e hifas, en la fig C se observa elongación de las hifas acumuladas con filamento y ramificación. Hay conidios en forma de raqueta fig G. Este *Aspergillus* en condiciones de

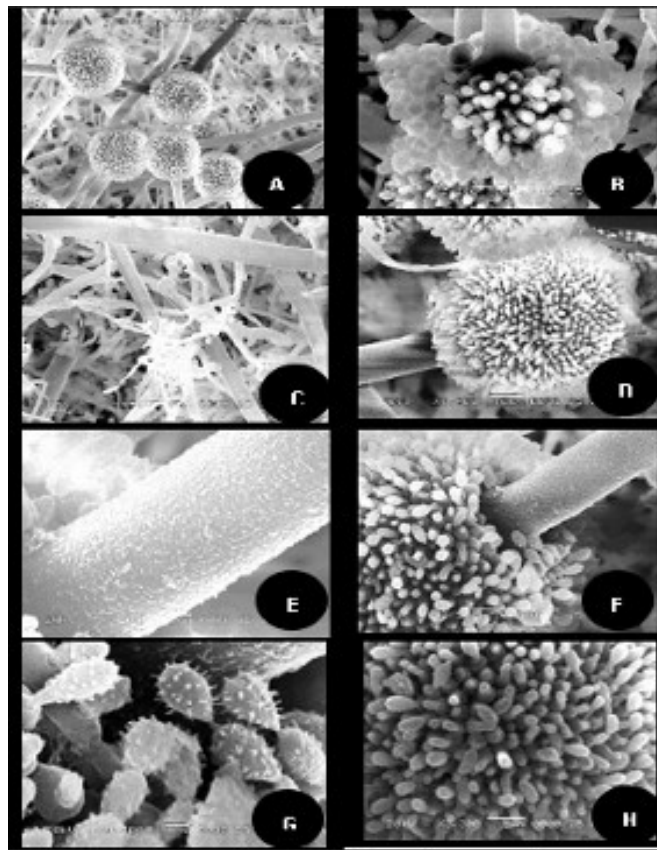


Fig. 3. *Aspergillus uessalvadorensis* Microfotografía electrónica de barrido. Cortesía de CENSALUD por Dra Vianney de Abrego. A.Morfología *Aspergillus*, B. vesícula, C: Zapata, elongación de las hifas con filamento y ramificación D. Cabeza de conidios, E. codióforo rugoso, F. vesícula globosa y fialide, G. conidios, H. cabeza de conidiales columnar y conidióforo.

temperatura le favorece las altas temperaturas ya que una humedad relativa detiene el crecimiento de hongos que producen estas toxinas como aflatoxinas, al exponerlo al calor crece y es

termorresistente. 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 protegerlo. Su composición química se basa en proteínas y glucoproteínas en un 10%, lípidos en un 8%, minerales como el calcio, el magnesio y el fósforo. Tienen componentes de quitina, quitosanos, peptidoglicanos y mánanos. En el laboratorio, la quitina se suaviza con un 40% de hidróxido de potasio para su estudio morfológico. Los hongos no tienen celulosa en la mayoría de ellos, a diferencia de los vegetales. (Garraway, 1984) (Vega, 2021). El *Aspergillus* tiene un ciclo biológico muy sencillo, en el que se forman las esporas para su reproducción y tras su germinación se forman las hifas, que serán las formas invasoras 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. (Abarca, 2000, Atlas, 2006). 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 pueden ser inhalados fácilmente. Resisten las altas temperaturas debido a su duro caparazón, algunos contienen melanina que los protege del calor y pueden recorrer kilómetros a distancia a otras zonas y colonizar. Crecen rápidamente en menos de 5 días y ya han madurado. En la Fig.4 se observan las cabezas de las especies *A.niger* y *A.uessalvadoriensis*, en las que se observan las diferencias de *A.niger* su cabeza es redonda, radiada y biseriada con métula, mientras que *A.uessalvadoriensis* tienen forma de mazo alargada columnar en su extremo uniseriada sin métula.

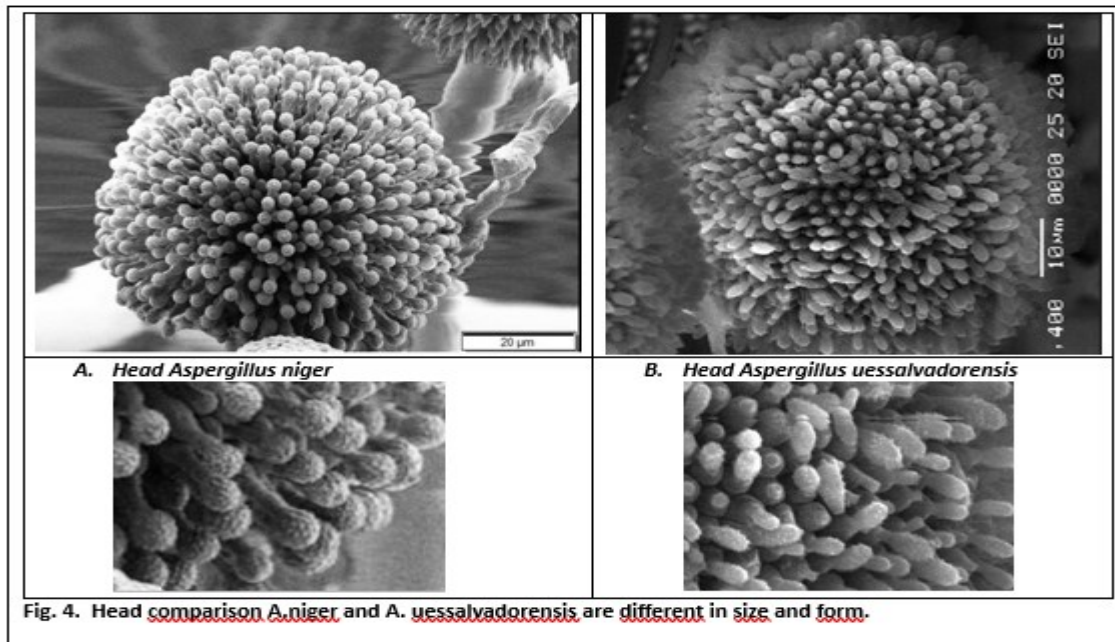


Fig 4. Cabezas: vesícula globosa radial de la especie *A.niger* y vesícula globosa columnar de *A.uessalvadorensis*.

Múltiples especies y variedades del género *Aspergillus* circulan por todo el mundo, se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican 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* y otros. (Alcalá, 2018), (Ruiz,2018) En general del genero *Aspergillus* tiene entre 30-40 megabases (Mb), que equivale a unos 30-40 millones de pares de bases (pb) a considerar en una secuenciación.

B. Caracterización genotípica.



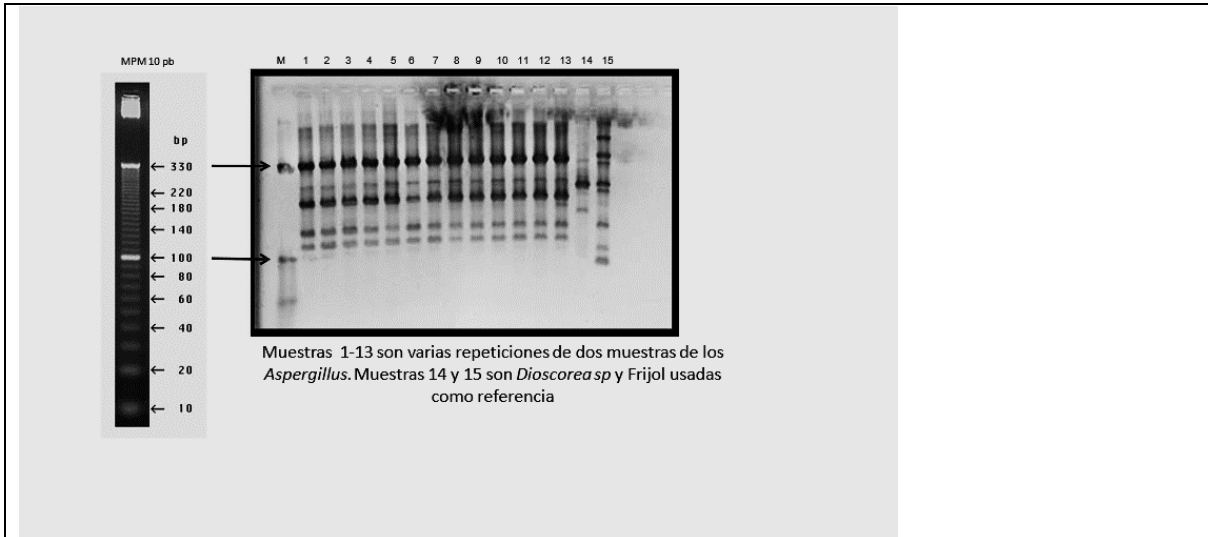
Fig. 5 . Evolución estudio fenotípico y genotípico.

A la izquierda semilla nacascal, a la derecha conidia a 100x, abajo conidióforo a 100x,al centro el gDNA y a la derecha microfotografía electrónica de barrido de conidoforo.

En la figura 5 Se tiene la evolución del estudio desde el origen de la semilla, el aislamiento del hongo a la observación a 100x conidia, luego a la izquierda el conidióforo a 100x, al centro la secuenciación gDNA y a la derecha microfotografía electrónica del conidióforo y al final la secuenciación gDNA.

-PCR preliminar .

En la Fig. 6. Se observa la PCR de la muestra de la especie, en la que se destaca en primer lugar que es del género *Aspergillus spp.* En 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 con la muestra de estudio.



Aislamiento de ADN

El método más eficiente para extraer ADN del micelio del hongo fue el reportado por Sagai-Marroof, (984) con el que se obtuvo ADN de alto peso molecular (Figura 2).

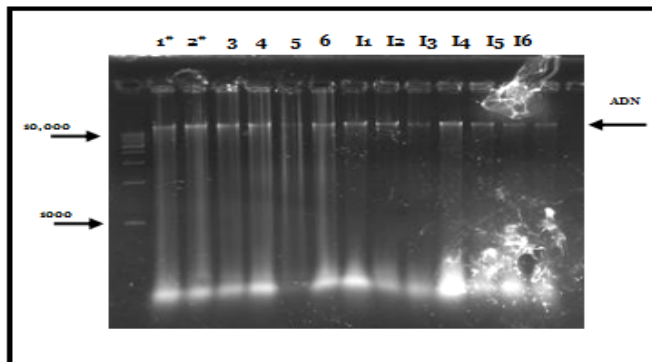


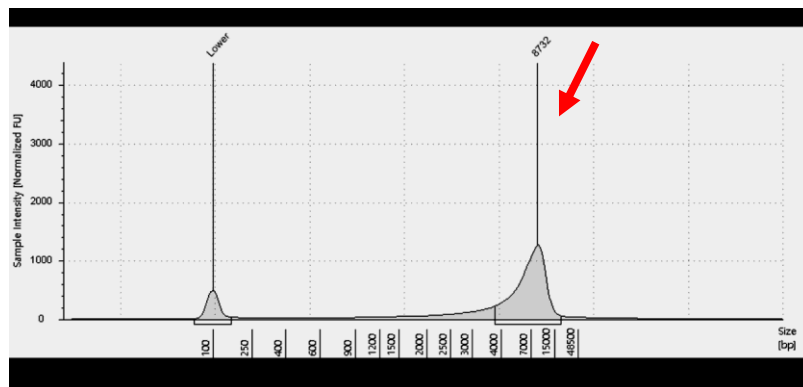
Fig.2. ADN genómico obtenido en trece muestras de *Aspergillus sp.*

Fig. 6. Muestra PCR de diferentes especies. El Salvador. *Aspergillus uessalvadorensis* Fuente: Instituto de Biología Molecular. México.

-PCR

Un gráfico de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se refiere a la representación gráfica de los resultados de un experimento PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real. Este tipo de gráfico muestra cómo la cantidad de ADN amplificado aumenta a lo largo de los ciclos de la PCR, y es fundamental para analizar la expresión génica, detectar mutaciones, o cuantificar ADN o ARN en una muestra. El Eje X: Representa el número de ciclos de PCR. A medida que avanzan los ciclos, la cantidad de ADN amplificado aumenta exponencialmente, si el ADN diana está presente. El Eje Y: Representa la cantidad de fluorescencia detectada, que es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. En qPCR, los gráficos muestran la intensidad de fluorescencia a lo largo de los ciclos, lo que permite cuantificar el ADN. Las curvas de amplificación representan cómo el ADN se amplifica durante los ciclos. Una curva típica comienza plana, luego sube exponencialmente y finalmente se aplanan nuevamente indicando que los reactivos se agotan. El ciclo umbral (Ct) es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN; un Ct más bajo indica una mayor cantidad inicial de ADN. Si se compara la expresión de un gen específico en diferentes muestras, el gráfico de PCR muestra cuál muestra tiene una mayor o menor expresión del gen en algunos experimentos, la presencia o ausencia de un producto de PCR específico puede indicar la presencia de una mutación.

-Extracción de gDNA.



gDNA extraction Aspergillus

Análisis. En la fig. 7. Se observó la extracción de gADN, del TapeStation gDNA Screen Tape 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. Hace referencia al ADN extraído de células o micelio, el cual contiene la información genética completa de un organismo con base a la cantidad, calidad, o características del ADN total extraído de una muestra antes de la secuenciación. Los cebadores deben estar especialmente diseñados para garantizar una alta especificidad y generar amplicones que varían en tamaño de 100 a 150 pb. Después el genotipado se llevó a cabo en los laboratorios de MACROMEDIA INC. Corea del Sur, cumple con un protocolo de calidad estándar para procesar el proyecto de investigación, el cual consta de las siguientes etapas: preparación de la muestra, preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis bioinformático. En cada uno de los pasos se cumple el control de calidad de la muestra, el control de calidad de la biblioteca y el control de calidad de los datos para finalizar el proyecto terminado. con certificación de Illumina CSPRO™ certificación para laboratorios de secuenciación e Illumina Genome Network. “Para determinar el método DNA QC METHOD se realizó mediante el método del sistema QuantiFluor® dsDNA* utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo**. Macrogen cuantificó el material genómico de partida mediante cuantificación basada en fluorescencia. Dado que la cuantificación basada en fluorescencia utiliza colorantes específicos de ADN de doble cadena, este método cuantifica el dsDNA con mayor precisión que el basado en espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Se utilizaron los siguientes aparatos: * Sistema QuantiFluor® dsDNA (Promega, cat. n.º E2671). ** Lector de microplacas multimodo VICTOR Nivo (PerkinElmer, n.º de pieza HH35000500). Para la evaluación del estado del ADN: se utiliza el bioanalizador 2100*** (o 4200 TapeStation****). Se verificó la integridad del ADN genómico utilizando un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies (o 4200 TapeStation). Para determinar el método RNA QC METHOD se realizó mediante el método de ensayo de ARN RiboGreen Quant-it™* utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo**. Macrogen cuantificó el material genómico de partida mediante cuantificación basada en fluorescencia. El reactivo de ARN RiboGreen Quant-iT™ también se une al ADN. Por lo tanto, se recomendó utilizar un pretratamiento con ADNasa sin ARNasa para una medición precisa de la concentración. * Kit de ensayo de ARN RiboGreen Quant-iT (Invitrogen, cat. n.º R11490) ** Lector de microplacas multimodo VICTOR Nivo (PerkinElmer, n.º de pieza HH35000500). Para la evaluación del estado del ARN: se utilizó el bioanalizador 2100*** (o el TapeStation 4200****). Se comprobó la integridad total del ARN utilizando un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies (o el TapeStation 4200). El uso de ARN degradado puede provocar bajos rendimientos, sobreetiquetado del extremo 5' de la molécula de ARN o crear fallas del protocolo, por lo que se utilizó muestras de ARN de alta

calidad. *** 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Part# G2939BA).**** 4200 TapeStation System (Agilent, Part# G2991BA)“. (MACROGEN,2024)

Interpretación. Una alta concentración: Indica una buena cantidad de ADN extraído, lo cual 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 baja cantidad de ADN. El gADN genómico es el ADN que contiene la información genética completa de un organismo, incluyendo todos los genes y regiones reguladoras presentes en su genoma. Hasta este momento se desconoce que especie podría ser.

-Técnica de qPCR.

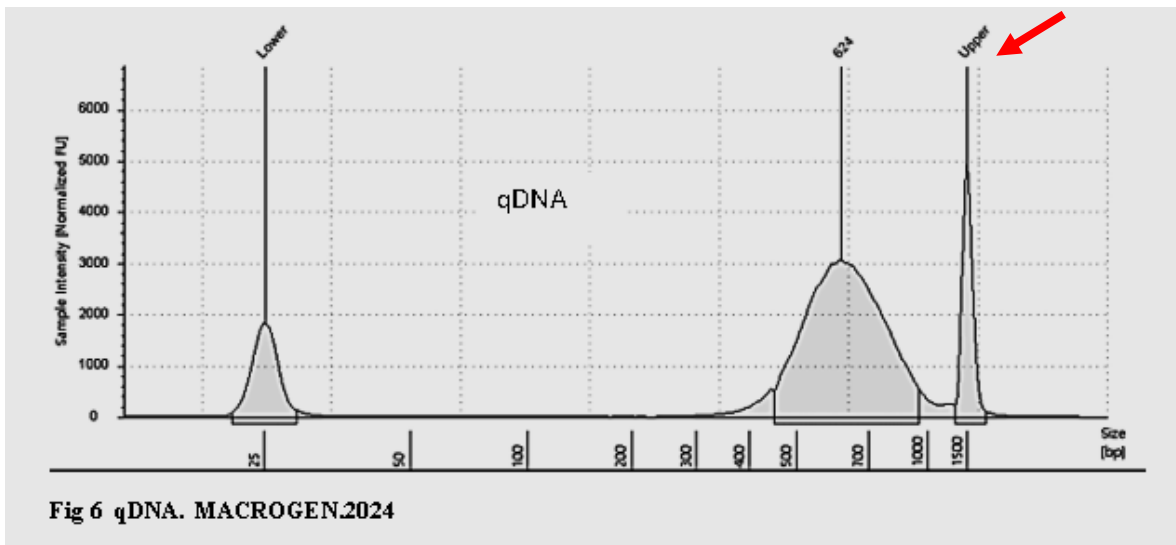


Fig 6 qDNA. MACROGEN.2024

Fig. 8 qDNA. *Aspergillus uessalvadoriensis* MACROGEN INC. 2024

Análisis. En la Fig. 8. Se observa de muestra enviada desde El Salvador del LightCycle qPCR se obtuvieron los 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul con la librería TruSeq Nano DNA (350_META) indicando que la prueba pasa a la siguiente etapa que es la construcción con 32 kits tipos de librerías que van desde 5 a 10 nM en la plataforma NovaSeq. Hace referencia 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 espectrofotometría o electroforesis en gel. Comprobación del tamaño de la biblioteca. “Para verificar el tamaño de los fragmentos enriquecidos con PCR, se verificó la distribución del tamaño de la plantilla mediante la ejecución en un bioanalizador Agilent Technologies 2100 con un chip DNA 1000. Se utilizo la Biblioteca Illumina para lograr la máxima calidad de datos en las plataformas de secuenciación Illumina, se cuantificó las bibliotecas preparadas mediante qPCR de acuerdo con la Guía del protocolo de cuantificación de qPCR de Illumina. Se utilizó la biblioteca PacBio para generar una curva estándar de lecturas de fluorescencia y calcular la concentración de la muestra de la biblioteca, luego se utilizó la solución de cuantificación estándar Qubit y la calculadora.” (MACROGEN,2024)

Interpretación: Indica que a altas concentraciones: Muestras de ADN >10 ng/μL son ideales para la secuenciación, ya que aseguran que haya suficiente material genético para generar lecturas precisas. Caso contrario a bajas concentraciones: pueden requerir concentración adicional o repetir la extracción para asegurar suficiente ADN para el análisis. Para secuenciar un hongo se necesita una cantidad de pares de bases necesarios para secuenciar hongos puede variar dependiendo del objetivo del estudio y del tipo de secuenciación que se esté utilizando. Para obtener una cobertura adecuada del genoma completo de un hongo, generalmente se necesita 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 unos pocos megabases hasta más de 100 Mb megabases. Si se quiere secuenciar regiones específicas o ciertos genes, la cantidad de pares de bases requerida 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 un ADN cuantificado.

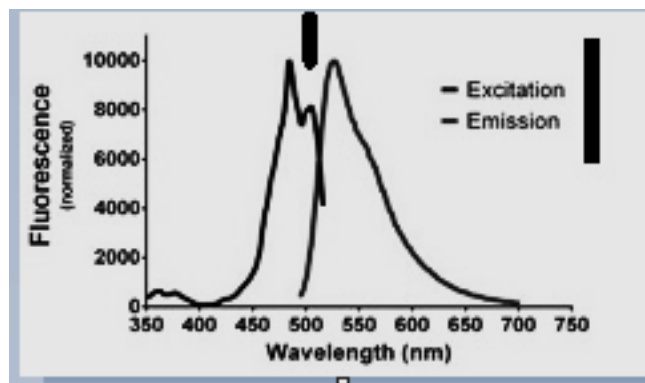
-cDNA library

Library DNA QC Criteria								
Platform	Library Type	Library Kit	Conc (molecules)	Conc (nM)	Conc (ng/ul)	Size(bp) From	Size(bp) To	etc
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (350)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (550)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (designated insert)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (LMW)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (350)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (550)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nexera DNA XT	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA Methylation	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel Methyl-Seq DNA library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq ChIP-seq library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Chromium Genome library v2	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nexera mate pair library (gel free)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nexera mate pair library (gel plus)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel-NGS 2S PCR-Free kit (350bp insert)	-	5	-	-	-	

Fig. 9 . cDNA librería.

Interpretación. Se utilizaron 33 kits de librerías. Se refiere a evaluar la calidad y la representatividad de la biblioteca de cDNA preparada para la secuenciación. Esta técnica se utiliza a menudo para crear una copia complementaria de ADN del ARNm a partir de un organismo específico. También se refiere a la visualización de la cantidad y/o calidad del ADN de doble cadena extraído de una muestra para análisis subsecuentes, como la secuenciación. Si los fragmentos son cortos: es un indicio de la degradación del ARN o una preparación ineficiente de la biblioteca. Si fragmentos son largos: indica problemas en la fragmentación del ARN durante la preparación. Es decir, se refiere a ADN complementario (complementary DNA). Este tipo de ADN se genera a partir del ARN mensajero (mRNA) mediante un proceso llamado transcripción inversa. El cDNA se usa para crear una biblioteca de secuenciación. Los fragmentos de cDNA se preparan añadiendo adaptadores en sus extremos. Estos adaptadores permiten que los fragmentos se unan a la superficie del flujo de celda y se amplifiquen durante el proceso de secuenciación.

-dsDNA



Se refiere al ADN de doble cadena, si tiene a una alta Concentración: Un valor alto en el gráfico indica una buena cantidad de ADN de doble cadena, lo cual es ideal para la secuenciación. Por ejemplo, concentraciones superiores a 10 ng/μL son generalmente consideradas 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, la ADN de doble cadena se desnaturaliza en ADN de cadena simple para permitir la lectura de las secuencias de nucleótidos. Durante la secuenciación, se lleva a cabo una amplificación y lectura de estos fragmentos de ADN para determinar la secuencia correcta de nucleótidos. En Macrogen es el FASTQ Files que contienen las secuencias de nucleótidos leídas directamente de la máquina de secuenciación, acompañado de información de calidad.

- Informe de SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA (Shotgun Metagenomic Sequencing Report): Resultado de datos. *Aspergillus sp* (MACROGEN)

Este informe está formado por las siguientes partes a analizar:

1.0-Estadística de datos sin procesar. (Raw Data Statistics.)

El apartado consta de:

A-Flujo de trabajo experimental. Macrogen.

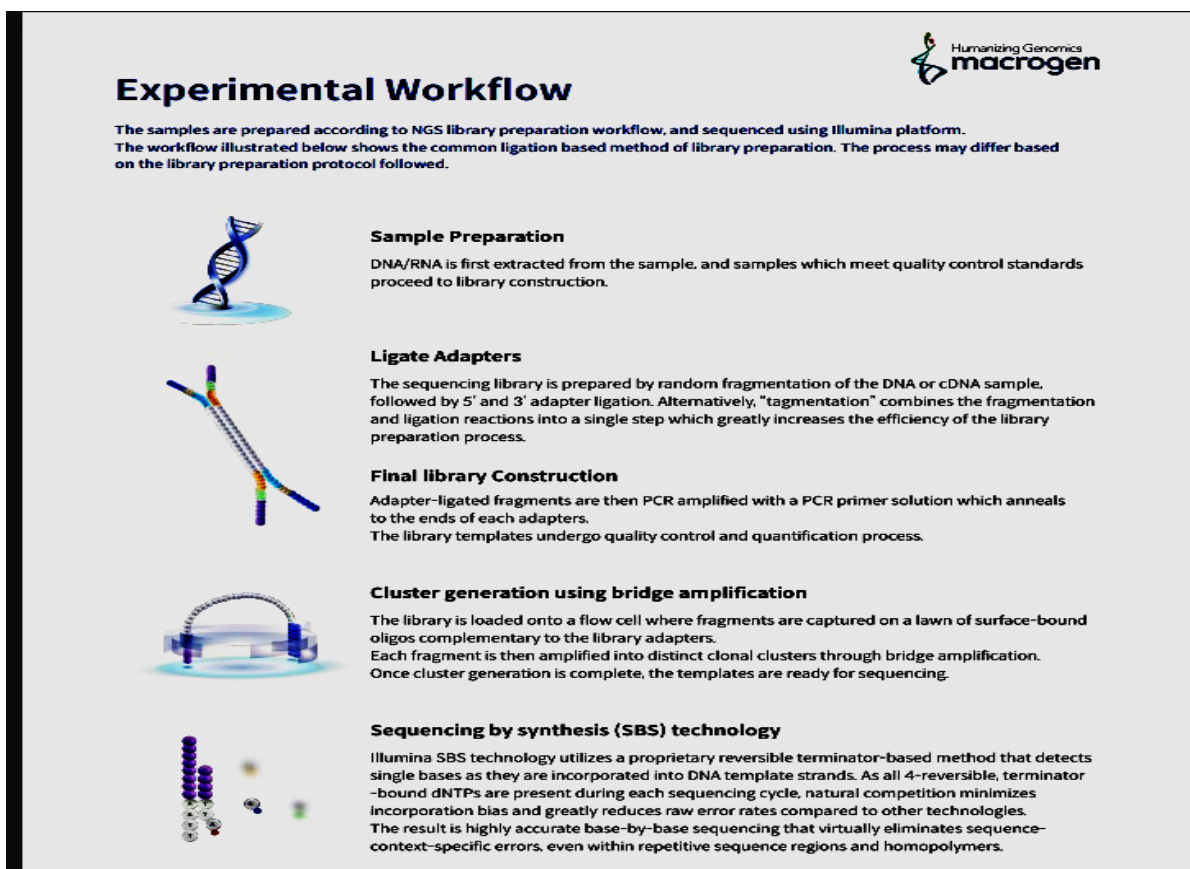


Fig. 10 . Flujo de trabajo de Macrogen.

En este apartado las muestras se preparan según el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Así por ejemplo: **Preparación de la muestra.** Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. **Adaptadores Ligate.** La biblioteca de

secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptador 5' y 3'. Alternativamente, la "marcación" combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. **Construcción final de la biblioteca.** A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recogen en los extremos de cada adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. **Generación de clústeres mediante amplificación de puentes.** La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de la biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puente. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. **Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS).** La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de ADN molduras. Dado que todos los dNTP 4 reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros. **Química de cuatro, dos y un canal.** Los sistemas que utilizan la química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos.

Generación de datos brutos. El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada base, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ utilizando bcl-convert, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas.

B. Tabla de datos brutos.

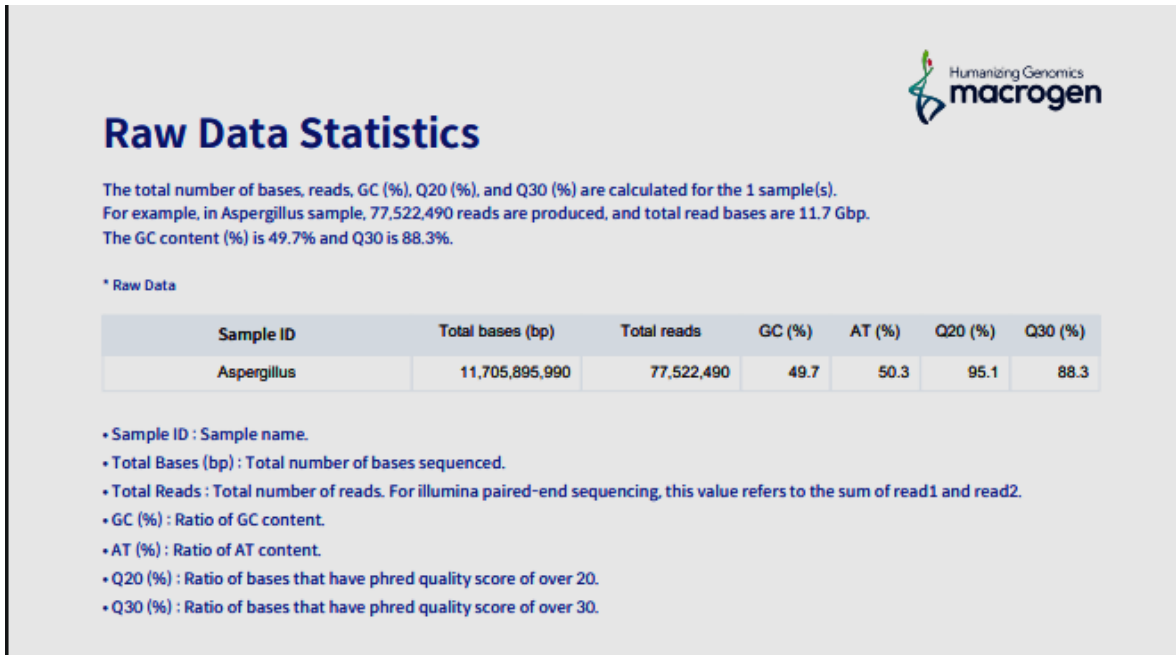


Fig 11. Tabla de datos brutos. MacroGen.

El raw data statistics o estadística de datos brutos, consta de: muestra ID, total de bases, total de lecturas, %GC, %AT, %Q20, %Q30 y calidad de ciclo, que se detalla a continuación:

1.1-Muestra ID:

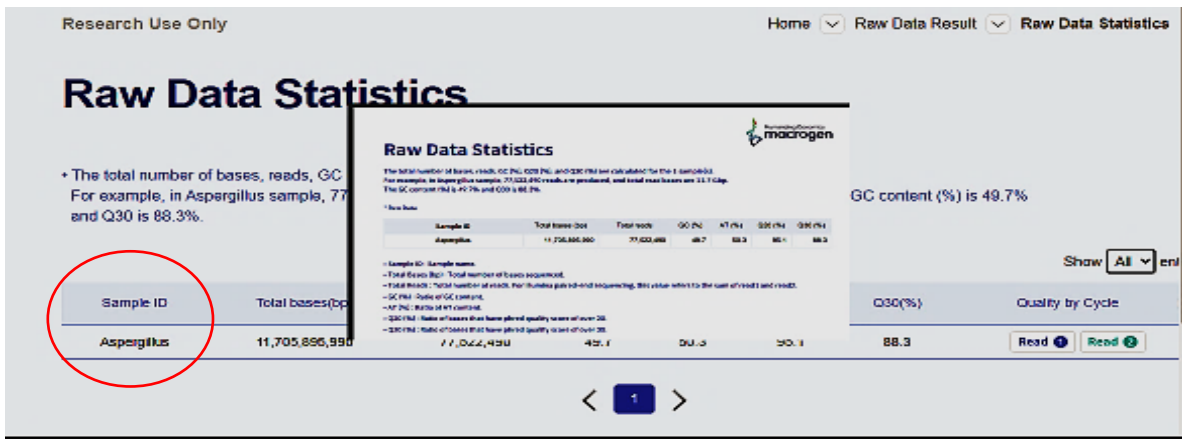


Fig. 12 . Identificación de muestras.

Es un código único asignado a cada muestra para distinguirla de otras en el mismo experimento. Cada muestra se registra con ID es decir es una identificación única para cada muestra y permite darles seguimiento durante cada etapa del proceso, es una clave para la identificación genómica.

Valor. La muestra enviada se identificó como *Aspergillus*.

Interpretación. Se refiere a un identificador único asignado a una muestra específica que se envía para análisis. Este ID permite rastrear y gestionar las muestras a lo largo de todo el proceso de análisis, desde la recepción y el procesamiento hasta la entrega de los resultados. Es determinante para asegurar que los datos y los resultados obtenidos se asocien correctamente con la muestra correspondiente, evitando confusiones y asegurando la precisión en la investigación o diagnóstico que se lleve a cabo.

1.2-Total de bases de un genoma: bp

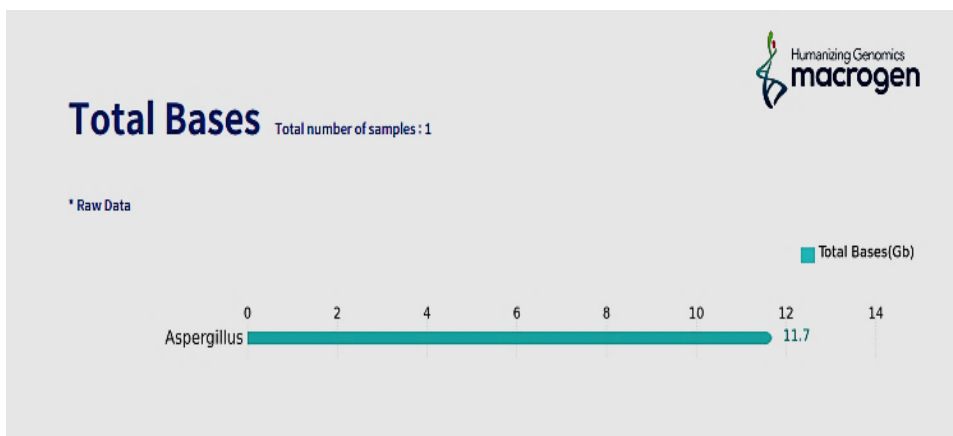


Fig 13 . Total de bases obtenidas. Macrogen

Valor. 11,705,895,990 pb

Análisis: Este valor indica 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 analizada. Es decir recuento de cuantas Guaninas, Citocinas y Adeninas y Timinas en la muestra. Es decir 5,735,889,035.1 fueron GC que contienen este número de nucleótidos que contienen la base nitrogenada GC y 5,852,947,,995 fueron AT es decir que hay este número de nucleótidos que contiene la base nitrogenada AT. En porcentaje el total de bases secuenciadas en Gb expresada en

porcentaje fue del 11.7, es decir la cantidad total de nucleótidos o base nitrogenadas presentes en la muestra de ADN. En su efecto el 11.7 la cantidad total en picomoles presentes en la muestra analizada.

Interpretación. Se refiere al conteo total de nucleótidos presentes en el genoma de la muestra, se asocia con la secuenciación de genomas de alta capacidad, esto implica que se están analizando y contabilizando todas las bases (A, T, C y G) que componen el ADN de la muestra. Si es alto el valor indica una gran cantidad de datos secuenciados, lo que generalmente mejora la capacidad para capturar una imagen completa del microbiota presente. Si es bajo indica cobertura insuficiente y limitar la capacidad para detectar especies raras o en baja abundancia. Las bases se identifican así: Adenina (A): color Verde. Citosina (C): Azul. Guanina (G): Negro. Timina (T): Rojo. Un gráfico de calidad con un pico verde sugiere que las secuencias en esa región son confiables y tienen pocas probabilidades de contener errores. Un gráfico de color amarillo suele indicar una calidad media o intermedia en los datos de secuenciación o análisis genético. Esto significa que las lecturas o señales en esa región pueden no ser tan confiables. Un gráfico de color rojo esto sugiere que las lecturas en esa región tienen una alta probabilidad de contener errores o ser poco confiables. En otros acápites un color negro indica Guanina, naranja es Timina, amarillo es Adenina y verde es Citocina.

1.3-Total lecturas:

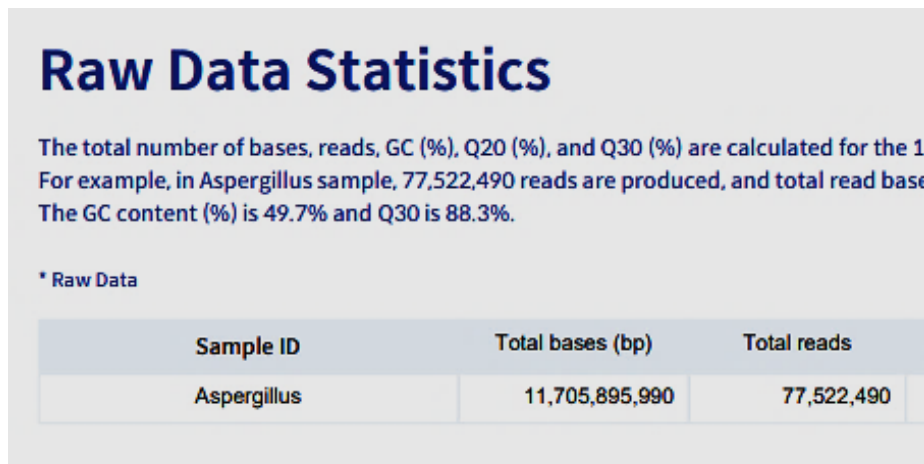


Fig. 14 . Total, de lecturas. Macrogen.

Valor. 77,522,490.

Análisis: El número 77,522,490 entonces el valor total sería 77,522. Esto podría indicar que en total se han registrado 77,522 lecturas (o “reads”). Se producen lecturas 77.522.490 y las bases de lectura totales son de 11,7 Gbp. En otras palabras el 66 % de lecturas de ADN es la proporción de secuencias fueron leídas exitosamente de los fragmentos de ADN que han sido secuenciados y luego se ensamblan o se alinean para ronstruir la secuencia completa. Este porcentaje indica también que se ha secuenciado correctamente y ha generado datos de calidad y el resto 34 % podría corresponder a lecturas fallidas o de baja calidad o que no pudieron ser alineadas o ensambladas correctamente

Interpretación. Se refiere al número total de lecturas o **reads** en inglés. Que son generadas durante el proceso de secuenciación de una muestra de ADN. Las lecturas son fragmentos de ADN que se han secuenciado, y cada lectura representa una parte del material genético que ha sido analizado. Un mayor número de lecturas generalmente indica una mayor cobertura del genoma, lo que puede resultar en una mayor precisión y confiabilidad en los resultados del análisis. De tal forma que es una métrica importante para evaluar la calidad y la cantidad de datos obtenidos en un experimento de secuenciación. Indica si hay altos valores: hay una cantidad significativa de datos secuenciados, lo que generalmente mejora la capacidad de capturar una imagen completa del microbiota presente.

1.4-GC/AT Content:

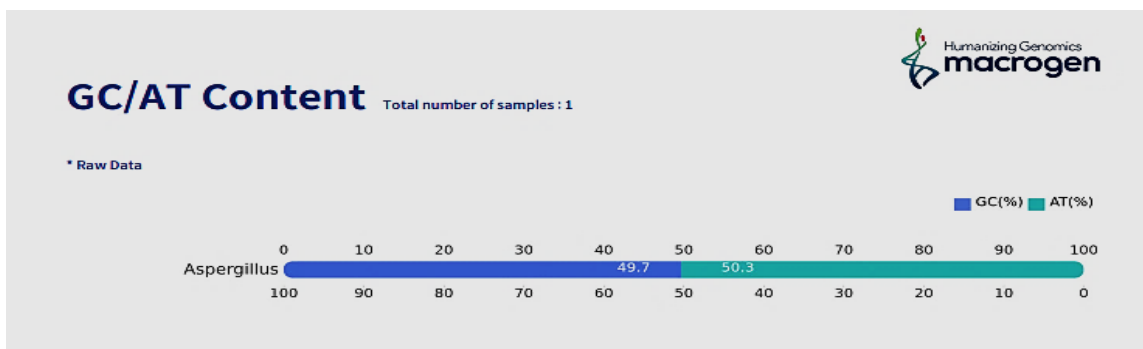


Fig. 15 . Contenido de nucleótidos. Macrogen.

Valor. GC % 49.7 y AT % 50.30

Análisis: Indica que hay 49.7 % de Guanina-Citocina y un 50.30% de Adenina-Timina.

Interpretación. Se refiere al contenido de las bases nitrogenadas guanina (G), citosina (C), adenina (A) y timina (T) en una secuencia de ADN. Es un indicador de la composición de la secuencia y puede influir en propiedades como la estabilidad del ADN y la temperatura de fusión (Tm). Un alto

contenido GC indica una mayor proporción de guanina y citosina en las secuencias. Si es alto el contenido AT indica una mayor proporción de Adenina y Timina.

1.5-GC Contenido:

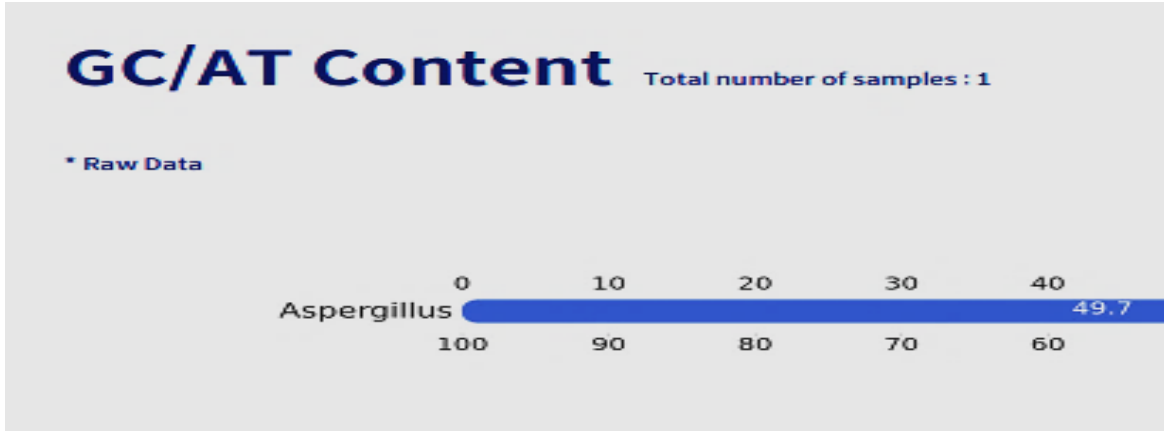


Fig. 16 . Contenido de bases GC. Macrogen

Valor. The GC content (%) is 49.7%

Análisis: Indica un contenido de 49.7 % de GC en una secuencia de ADN sugiere un equilibrio considerable entre los pares de bases GC y AT, lo que puede influir en la estabilidad y propiedades de la secuencia de ADN. Porcentaje GC: Indica que el 50% de las bases en la secuencia de ADN son guanina o citosina, mientras que el 50% restante son adenina o timina. Este porcentaje es una medida del equilibrio entre estos dos tipos de pares de bases en una secuencia.

Interpretación. Es el porcentaje de Guanina y Citosina en una secuencia de ADN. Un alto contenido de GC generalmente sugiere una mayor estabilidad de la doble hélice, debido a la formación de tres enlaces de hidrógeno entre G y C, en comparación con los dos enlaces de hidrógeno formados entre A y T.

1.6-AT Contenido:

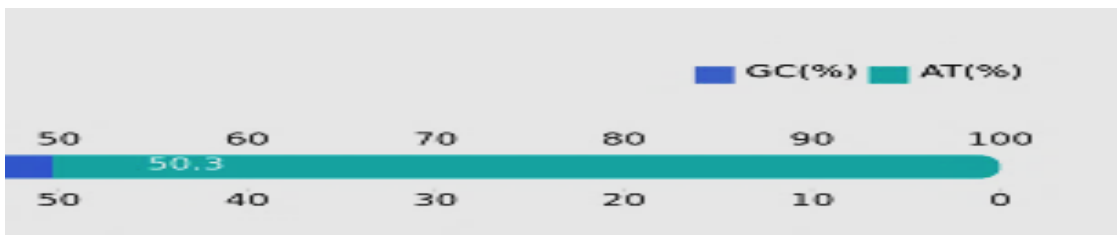


Fig. 17 . Contenido de bases AT. Macrogen.

Valor. 50.3

Análisis: El valor "55.0 AT %" se refiere al porcentaje de contenido de pares de bases adenina-timina (AT) en una secuencia de ADN. Es decir que la composición del ADN las bases adenina (A) y timina (T) se emparejan entre sí mediante dos enlaces de hidrógeno. El contenido AT en una secuencia de ADN se refiere a la proporción de bases adenina y timina en comparación con las bases guanina y citosina. Un porcentaje AT de 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, existiendo un equilibrio en las pares de bases.

Interpretación. Es el porcentaje de adenina y timina en la secuencia indica un bajo contenido de GC y un alto contenido de AT pueden hacer que la cadena de ADN sea menos estable y más propensa a desnaturalizarse a temperaturas más bajas. El contenido de GC/AT puede ser importante para evaluar la calidad de una secuencia y para interpretar ciertos resultados, como la eficiencia de amplificación en PCR o la predicción de la estructura secundaria del ARN.

1.7-Las métricas Q20 y Q30:

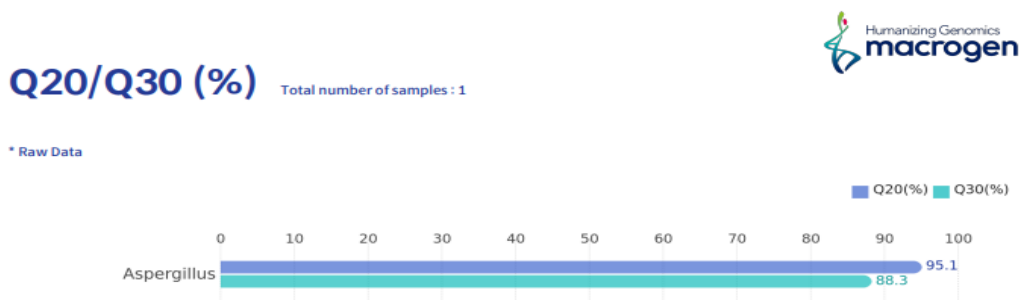


Fig. 18 . Contenido de bases métricas. Macrogen

Valor. Q 20 95.1 y Q 30 88.3

Análisis: Un valor de Q 20 de 95.1 nos indica que tiene un score alto, lo cual es bueno, porque si fuese bajo indicaría baja calidad lo que no sucedió.

Interpretación. Altos valores indican que una alta proporción de las bases tiene un score de calidad alto, lo que sugiere lecturas precisas y fiables. Una baja proporción de bases con scores Q20 o Q30 indica una menor calidad de las lecturas, con una mayor probabilidad de errores en las bases. Una

alta proporción de bases Q30 es especialmente deseable, ya que indica una secuenciación de alta calidad con bajos niveles de error. **Q20**: porcentaje de bases con una calidad de valor phred o medida logarítmica igual o superior a 20. Esto es la probabilidad de encontrar 1 base incorrecta de cada 100 bases, o una precisión de 99%. **Q30**: Indica que el 99.9% de las bases secuenciadas tienen un 99.9% de probabilidad de ser correctas. Este es un estándar de calidad más alto que el Q20 y se considera excelente. **Q30**: porcentaje de bases con una calidad de valor phred igual o superior a 30. Esto es la probabilidad de encontrar 1 base incorrecta cada 1000 bases, o una precisión de 99.9% **Q20**: Indica que el 95% de las bases secuenciadas tienen un 95% de probabilidad de ser correctas. Se considera que una lectura Q20 es de buena calidad. El valor Q20 representa un nivel bajo de errores en la secuenciación. También nos indica el porcentaje total de las lecturas que alcanzan esos umbrales de calidad. Por ejemplo, si se indica que el 90% de las lecturas tienen una calidad Q30, significa que el 90% de las bases secuenciadas son altamente confiables. En otras palabras, Q20: con 99% de precisión (1 error por cada 100 bases). Q30: con 99.9% de precisión (1 error por cada 1000 bases).

1.9-Calidad por ciclo:

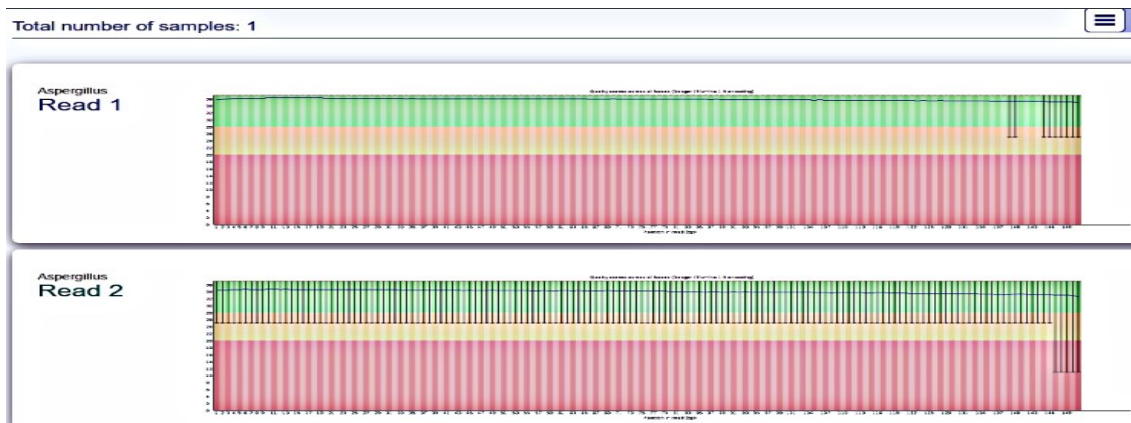


Fig. 19. Calidad de datos por ciclos Macrogen

Valor: Q30 valor alto, intermedio entre Q30 y Q20, y Q30 menor a Q20 indica valor bajo.

Análisis: En la lectura 1 lectura 2 indica grado de identificación en cada uno de esos ciclos. Se representa comúnmente en un gráfico donde el eje X muestra los ciclos en las posiciones en la secuencia, y el eje Y muestra una medida de calidad, a menudo en forma de puntaje de calidad como el valor Q. Es un análisis de calidad realizado por FASTQC para lecturas brutas del genoma del *Aspergillus*. En la parte alta se refiere a la calidad. En la parte baja se observa en sentido 5' a 3' y

viceversa en sentido contrario. Eje X son las bases y el eje Y el valor de Q30 Los colores representan la calidad , así el verde indica calidad alta, amarillo indica calidad intermedia y calidad baja el rosado. Un valor alto de calidad por ciclo sugiere que la secuenciación es precisa y que se identifican correctamente las bases en ese ciclo específico. Un valor bajo podría indicar problemas con la lectura en ese punto, como errores de secuenciación o problemas con la muestra.

Interpretación. Se refiere a la calidad de los datos generados, se evalúa en relación con cada ciclo de secuenciación. Esto significa que la calidad de los datos se monitoriza continuamente a medida que se realiza la secuenciación, permitiendo detectar y corregir errores en tiempo real, lo que a su vez asegura que los resultados finales sean más precisos y confiables. Es un punto crítico de control ya que la calidad de los datos puede influir significativamente en las interpretaciones y conclusiones que se derivan de estudios genéticos, ya que asegura la calidad a lo largo de cada ciclo.

C. Entregas. Deliverables.

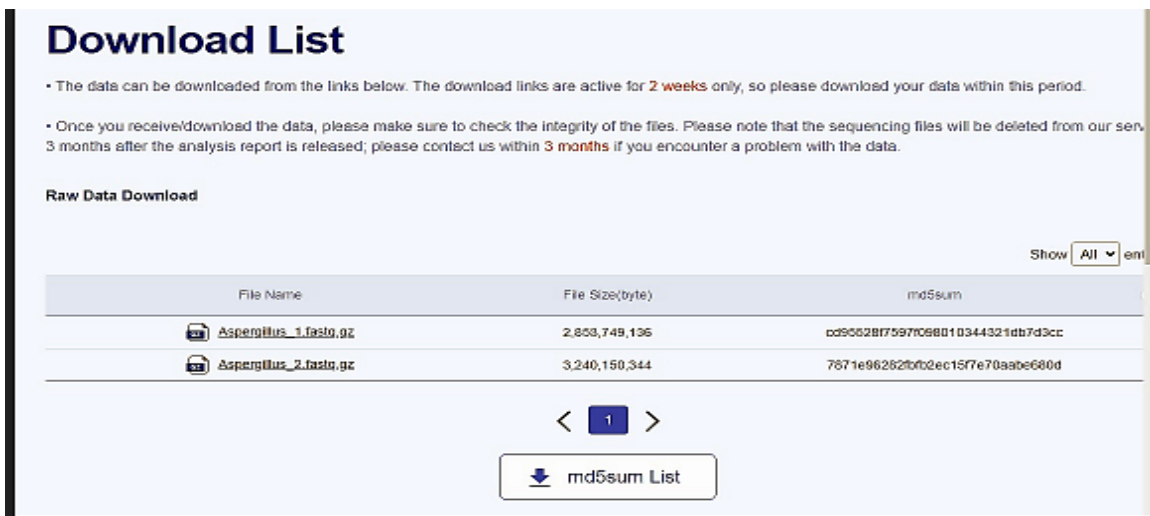


Fig 20. Entregas. Macrogen.

Valor. Los datos se pueden descargar desde los siguientes enlaces. Los enlaces de descarga están activos solo durante 2 semanas, así que descargue sus datos dentro de este período. Una vez que reciba/descargue los datos, asegúrese de verificar la integridad de los archivos. Tenga en cuenta que los archivos de secuenciación se eliminarán de nuestro servidor 3 meses después de que se publique el informe de análisis.

Raw Data Download

Interpretación- Es una Lista de descargas. Los datos para este pedido se entregan en PDF al usuario o cliente. Están en plataforma por 3 meses. Se da también una Información del disco duro **HDD**. El siguiente diagrama muestra cómo se guardan los entregables dentro del disco duro para ayudarlo a navegar por los archivos. Se envían en Excel, Note Pade/ Block de notas y archivos comprimidos para revisión por el usuario.

D.Apéndice o Appendix

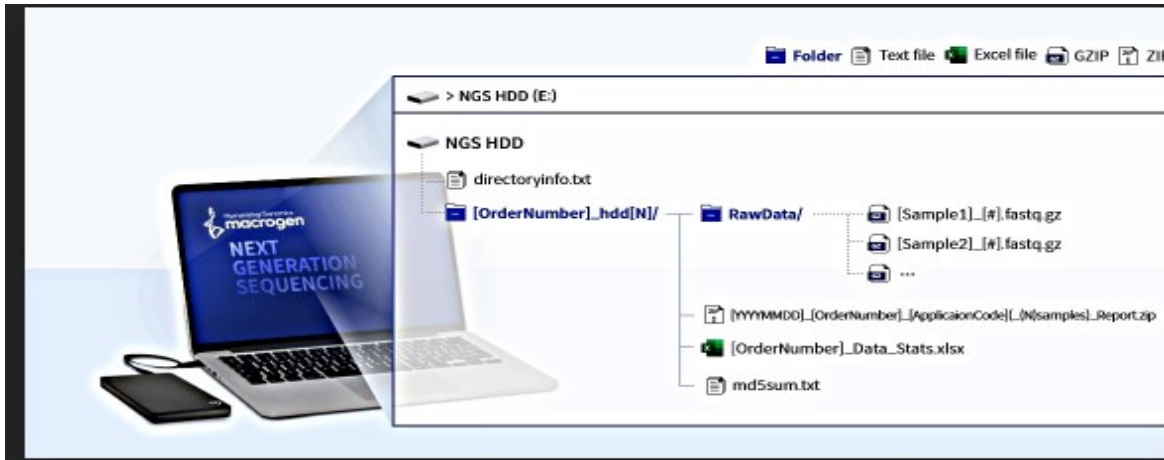


Fig. 21. Apéndice

Valor. Los datos NGS tienden a tener un tamaño de archivo grande, lo que hace que sea más probable que se corrompan durante la transferencia de archivos. Por lo tanto, es importante que verifique la suma md5 de los archivos después de recibirlos para asegurarse de que lo que recibió es lo que le dimos.

Este comprende **FAQ**. se refiere a "Frequently Asked Questions" (Preguntas Frecuentes). (Macrogen,2024)

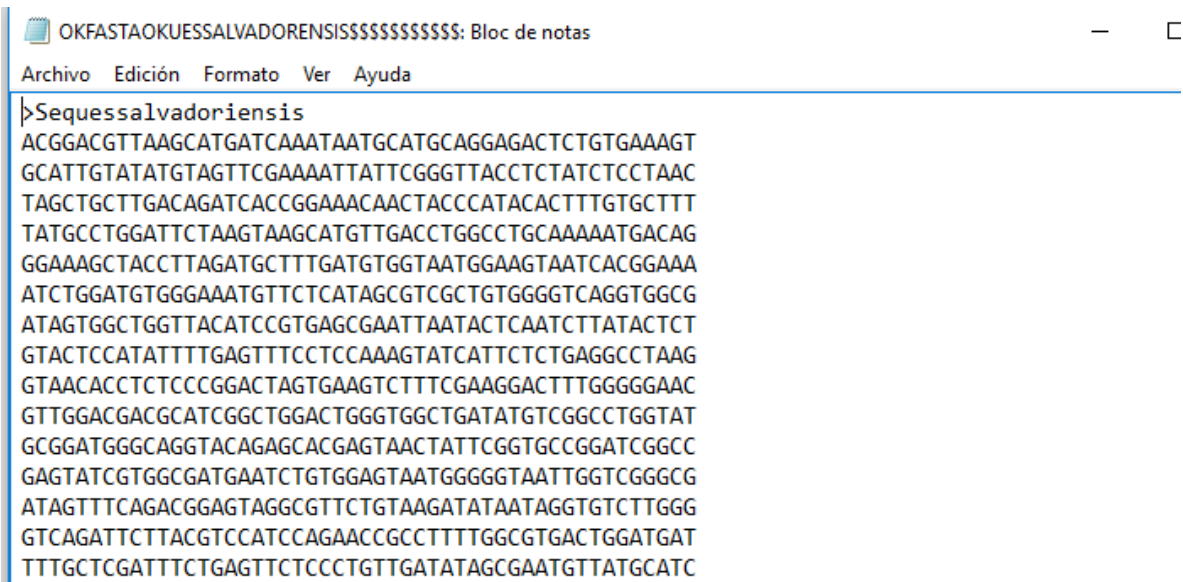
FASTQ es un formato de archivo utilizado para almacenar datos de secuenciación de ADN. Es un estándar en bioinformática para representar tanto las secuencias de nucleótidos como las calidades de las secuencias obtenidas durante el proceso de secuenciación. Para poder leer las lecturas de las bases de nucleótidos los archivos se convierten en otro programa llamado **FASTA** de lectura fácil para leer toda la secuenciación completa en proceso de curar. El archivo pesa 13.5 Gb.

```

>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:4218:1000:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG#0/1
NACGGACGTTAAGCATGATCAAATAATGCATGCAGGAGACTCTGTGAAAGTGCATTGTATATGTAG
TTCGAAAATTATTCCGGTTACCTCTATCTCCTAACTAGCTGCTTGACAGATCACCGGAAACAAC
CCATACACTTTGTGCTTT
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:19886:1016:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG#0/1
TATGCCTGGATTCTAAGTAAGCATGTTGACCTGGCCTGCAAAAATGACAGGGAAAGCTACCTTAGA
TGCTTTGATGTGGTAATGGAAGTAATCACGGAAAATCTGGATGTGGGAAATGTTCTCATAGCGTCG
CTGTGGGGTCAGGTGGCGA
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:27516:1016:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG#0/1
TAGTGGCTGGTTACATCCGTGAGCGAATTAATACTCAATCTTATACTCTGTACTCCATATTTTGAG
TTTCTCCAAAGTATCATTCTCTGAGGCCTAAGGTAACACCTCTCCCGGACTAGTGAAGTCTTTCCG
AAGGACTTTGGGGGAACGT
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:24089:1031:N:0:TCTCTACT+GACCCGCG#0/1
TGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAG
AGCACGAGTAACATTCGGTGCCGGATCGGCCGAGTATCGTGGCGATGAATCTGTGGAGTAATGGG
GGTAATTGGTCGGGCGATA
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:25391:1031:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG#0/1
GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGGGGTCAGATTCTTACGTCCAT
CCAGAACC GCCTTTTGGCGTGACTGGATGATTTTGCTCGATTCTGAGTTCTCCCTGTTGATATAG
CGAATGTTATGCATCTCAT
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:3974:1047:N:0:TCTCTACT+GACCCGCG#0/1
CAGAGGACGAGTACCGAAGGTATGACTGGTCCGGCTCCGTTACCCCACTTGTGTGTCTTGGCCG
ATCAGTTAACATGTCAGAGACTTAGTCTATCGGCACCCTGTCTGCGTAGTCAGACTGCCCTGAAGG
TGAGGGAGATAGTCTGGA
>A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:12491:1047:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG#0/1
CCGAAATCATTGAATTGAATTGCCAATGGCCAGGGCCTTGGTGGTGCAGTCAAGGAGTAATACAT

```

FASTA 1



OKFASTAOKUESSALVADORENSIS: Bloc de notas

Archivo Edición Formato Ver Ayuda

```

>Sequessalvadoriensis
ACGGACGTTAAGCATGATCAAATAATGCATGCAGGAGACTCTGTGAAAGT
GCATTGTATATGTAGTTTCGAAAATTATTCCGGTTACCTCTATCTCCTAAC
TAGCTGCTTGACAGATCACCGGAAACAACACCATACACTTTGTGCTTT
TATGCCTGGATTCTAAGTAAGCATGTTGACCTGGCCTGCAAAAATGACAG
GGAAAGCTACCTTAGATGCTTTGATGTGGTAATGGAAGTAATCACGGAAA
ATCTGGATGTGGGAAATGTTCTCATAGCGTCGCTGTGGGGTCAGGTGGCG
ATAGTGGCTGGTTACATCCGTGAGCGAATTAATACTCAATCTTATACTCT
GTACTCCATATTTGAGTTTCTCCAAAGTATCATTCTGAGGCCTAAG
GTAACACCTCTCCCGGACTAGTGAAGTCTTTCGAAGGACTTTGGGGGAAC
GTTGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTAT
GCGGATGGGCAGGTACAGAGCACGAGTAACATTCGGTGCCGGATCGGCC
GAGTATCGTGGCGATGAATCTGTGGAGTAATGGGGTAATTGGTCGGGCG
ATAGTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGGG
GTCAGATTCTTACGTCCATCCAGAACC GCCTTTTGGCGTGACTGGATGAT
TTTGCTCGATTCTGAGTTCTCCCTGTTGATATAGCGAATGTTATGCATC

```

FASTA 2.

Fig. 22. FASTA. Format.

Valor. Se tiene el componente de dos lecturas de nucleótidos , en el orden 5 “ a 3” y viceversa la lectura 2 de la secuencia de bases.

Interpretación. Contiene la secuencia de nucleótidos leída durante la secuenciación. Está representada por las letras A, T, C, y G (y a veces N para bases no determinadas). Los caracteres se basan en la codificación ASCII, donde cada uno tiene un valor numérico que se traduce en una puntuación de calidad. Las puntuaciones más altas indican una mayor confianza en la lectura de esa base. Para finalizar el programa verifica la estructura y formato. Analiza las secuencias y las puntuaciones de calidad para evaluar la confiabilidad de los datos. Usa herramientas bioinformáticas para procesar y analizar los datos.

2.0- El QC Statistics. Control de calidad Estadístico.

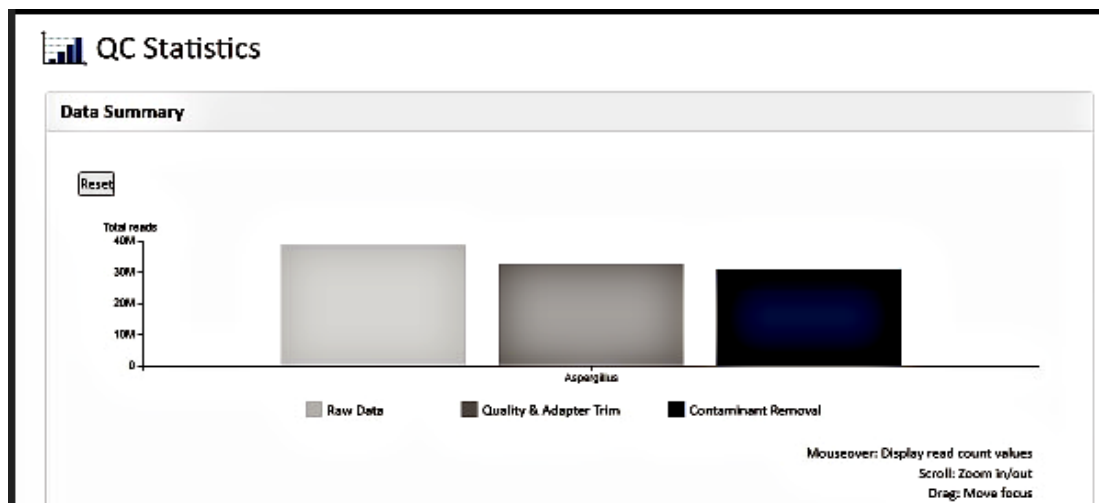


Fig. 23. Control de calidad. Macrogen

Este grafico comprende: Datos brutos, Calidad y ajuste del adaptador, Eliminación de contaminantes y Lecturas pasadas de control de calidad. Se utiliza para verificar la va variabilidad durante el proceso de produccion. Esto permite un mejor control de calidad y que se puede corregir cualquier eventualidad que altere los datos. En el eje de las X se tiene el Aspergillus y en el eje de las Y se tiene el total de lecturas efectuadas. En resumen, en un contexto estadístico que implica la aplicación de métodos estadísticos para asegurar y mejorar la calidad a lo largo del proceso de producción o en la prestación de servicios.

Interpretación. Se refiere a las estadísticas de control de calidad utilizadas en los procesos de secuenciación y análisis genético. En general, el QC (control de calidad) implica la evaluación de

varios parámetros, como la calidad de las lecturas obtenidas, la cantidad de datos generados, y la identificación de posibles contaminaciones o errores en el proceso de secuenciación. Puede indicar también altos valores: Indican una buena cobertura, lo que sugiere que la muestra ha sido secuenciada suficientemente para capturar la mayoría de las especies presentes. Si tiene valores bajos: Podría indicar que la muestra no está completamente representada, lo que puede llevar a una subestimación de la diversidad.

2.1-Nombre de la muestra (Sample name)

Data Statistics				
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)	Contaminant Removal (n)	QC Passed reads (%)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420	30,561,740	79.88

Fig. 25. Nombre de la muestra.

Valor. Nombre de la muestra enviada fue Aspergillus.

Interpretación. Este nombre fue adjudicado por el cliente a los servicios de Macrogen , para que pueda ser identificado durante todo el tiempo que dure la secuenciación en cada paso.

2.2-Datos brutos (Raw data)

Data Statistics	
Sample name	Raw data (n)
Aspergillus	38,761,245

Valor. 38,761.245 n

Análisis: La cantidad de 38,761.245 n es el numero de lecturas o fragmentos de ADN que fueron generados durante el experimento. Este numero lo da la maquina de secuenciacion.

Interpretación. Raw data (datos en bruto): Son los datos originales y sin procesar que se obtienen directamente del equipo de secuenciación. Estos datos aún no han sido sometidos a pasos de procesamiento como recorte de calidad, eliminación de adaptadores, remoción de contaminantes, o cualquier otro tipo de filtrado.

2.3- Calidad y recorte del adaptador. (Quality and adapter trim.)

Data Statistics		
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420

Fig. 26. Recorte.

Valor. 32,535,420

Análisis. Indica que 32,535,420 fueron eliminados adaptadores no deseados.

Interpretación. Quality trim (recorte por calidad): Esto se refiere al proceso de eliminar las partes de las lecturas de ADN que tienen baja calidad. Las secuencias de baja calidad, generalmente en los extremos de las lecturas, se eliminan para evitar errores en el análisis posterior. Los adaptadores son secuencias cortas de ADN que se añaden a las muestras durante la preparación para la secuenciación. A veces, estos adaptadores pueden quedar en las lecturas secuenciadas y necesitan ser eliminados porque no son parte del ADN de interés. Este proceso asegura que solo las secuencias relevantes del ADN sean analizadas.

2.4-Eliminación de contaminantes. (Contaminant removal).

Data Statistics			
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)	Contaminant Removal (n)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420	30,961,740

Fig, 27. Eliminación de contaminantes o Contaminant removal.

Valor. 30,961,740

Análisis: Se refiere que 30,961,740 es un valor alto que fueron identificadas como contaminantes y eliminadas 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 se está trabajando con una muestra de otro organismo. La remoción de contaminantes es un paso crucial en el análisis de datos de secuenciación para asegurarse de que los resultados sean precisos y reflejen únicamente las secuencias de interés. Esto ayuda a mejorar la calidad y la fiabilidad de los datos finales utilizados en estudios posteriores.

Interpretación. Es el control de calidad, se refiere a: Verificación de la calidad de las muestras. Permitiendo tener que las muestras de ADN o ARN estén intactas y libres de contaminantes. Si los valores son altos indican una buena cobertura, lo que sugiere que la muestra ha sido secuenciada suficientemente para capturar la mayoría de las especies presentes. Si los valores son bajos: Podría indicar que la muestra no está completamente representada, lo que puede llevar a una subestimación de la diversidad.

2.5-Control de calidad de lectura anterior. (QC passed read).

Data Statistics				
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)	Contaminant Removal (n)	QC Passed reads (%)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420	30,961,740	79.88

Fig. 28. Control de calidad o qcPassed.

Valor. 79.88 indica que fue aceptado como buen desempeño del proceso.

Interpretación. Calidad de Producto: En un contexto de fabricación o control de calidad, que suele referirse a control de calidad. El valor 79.88 qc passed podría significar que un porcentaje del 79.88% de los productos o unidades han pasado el control de calidad. Esto indicaría una tasa de éxito o conformidad de las unidades revisadas.

3.0-Análisis taxonómico:

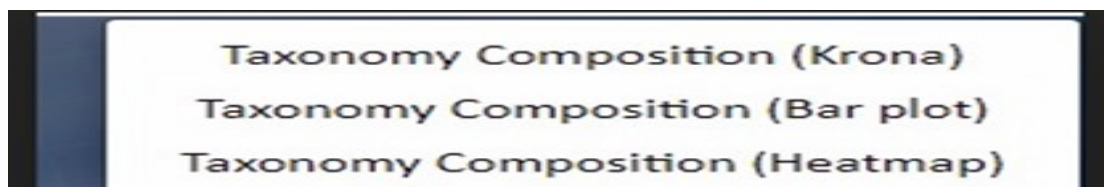


Fig. 29.Contenido del analisis taxonomico. Macrogen

Comprende el estudio del análisis de la composición taxonómica Krona, la composición taxonomica Bar plot, La composición taxonomica Heatmap, la Diversidad Alfa y la Diversidad Beta. Se detalla a continuación:

Interpretación. Se refiere a que las secuencias obtenidas se comparan con bases de datos de referencia, como GenBank o bases de datos especializadas en taxonomía. Se utilizan algoritmos y herramientas bioinformáticas (como BLAST, Kraken, y otros), se identifican las secuencias correspondientes a diferentes taxones. Esto ayuda a clasificar las secuencias en diferentes niveles taxonómicos como reino, phylum, clase, orden, familia, género y especie. A cada ítem se elabora un gráfico. Se genera un informe que incluye las especies identificadas, su abundancia, y cualquier otra información relevante como la presencia de especies raras y otros.

3.1-Taxonomía Krona:

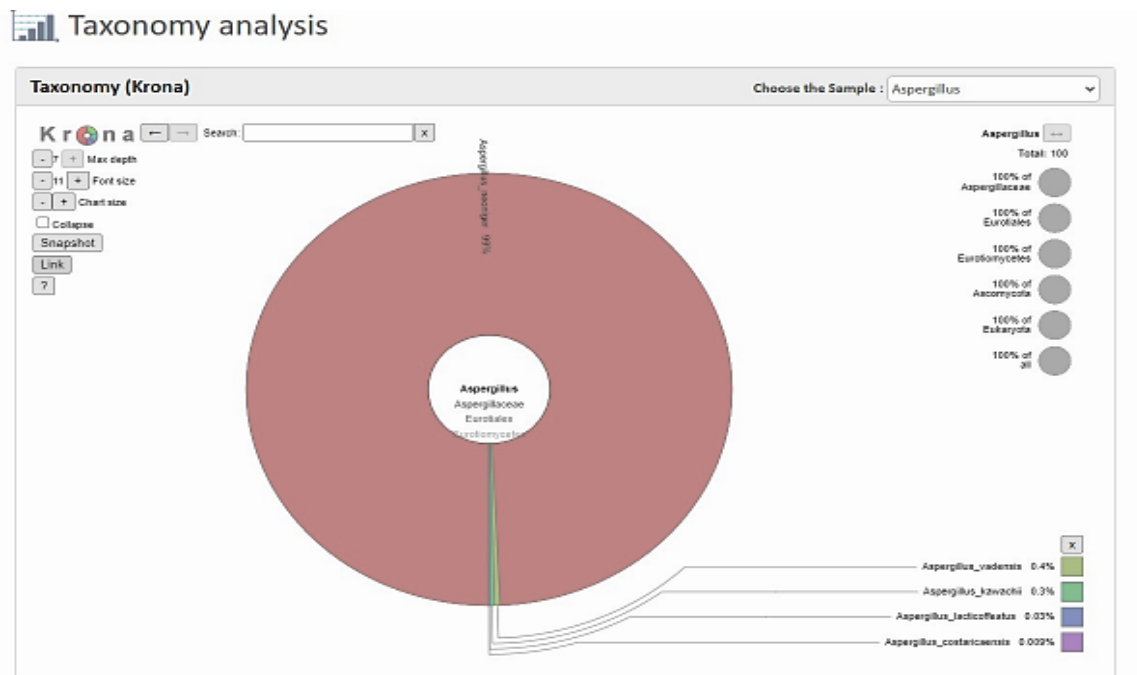


Fig. 30. Taxonomia Krona del analisis taxonomico. Macrogen

Análisis: Se tiene que del reporte de secuenciación, el 99 % se identificó *Aspergillus neoniger*. *Aspergillus vadensis* 0.4%, *Aspergillus kawachii* 0.3%, *Aspergillus lacticoffeatus* 0.03% y *Aspergillus costaricensis* 0.009 %.

Interpretación. El gráfico se compone de varios círculos concéntricos. Donde cada círculo representa un nivel taxonómico diferente (por ejemplo, dominio, filo, clase, orden, familia, género, especie). Los

Segmentos Radiales: Los segmentos de cada anillo concéntrico representan taxones específicos en ese nivel jerárquico. Por ejemplo, el círculo más interno podría representar dominios (Bacteria, Archaea, Eucariotes), y los círculos sucesivos representan subdivisiones más específicas. El tamaño de los Segmentos: El tamaño de cada segmento dentro de un anillo concéntrico indica la abundancia relativa del taxón representado en esa categoría. Cuanto más grande sea el segmento, mayor será la abundancia de ese grupo en la muestra es una herramienta de visualización de datos que se utiliza para representar la composición taxonómica de muestras biológicas, especialmente en el ámbito de la metagenómica. Krona permite generar gráficos interactivos parecidos a pastel o radar que muestran la diversidad y la abundancia de diferentes grupos taxonómicos en forma de gráficos circulares o de anillos (doughnut charts), donde cada segmento representa un taxón y su tamaño es proporcional a su abundancia. Esta forma de análisis puede ser utilizada para analizar datos de secuenciación masiva. Los segmentos más grandes indican una mayor proporción de esa categoría en comparación con los segmentos más pequeños.

3.2 -Diagrama de barras de taxonomía: Bar Plot

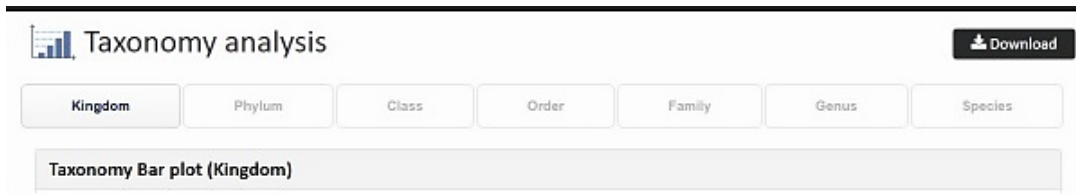


Fig. 31. Taxonomía de Barras del análisis taxonómico. Macrogen

Este apartado comprende Barras de Reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Genero y Especie. Se detalla a continuación.

Interpretación. Es una representación visual utilizada en el análisis de datos metagenómicos, especialmente en estudios de microbiomas. Indica que este tipo de gráfico permite visualizar la composición taxonómica de las comunidades microbianas presentes en una muestra. Cada barra en el gráfico representa un grupo taxonómico (como reino, phylum, orden, clases, especies, géneros, familias) y su longitud corresponde a la abundancia relativa de ese grupo en la muestra analizada. Los colores distintivos: Generalmente, cada taxón o grupo se representa con un color diferente, lo que facilita la visualización y comparación de las diferentes especies o grupos presentes en la muestra. Estos gráficos son especialmente útiles para comparar las comunidades microbianas entre diferentes muestras, permitiendo observar diferencias en la diversidad y composición. Cada barra

está dividida en segmentos de diferentes colores, donde cada color representa un taxón específico (especie, género, familia, orden, clase, familia y phylum). la longitud de cada segmento dentro de una barra indica la proporción del taxón en esa muestra. Asi por ejemplo un color podría estar asociado con una especie particular, mientras que otro color representa una especie diferente. , las barras de diferentes colores podrían indicar distintas condiciones experimentales, tiempos de muestreo o ubicaciones geográficas. El análisis se puede hacer según la lectura, puede ser: Verde: Alta calidad. Amarillo: Calidad media, que requiere revisión. Rojo: Baja calidad, generalmente descartada. Cada color en un barplot puede representar una categoría taxonómica específica, como diferentes especies, géneros o familias. Por ejemplo, un color podría estar asociado con una especie particular, mientras que otro color representa una especie diferente. Su Interpretación. Es por distribución de Colores: los colores en las barras para identificar los diferentes taxones presentes y su abundancia relativa. Un segmento largo indica un taxón dominante en esa muestra. O por comparación entre Muestras: Se puede comparar las barras entre diferentes muestras para ver cómo varía la composición taxonómica se refiere generalmente a una representación gráfica que muestra datos de manera comparativa. Un gráfico de barras podría ser utilizado para analizar aspectos de los resultados obtenidos, como la abundancia de diferentes especies, la calidad de la secuenciación, la distribución de variantes genéticas. En un gráfico de barras, cada barra representa una categoría o un grupo y su altura indica la cantidad o el valor de esa categoría. Un gráfico de barras podría mostrar la cantidad de lecturas o secuencias asignadas a diferentes especies en una muestra ambiental. Si tiene diversidad Alta: Si una muestra tiene muchos colores y cada segmento tiene una longitud similar, eso indica una alta diversidad taxonómica o diversidad Baja: Si hay una muestra tiene uno o dos colores predominantes y los otros segmentos son muy pequeños, eso indica baja diversidad taxonómica.

-Diagrama de barras de Reino. (bar plot kingdom).

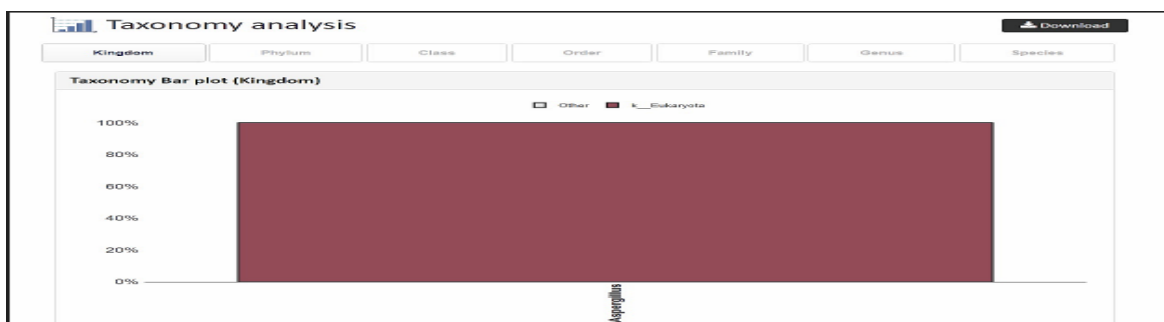


Fig. 32 .Diagrama de barras de Reino del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus*, es clasificada como del **Reino Fungi**. Son **Eucariotas** porque su reproducción es por esporas.

Interpretación. Si hay abundancia de Reinos: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes reinos. O referirse a Comparación entre Muestras: una muestra podría tener una mayor proporción de un reino específico en comparación con otra muestra.

-Diagrama de Barras de Phylum. (Bar plot Phylum)

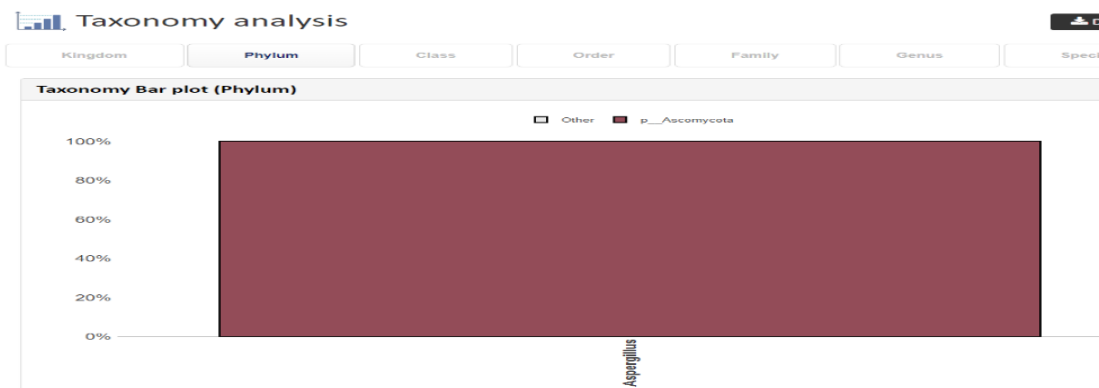


Fig. 33.Diagrama de barras de Phylum del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como del **Phylum Ascomycota**.

Interpretación. Se refiere a una representación gráfica que muestra la abundancia relativa de diferentes filos de organismos presentes en una muestra biológica. El eje X suele representar los diferentes filos (plural de phylum), que son categorías taxonómicas en la jerarquía de los organismos. El eje Y muestra la abundancia relativa de cada filo, que puede ser en términos de porcentaje, número de lecturas, o alguna otra medida de abundancia. Es útil para identificar cuáles filos son predominantes en una muestra específica. Abundancia de Filos: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes filos.

- Diagrama de barras de Clase. (bar plot Class.)

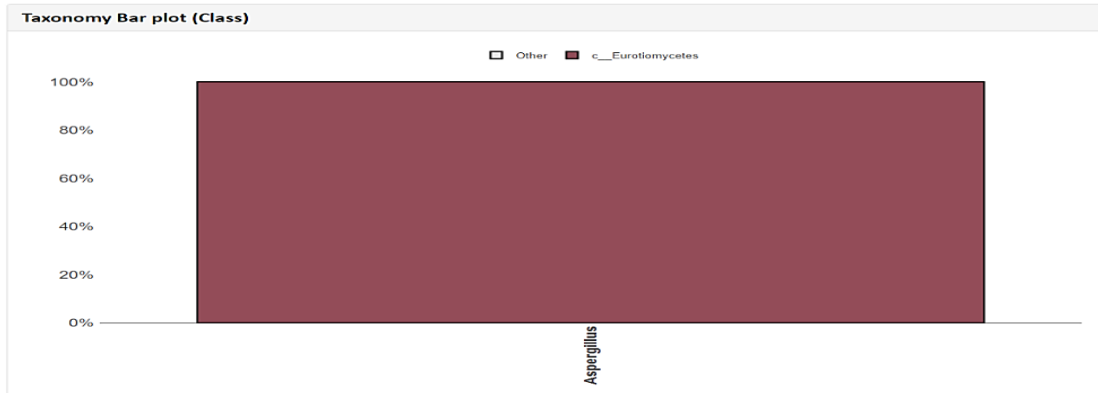


Fig. 34 .Diagrama de barras de Clase del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus uessalvadorensis* es clasificada como de la **Clase Eurotiomycetes**

Interpretación. Se refiere a grupos taxonómicos o clases de expresión génica, que se representan en el gráfico de barras. Cada barra en el gráfico podría representar la cantidad de ADN de una especie específica para cada categoría. Si hay abundancia de Clases: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre las diferentes clases.

-Diagrama de barras de Familia. (bar plot Family).

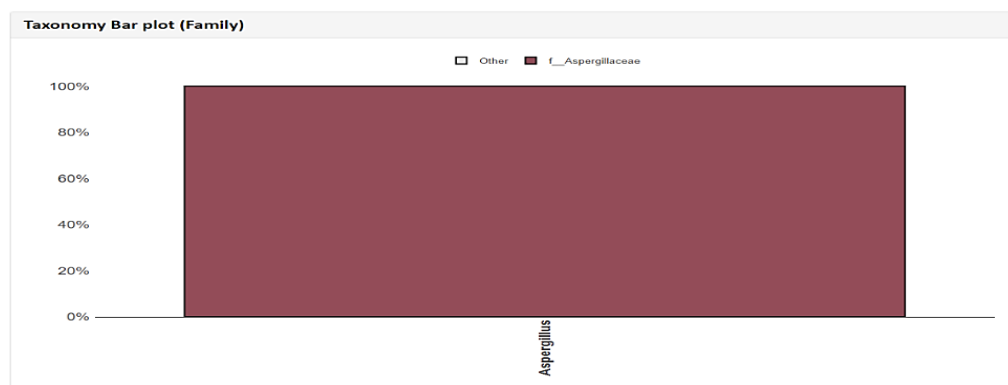


Fig. 35. Diagrama de barras de Familia del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como de la **Familia Aspergillaceae**

Interpretación. Podría referirse a un conjunto de gráficos de barras que se utilizan para representar datos en diversas aplicaciones relacionadas con la biología, la genética o la bioinformática. Permite

identificar cuáles muestras tienen perfiles similares o diferentes. Esto puede ayudar a agrupar muestras con características similares.

-Diagrama de Barras de Orden (bar plot Order).



Fig. 36. Diagrama de barras de Orden del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como de **Orden Eurotiales**

Interpretación. Podría referirse a un conjunto de gráficos de barras que se utilizan para representar datos. Una abundancia de Órdenes: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes órdenes. Si hay una comparación entre Muestras: Puedes comparar la composición de los órdenes entre diferentes muestras o condiciones experimentales. Por ejemplo, si un orden es más abundante en una muestra en comparación con otras, esto puede indicar una característica distintiva de esa muestra.

-Diagrama de barras de Genero (bar plot Genus).



Fig. 37. Diagrama de barras de Genero del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como del **género *Aspergillus***.

Interpretación. Se refiere a una representación gráfica que muestra la abundancia o la frecuencia de diferentes géneros de organismos en una muestra o conjunto de datos. Cada barra representa un género específico y su longitud es proporcional a su abundancia relativa en la muestra analizada.

- Diagrama de barras de Especies (bar plot de species).

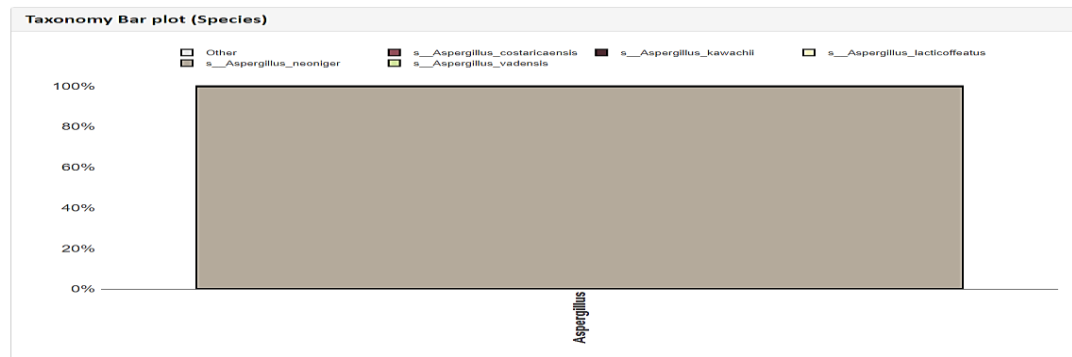


Fig. 38. Diagrama de barras de Especie del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la **Especie *neoniger*** por estar registrada en 2014. Pero se hace la observación con pruebas documentales, periciales y testimoniales que se realizaron estudios preliminares de aislamiento en 2006 de caracterización macroscópica y microscópica de *Aspergillus* de este mismo hongo en los años 2006, estudios de microscopía simple y microscopía electrónica de barrido y PCR del hongo encontrado en 2008 y publicado en revista El Universitario en 2008, luego se realizó la extracción de gDNA, qPCR, cADN en 2024 por MACROGEN INC. Metagenome Shotgun Sequencing Reports. Se aclara que según las normas internacionales de taxonomía actuales vigentes, puede aceptarse el término subespecie porque aun no se ha definido y aceptado por nombre de secuenciación DNA, si hay referencias documentadas de que se llamó anteriormente dicha especie por diferencia genética, nicho ecológico (semilla) y Geolocalización como es la zona norte de Morazan de El Salvador, perfectamente puede adjudicarse la subespecie derivada de la especie y género. En consulta por email al máximo exponente de designación de nomenclaturas taxonómicas, el **Dr. Wreuter Werner**¹ se cita "Si el

¹ Nomenclatural Advisor to Flora of North America. Author Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas: (Código de Melbourne).

nombre de la especie fue publicado válidamente en primer lugar, con una descripción adecuada y un tipo, entonces su publicación posterior basada en una secuencia de ADN (que actualmente no se acepta en lugar de una descripción) no tiene estatus en la nomenclatura. Actualmente no es posible validar el nombre de un nuevo taxón (por ejemplo, una subespecie con el mismo epíteto final) citando la secuencia de ADN como el tipo. Las propuestas correspondientes fueron rechazadas en el reciente Congreso Botánico Internacional en Madrid, pero se designó un comité especial para estudiar la cuestión de los "tipos de ADN". De lo contrario, lo mejor que puede hacer es transferir el nombre de la especie actual (no ADN) al rango de subespecie, manteniendo su tipo original. Si ese tipo es insuficiente para una identificación precisa, tiene la libertad de designar un epitipo (de nuevo un espécimen normal, pero del cual se ha secuenciado el ADN)."

Interpretación. El método de secuenciación sirve para identificar qué especies están presentes y en qué cantidades. Ejes: El eje X generalmente representa las diferentes especies (o grupos taxonómicos), mientras que el eje Y representa las abundancias (que pueden ser cuentas absolutas o proporciones) de esas especies. Barras: Cada barra del gráfico representa la abundancia de una especie específica. La altura de la barra indica la cantidad o proporción relativa de esa especie en comparación con las demás. Abundancia de especies: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre las diferentes especies.

3.3-Taxonomía de mapas de calor. (Heatmap taxonomy)

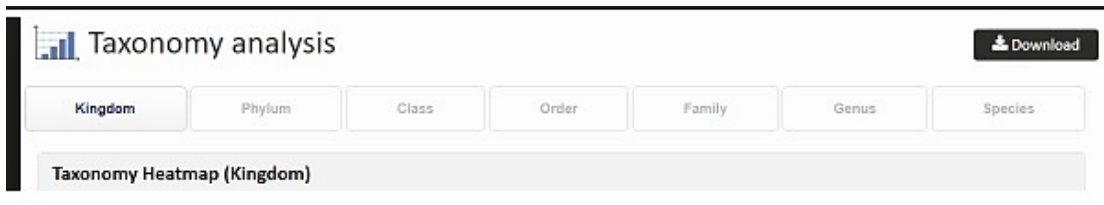


Fig. 39 .Diagrama de Mapas de calor del análisis taxonómico. Macrogen

Este diagrama comprende un mapa de calor clasificadas por Reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Genero y Especie. Se detalla a continuación.

Interpretación. Se refiere a una representación visual de la diversidad y abundancia de diferentes taxones de organismos presentes en una muestra biológica. Es una herramienta gráfica que utiliza colores para representar valores cuantitativos en una matriz, lo que permite identificar patrones y comparaciones de manera visual. Los ejes suelen representar diferentes taxones a nivel de especie,

género o familia, mientras que los colores indican la abundancia de cada taxón en la muestra analizada. Cada celda en el heatmap tiene un color que representa el nivel de expresión si es rojo para alta expresión y verde para baja expresión. Los genes que muestran un patrón similar de expresión en diferentes muestras pueden estar regulados conjuntamente o tener funciones relacionadas. Indican también la intensidad de la correlación entre muestras. Un color más cálido si es rojo puede indicar una alta correlación, mientras que un color más frío como el azul puede indicar una baja correlación. Permite identificar cuáles muestras tienen perfiles similares o diferentes.

-Mapa de calor de Reino. (Heatmap Kingdom).



Fig. 40.Diagrama de calor Reino del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del **Reino Eucaryote**.

Interpretación. Sugiere un enfoque en la representación de datos mediante mapas de calor (heatmaps), que son útiles para mostrar frecuencias o intensidades de diferentes parámetros en un formato visual que permite una fácil interpretación. Si un reino tiene una gran presencia en muchas muestras, su fila correspondiente tendrá un color más oscuro en la mayoría de las columnas, indicando que es el grupo dominante.

-Mapa de calor de Phylum. (Heatmap Phylum).

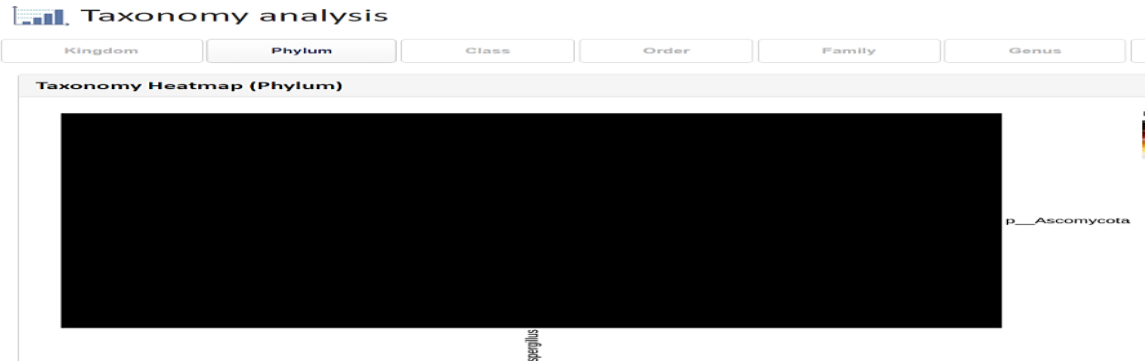


Fig. 41.Diagrama de calor Phylum del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del **Phylum Ascomycota**.

Interpretación. El heatmap phylum o mapa de calor por filo es una representación gráfica que muestra la abundancia relativa de diferentes filos de organismos en una muestra determinada, como una muestra de microbiana. El heatmap permite identificar patrones en la composición del microbioma entre diferentes muestras. Representa Ejes: Generalmente, en el eje horizontal se encontrarán las diferentes muestras analizadas, mientras que en el eje vertical se listarán los diferentes filos de organismos, la intensidad o el color de cada celda en el mapa de calor representa la abundancia relativa de ese filo en la muestra correspondiente. Por lo general, los colores más oscuros o intensos indican una mayor abundancia, mientras que los colores más claros indican una menor abundancia.

-Mapa de calor Clase. (Heatmap Class.)

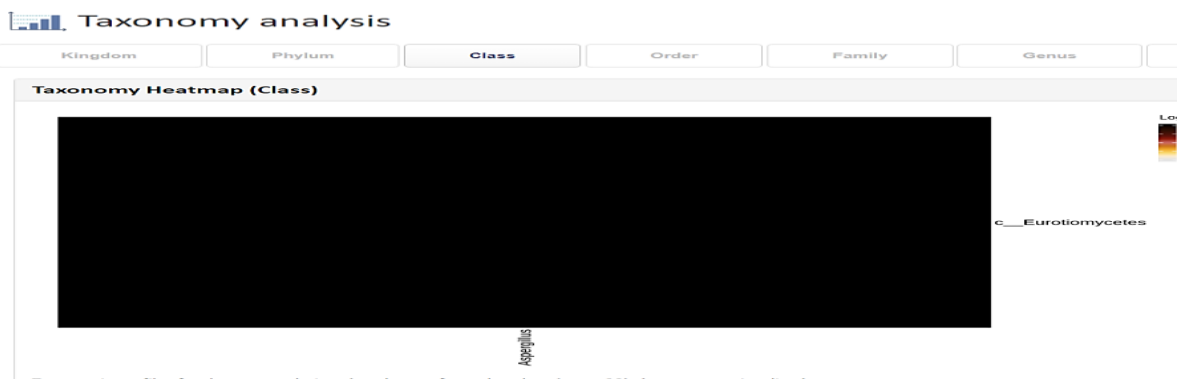


Fig. 42.Diagrama de calor Clase del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la **Clase Eurotiomycetes**.

Interpretación. Se refiere a una herramienta de análisis en el contexto de la bioinformática, es utilizada para visualizar datos de variaciones genéticas o expresiones de genes mediante gráficos de calor (heatmaps). En un hitmap, cada celda del gráfico representa la magnitud de una asociación o una medida de interés, donde los colores indican diferentes niveles de expresión o actividad. Las áreas o genes que muestran mayor actividad suelen representarse con colores más intensos. Los colores más oscuros o intensos: Representan una mayor abundancia relativa de esa clase en la muestra. Colores más claros o apagados: Representan una menor abundancia relativa.

-Mapa de calor de Orden. (Heatmap order.)

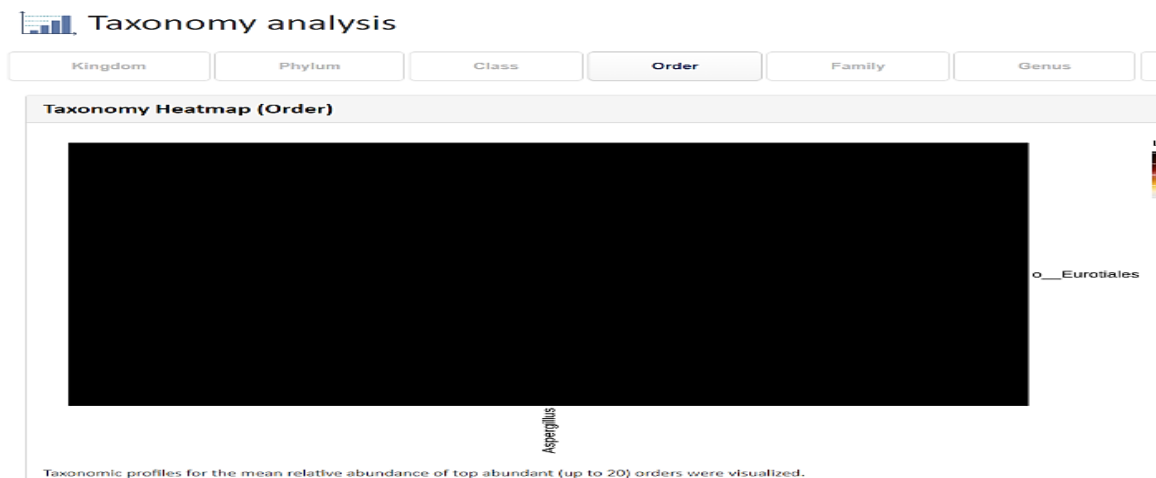


Fig. 43. Diagrama de calor Orden del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la Orden Eurotiales.

Interpretación. Se refiere a la forma en que se organizan los datos en el hitmap. Esto puede incluir el agrupamiento de genes o muestras similares, lo que facilita la visualización de patrones o correlaciones en los datos. Si una fila (orden) tiene colores consistentemente más oscuros en varias columnas (muestras), esto indica que ese orden es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Familia (Heatmap Family.)

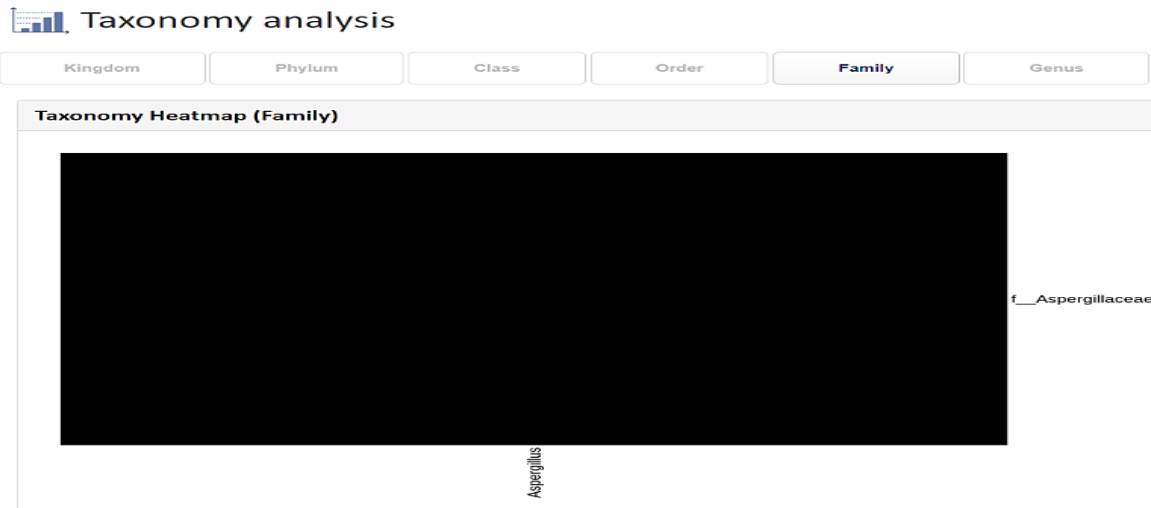


Fig. 44. Diagrama de calor Familia del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la Familia Aspergillaceae.

Interpretación. Si hay dominancia de Familias: Si una fila correspondiente a una familia específica es consistentemente más oscura en varias columnas, esto indica que dicha familia es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Genero. (Heatmap Genus.)

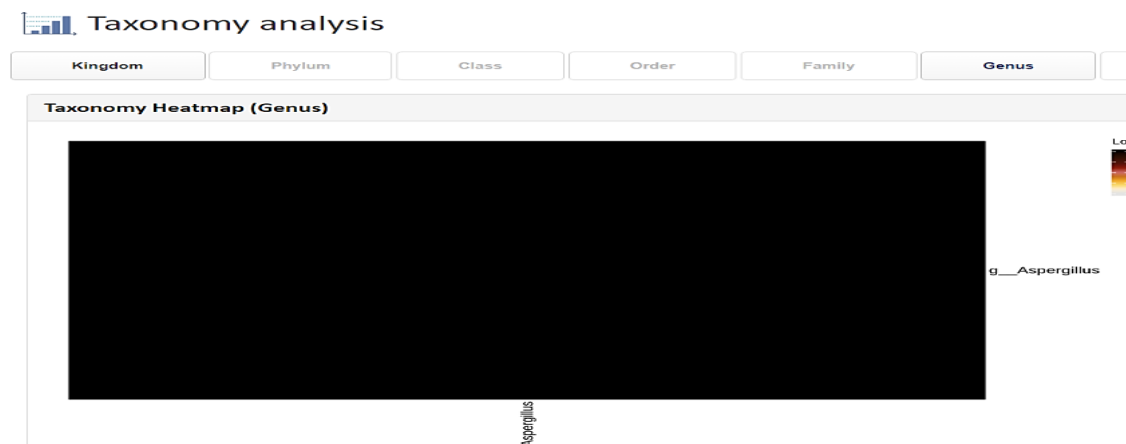


Fig. 45. Diagrama de calor Genero del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del **Genero Aspergillus**.

Interpretación. Se refiere a que si utiliza colores para representar datos en una matriz, donde cada celda corresponde a la abundancia de un género particular en diferentes muestras o condiciones. Esto permite identificar patrones en los datos, como la prevalencia de ciertos géneros en diferentes condiciones experimentales o en distintas muestras biológicas. Dominancia de Géneros: Si una fila correspondiente a un género específico es repetitiva más oscura en varias columnas, esto indica que dicho género es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Especie. (Heatmap Species).



Fig. 46. Diagrama de calor Especie del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la **especie neoniger**. En la que se observa de otras especies presenta con mayor frecuencia. Se aclara que desde el 2006 se inicio estudio morfologico, en 2007 se hizo acta notarial , en 2008 se registro en CNR y publicacion en repositorio el 2008, por lo que se dio a la espera de la secuenciacion. Pero otros investigadores en el 20011 encontraron una especie llamada neoniger y que en 2014 se secuenció esta especie y se utilizo como base de primer para comparar con otras especies.

Interpretación. Se refiere a un tipo de análisis que muestra la distribución y la abundancia de diferentes especies en un conjunto de datos, generalmente relacionado con datos genéticos o metagenómicos. En este tipo de análisis, se utilizan representaciones gráficas para visualizar cuántas veces se encuentra cada especie en las muestras analizadas. Al utilizar la escala de colores: Los colores indican la abundancia relativa de cada especie en las muestras. Si hay colores más oscuros o intensos: Indican una mayor abundancia relativa de esa especie en la muestra. O colores más claros o apagados: Indican una menor abundancia relativa. La variación en la intensidad del color permite identificar visualmente qué especies son más abundantes y comparar estas abundancias entre las diferentes muestras.

-Descripción del archivo de resultados.

FORMATO FASTQ: Es un formato utilizado para almacenar datos de secuenciación de ADN. El formato FASTQ contiene información de las secuencias de nucleótidos y sus respectivas calidades. Es ampliamente utilizado en bioinformática y en la secuenciación de nueva generación (NGS). Se utiliza similar a un Block de notas o note pad con extensión txt que en cualquier computadora se puede leer los electroferogramas, que tiene 60 caracteres por región, cuando es para secuenciación de fragmentos pequeños de DNA como 500 pb.

MD5sum: Es un comando utilizado para calcular y verificar el valor hash MD5 de un archivo. El valor hash MD5 es una representación de tamaño fijo (128 bits) de los datos originales, lo que permite verificar la integridad de los archivos. Sirve para comprobar integridad de archivos y evitar errores de transferencia. Se asegura que los archivos de datos genéticos no se corrompan durante la transferencia o almacenamiento. Al calcular el hash MD5 de un archivo en el momento de la creación y luego volver a calcularlo después de la transferencia, puede comprobarse que el archivo no ha sido alterado.

4.-Metodología. (Methods)

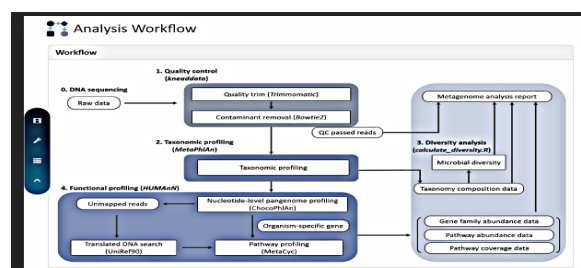


Fig. 47. Metodo empleado.

Se refiere a los pasos utilizados para llegar a los resultados obtenidos provenientes de 1. Control de calidad, 2.Taxonomía, 3.Diversidad alfa y beta y 4. Perfilado funcional.

5.Análisis molecular. *Aspergillus* de la muestra enviada de El Salvador.

Para el analisis molecular se utilizaron los programas BLAST Basic Local Alignment Search Tool,MEGA 11 Molecular Evolutionary Genetics Analysis, CLUSTAL OMEGA Multiple Sequence Alignment program , Nucleotid BLAST program, GENE BANK Genetic Sequence database y otros no menos importantes.

Por análisis de estudios moleculares con el programa Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA). Se determinó que la cepa es del género *Aspergillus* pero su especie es similar pero no igual a la reportada por tipo DNA. Ver Fig 48. Se utilizo las siguientes secuencias de Bases:

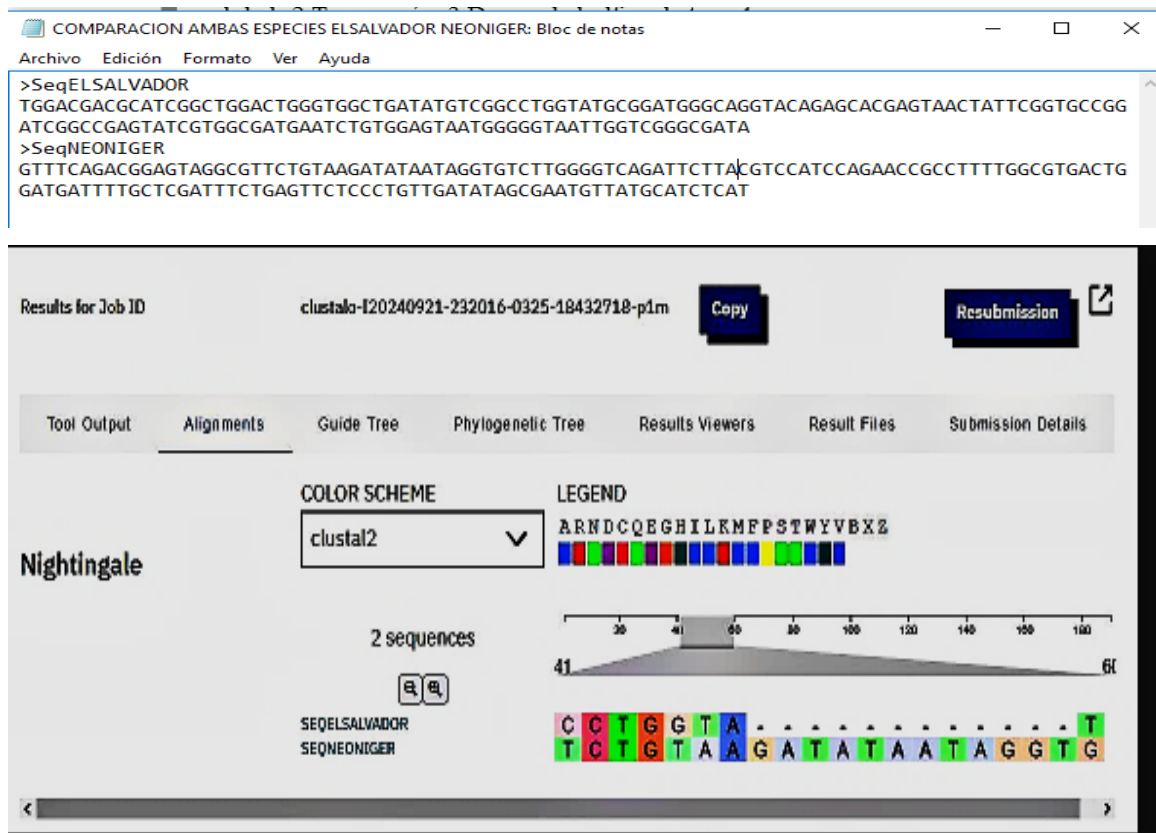


Fig 48. Comparación genoma de las especies de El Salvador y la reportada por tipo DNA según la secuencia de bases.

En la fig 48 se observa que un segmento de secuencias de DNA de El Salvador 1 con la secuencia de la especie neoniger 2 no es igual. La similitud entre las bases Citocina y Guanina se puede observar

en el grafico no es un mayor porcentaje que varia en rango entre 40 a 60 la de El Salvador en relación a la cepa neoniger que esta entre 41 a 60 nucleotidos de Pb. Es decir que coinciden CC,GG y AA en un 0.15% con la de la especie neoniger reportada por tipo ADN. Los espacios en blanco son huecos que no coinciden con la especie neoniger.



Fig 49. Comparacion Clustal O(1.2.4) multiple sequence alignment entre las dos especies EL SALVADOR y especie neoniger.

En la fig 49 se tiene por comparacion Clustal alineamiento multiple entre las dos secuencias en donde se observa la distribución de las bases entre ellas hay diferencias en los nucleotidos 56-54,116-55,151-80 en la comparación de la secuencias entre ellas, la secuencia entre GC y AT se diferencian. Un asterisco indica que coinciden ambas nucleotidos, dos asteriscos es débil la relación. Los espacios en blanco no se han conservado puede que haya habido inserción o delección.

-Por árbol filogenético se tiene que ambas especies proceden de un origen o árbol filogenético común que son del genero *Aspergillus*. Ver fig. 50.



Fig 51. Relación entre las especies de El Salvador, *neoniger* y *niger*.

En la fig 51 se observa que las tres especies no coinciden en la secuencia, sino que unicamente en 8 casos alineados que estan señalados con un asterisco coinciden en la secuencia de GGG, CCC, AAA,TTT conservando una relación pero el resto de bases son diferentes. Por lo que las tres especies no son iguales en los lineamientos, por lo que pudieron haber tenido mutaciones o regiones no conservadas.

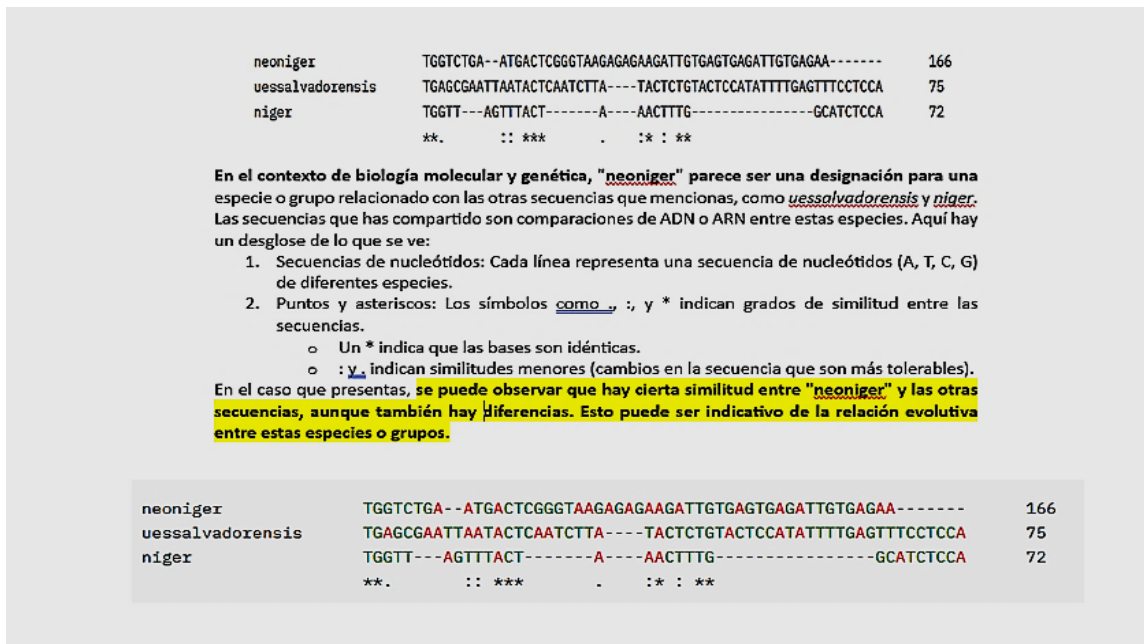


Fig. 52. Relación entre las especies de *uessalvadoriensis*, *neoniger* y *niger*.

Se observa que hay diferencias porque la secuencias no hay similitud, en la que las especies han evolucionado en forma diferente en los pares de bases, en forma filogenética si hay diferencias marcadas. Coinciden en TTT, GGG,AAA,CCC en los nucleotidos 166,75,72, lo demas no estan alineadas.

-Comparación de tres secuencias: *Aspergillus uessalvadoriensis* y *neoniger*

```

-----
>uessalvadoriensis1
CAGAGGACGAGTACCGAAGGTATGACTGGTCCGGCTCCGTTACCCCACT
TGTTGTGTTGCCGATCAGTTAACATGTCAGAGACTTAGTCTATCGGC
ACCTGTCTGCGTAGTCAGACTGCCCTGAAGGTGAGGGAGATAGTCTGGA
>uessalvadoriensis2
CCGAAATCATTGAATTGAATTGCCCAATGGCCAGGGCCTTGGTGGTGCAG
TCAAGGAGTAATACATTGCTGTGGTTTGTATGTACAAAAGTACAGTCCGT
AACTATATCTAACCAAGCCCTCTGTGGAGTCTCAGGAGCAGATAAGAAG
G
>NEONIGER
TCATGCCCTAACTACGGTTCATGCTCTAACTACGGTTCATGCTTAACTACGGTTCATGCCCTATCTCATGGTCCATGGAGCCCTTTTCGACCGG
AGCCGAGCCTTGATTC
-----
    
```

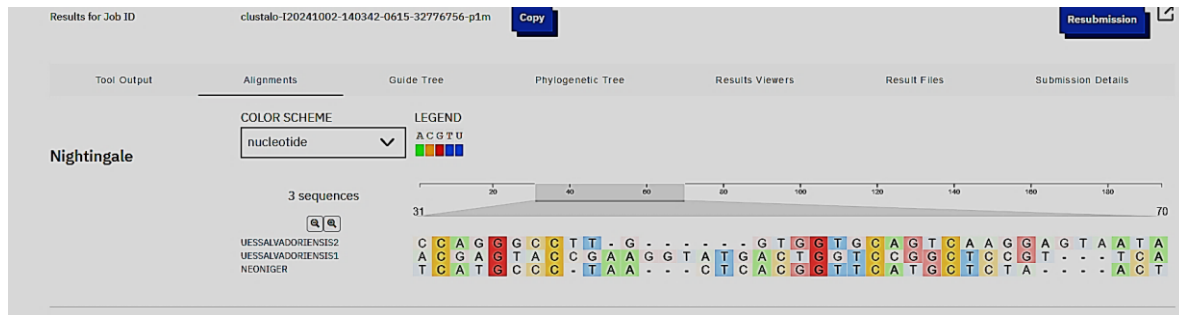
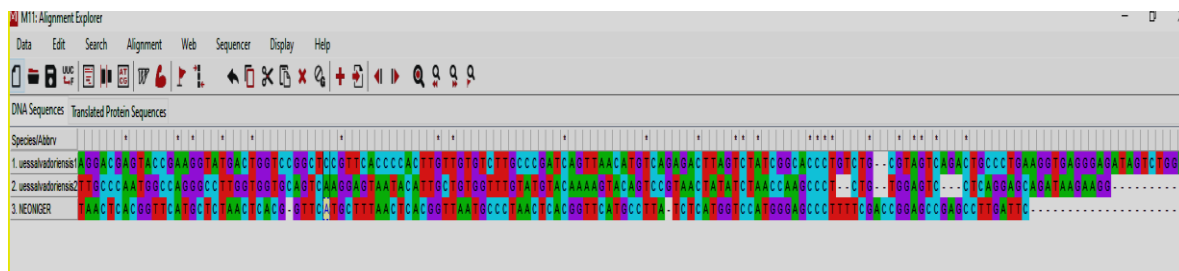
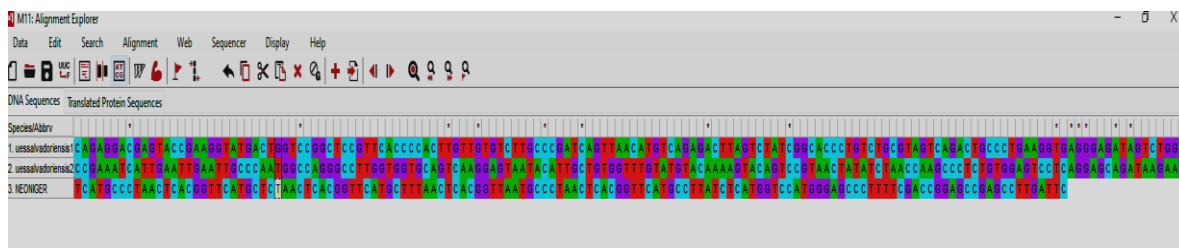


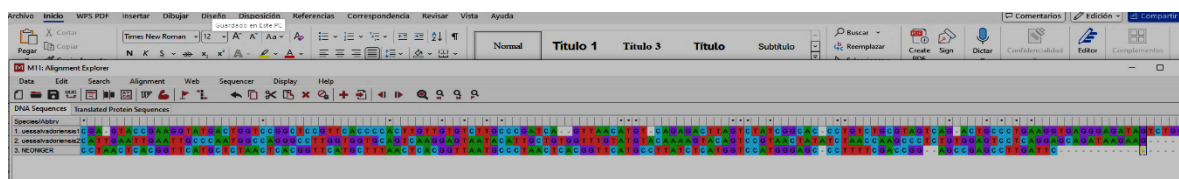
Fig. 53. Comparación de tres secuencias uessalvadoriensis y neoniger.

En la fig 53 Se esta mostrando una secuencia de ADN o ARN de diferentes muestras, probablemente de un análisis genético. Cada línea parece representar una secuencia diferente, con un nombre de especie o muestra seguido de la secuencia de nucleótidos y su longitud. uessalvadoriensis2 y uessalvadoriensis1 parecen referirse a muestras de una especie que podría ser endémica de El Salvador, dado el nombre. neoniger podría referirse a otra especie o muestra, posiblemente un organismo que ha sido estudiado en el mismo contexto. Los números al final de cada línea podrían indicar la longitud de la secuencia en bases. Se observan que ambas especies coinciden en dos ocasiones marcado con asterisco las regiones estan conservadas en un 40 a 60 %.

-Protein secuencias . (Secuencias de Proteínas) de Aspergillus.



Alineada con clustalw



Alineada con muscle

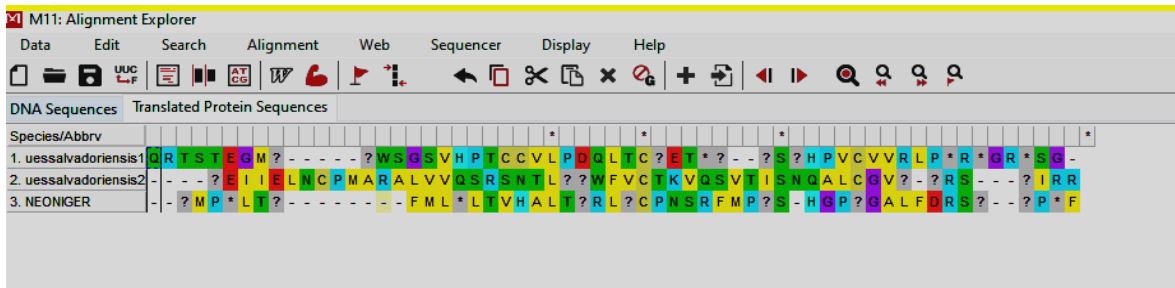


Fig 54. Protein secuencias alineadas en Clustalw y muscle. MEGA11

En la Fig 54 se tiene que las secuencias alineadas coinciden 24 ocasiones lo que indica están conservando positivo con su ancestro común del genero *Aspergillus*. Los asteriscos indican que son aminoácidos idénticos que no sufren sustituciones. Los que no tienen símbolos indican una sustitución no conservada negativa, en donde los aminoácidos son diferentes y no comparten propiedades químicas similares. Las letras L, C y S en el contexto de secuencias de proteínas generalmente representan los aminoácidos específicos en una secuencia que coinciden, son: L: Leucina (Leu) - Un aminoácido hidrofóbico que es importante en la estructura de las proteínas. C: Cisteína (Cys) - Un aminoácido que contiene azufre y es conocido por formar enlaces disulfuro, lo que ayuda a estabilizar la estructura de las proteínas. S: Serina (Ser) - Un aminoácido polar que a menudo participa en la modificación postraduccional de proteínas, como la fosforilación. En las secuencias de proteínas, estas letras se utilizan para abreviar los nombres de los aminoácidos, permitiendo una representación compacta de la secuencia. Los sitios identificados están en la 23,29 y 38. Con porcentajes de L 50.37% Protein secuencias, C 23.63% y S 26% (Bioinformatic ,2024). Para el caso los términos que compartes se refieren a un conjunto de datos relacionados con secuencias genéticas, probablemente en un estudio de biología molecular o genética. Aquí te explico cada parte: uessalvadoriensis2: Este es probablemente un nombre de especie que se ha identificado, tal vez en un contexto geográfico relacionado con El Salvador. El "2" indica que es una variante o una segunda muestra de esta especie. uessalvadoriensis1: Similar al anterior, este es otro identificador

para una variante o muestra de la misma especie, "uessalvadoriensis", con el "1" indicando que es la primera muestra. GATAGTCTGGA---: Esta es una secuencia de nucleótidos que corresponde a "uessalvadoriensis1". Los guiones al final indican que hay partes de la secuencia que no están disponibles o son desconocidas. neoniger: Este es el nombre de otra especie o grupo taxonómico. La secuencia CCGAGCCTTGATTC se relaciona con "neoniger". Los Números (151, 150, 134): Estos números podrían representar la longitud de las secuencias de nucleótidos en cada caso. Por ejemplo, "151" podría ser la longitud de la secuencia para "uessalvadoriensis2", "150" para "uessalvadoriensis1" y "134" para "neoniger". En resumen, parece ser un resumen de secuencias de ADN de diferentes muestras o especies, posiblemente en un contexto de investigación genética.

The screenshot shows the BLAST search results interface. At the top, it says 'BLAST® » blastn suite » results for RID-FUK9N51Z016'. Below this, there's an 'Important update' section. The main search parameters are: Job Title: 3 sequences (uessalvadoriensis1), RID: FUK9N51Z016, Results for: *1:icl|Query_605769 uessalvadoriensis1(150bp), Program: Citation, Database: core_nt, Query ID: icl|Query_605769, Description: uessalvadoriensis1, Molecule type: dna, Query Length: 150. On the right, there's a 'Filter Results' section with input fields for Percent Identity, E value, and Query Coverage. At the bottom, a yellow message box with a warning icon states: 'No significant similarity found. For reasons why, click here'. This message box is circled in red.

Fig. 55. Secuencias comparadas en programa Blast.

En la Fig. 55 se observa que al comparar las secuencias de fragmentos de uessalvadoriensis con neoniger no se encontró ninguna similitud significativa.

-Marco de lectura abierto del Aspergillus muestra de El Salvador

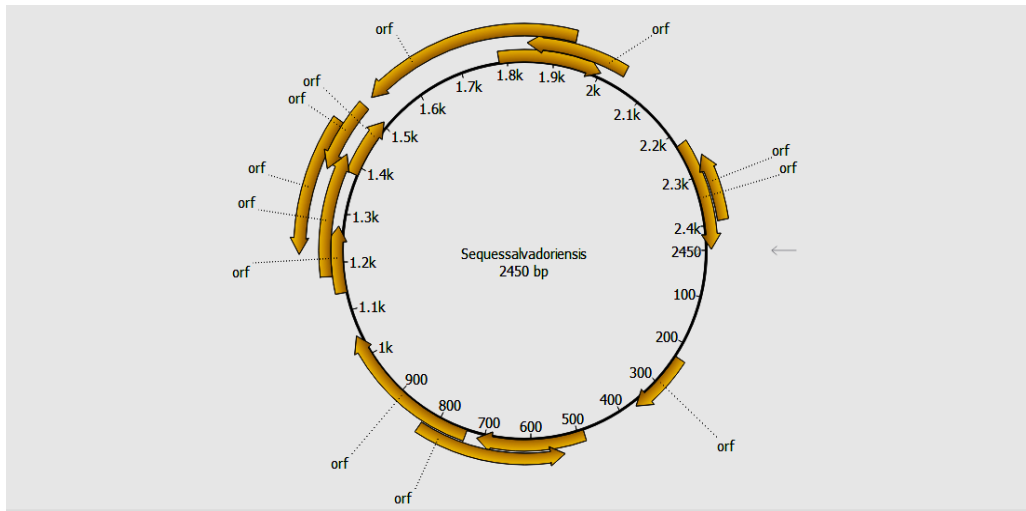


Fig. 56. Gráfico ORF de la secuencia *Sequessalvadoriensis* de 2450 bp

En la Fig 56 es un gráfico ORF (Marco de Lectura Abierto) circular implica interpretar la representación gráfica de los marcos de lectura en un contexto biológico, generalmente en estudios de genomas. Aquí tienes algunos pasos para entenderlo: Estructura Circular: El gráfico suele ser circular, representando la secuencia de ADN. Los puntos o segmentos en el círculo corresponden a diferentes regiones del ADN. Marcos de Lectura: Busca los marcos de lectura abiertos, que están señalizados y se presentan como líneas o bloques. Cada ORF representa una posible secuencia de codificación para una proteína. Dirección: Observa 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, un ORF más largo tiene más probabilidades de codificar una proteína funcional. En un gráfico ORF circular, "1.7k" generalmente se refiere a la longitud de un marco de lectura abierto (ORF) que mide 1,700 pares de bases (bp) de longitud. La "k" representa "kilo", que en este caso significa mil. Esto implica que el ORF en cuestión podría codificar una proteína, y su longitud es relevante para entender 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 ORF circular,

las flechas suelen tener significados específicos relacionados con la información genética representada. Según Dirección de Transcripción: Las flechas indican la dirección en la que se transcribe el ADN a ARN. Normalmente, apuntan de 5' a 3', que es la dirección en la que se sintetiza el ARN. Orientación del Gen: Pueden mostrar si el gen está en la cadena directa (sense) o en la cadena complementaria (antisense). Una flecha hacia fuera del círculo indica un gen en la cadena directa, mientras que una flecha hacia dentro puede representar un gen en la cadena complementaria. Señales de Promotor o Terminador: Algunas flechas pueden señalar la ubicación de promotores o terminadores, que son elementos reguladores que controlan la transcripción del gen. Relación entre ORF: En gráficos más complejos, las flechas pueden conectar diferentes ORF o genes, indicando relaciones funcionales o de regulación entre ellos. En un gráfico ORF circular, las flechas que apuntan hacia la izquierda o hacia la derecha generalmente indican la dirección de transcripción de los marcos de lectura abiertos (ORF). Aquí te explico más sobre su significado: Flechas hacia la derecha: Indican que el ORF correspondiente se encuentra en la cadena de ADN en la dirección 5' a 3', lo que significa que se está transcribiendo desde esa cadena. Esto se considera la cadena sense o directa. Flechas hacia la izquierda: Indican que el ORF está en la cadena complementaria, transcribiéndose en la dirección 3' a 5'. Esta cadena se conoce como antisense. 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.

-Análisis build dotplot. (Gráfico de puntos) muestra Aspergillus

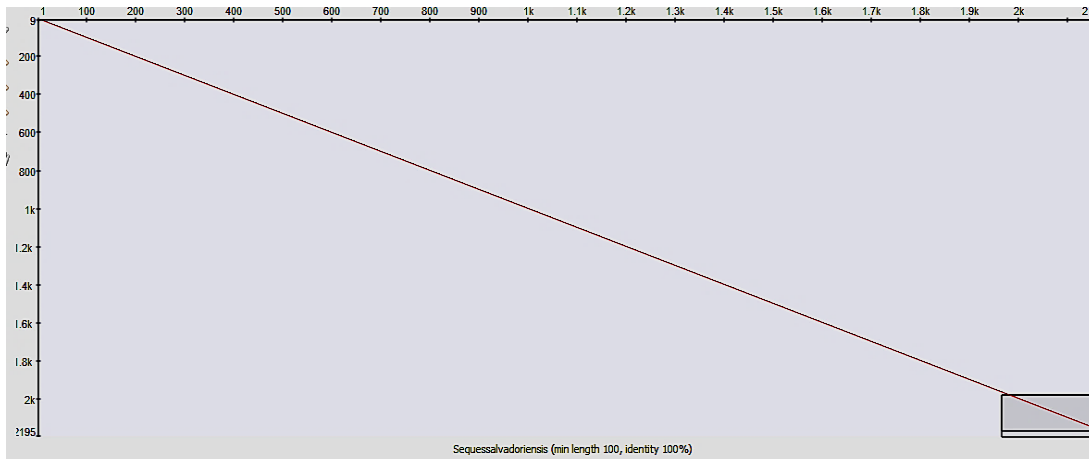


Fig. 57. Gráfico build dotplot de la secuencia *uessalvadoriensis*.

En la Fig 57 el análisis Wild Dotplot es una técnica utilizada en bioinformática y biología molecular para comparar secuencias de ADN, ARN o proteínas. Un dotplot (o "gráfico de puntos") es una representación visual que permite observar la relación entre dos secuencias. En un dotplot: Cada secuencia se representa en un eje (horizontal y vertical). Se coloca un punto donde las bases o aminoácidos de las dos secuencias coinciden. El análisis Wild Dotplot se refiere a un enfoque que utiliza un dotplot para identificar similitudes, divergencias y patrones en las secuencias:

Identificación de Regiones Conservadas: Los puntos agrupados en la gráfica pueden indicar regiones que han sido conservadas a lo largo de la evolución. Detección de Repeticiones: Las líneas diagonales o agrupaciones de puntos pueden revelar repeticiones o patrones dentro de las secuencias. Comparación de Genomas: Es útil para comparar genomas completos, identificando homología entre diferentes especies. Visualización de Variabilidad: Puede ayudar a identificar variaciones en secuencias, como inserciones, deleciones o sustituciones. Interpretación Diagonal: Una línea diagonal indica similitudes continuas entre las dos secuencias. Ruido o puntos dispersos: Puede indicar diferencias significativas o variabilidad entre las secuencias. Un dotplot es una representación gráfica que permite visualizar las similitudes y diferencias entre dos secuencias (de ADN, ARN o proteínas) colocando puntos en un gráfico donde coinciden elementos equivalentes. La

línea recta invertida en build dotplot significa: Similitud Inversa: Una línea diagonal que se inclina hacia abajo (invertida) puede indicar que hay similitudes entre las secuencias en el sentido inverso. Esto puede ser indicativo de que una de las secuencias está en la dirección opuesta (3' a 5') o que se está considerando la secuencia complementaria. Reversibilidad: En algunos casos, puede señalar que hay secciones que son complementarias entre sí, sugiriendo que las secuencias son homologadas, pero en orientaciones opuestas. Repeticiones: A veces, una línea invertida también puede señalar regiones repetitivas que han sido reordenadas o invertidas en comparación con una de las secuencias. Estructura de Genes: En el análisis de genes, una línea recta invertida puede representar un gen que está orientado en dirección opuesta a otros genes en la misma región del genoma.

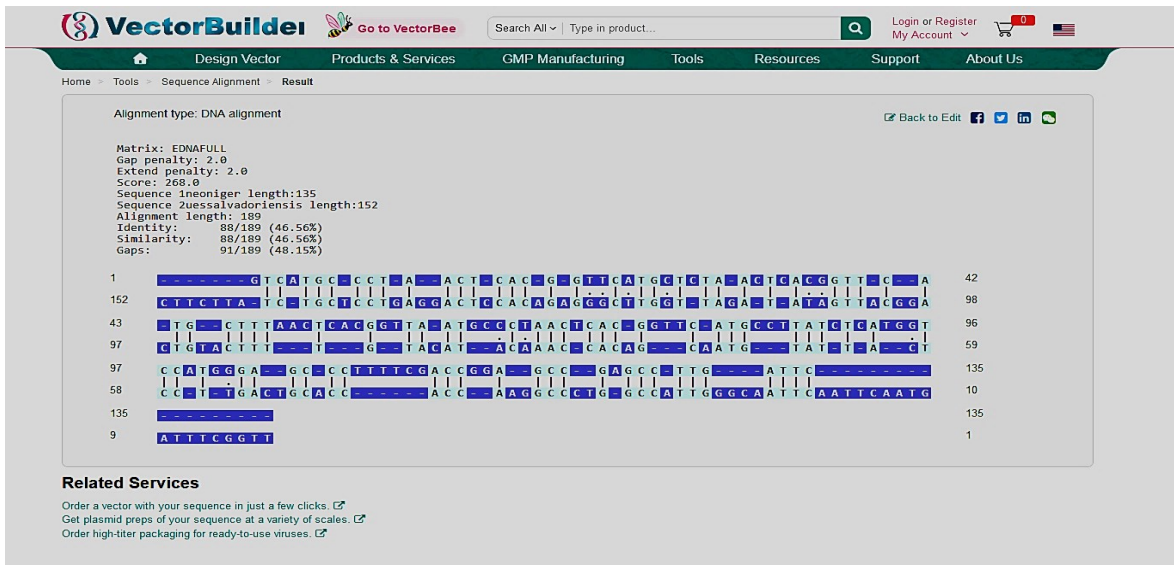


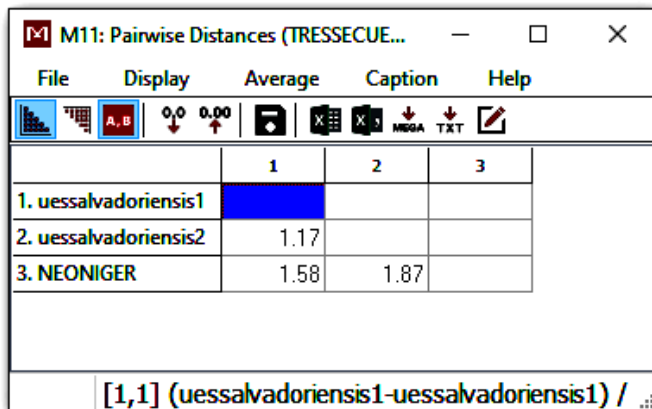
Fig 58. Analisis de las secuencias uessalvadoriensis y neoniger en programa VectorBuilder.

En la Fig 58 es una alineación de secuencias de ADN. Que significa: Números en la Parte Superior: Los números (135, 9) generalmente representan la longitud de las secuencias o la posición de alguna de las secuencias alineadas. Sin más contexto, es difícil decir con certeza qué significan, pero podrían

indicar el inicio o la posición de las secuencias. Secuencias de ADN: Las líneas con letras (A, T, C, G) representan nucleótidos de ADN. Los guiones (-) indican posiciones donde hay inserciones o eliminaciones (gaps) en la alineación. Cada letra corresponde a un nucleótido: A: Adenina, T: Timina, C: Citosina, G: Guanina. Alineación: Las líneas con | representan coincidencias entre las secuencias alineadas. Cuantos más se encuentren, más similar es la secuencia en esa posición. Los espacios o puntos (.) pueden indicar que hay una diferencia en esa posición específica entre las secuencias. Interpretación General: Este tipo de alineación se utiliza para comparar dos o más secuencias de ADN y ver cómo se relacionan entre sí. Las similitudes pueden indicar homología, lo que sugiere que las secuencias provienen de un ancestro común o que tienen funciones biológicas relacionadas.

Los resultados de un alineamiento de secuencias de ADN entre dos secuencias: "neoniger" y "uessalvadoriensis". Significa: Alignment type: DNA alignment: Indica que se trata de un alineamiento de secuencias de ADN. Matrix: EDNAFULL: Se refiere a la matriz de puntuación utilizada para evaluar la similitud entre nucleótidos. EDNAFULL es una matriz comúnmente usada para alineamientos de ADN, que asigna puntajes a las coincidencias y diferencias entre nucleótidos. Gap penalty: 2.0: Este es el costo asignado por introducir un espacio (gap) en el alineamiento. Un valor más alto significa que se penaliza más la introducción de gaps. Extend penalty: 2.0: Este es el costo adicional por extender un gap una vez que se ha introducido. También influye en la forma en que se manejan las inserciones y eliminaciones en la alineación. Score: 268.0: Este es el puntaje total del alineamiento. Un puntaje más alto indica un alineamiento más favorable entre las dos secuencias. Sequence 1 neoniger length: 135: Longitud de la primera secuencia (neoniger) es de 135 nucleótidos. Sequence 2 uessalvadoriensis length: 152: Longitud de la segunda secuencia (uessalvadoriensis) es de 152 nucleótidos. Alignment length: 189: La longitud total del alineamiento, que incluye las secuencias alineadas más los gaps. Identity: 88/189 (46.56%): Indica que hay 88 posiciones en las que las dos secuencias son idénticas, lo que representa el 46.56% de la longitud

total del alineamiento. Similarity: 88/189 (46.56%): La similitud es la misma que la identidad en este caso, lo que sugiere que no hay diferencias en la forma en que se están contando (es decir, no se están considerando las similitudes basadas en propiedades químicas de los nucleótidos). Gaps: 91/189 (48.15%): Indica que hay 91 posiciones que son gaps en el alineamiento, representando el 48.15% del alineamiento total. Esto puede sugerir que hay una gran cantidad de diferencias entre las secuencias, o que las secuencias son más diversas en longitud. Resumen El alineamiento sugiere que las secuencias "neoniger" y "uessalvadoriensis" tienen un grado moderado de similitud (46.56%), pero también una alta proporción de gaps, lo que puede indicar variaciones significativas entre ellas.



	1	2	3
1. uessalvadoriensis1	0.00		
2. uessalvadoriensis2	1.17		
3. NEONIGER	1.58	1.87	

[1,1] (uessalvadoriensis1-uessalvadoriensis1) / ...

Fig. 59. A. Distancia de Filogenia de las especies uessalvadoriensis y neoniger.

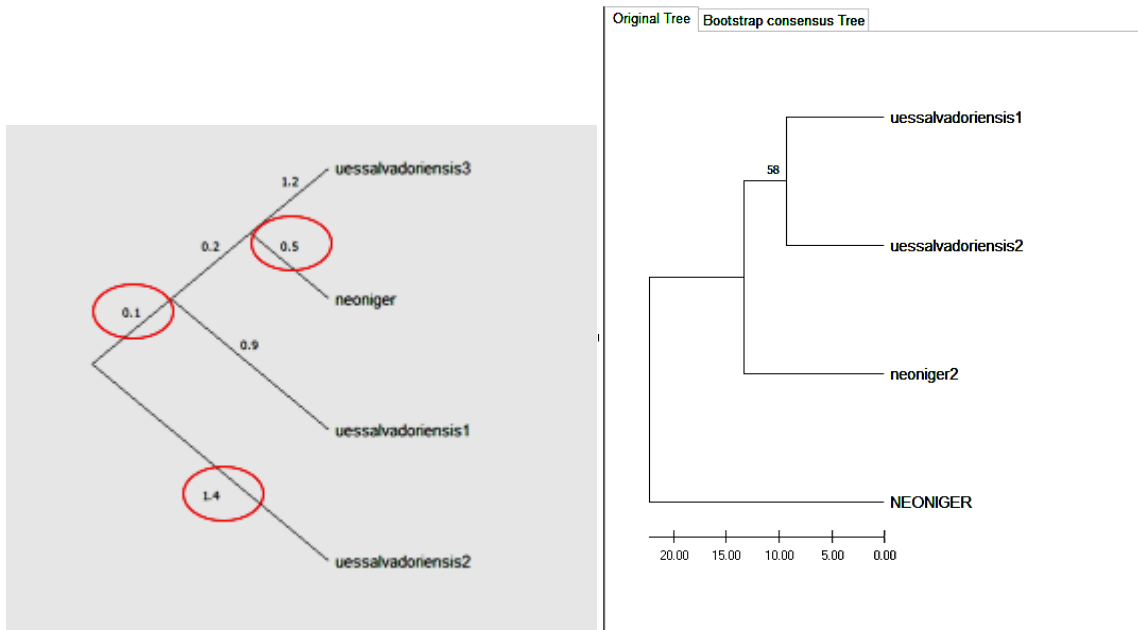


Fig. 59. B. Distancia de Filogenia de las especies uessalvadoriensis y neoniger.

En la **Fig 59 A** el valor estimado del parámetro de forma para la distribución Gamma discreta es 23,3524. El patrón y las tasas de sustitución se estimaron según el modelo Tamura-Nei (1993) (+G) [1]. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en las tasas evolutivas entre sitios (5 categorías, [+G]). Las tasas evolutivas medias en estas categorías fueron 0,73, 0,88, 0,99, 1,10 y 1,30 sustituciones por sitio. Las frecuencias de nucleótidos son A = 23,50 %, T/U = 26,50 %, C = 25,35 % y G = 24,65 %. Para estimar los valores de ML, se calculó automáticamente una topología de árbol. La máxima verosimilitud logarítmica para este cálculo fue -580,228. Este análisis involucró 3 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1.º, 2.º, 3.º y no codificante. Hubo un total de 156 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11. Indica una secuencia de ADN o ARN de diferentes muestras, probablemente de un análisis genético. Cada línea parece representar una secuencia diferente, con un nombre de especie o muestra seguido de la secuencia de nucleótidos y su longitud. uessalvadoriensis2 y uessalvadoriensis1 parecen referirse a muestras de una especie que podría ser endémica de El

Salvador, dado el nombre. *neoniger* podría referirse a otra especie o muestra, posiblemente un organismo que ha sido estudiado en el mismo contexto. Los números al final de cada línea podrían indicar la longitud de la secuencia en bases. Los números (1.17, 1.58, 1.87): Estos podrían ser valores que representan alguna medida, como la distancia genética, la divergencia entre las secuencias, o algún otro tipo de comparación (como tasas de sustitución o medidas de diversidad). En este contexto, podrían indicar la similitud o diferencia genética entre las muestras. Los números como 1.17, 1.58 y 1.87, en el contexto de un análisis genético, generalmente se interpretan como medidas de distancia genética entre las secuencias de ADN de las muestras. Distancia genética: Estas cifras suelen representar la cantidad de cambios o diferencias nucleotídicas entre las secuencias. Un número más bajo sugiere una mayor similitud genética, mientras que un número más alto indica que las secuencias son más diferentes. Escala: La escala de las distancias puede variar dependiendo del método utilizado para calcularlas (por ejemplo, distancia de Kimura, distancia de Jukes-Cantor, etc.). Es importante saber qué método se usó para interpretar correctamente los valores. Comparaciones: Si consideras que *uessalvadoriensis1* y *uessalvadoriensis2* tienen una distancia de 1.17, esto podría indicar que son bastante similares genéticamente. En cambio, si comparas *uessalvadoriensis1* con *neoniger* y obtienes una distancia de 1.58, esto sugiere que hay una diferencia notable entre ellos. Una distancia de 1.87 entre *uessalvadoriensis2* y *neoniger* indica una diferencia aún mayor, lo que podría significar que estas dos especies están más distantes evolutivamente. Interpretación evolutiva: Estas distancias pueden proporcionar información sobre la historia evolutiva de las especies, ayudando a construir árboles filogenéticos que muestren las relaciones entre ellas. En el contexto de filogenia, una "posición" de 58 generalmente se refiere a una ubicación específica en un árbol filogenético, que es una representación gráfica de las relaciones evolutivas entre diferentes especies o grupos. **En la Fig 59 B** Aquí hay algunas interpretaciones posibles: En Mega11, "1.4" podría referirse a un parámetro relacionado con la tasa de sustitución en

un modelo filogenético. Esto generalmente indica que la tasa de cambio para un tipo específico de nucleótido o aminoácido es 1.4 veces más alta que otra tasa de referencia. Este ajuste es importante para modelar con precisión la evolución de las secuencias. "0.5" generalmente representa un parámetro, como la tasa de sustitución o una frecuencia de nucleótidos. Esto podría indicar que la tasa de cambio entre ciertos tipos de nucleótidos es la mitad de la tasa de referencia. "0.1" podría indicar una frecuencia de nucleótidos o una tasa de sustitución baja en comparación con otros parámetros del modelo. Esto sugiere que ciertos cambios evolutivos son menos frecuentes. Este tipo de ajuste es clave para reflejar con precisión la evolución en el análisis filogenético. Interpretación general: Los números más bajos indican que las secuencias están más estrechamente relacionadas evolutivamente, mientras que los números más altos sugieren una mayor divergencia. Esto podría usarse para inferir relaciones filogenéticas, como qué especies están más relacionadas entre sí y cómo han evolucionado a lo largo del tiempo.

-Protein GRAVY results. (Resultado de proteínas GRAVY) muestra Aspergillus El Salvador.

Results for 2450 residue sequence "Sequessalvadoriensis" starting "ACGGACGTTA" es **0.741**

Se refiere al cálculo del índice GRAVY (Hydropathicity Value), que mide la hidropatía o la capacidad de una proteína para interactuar con el agua. Un valor GRAVY se calcula sumando los valores de hidropatía de los aminoácidos que componen la proteína. Para el resultado es **0.741**. Este valor positivo indica que la proteína tiene una tendencia a ser hidrófoba, es decir, tiene más aminoácidos que son menos solubles en agua. Las proteínas con valores GRAVY altos suelen ser menos solubles en soluciones acuosas y pueden tener funciones que requieren interacciones menos favorables con el agua, como las que se encuentran en membranas celulares. El término "Hidrófoba" se refiere a la propiedad de una molécula o sustancia de ser repelente al agua. Las moléculas hidrófobas tienden a no disolverse en agua y, en cambio, prefieren interactuar entre sí. Esto se debe a su estructura

química, que suele estar compuesta por grupos apolares o no cargados. En el contexto de las proteínas, los aminoácidos hidrófobos suelen encontrarse en el interior de la proteína, donde están protegidos del agua, mientras que los aminoácidos hidrofílicos (que atraen el agua) suelen estar en la superficie, interactuando con el medio acuoso. Esta disposición es importante para la estructura y función de la proteína, ya que influye en su plegamiento y estabilidad.

-Mutate for Digest results. (Mutar para obtener resultados de Digest). Aspergillus muestra El Salvador.

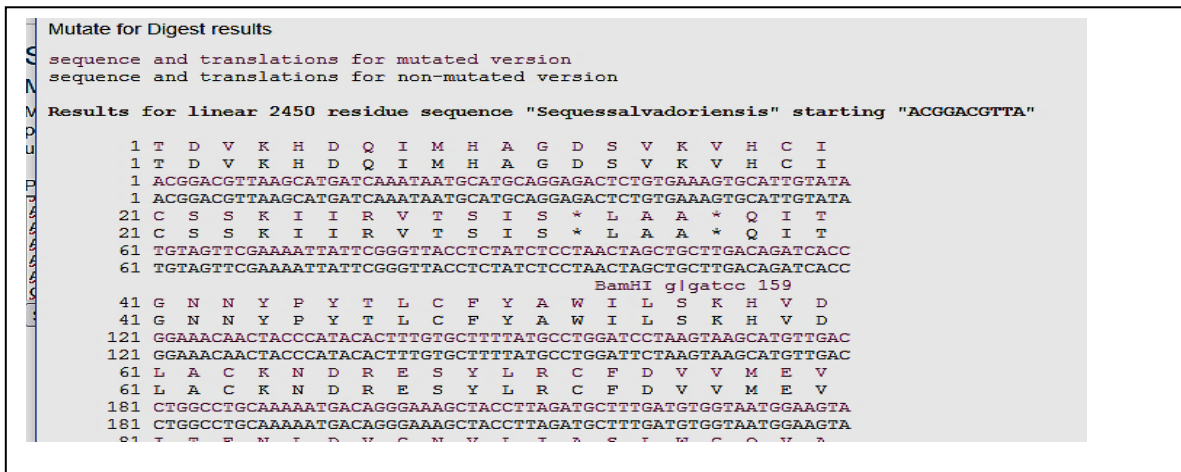


Fig 60. Gráfico Mutate for Digest results.

Se refiere a un análisis que muestra las secuencias de proteínas y sus traducciones correspondientes, tanto para una versión mutada como para una versión no mutada de una secuencia específica. Desglose de los resultados: Secuencia lineal de 2450 residuos: Se está trabajando con la secuencia de la proteína Sequessalvadoriensis que comienza con ACGGACGTTA. Mutación: El análisis parece comparar dos versiones de la secuencia, una mutada y otra no mutada. Aunque no se especifican los cambios en extracto, estas mutaciones pueden implicar sustituciones de aminoácidos en la secuencia. Traducciones: A continuación, se presentan las traducciones de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos. Las letras representan aminoácidos específicos: Por ejemplo, "T" corresponde a treonina, "D" a ácido aspártico, "V" a valina. Codones: Las líneas que muestran

secuencias de nucleótidos indican cómo los codones de la secuencia se traducen en aminoácidos.

Estructura: La estructura de los resultados sugiere que la comparación de aminoácidos en las posiciones dadas muestra si hay alguna diferencia significativa entre la versión mutada y la no mutada.

-Group Protein results. (Resultado de grupo de proteínas.). Aspergillus. El Salvador.

Group Protein results

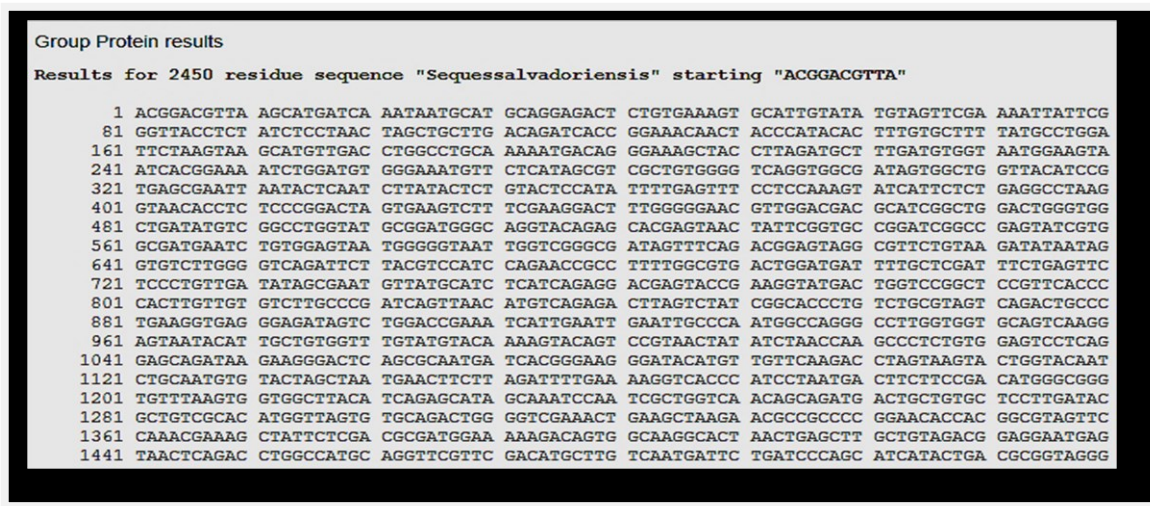


Fig 61. Group Protein results.

Se refiere a un análisis que agrupa o presenta información sobre una secuencia de proteínas. En este caso, se están mostrando los resultados para una secuencia de 2450 residuos de la proteína Sequessalvadoriensis, comenzando con ACGGACGTTA. Desglose de los resultados: Secuencia de Nucleótidos: La información que proporcionas incluye la secuencia completa de nucleótidos de la proteína. Cada línea muestra un fragmento de esta secuencia. Representación de Codones: La secuencia está escrita en bloques que pueden representar codones, que son grupos de tres nucleótidos que codifican un aminoácido. Organización: Los números al inicio de las líneas indican la posición dentro de la secuencia total. Esto es útil para referirse a partes específicas de la secuencia.

Estudio de la Secuencia: Estos resultados son importantes para entender la composición y estructura de la proteína.

-CpG islands results. (Resultados de las islas CpG). Aspergillus El Salvador

```
CpG Islands results
Results for 2450 residue sequence "Sequessalvadoriensis" starting "ACGGACGTTA"
CpG island detected in region 340 to 539 (Obs/Exp = 0.80 and %GC = 50.50)
CpG island detected in region 341 to 540 (Obs/Exp = 0.78 and %GC = 51.00)
CpG island detected in region 342 to 541 (Obs/Exp = 0.78 and %GC = 51.00)
CpG island detected in region 343 to 542 (Obs/Exp = 0.84 and %GC = 51.50)
CpG island detected in region 344 to 543 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 345 to 544 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 346 to 545 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 347 to 546 (Obs/Exp = 0.81 and %GC = 52.50)
CpG island detected in region 348 to 547 (Obs/Exp = 0.89 and %GC = 52.50)
```

Fig. 62 CpG Islands results.

Se refiere a un análisis que identifica islas CpG en una secuencia de ADN. Las islas CpG son regiones ricas en pares de bases citosina (C) y guanina (G) donde los nucleótidos C están seguidos por nucleótidos G en el mismo sentido, y son importantes en la regulación de la expresión génica. Desglose de los resultados: Isla CpG detectada en la región 340 a 539:Obs/ Exp = 0.80: Este valor representa la relación entre la cantidad observada de dinucleótidos CpG y la cantidad esperada. Un valor menor a 1 sugiere que hay menos CpG de lo esperado, lo cual es común en muchas secuencias genómicas. %GC = 50.50: Esto indica que el 50.50% de los nucleótidos en esa región son guanina y citosina, lo que es un porcentaje relativamente alto y común en islas CpG. Isla CpG detectada en la región 341 a 540:Obs/Exp = 0.78: Similar al anterior, este valor indica que la cantidad de dinucleótidos CpG es también menor de lo esperado.% GC = 51.00: Indica un ligero aumento en el contenido de GC en esta región. Interpretación: Importancia Biológica: Las islas CpG a menudo están

asociadas con promotores de genes y pueden ser cruciales para la regulación de la expresión génica. La metilación de las citosinas en estas regiones puede influir en si un gen se activa o se silencia.

-Group DNA results. (Resultado de grupos DNA) Aspergillus.

Results for **2450** residue sequence Sequessalvadoriensis starting **ACGGACGTTA**

Se refiere a un análisis que clasifica o agrupa secuencias de ADN en función de ciertas características, similitudes o criterios específicos. Se aplica a una secuencia de 2450 residuos del organismo Sequessalvadoriensis, comenzando con ACGGACGTTA. Desglose del significado: Group DNA results: Indica que se han agrupado o clasificado secuencias de ADN. Esto puede implicar la identificación de secuencias homólogas, la clasificación en familias de genes, o la agrupación según propiedades funcionales o estructurales. Results for 2450 residue sequence: Esto especifica que los resultados se basan en una secuencia de ADN que tiene 2450 residuos (nucleótidos), sugiriendo que se trata de una secuencia considerablemente larga. Starting "ACGGACGTTA": Indica que la secuencia analizada comienza con "ACGGACGTTA", lo que proporciona un contexto específico para la agrupación o análisis. Implicaciones del análisis: Agrupar secuencias de ADN es útil para: Identificación de homologías: Encontrar genes o secuencias relacionadas evolutivamente en diferentes organismos. Estudios funcionales: Analizar funciones compartidas entre genes o secuencias agrupadas. Filogenética: Investigar relaciones evolutivas entre diferentes especies a través de sus secuencias de ADN.

-Proteins stats results. Muestra de El Salvador.

Results for **2450** residue sequence "Sequessalvadoriensis" starting "ACGGACGTTA"

Pattern:	Times found:	Percentage:
A	594	24.24
B	0	0.00
C	579	23.63

D	0	0.00
E	0	0.00
F	0	0.00
G	640	26.12
H	0	0.00
I	0	0.00
K	0	0.00
L	0	0.00
M	0	0.00
N	0	0.00
P	0	0.00
Q	0	0.00
R	0	0.00
S	0	0.00
T	637	26.00
V	0	0.00
W	0	0.00
X	0	0.00
Y	0	0.00
Z	0	0.00
Aliphatic G,A,V,L,I	1234	50.37
Aromatic F,W,Y	0	0.00
Sulphur C,M	579	23.63
Basic K,R,H	0	0.00
Acidic B,D,E,N,Q,Z	0	0.00
Aliphatic hydroxyl S,T	637	26.00
tRNA synthetase class I Z,E,Q,R,C,M,V,I,L,Y,W	579	23.63
tRNA synthetase class II B,G,A,P,S,T,H,D,N,K,F	1871	76.37

Fig 63 A. Resultados de las estadísticas de proteínas

En la Fig 63 A. El *Aspergillus* tiene que en La Proteína A: Se encontró 594 veces, lo que representa el 24.24% del total de observaciones. Proteína B: No se encontró en ninguna observación, lo que significa que su porcentaje es 0.00%. En resumen, la Proteína A es bastante común en los datos muestreados, mientras que la Proteína B no se ha detectado en absoluto. Los datos parecen ser estadísticas sobre la frecuencia de aparición de diferentes grupos de aminoácidos en proteínas o en un conjunto de datos específico. El grupo de los Alifáticos (G, A, V, L, I): Encontrados 1234 veces. Representan el 50.37% del total. Esto indica que estos aminoácidos son los más comunes en tu conjunto de datos. Aromáticos (F, W, Y): Encontrados 0 veces. Representan 0.00%. No hay presencia de estos aminoácidos en el conjunto. Azufre (C,M): Encontrados 579 veces. Representan el 23.63%.

Estos aminoácidos son relativamente comunes. Básicos (K, R,H): Encontrados 0 veces. Representan 0.00%. Al igual que los aromáticos, no se han detectado. Ácidos (B,D,E,N,Q,Z):Encontrados 0 veces. También 0.00%. Ninguno de estos aminoácidos está presente. Alifáticos hidroxilados (S,T): Encontrados 637 veces. Representan el 26.00%. Son un grupo significativo en tu conjunto. tRNA sintetasa clase I (Z,E,Q,R,C,M,V,I,L,Y,W): Encontrados 579 veces. Representan el 23.63%. Un grupo importante, similar a los aminoácidos azufrados. tRNA sintetasa clase II (B,G,A,P,S,T,H,D,N,K,F): Encontrados 1871 veces. Representan el 76.37%. Este grupo es el más abundante en tu conjunto de datos. No se encontraron aminoácidos aromáticos, básicos o ácidos. Lo anterior es un análisis de la composición de aminoácidos en un conjunto de datos, posiblemente relacionado con secuencias de proteínas o muestras biológicas. La composición de aminoácidos en los hongos tiene un papel crucial en su biología y funciones. Aquí te explico cómo puede beneficiarle a un hongo tener la variedad de aminoácidos que se describen: Alifáticos (G, A, V, L, I): Función: Estos aminoácidos son clave para la formación de estructuras proteicas estables, contribuyendo a la hidrofobicidad y el plegamiento de proteínas. Su alta proporción puede ayudar al hongo a mantener la integridad de sus proteínas, favoreciendo su crecimiento y adaptación a diferentes entornos. Ausencia de Aromáticos (F, W, Y): Implicación: Aunque la ausencia de estos aminoácidos es inusual, podría sugerir que el hongo ha adaptado su metabolismo o su entorno para no requerir estas estructuras. Esto podría estar relacionado con su nicho ecológico o su manera de interactuar con su entorno. Azufre (C, M):Función: Los aminoácidos que contienen azufre son importantes en la formación de enlaces disulfuro, que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas. Esto puede ser crucial para las funciones enzimáticas y la resistencia a condiciones adversas. Ausencia de Básicos (K, R, H):Implicación: La falta de aminoácidos básicos puede limitar la capacidad del hongo para interactuar electrostáticamente con otras moléculas. Sin embargo, esto podría ser una adaptación a su entorno, donde no necesita estas interacciones para su supervivencia. Ausencia de Ácidos (B, D,

E, N, Q, Z): Implicación: La ausencia de aminoácidos ácidos puede sugerir que el hongo no necesita estas características para su metabolismo o podría estar utilizando otros mecanismos para regular el pH o llevar a cabo reacciones bioquímicas. Alifáticos Hidroxilados (S, T): Función: Estos aminoácidos son importantes para la formación de enlaces de hidrógeno y la estabilidad de las estructuras proteicas. Su presencia ayuda al hongo a mantener la función y estabilidad de sus proteínas en condiciones variadas. tRNA Sintetasa Clase I y II: Función: La presencia de aminoácidos relacionados con estas sintetetas sugiere que el hongo tiene una capacidad robusta para traducir proteínas. Esto es fundamental para la síntesis de proteínas necesarias para su crecimiento, reproducción y respuesta a cambios ambientales. En conjunto, la composición de aminoácidos refleja adaptaciones evolutivas del hongo a su entorno. La predominancia de ciertos grupos de aminoácidos puede facilitar su crecimiento y supervivencia en condiciones específicas, afectando su metabolismo, interacción con otros organismos y respuesta a factores ambientales. Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas, que son esenciales para casi todas las funciones biológicas en los organismos. Aunque los aminoácidos en sí mismos no se encuentran en las secuencias de ADN, la relación entre el ADN y los aminoácidos es crucial. Codificación de proteínas: El ADN contiene secuencias de nucleótidos que se organizan en genes. Cada gen se transcribe a ARN mensajero (ARNm), que luego se traduce en una secuencia de aminoácidos. Esta secuencia determina la estructura y función de la proteína resultante. Código genético: Cada grupo de tres nucleótidos (codón) en el ARNm corresponde a un aminoácido específico. Por lo tanto, la secuencia de ADN determina qué aminoácidos se ensamblan para formar una proteína. Funciones biológicas: Las proteínas desempeñan funciones estructurales, enzimáticas, de transporte, defensa, entre otras. Los aminoácidos son fundamentales para estas funciones, y su diversidad permite la gran variedad de proteínas que existen en los organismos. En resumen, aunque los aminoácidos no están directamente en el ADN, su secuencia está codificada en el ADN y es esencial para la producción de

proteínas y el funcionamiento de los organismos. Para interpretar los aminoácidos en las secuencias, se utiliza el código genético, que asigna un codón de tres nucleótidos a cada aminoácido. Primero, se transcribe la secuencia de ADN a ARN mensajero (ARNm), y luego este ARNm se traduce en una cadena de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Cada codón en el ARNm corresponde a un aminoácido específico, lo que permite ensamblar la proteína en el orden correcto.

Al utilizar el **programa LALYNG**, se puede analizar: En las secuencias de uessalvadoriensis y neoniger se compara:

SECUENCIAS. El programa solo pide dos secuencias.

```
>uessalvadoriensis1
TGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGAGCACGAGTAACTATTGGGTGC
CGGATCGGCCGAGTATCGTGGCGATGAATCTGTGGAGTAATGGGGTAATTGGTCGGGCGATA
>neoniger
GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGCTTGGGGTCAGATTCTTACGTCCATCCAGAACC GCCTTTTGGCGTGACT
GGATGATTTTGCTCGATTCTGAGTTCTCCCTGTTGATATAGCGAATGTTATGCATCTCAT
```

Resultados.

Tool output
/fasta/bin/lalign36 -m 91 lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.asequence lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.bsequence -p -s BL50 -f -12 -g -2 -E 10.0 -m 0 -m "F11 lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.output.lav"

Download

```

LALIGN finds non-overlapping local alignments
version 36.3.0h May, 2020
Please cite:
X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381

Query: lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.asequence
I>>uessalvadoriensis1 - 151 aa
Library: lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.bsequence
151 residues in 1 sequences

Statistics: (shuffled [500]) MLE statistics: Lambda= 0.8523; K= 4024
statistics sampled from 1 (1) to 500 sequences
Threshold: E() < 10 score: 306
Algorithm: Smith-Waterman (SSE2, Michael Farrar 2006) (7.2 Nov 2010)
Parameters: BL50 matrix (15:-5), open/ext: -12/-2
Scan time: 0.010

The best non-identical alignments are:
neoniger (151) 366 15.7 0.36 0.477 0.651 149
+- 335 13.3 0.89 0.470 0.636 151
+- 315 11.8 1 0.477 0.636 132
+- 311 11.5 1 0.470 0.616 151

>>uessalvadoriensis1, 151 aa vs lalign-I20241014-140919-0264-12644004-p1m.bsequence library

>>neoniger (151 aa)
Waterman-Eggert score: 366; 15.7 bits; E(1) < 0.36
47.7% identity (65.1% similar) in 149 aa overlap (9-149:1-135)

10 20 30 40 50 60
uessal GCATCGGCTCGACTGGGTGG-CTGATATGTCGGCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGA
:..: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGCTTGGGGTCAGATTCT--
10 20 30 40 50

70 80 90 100 110 120
uessal GCMCAGTAACATATCGGTGCGGATGGCGGATATGTCGGC--GATGATCTG-TGGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig -TACGT----CCAT-----CCBAACCCCTTTTGGCGTACTGGATGATTTCTCGA
60 70 80 90 100

130 140
uessal GTAATGGGGGTA---ATTGGTCGGGCGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TTTCAGATTCCTCCCTGTTGATAGCGA
110 120 130
    
```

```

>--
Waterman-Eggert score: 335; 13.3 bits; E(1) < 0.89
47.0% identity (63.6% similar) in 151 aa overlap (2-143:6-147)

    10   20   30   40   50   60
uessal GGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGCTGATATGCGCCCTGGATATCGCGATGGCGAGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig AGACGGAGTA--GCG-GTCTGTAGATATAATAGGTCTCTGGGGT-CAGATTCCTACG
    10   20   30   40   50   60

    70   80   90   100  110
uessal TACAGAGCAGAGTAACTATTCGGGT---CGGGATCG---GC-CGAGTATCGTGGCGAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TCCA--TCAGAACCCGCTTTTGGCGTGACTGGATGATTTTCTCGA--TTTC--TGAGTT
    70   80   90   100  110

    120  130  140
uessal GAATCTGTGGA-GTAAATGGGGTAATTGGTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig CTCCTGTTGATATAGGAAATGTTATGCATC
    120  130  140

>--
Waterman-Eggert score: 315; 11.8 bits; E(1) < 1
47.7% identity (63.6% similar) in 132 aa overlap (1-119:23-148)

    10   20   30   40   50
uessal TGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGAT---ATGTC-GGCCTGGTATCGCGATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TGTAAAGATATAAGGTG-TCTTGGGGTCAAGTCTTACGTCATCCAGAACCCGCTTTT
    30   40   50   60   70   80

    60   70   80   90   100  110
uessal GGCAGGTACAGAGCAGAGTAACTATTCGGTGGCGGA--TCGGCCGAGTATCGTGGCGA-
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig GGCGTG-ACTGG--ATGATTT--TGCTGATTTCTGAGTTCCCTGTTGATATAGCGAA
    90   100  110  120  130

uessal ----TGAATCT
      : : : : :
neonig TGTATGATCT
    140

>--
Waterman-Eggert score: 311; 11.5 bits; E(1) < 1
47.0% identity (61.6% similar) in 151 aa overlap (2-151:10-141)

    10   20   30   40   50   60
uessal GGACGACGCAT-CGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGCGCTGGTATCGCGGATGGCGAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig GGAGTAGGCTTCTGTAAGATATAATAGGTCTTGG-GGTCAG--ATTCTACGTCCA-
    10   20   30   40   50   60

    70   80   90   100  110  120
uessal GTACAGAGCAGAGTAACTATTCGGTGGCGGATCGGCCGAGTATCGTGGCGGATGAATCG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TCCAGAAC-CG---CCTTTT---GGCGTGACTGGATGATTTGCT--CGAT--TTCTG
    70   80   90   100  110  120

    130  140  150
uessal TGGAGTAATGGGGTAATTGGTCGGCGATA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig AGTTCCTGTTGATATAG--CGAATGTTA
    120  130  140

>>>///
151 residues in 1 query sequences
151 residues in 1 library sequences
ScmpLib [36.3.8h May, 2020]
start: Mon Oct 14 13:09:21 2024 done: Mon Oct 14 13:09:21 2024
Total Scan time: 0.010 Total Display time: 0.000

Function used was LALIGN [36.3.8h May, 2020]

```

If you use this service, please consider citing the following publication: The EM in its bio.tools record.

The best non-identical alignments are:	ls-w	bits	E(1)	% id	% sim	alen	
neoniger	(151)	366	15.7	0.36	0.477	0.651	149
+-		335	13.3	0.89	0.470	0.636	151
+-		315	11.8	1	0.477	0.636	132
+-		311	11.5	1	0.470	0.616	151

Interpretación de cada parte:

- The best non-identical alignments are: Esto indica que los alineamientos mostrados son los mejores alineamientos no idénticos, es decir, no son alineamientos con secuencias idénticas a la consulta, sino secuencias similares. ls-w: Este valor puede referirse a la longitud del segmento alineado (length of segment aligned) o alguna medida interna de la herramienta que describe el tamaño del fragmento alineado o la ventana que se está utilizando para el alineamiento. Sin embargo, la información específica de "ls-w" puede variar según la herramienta. bits: Puntuación en bits: Esta es una medida de la calidad del alineamiento, donde un valor más alto indica un alineamiento mejor o más confiable. La puntuación en bits es una transformación del valor de "raw score" (puntuación bruta) que considera la probabilidad de que el alineamiento ocurra al azar. E(1): Valor E (E-value): Esto representa el número esperado de alineamientos con esa puntuación o mejor que podrían ocurrir al azar en una búsqueda en una base de datos de un determinado tamaño. Un valor E más bajo indica un alineamiento más significativo. Por ejemplo, un valor de 0.36 significa que hay una probabilidad baja de que el alineamiento sea debido al azar, lo cual indica que es significativo. Los valores E más altos (como 1) indican que el alineamiento es menos significativo y podría deberse al azar. %_id: Porcentaje de identidad: Muestra el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos idénticos en el alineamiento entre la secuencia de

consulta y la secuencia alineada. Por ejemplo, en el primer alineamiento, 47.7% de las posiciones alineadas tienen residuos idénticos. %_sim: Porcentaje de similitud: Representa el porcentaje de posiciones en las que los residuos son similares, no necesariamente idénticos. Esto incluye sustituciones conservativas, donde los aminoácidos son diferentes, pero tienen propiedades fisicoquímicas similares (por ejemplo, cambiar entre dos aminoácidos con carga positiva). En el primer alineamiento, el 65.1% de las posiciones son similares en términos de características físico-químicas. alen: Longitud del alineamiento: Esto indica la longitud total del alineamiento (número de posiciones alineadas). En el primer alineamiento, 149 posiciones están alineadas entre las dos secuencias. Ejemplo de interpretación: Tomemos la primera fila del resultado para explicarlo: neoniger: Esto probablemente se refiere al nombre de la secuencia o entrada alineada. (151): Este podría ser el número total de residuos en la secuencia alineada o el número total de secuencias en la base de datos. 366 (bits): La puntuación en bits, que indica un alineamiento fuerte y de alta calidad. E(1) = 0.36: El valor E indica que hay una probabilidad baja de que este alineamiento ocurra por casualidad (lo cual es bueno). %_id = 0.477 (47.7%): El porcentaje de identidad muestra que el 47.7% de los residuos son idénticos entre las dos secuencias. %_sim = 0.651 (65.1%): El porcentaje de similitud indica que el 65.1% de los residuos son similares en características. Alen = 149: Esto indica que el alineamiento tiene una longitud de 149 posiciones.

Resumen:

- El informe te muestra los mejores alineamientos no idénticos a la secuencia de consulta.
- Te da una serie de métricas, como la puntuación en bits (calidad del alineamiento), el valor E (significancia estadística), el porcentaje de identidad y similitud, y la longitud del alineamiento, que te permiten evaluar qué tan bien se alinean las secuencias en términos de identidad y características similares.

The best non-identical alignments are:	ls-w	bits	E(1)	%_id	%_sim	alen
neoniger (151)	366	15.7	0.36	0.477	0.651	149
+-	335	13.3	0.89	0.470	0.636	151
+-	315	11.8	1	0.477	0.636	132
+-	311	11.5	1	0.470	0.616	151

The best non-identical alignments are: ls-w bits E(1) %_id %_sim alen neoniger (151) 366 15.6 0.36 0.477 0.651 149 +- 335 13.3 0.9 0.470 0.636 151 +- 315 11.7 1 0.477 0.636 132 +- 311 11.4 1 0.470 0.616 151 .1. The best non-identical alignments are:

Esto significa que las secuencias listadas son las mejores secuencias alineadas con la secuencia de consulta, excluyendo las que son completamente idénticas. 2. ls-w: Este campo generalmente indica la longitud del segmento alineado. En algunos contextos, puede referirse a la longitud del alineamiento de la secuencia de consulta con la secuencia correspondiente en la base de datos. No aparece un valor específico en el resultado que mostraste, por lo que puede ser opcional o no relevante en este formato. 3. bits: Puntuación en bits: Una puntuación en bits más alta indica que el alineamiento es más fuerte o más confiable. Es una medida estandarizada de la calidad del alineamiento. 366 es un alineamiento de muy alta calidad en comparación con los demás, que tienen puntuaciones más bajas como 335, 315, y 311. 4. E(1): Valor E (E-value): Representa el número de alineamientos esperados por azar con una puntuación similar o mayor. Un valor E bajo significa que el alineamiento es estadísticamente significativo. 15.6, 13.3, 11.7, y 11.4: Estos valores E son relativamente altos (en el rango de probabilidades superiores a 1), lo que significa que los alineamientos no son muy significativos o podrían ser fortuitos. Valores E muy bajos (como 0.001 o menores) indicarían una mayor

significancia.0.36 es el valor más bajo en la primera fila, lo que indica un alineamiento más confiable en comparación con los otros valores E.5. %_id:Porcentaje de identidad: El porcentaje de posiciones en el alineamiento donde las secuencias tienen los mismos nucleótidos o aminoácidos.En el primer alineamiento, 47.7% de las posiciones alineadas son idénticas entre las secuencias.En los otros alineamientos, los porcentajes son similares: 47% de identidad.6. %_sim:Porcentaje de similitud: El porcentaje de posiciones donde las secuencias tienen aminoácidos que son diferentes, pero tienen propiedades fisicoquímicas similares (sustituciones conservativas).En el primer alineamiento, el 65.1% de las posiciones son similares en términos de características, lo cual es un buen valor.Los otros alineamientos tienen porcentajes similares: 63.6% y 61.6%.7. alen:Longitud del alineamiento (alignment length): El número total de posiciones alineadas entre las secuencias.El primer alineamiento tiene una longitud de 149 posiciones, mientras que los otros tienen longitudes de 151, 132, y 151.Ejemplo de interpretación (primera fila):neoniger (151): Esta es la secuencia alineada, cuyo nombre es "neoniger" y parece tener una longitud de 151 residuos (nucleótidos o aminoácidos).366 bits: El alineamiento tiene una puntuación de 366 bits, lo cual indica una alta calidad.15.6 E-value: Este valor E indica que hay cierta probabilidad de que el alineamiento haya ocurrido por casualidad, aunque sigue siendo moderadamente significativo.0.477 %_id: El 47.7% de las posiciones son idénticas entre las dos secuencias alineadas.0.651 %_sim: El 65.1% de las posiciones son similares, lo que indica un buen grado de conservación.149 alen: El alineamiento cubre 149 posiciones. Resumen general:El informe muestra los mejores alineamientos no idénticos y evalúa cada uno en términos de puntuación (bits), significancia estadística (E-value), porcentaje de identidad (%_id), porcentaje de similitud (%_sim), y longitud del alineamiento (alen). Un alineamiento con una alta puntuación en bits, un bajo valor E, y altos porcentajes de identidad y similitud se considera más confiable y significativo.

```

>>neoniger                                     (151 aa)
  Waterman-Eggert score: 366; 15.7 bits; E(1) < 0.36
  47.7% identity (65.1% similar) in 149 aa overlap (9-149:1-135)

      10      20      30      40      50      60
uessal GCATCGGCTGGACTGGGTGG-CTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGT-CTTGGGGTCAGATTCT--
              10      20      30      40      50

      70      80      90      100     110     120
uessal GCACAGTAAGTATTTCGGTGCCGGATCGGCCGAGTATCGTGGC--GATGAATCTG-TGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig -TACGT---CCAT-----CCAGAACCGCCTTTTGCCGTGACTGGATGATTTTGCTCGA
              60      70      80      90      100

      130     140
uessal GTAATGGGGTA----ATTGGTCGGGCGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TTTCTGAGTTCTCCCTGTTGATATAGCGA
              110     120     130

```

El texto que muestras proviene de un alineamiento de secuencias de proteínas (o ADN/ARN) y describe cómo dos secuencias (en este caso, probablemente dos secuencias de aminoácidos) se

comparan en términos de **identidad**, **similitud**, y el **alineamiento posicional**. Vamos a desglosar lo que significa cada parte: 1. 47.7% identity (65.1% similar) in 149 aa overlap (9-149:1-135):47.7% identity: Indica que el 47.7% de las posiciones alineadas tienen aminoácidos idénticos en ambas secuencias.65.1% similar: Indica que el 65.1% de las posiciones alineadas tienen aminoácidos similares (aunque no idénticos), lo que incluye sustituciones conservativas, donde los aminoácidos tienen propiedades fisicoquímicas similares (por ejemplo, ambos son hidrofóbicos o cargados positivamente).149 aa overlap: Indica que las dos secuencias están alineadas en una región de 149 aminoácidos.(9-149:1-135): Esto indica el rango de posiciones en el alineamiento de ambas secuencias:9-149: La primera secuencia (probablemente "uessal") tiene el alineamiento comenzando en la posición 9 y terminando en la posición 149.1-135: La segunda secuencia (probablemente "neonig") tiene el alineamiento comenzando en la posición 1 y terminando en la posición 135.2. Alineamiento de secuencias: Este es el bloque que muestra el alineamiento de las dos secuencias: Ejemplo del primer segmento:

```

      10      20      30      40      50      60
uessal GCATCGGCTGGACTGGGTGG-CTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGA
      : .:.:. :.:. :.:. : .:.:. : . : . :.:. : . :. :.:.:.
neonig GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGT-CTTGGGGTCAGATTCT--
      10      20      30      40      50

```

Secuencia 1 ("uessal"): Es la secuencia alineada de la primera proteína o gen. Secuencia 2 ("neonig"): Es la secuencia alineada de la segunda proteína o gen. Caracteres alineados: Los dos puntos (:) indican posiciones donde los residuos (aminoácidos) son idénticos en ambas secuencias. Los puntos (.) o espacio vacío) indican que las posiciones tienen residuos similares pero no idénticos. Los guiones (-) representan brechas (gaps), que son posiciones en las que un aminoácido está presente en una secuencia pero no en la otra, debido a una inserción o delección.

objective

Copiar código

```

uessal GCATCGGCTGGACTGGGTGG-CTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGA
      : .:.:. :.:. :.:. : .:.:. : . : . :.:. : . :. :.:.:.
neonig GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGT-CTTGGGGTCAGATTCT--

```

En la primera línea, la secuencia "uessal" tiene la cadena de aminoácidos GCATCGGCTGGACTGGGTGG-CTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGA. En la segunda línea, la secuencia "neonig" tiene la cadena GTTTCAGACGGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGT-CTTGGGGTCAGATTCT--. Las posiciones idénticas están indicadas por los dos puntos (:). Por ejemplo,

Valor E (E-value): El valor E indica el número esperado de alineamientos que podrían ocurrir por casualidad en una base de datos de ese tamaño. Un valor E < 1 indica que el alineamiento es estadísticamente significativo, ya que hay menos de una alineación esperada por azar. 4. 47.7% identity (63.6% similar) in 132 aa overlap (1-119:23-148). 47.7% identity: El 47.7% de las posiciones alineadas tienen aminoácidos (o nucleótidos) idénticos en ambas secuencias. 63.6% similar: El 63.6% de las posiciones alineadas tienen aminoácidos que son similares, aunque no idénticos. Esto incluye sustituciones conservativas, donde los residuos tienen propiedades físico-químicas similares. 132 aa overlap: Esto significa que las dos secuencias están alineadas en una región de 132 aminoácidos de longitud. (1-119:23-148): Indica las posiciones del alineamiento en ambas secuencias: 1-119: En la primera secuencia (uessal), las posiciones 1 a 119 están alineadas. 23-148: En la segunda secuencia (neonig), las posiciones 23 a 148 están alineadas. 5. Alineamiento de secuencias: El bloque de secuencias muestra el alineamiento entre las dos secuencias.

Alineamiento:

css

```

>--
  Waterman-Eggert score: 315; 11.8 bits; E(1) < 1
  47.7% identity (63.6% similar) in 132 aa overlap (1-119:23-148)

              10      20      30      40      50
uessal TGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGAT----ATGTC-GGCCTGGTATGCGGATG
      :: : : : . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig TGTAAGATATAATAGGTG-TCTTGGGGTCAGATTCTTACGTCCATCCAGAACC GCCTTTT
              30      40      50      60      70      80

              60      70      80      90      100     110
uessal GGCAGGTACAGAGCACGAGTAAGTATTCGGTGCCGGA--TCGGCCGAGTATCGTGGCGA-
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig GGC GTG- ACTGG--ATGATTT--TGCTCGATTTCTGAGTTCTCCCTGTTGATATAGCGAA
              90      100     110     120     130

uessal -----TGAATCT
      :: : : : :
neonig TGTTATGCATCT
              140
  
```

- -
- Secuencia "uessal": La primera secuencia alineada. Secuencia "neonig": La segunda secuencia alineada. Caracteres alineados: Los dos puntos (:) indican posiciones donde las secuencias tienen aminoácidos idénticos. Los puntos (. o espacios) indican que los residuos en esa posición son similares, pero no idénticos. Los guiones (-) representan brechas (gaps), donde hay una

inserción o delección en una de las secuencias. **Interpretación:** css . Copiar código Uessal
 TGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGAT---ATGTC-GGCCTGGTATGCGGATG :: :: . : . : : : ::
 : : : : : : : : : : : : Neonig TGTAAGATATAATAGGTG-
 TCTTGGGGTCAGATTCTTACGTCCATCCAGAACCGCCTTTT

En esta parte del alineamiento: Las posiciones con ":" representan aminoácidos idénticos entre ambas secuencias, por ejemplo, las posiciones con G o C en ambas secuencias. Las posiciones con "." representan aminoácidos similares, pero no idénticos, como las diferencias entre G y A en las posiciones respectivas. Los guiones (-) son brechas donde faltan residuos en una secuencia.
 Posiciones finales del alineamiento: Copiar código

```

uessal -----TGAATCT
          :: ::::
neonig TGTTATGCATCT
          140
  
```

Aquí hay una brecha en la secuencia "uessal" al principio, mientras que la secuencia "neonig" tiene residuos adicionales TGTTATGC. Los dos puntos (:) indican residuos idénticos en la parte alineada: AATCT aparece en ambas secuencias, aunque en diferentes posiciones. Resumen: Este informe describe un alineamiento entre dos secuencias, destacando que el 47.7% de los residuos son idénticos y el 63.6% son similares. La puntuación Waterman-Eggert de 315 indica que es un alineamiento local de buena calidad, aunque no perfecto. El alineamiento cubre 132 aminoácidos, y el valor E < 1 sugiere que es estadísticamente significativo.

```

| Waterman-Eggert score: 311; 11.4 bits; E(1) < 1
| 47.0% identity (61.6% similar) in 151 aa overlap (2-151:10-141)
|
|      10   20   30   40   50   60
| uessal GGACGACGCAT-CGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAG
|      :: :::: : : : : : : : : : : : : : : : :
| neonig GGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGG-GGTCAG--ATTCTACGTCCA-
|      10   20   30   40   50   60
|
|      70   80   90  100  110  120
| uessal GTACAGAGCACGAGTAACTATTCGGTGCCGGATCGGCCGAGTATCGTGGCGATGAATCTG
|      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
  
```

Este reporte describe un alineamiento local entre dos secuencias usando el algoritmo Waterman-Eggert, que permite encontrar regiones de alta similitud entre secuencias. Vamos a desglosar cada parte del reporte para entender mejor su significado. 1. Waterman-Eggert score: 311. Puntuación

Neonig GGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGG-GGTCAG--ATTCTTACGTCCA-

En las posiciones alineadas, el símbolo :: indica residuos idénticos entre ambas secuencias. Por ejemplo, la secuencia "uessal" y "neonig" coinciden en la primera posición con el residuo **G**. Las diferencias están marcadas con **puntos** (.). Por ejemplo, en la posición 5, hay una similitud en lugar de una identidad exacta. Los **guiones (-)** representan brechas donde una secuencia tiene residuos que la otra no.

En la segunda parte:

```
>--
Waterman-Eggert score: 311; 11.5 bits; E(1) < 1
47.0% identity (61.6% similar) in 151 aa overlap (2-151:10-141)

      10      20      30      40      50      60
uessal GGACGACGCAT-CGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGGCAG
      :: : ::. : : ..: . .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
neonig GGAGTAGGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGG-GGTCAG--ATTCTTACGTCCA-
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
uessal GTACAGAGCACGAGTAACTATTCGGTGCCGGATCGGCCGAGTATCGTGCCGATGAATCTG
      : ::::: : : :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
neonig -TCCAGAAC-CG----CCTTTT---GGCGTGACTGGATGATTTTGCT--CGAT--TTCTG
      70      80      90     100     110

      130     140     150
uessal TGGAGTAATGGGGGTAATTGGTCGGGCGATA
      .: . : : : ::::: : : .: .: .:
neonig AGTTCTCCCTGTTGATATAG--CGAATGTTA
      120     130     140
```

Aquí nuevamente se ve una mezcla de coincidencias (indicado por::), similitudes (puntos.), y brechas (-). 6. Residues in query and library sequences: 151 residues in 1 query sequences: Indica que la secuencia de consulta ("uessal") tiene 151 residuos. 151 residues in 1 library sequences: Indica que la secuencia de referencia ("neonig") también tiene 151 residuos. 7. Método usado: LALIGN. LALIGN: Es un programa de alineamiento que utiliza el algoritmo Waterman-Eggert para encontrar alineamientos locales óptimos entre dos secuencias.

Resumen:

Este reporte muestra un alineamiento entre las secuencias "uessal" y "neonig", con un 47% de identidad y 61.6% de similitud en una región de 151 aminoácidos. La puntuación Waterman-Eggert de 311 y el E-value < 1 indican que el alineamiento es de buena calidad y no ocurre por azar.

6. PROGRAM EMBOSS WATER



Job Dispatcher Help & Privacy Your Jobs **Input form**

Feedback

Welcome to the new **Job Dispatcher** website. We'd love to hear your [feedback](#) about the new webpages!



Job Dispatcher Help & Privacy Your Jobs **Input form**

Feedback

Welcome to the new **Job Dispatcher** website. We'd love to hear your [feedback](#) about the new webpages!

EMBOSS Water uses the Smith-Waterman algorithm (modified for speed enhancements) to calculate the local alignment of two sequences.

Input sequence ①

Sequence type

Protein DNA

Paste your **first** sequence here - or use the example sequence

Example No se ha seleccionado ningún archivo.

Paste your **second** sequence here - or use the example sequence

Example No se ha seleccionado ningún archivo.

Use the example

Clear sequence

More example inputs

Parameters

OUTPUT FORMAT ①

pair

More options ▾

Submit

Title

EMBOSS Water's job

Submit

If you use this service, please consider citing the following publication: [The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024](#). More information about this bioinformatics application can be found in its [bio.tools](#) record.

SECUENCIAS

>uessalvadorensis

```

TAGTGGCTGGTTACATCCGTGAGCGAATTAATACTCAATCTTATACTCTGTACTCCATATTTGAGTTTCTCCAAAGTATCATTCTCTGAGG
CCTAAGGTAACACCTCTCCCGACTAGTGAAGTCTTTCGAAGGACTTTGGGGGAACGTTGGACGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCT
GATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGGCAGGTACAGAGCACGAGTAACTATTCGGTGCCGGATCGGCCGAGTATCGTGGCGATGAATCT
GTGGAGTAATGGGGGTAATTGGTCGGGCGATAGTTTCAGACGGAGTAGCGCTTCTGTAAGATATAATAGGTGTCTTGGGGTCAGATTCT
TACGTCCATCCAGAACCCTTTGGCGTGACTGGATGATTTGCTCGATTTCTGAGTCTCCCTGTTGATATAGCGAATGTTATGCATCTC
ATCAGAGGACGAGTACCGAAGGTATGACTGGTCCGGCTCCGTTACCCCACTTGTGTGTCTTGCCCGATCAGTTAACATGTCAGAGACT
TAGTCTATCGGCACCCTGTCTGCGTAGTCAGACTGCCCTGAAGGTGAGGGAGATAGTCTGGACCGAAATCATTGAATTGAATTGCCCAAT
GGCCAGGGCCTTGGTGGTGCAATCAAGGAGTAATACATTGCTGTGGTTTGTATGTACAAAAGTACAGTCCGTAACATATCTAACCAAGC
CCTGTGTGAGTCTCAGGAGCAGATAAGAAGGGACTCAGCGCAATGATCACGGGAAGGGATACATGTTGTTCAAGACCTAGTAAGTA
CTGGTACAATCTGCAATGTGACTAGCTAATGAACTTCTAGATTTTGAAAAGGTCACCCATCCTAATGACTTCTCCGACATGGGCGGGT
GTTA
    
```

>neoniger

```

GGGGGTAATTGAATCCGTCGAGTGAGCCTAGCCCCGACATGGGGGAAGGGTAAGTgggaggagcaggaggatcGGACCA
TGGCTGCAGGcaggggggggtgggggtgtTAAATGGTCTGAATGACTCGGGTAAGAGAGAAGATTGTGAGTGAGATTG
TGAGAAGTGATGATTCATCTGGCCAAGTGAAGAACCGACCACCAAATATCTGTGAGtagtggcagcagcagcagcagc
    
```

agaaggatgTCAGGCTCGCTGAGATTACTGTTTTCCGGATTATTCGCGCTGGGAATTTCCATTGGCATGACTTGAGCC
 TCTTCTGCCGAGACAGGCTTAGCGCAGGCGAGGCAGCTGGGATCCACATTCTGTTTTGAGATGGGTATCCTGACTGCTAA

RESULTADOS:

```

Tool output
Download
#####
# Program: water
# Rundate: Mon 14 Oct 2024 15:07:39
# Commandline: water
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_water-I20241014-150734-0655-57840783-p1m.asequence
# -bsequence emboss_water-I20241014-150734-0655-57840783-p1m.bsequence
# -datafile EBLOSUM62
# -gapopen 10.0
# -gapextend 0.5
# -aformat3 pair
# -sprotein1
# -sprotein2
# Align_format: pair
# Report_file: stdout
#####

#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: uessalvadorensis
# 2: neoniger
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 518
# Identity: 233/518 (45.0%)
# Similarity: 233/518 (45.0%)
# Gaps: 143/518 (27.6%)
# Score: 970.5
#
#
#=====

```

#=====

que otras no. Esto es útil para identificar similitudes y diferencias en secuencias que pueden tener relevancia biológica. En el contexto de la secuenciación de ADN, las líneas que has proporcionado, como #-----, suelen utilizarse como separadores o delimitadores en archivos de datos, especialmente en formatos como FASTA o en resultados de alineamientos. Aquí tienes algunas interpretaciones posibles: Separador visual: Estas líneas ayudan a distinguir entre diferentes secciones de datos, como diferentes secuencias o resultados de alineamientos. Indicador de espacio: En algunos casos, pueden representar un espacio donde no hay datos relevantes o indicar que no hay similitudes en esa parte del alineamiento. Formato de archivo: En ciertos formatos, el símbolo # puede denotar un comentario o una línea de encabezado que no se debe procesar como datos.

```
#-----
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: uessalvadorensis
# 2: neoniger
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 518
# Identity:    233/518 (45.0%)
# Similarity:  233/518 (45.0%)
# Gaps:       143/518 (27.6%)
# Score: 970.5
#
#
#-----
```

Que significa # Length: 518 # Identity: 233/518 (45.0%) # Similarity: 233/518 (45.0%) # Gaps: 143/518 (27.6%) # Score: 970.5 . Las líneas que has proporcionado son parte de un resumen de un alineamiento de secuencias. cada término: # Length: 518: Esta es la longitud total del alineamiento, que incluye todas las posiciones de la secuencia alineada, incluidas las que pueden estar vacías debido a gaps (espacios). # Identity: 233/518 (45.0%): Este valor indica el número de posiciones en las que las secuencias son idénticas. En este caso, hay 233 posiciones idénticas en el alineamiento, lo que representa el 45.0% de la longitud total. # Similarity: 233/518 (45.0%): La similitud se refiere a las posiciones donde las bases son similares, lo que generalmente significa que las bases son iguales o tienen algún tipo de similitud funcional (como aminoácidos similares en proteínas). Aquí, el valor es igual al de identidad, lo que puede indicar que no se está considerando otro tipo de

similitud. # Gaps: 143/518 (27.6%): Este número indica cuántas posiciones en el alineamiento son gaps (espacios). Hay 143 gaps, lo que representa el 27.6% de la longitud total. Los gaps se introducen para optimizar el alineamiento y permitir que las secuencias se ajusten adecuadamente. # Score: 970.5: Este es el puntaje total del alineamiento, que suele calcularse en función de los valores de identidad, similitud y gaps. Un puntaje más alto generalmente indica un alineamiento más fuerte o más confiable. que significa # # #=====
 Las líneas que has proporcionado, como # y #=====
 suelen tener los siguientes significados en el contexto de archivos de datos o resultados de alineamientos:
 Comentarios: Las líneas que comienzan con # generalmente se interpretan como comentarios. Esto significa que no contienen datos que deban ser procesados y sirven principalmente para proporcionar información adicional sobre el contenido del archivo. Separadores Visuales: La línea de igualdades #=====
 actúa como un separador visual, ayudando a distinguir entre diferentes secciones del archivo o resultados. Puede indicar el final de un bloque de información y el comienzo de otro. Encabezados: A veces, las líneas que contienen símbolos como # se utilizan para marcar encabezados que describen el tipo de datos que siguen.

```

uessalvadoren 190 GGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGAGCACGAGTAACTATTCGGTGC 239
      ||...|||| .|.|||| ||      |||||.||
neoniger      44 GGAAGGGTA---AGttggg-ag-----gagcagga----- 69

```

El fragmento es un alineamiento de secuencias entre dos organismos o genes diferentes, en este caso, "uessalvadoren" y "neoniger". Identificación de secuencias: "uessalvadoren": Esto parece ser el nombre de la primera secuencia (puede ser un nombre de especie o una designación de muestra). "neoniger": Nombre de la segunda secuencia (posiblemente otra especie o muestra). Posiciones: "190 GGCCTGGTATGCGGATGGGCAGGTACAGAGCACGAGTAACTATTCGGTGC 239": Esta es la secuencia de ADN de "uessalvadoren" que va desde la posición 190 hasta la 239. La secuencia muestra nucleótidos que pueden ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). "44 GGAAGGGTA---AGttggg-ag-----gagcagga----- 69": Esta es la secuencia de ADN de "neoniger" que va desde la posición 44 hasta la 69. Los guiones (---) indican gaps (espacios) que se han introducido para alinear las secuencias. Alineamiento: "||...|||| .|.|||| || |||||.||": Esta línea representa la relación entre las bases de ambas secuencias: "||" indica que las bases en esas posiciones son idénticas. "." indica que las bases son diferentes. Los gaps (espacios) se reflejan en las posiciones donde hay guiones en la secuencia de "neoniger".

```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: uessalvadorensis
# 2: neoniger
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 518
# Identity: 233/518 (45.0%)
# Similarity: 233/518 (45.0%)
# Gaps: 143/518 (27.6%)
# Score: 970.5
#
#
#####

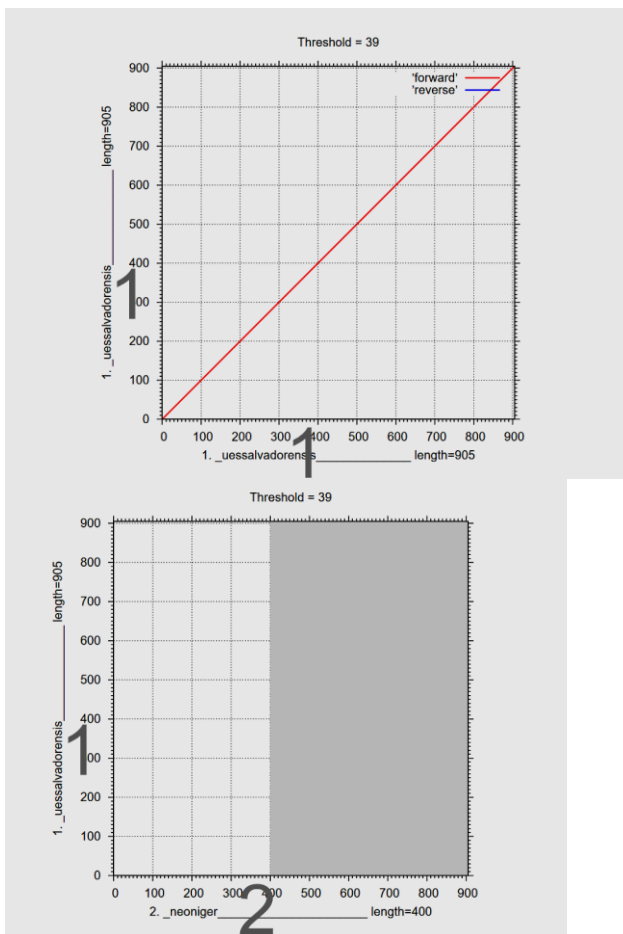
```

Que significa # Report_file: stdout #####
 ##### ## Aligned_sequences: 2 # 1: uessalvadorensis # 2: neoniger # Matrix:
 EBLOSUM62 # Gap_penalty: 10.0 # Extend_penalty: 0.5 ## Length: 518 # Identity: 233/518 (45.0%) # Similarity: 233/518
 (45.0%) # Gaps: 143/518 (27.6%) # Score: 970.5 # # =====

Esto significa:

1. **# Report_file: stdout:** Indica que el informe se ha generado en la salida estándar (stdout), lo que significa que se muestra en la consola o terminal en lugar de guardarse en un archivo.
2. **#####:** Esta línea es un separador visual que ayuda a organizar el contenido del informe.
3. **#=====:** Otro separador visual, similar al anterior, que podría indicar el inicio de un nuevo bloque de información.
4. **# Aligned_sequences: 2:** Indica que se han alineado dos secuencias en este análisis.
5. **# 1: uessalvadorensis:** Nombre de la primera secuencia alineada.
6. **# 2: neoniger:** Nombre de la segunda secuencia alineada.
7. **# Matrix: EBLOSUM62:** La matriz de puntuación utilizada para evaluar la similitud entre las secuencias. EBLOSUM62 es una matriz comúnmente utilizada para alineamientos de proteínas.
8. **# Gap_penalty: 10.0:** Penalización por introducir un gap en el alineamiento. Un valor más alto indica que se penaliza más la introducción de gaps.
9. **# Extend_penalty: 0.5:** Penalización por extender un gap. Esto se refiere a la penalización adicional que se aplica si se añade más espacio en un gap ya existente.

10. **# Length: 518**: Longitud total del alineamiento, que incluye todas las posiciones, incluidas las que pueden ser gaps.
11. **# Identity: 233/518 (45.0%)**: Número de posiciones idénticas en el alineamiento. 233 posiciones son idénticas, representando el 45.0% del total.
12. **# Similarity: 233/518 (45.0%)**: Número de posiciones que son similares, que en este caso es igual al número de posiciones idénticas.
13. **# Gaps: 143/518 (27.6%)**: Número de posiciones que son gaps en el alineamiento. 143 gaps representan el 27.6% de la longitud total.
14. **# Score: 970.5**: Puntaje total del alineamiento, que refleja la calidad del alineamiento. Un puntaje más alto generalmente indica un mejor alineamiento.



La frase "forward and reverse embos water" parece estar relacionada con técnicas de secuenciación o análisis de ADN, pero podría estar algo confusa o incompleta. Aquí hay algunas interpretaciones posibles de cada término:

1. **Forward:** Se refiere a la dirección en la que se está leyendo o sintetizando la secuencia de ADN. En la secuenciación, esto suele referirse a la lectura de la hebra "sense" (o sentido) del ADN.
2. **Reverse:** Esto se refiere a la lectura de la hebra opuesta, también conocida como la hebra "antisense". En algunos métodos de secuenciación, se generan ambas lecturas para asegurar la precisión y la cobertura del análisis.
3. **Emboss:** Puede referirse a un conjunto de herramientas de bioinformática llamadas EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite), que proporciona programas para manipular y analizar datos biológicos, como secuencias de ADN.
4. **Water:** Podría referirse al programa "Water" que es parte de EMBOSS. Este es un algoritmo para realizar alineamientos de secuencias, específicamente el algoritmo de Smith-Waterman para alineamientos locales.

El término "**Threshold = 39**" se refiere a un valor que se utiliza para filtrar o evaluar la calidad del alineamiento.

Significado:

- **Threshold (umbral):** Este valor establece un límite que determina si un alineamiento debe considerarse significativo o relevante. Un threshold de 39 indica que solo se informarán los alineamientos que tengan una puntuación igual o superior a 39.

Implicaciones:

1. **Calidad del Alineamiento:** Un threshold más alto puede implicar que solo se mostrarán alineamientos de alta calidad, mientras que un threshold más bajo puede incluir alineamientos menos confiables.
2. **Filtrado de Resultados:** Esto ayuda a reducir el número de resultados reportados, enfocándose en aquellos que tienen un valor que indica una mayor similitud o relevancia biológica.

Si hay líneas azules. De manera predeterminada, MAFFT considera las similitudes en las hebras directas (rojas) solamente, pero ignora las similitudes en las hebras inversas (azules). Si se ven líneas azules alrededor de las regiones diagonales en los gráficos anteriores, pruebe la opción "Ajustar dirección" en la página de entrada.

Discusión.

La PCR fue inventada por Karry Mullis en el año 1983. El uso de la PCR para el diagnóstico de *Aspergillus* se ha reportado desde principios de la década de 1990. En 2006 se constituyó la Iniciativa Europea de PCR por *Aspergillus*, en la que propuso protocolos estandarizados para la evaluación clínica generalizada de la PCR por *Aspergillus* de forma rápida y oportuna en los criterios de diagnóstico de la enfermedad. (Blanco, 2010). Las técnicas de secuenciación moderna son de segunda y tercera generación. La Segunda generación produce gran cantidad de lecturas cortas de 25-400 bp de secuencias de ADN. En esta generación se destaca la empresa Illumina Inc, actualmente es la empresa que ofrece servicios de calidad y control estricto 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 impide seguir replicándose. Por lo que se divide en cuatro reacciones de secuencias separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar que son: dATP, dGTP, dCTP, dTTP y la ADN polimerasa. Terminan la elongación de la cadena lo que permite una fragmentación de ADN de varios tamaños de longitud. (Sanger, 1977). En cambio, la tecnología de Illumina utiliza el método de secuenciación por síntesis, permitiendo la lectura paralela de millones de fragmentos por medio de la detección de 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 del fluoróforo, creando una imagen de un terminador reversible marcado fluorescentemente a medida que se añade cada dNTP, y luego se separa para el ingreso de la siguiente base. Al finalizar, se obtiene una secuenciación base por base con datos de alta precisión y calidad. Los de Tercera generación son las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos conocidas como third-generation sequencing (TGS), las cuales permiten extensiones de hasta 2.3 Mb y no requieren de una amplificación preliminar. (Illumina, 2022) Existe una tecnología Single Molecule, Real-time (SMRT) que permite incorporar lecturas de unos 60.000 pares de bases (bp), que propone una ventaja de rastrear variaciones estructurales o que presentan dificultades en la amplificación de ciertas áreas del genoma de un estudio en particular. la secuenciación mediante nanoporos Su desventaja es que presenta la limitación de que se requiere de una gran cantidad de ADN, para poder secuenciar y obtener un resultado fiable. (Valderrama,2020). En otros estudios reporta que el tamaño de los genomas es variado entre las diversas especies de *Aspergillus* spp, estos 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 (Rokas, 2007) en nuestro caso fue de 15000 pb. En resumen, después de la extracción de gADN en

el control de calidad, se lleva a cabo 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 este método, se utilizan moléculas fluorescentes para permitir la cuantificación de los productos amplificados, se mide y cuantifica la fluorescencia de las moléculas; normalmente, estas moléculas son tintes que se intercalan entre las bases de la doble hélice del ADN. (MERK,2024)

La PCR en tiempo real es una técnica molecular que permite amplificar y cuantificar el ADN de forma rápida y precisa. Permite hacer miles de millones de copias de una región particular del ADN. En otras palabras, puede medir la cantidad de ADN amplificado que hay durante la prueba. Su método consiste en utilizar una sonda fluorescente que se hibrida con la secuencia amplificada y emite una señal fluorescente cuando se excita con luz a una longitud de onda específica. A medida que se amplifica el ADN, aumenta la cantidad de sonda fluorescente unida al ADN amplificado, esta intensidad de la señal fluorescente se mide en cada ciclo de PCR y se utiliza para cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. Actualmente, existen dos tipos de sondas para cuantificar la amplificación en un ensayo de qPCR: colorante fluorescente y sonda fluorescente. (LABBOX,2024).

En nuestro estudio se utilizó 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. (Revista Microbiología, 2005) Otros estudios reportan que para caracterizar y diferenciar el género *Aspergillus* se han utilizado métodos basados en biología molecular, como el análisis de las secuencias que codifican los genes de los RNAs ribosómicos eucariotas 18S, 5.8S y 28 (Loredo,1997).

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 (Demeke, 1994) El *Aspergillus* es filamentoso compuesto por cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuestos a la levadura, que están compuestos por una sola célula redonda. (Conant, 1972). El *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, causando infección en el pulmón y los senos paranasales; su capacidad de 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 que son específicos de los hongos para

diferenciar las diferentes especies del género *Aspergillus*. (Frisvad,2007). Un trabajo relacionado con la obtención de PCR y ADN de *Aspergillus* sp en muestras clínicas encontró que el uso de estudios moleculares como la PCR en tiempo real es un procedimiento confiable para la cuantificación y evaluación de la infección pulmonar por *A. fumigatus* en modelos animales. (Sabino,2020) En muestras biológicas existe una variedad de técnicas moleculares en el mercado internacional para obtener una secuenciación o tipificación de hongos. En nuestro estudio se encontró que la técnica utilizada por MACROGEN INC parecida al metodo de Sanger o metodo por secuenciación en cadena, es muy efectiva para obtener información en tiempo real para el estudio del gADN y el análisis molecular de un hongo en particular. De los métodos moleculares utilizados para los estudios taxonómicos en *Aspergillus* spp, destacan: el análisis de las secuencias de ADN que codifican para RNAs ribosómicos (rRNA) y espaciadores internos transcritos (ITS) así como la técnica RAPD. (Loredo,1997). Además, entre otros usos, la técnica RAPD se ha utilizado con otros organismos como alternativa a los sRFLP, ya que proporciona información más fácil, rápida y fiable para mapear las características genéticas de cualquier especie. (Cuerno, 1992). En nuestro estudio se realizó análisis de ADN que utilizaron análisis de fragmentos de ADN, amplificados por PCR, que codifican para los genes de ARNr, tiene gran utilidad en la clasificación taxonómica del género *Aspergillus*, su ventaja radica en que estas secuencias de ITS se amplifican fácilmente por PCR, debido a que son repetitivas. Existen otros estandarizados como el micelio de *Aspergillus*, se probaron diferentes métodos de extracción de ADN como: el método de extracción de ADN y modificado para tejidos vegetales (Martínez-Soriano, 1993). En 1975 se comenzó a utilizar como método alternativo un nuevo método de identificación de hongos conocido como espectrometría de masas MALDI-TOF, basado en el perfil proteico específico de cada uno de ellos. En el caso de los hongos filamentosos, concretamente del género *Aspergillus*, una de sus limitaciones es su capacidad para identificar especies de forma multidiversa. Se trata de una técnica de ionización suave, que permite detectar proteínas. La 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). (Vidal, 2018). Otro método para identificar conidios e hifas para la detección de los ADN de *Aspergillus* que circulan en la comunidad es mediante PCR o amplificación por PCR denominada *Aspergillus*, mientras que el uso de muestras de sangre total con EDTA en caso de *Aspergilosis* pulmonar. En el caso de pacientes de alto riesgo que contengan elementos fúngicos intracelulares y extracelulares. (klings,2009) En otro estudio, concluyeron que la sensibilidad de la

PCR plasmática fue menor que la de la PCR realizada en muestras de sangre completa. (Loeffler, 2000). Actualmente existen kits comerciales sencillos que extraen ADN de solo 8,5 kb de tamaño, se recuperó en cultivos de caldo o agar, se usan aproximadamente 200 mg de micelio lavado, o se añade una placa de conidios (~10¹⁰) a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml para obtener una PCR de calidad. (Lee, 2004). Otros estudios son la hibridación basada en PCR en tiempo real, y la PCR LightCycler y para el análisis de polimorfismos de las regiones espaciadoras de genes ribosómicos mediante la técnica de secuenciación para la identificación de micromicetos. (Bogdanov, 2009). Para la construcción de las librerías se parte previamente de extracción del ADN a una concentración adecuada, luego a la cantidad optima de ADN extraído y luego a la amplificación. El método de control de calidad de la biblioteca de MacroGen consta de 1. Tamaño de la biblioteca Check.To verificar el tamaño de los fragmentos enriquecidos con PCR, verifica la distribución del tamaño de la plantilla ejecutándola en un Bioanalizador Agilent Technologies 2100 utilizando un chip DNA 1000. 2. Comprobación de la cantidad de bibliotecas Illumina. Para lograr la máxima calidad de los datos en las plataformas de secuenciación Illumina, es importante crear densidades de agrupación óptimas en cada carril de cada celda de flujo. Esto requiere una cuantificación precisa de las plantillas de la biblioteca de ADN. Por lo tanto, cuantificamos las bibliotecas preparadas utilizando qPCR de acuerdo con la Guía del protocolo de cuantificación de qPCR de Illumina.2) Biblioteca PacBioPara generar una curva estándar de lecturas de fluorescencia y calcular la concentración de la muestra de la biblioteca, se utiliza la solución de cuantificación estándar Qubit. Para encontrar nuevas especies en una biodiversidad se recurre a descubrirlas en ecosistemas inexplorados como muestras biológicas y otros. Se procede a la clasificación e identificación taxonómica en su estudio, luego se procede a métodos mas modernos como la secuenciación ADN e identificación de la posible nueva especie ya que estas tienen una característica única o huella personal que la diferencia de otras. Utilizando secuencias cortas de ADN para identificar y clasificar especies. En nuestro caso se procedió primero a una clasificación taxonómica macro y microscópica del hongo y luego al estudio del ADN para complementar ambos métodos coherentemente y tipificar la especie de estudio. Basándose en la taxonomía se utiliza un sistema jerárquico para clasificar los organismos. Las principales categorías, de mayor a menor jerarquía, son: Dominio: La categoría más amplia, que agrupa a los organismos en tres dominios principales: Bacteria, Archaea y Eukarya. Reino: Dentro de los dominios, se encuentran los reinos, como Animalia, Plantae y Fungi. Filo (o Phylum): Agrupa a organismos con características corporales similares. Clase: Dentro de cada filo, se dividen en clases. Orden: Cada clase se divide en órdenes. Familia: Dentro de cada orden, los organismos se agrupan

en familias. Género: Dentro de cada familia, los organismos se agrupan en géneros. Especie: La categoría más específica, que identifica a organismos que pueden reproducirse entre sí y producir descendencia con características genómicas de especie. (Hawksworth,2011). Esto basado en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) vigente que regula la nomenclatura de plantas. Actualmente la tecnología de secuenciación de Illumina, es 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 de SBS de Illumina usa la química XLEAP-SBS. Se crea una imagen de un terminador reversible marcado con fluorescencia a medida que se añade cada dNTP y luego se corta para permitir la incorporación 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. La química XLEAP-SBS en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 están diseñados cuidadosamente para permitirle obtener más información en su laboratorio, con 14 configuraciones y longitudes de lectura de 1 × 50 pb a 2 × 300 pb, hace 1.800 millones de lecturas de un solo extremo por ejecución para potenciar las aplicaciones con mayor uso de datos en su secuenciador, estas lecturas de un solo extremo por ejecución 100 millones–1,8 mil millones Longitud máxima de lectura 2 × 300 pb. Hace hasta 384 combinaciones duales únicas (UD) y 96 combinaciones duales combinatorias (CD). procesa de 1-500 ng de ADN para genomas pequeños o 100-500 ng de ADN para genomas grandes. Tamaño de inserción de destino ~350 pb. La secuenciación de nueva generación (NGS) secuenciar miles de organismos en paralelo, con capacidad de combinar muchas muestras en una sola secuenciación y obtener una alta cobertura de secuencia por muestra, 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 de identificar utilizando otros métodos. El sistema Miseq hace Máximo de lecturas individuales por ejecución 25 millones y Longitud máxima de lectura 2 × 300 pb. (ILLUMINA, 2024) En nuestro estudio se utilizó esta técnica Illumina más Informe de secuenciación metagenómica de escopeta llamado Shotgun Metagenomic Sequencing Report tal como se describió anteriormente.

Característica

Aspergillus niger

Aspergillus uesalvadorensis

Nombre Científico	<i>Aspergillus neoniger</i>	<i>Aspergillus uesalvadorensis</i>
Clasificación	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Aspergillaceae	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Aspergillaceae
Hábitat	Suelo, ambientes con material orgánico en descomposición	Suelo, ambientes forestales, material orgánico descompuesto
Distribución Geográfica	Común en climas cálidos y templados	Común en áreas tropicales y subtropicales, particularmente en América Central y Sudamérica
Características Morfológicas	Colonias algodonosas de color verde a gris	Colonias de color negro, café a marrón
Producción de Conidios	Conidios en cadenas, de forma globosa a subglobosa, con un color verde	Conidios más grandes, de forma cactus, de color café y forma más irregular con proyecciones espiculas.
Temperatura Óptima	25-30 °C	20-28 °C
Patogenicidad	Ocasionalmente patógeno, especialmente en individuos inmunocomprometidos	Generalmente no patógeno, pero se han reportado casos en humanos inmunocomprometidos
Uso Industrial	Puede ser usado en biotecnología, como productor de enzimas	tiene aplicaciones industriales como colorante.
Producción de Toxinas	Algunas cepas pueden producir micotoxinas como aflatoxinas	No se reporta producción significativa de micotoxinas
Interacción con Otros Organismos	Puede estar involucrado en la descomposición de materia orgánica	Descompone material vegetal en su ambiente natural

Tabla 1. Diferencias entre las especies *neoniger* y *uesalvadorensis*.

En la Tabla 1 se muestra que *Aspergillus neoniger* pertenece a la sección Nigri del género *Aspergillus*, la cual es conocida por incluir especies de colores oscuros (negros o grises) que, en su mayoría, son saprófitas, aunque algunas pueden producir micotoxinas. Por otro lado, *Aspergillus uesalvadorensis* pertenece a la sección Flavi, que agrupa especies productoras de aflatoxinas y otras micotoxinas. Esta especie está más asociada a ambientes cálidos y húmedos. Aunque *A. uesalvadorensis* no es tan reconocida por producir aflatoxinas, sí puede

generar otras micotoxinas. En ciertos casos, es capaz de producir ocratoxina A, una toxina que afecta tanto la calidad de los alimentos como la salud humana y animal. En cuanto a la capacidad de *A. uesalvadorensis* para producir aflatoxinas, especialmente aflatoxina B1, que es una de las toxinas más peligrosas para la salud humana y animal, esta especie se encuentra comúnmente en productos agrícolas como maíz, maní y otras semillas oleaginosas, donde crece en condiciones de alta humedad y temperaturas cálidas. Su distribución es amplia y no está limitada a una región geográfica específica, siendo frecuente en ambientes naturales, especialmente en material vegetal en descomposición, así como en muestras de aire y alimentos. *A. uesalvadorensis* fue aislada por primera vez en El Salvador, aunque también se encuentra en otras regiones tropicales y subtropicales de América Central, y se asocia principalmente con productos agrícolas de esta área. Generalmente, esta especie forma colonias de color negro o gris oscuro, y sus esporas son de tonalidad oscura. Su desarrollo no depende de condiciones ambientales específicas, lo que la hace más cosmopolita. Las colonias de *Aspergillus uesalvadorensis* suelen presentar colores que varían entre amarillo, verde o negro, dependiendo del tiempo de cultivo, y están asociadas con la formación de esporas en forma de conidios sobre estructuras denominadas conidióforos, con la formación de espículas. (Vásquez, 2024) Estas características morfológicas son similares a las de otras especies dentro de la sección Flavi, salvo por las espículas características de esta especie en particular, que producen pigmentos en tonos amarillos o café oscuro. En cuanto a *Aspergillus neoniger*, su metabolismo está principalmente relacionado con la descomposición de materia orgánica. Algunas especies dentro de la sección Nigri tienen la capacidad de descomponer diversos tipos de sustratos vegetales, lo que las convierte en más versátiles en términos de su alimentación. Por su parte, *Aspergillus uesalvadorensis*, al pertenecer a la sección Flavi, posee una mayor capacidad para producir aflatoxinas bajo condiciones específicas de humedad y temperatura, lo que tiene implicaciones ecológicas y económicas importantes, debido al riesgo de contaminación de cultivos. Aunque también puede producir algunas micotoxinas como ocratoxinas, generalmente no tiene el mismo impacto directo en la salud humana y animal que otras especies como *A. neoniger*. Sin embargo, su capacidad para crecer en productos agrícolas

en descomposición lo convierte en un riesgo potencial para la calidad de los alimentos. La capacidad de *A. uesalvadorensis* para producir aflatoxinas, que son carcinógenas y hepatotóxicas, lo convierte en un hongo de relevancia en el ámbito de la seguridad alimentaria y la salud pública. La contaminación por aflatoxinas es una preocupación seria en la producción de alimentos, especialmente en cereales y frutos secos. En cuanto a la clasificación molecular de *Aspergillus neoniger* y *Aspergillus uesalvadorensis*, esta puede realizarse mediante análisis filogenéticos basados en secuencias de genes específicos. Estos análisis permiten comprender mejor sus diferencias genéticas y su relación dentro del género *Aspergillus*.

Principales diferencias a nivel molecular: **Análisis Filogenético:** El análisis filogenético molecular consiste en comparar las secuencias de genes de diferentes especies de *Aspergillus* para establecer su relación evolutiva. Aunque ambas especies pertenecen al género *Aspergillus*, se ubican en secciones distintas, lo que sugiere que han seguido trayectorias evolutivas divergentes a lo largo del tiempo. *Aspergillus neoniger* se encuentra en la sección Nigri del género, mientras que *Aspergillus uesalvadorensis* pertenece a la sección Flavi. Esta última incluye especies como *A. niger* y otras similares, que comparten características genéticas, especialmente en los genes relacionados con la descomposición de materia orgánica y la producción de micotoxinas, como las ocratoxinas del género *Aspergillus* (Perrone, 2015). Por otro lado, *A. uesalvadorensis*, al estar en la sección Flavi, tiene una mayor capacidad para producir aflatoxinas, especialmente aflatoxina B1. Genéticamente, estas especies presentan un conjunto de genes vinculados a la biosíntesis de micotoxinas, lo que las diferencia molecularmente de las especies de la sección Nigri.

Genes utilizados en la clasificación molecular: Para la clasificación molecular de estas especies, se emplean secuencias de genes ribosomales y otros genes metabólicos clave. Algunos de los más utilizados incluyen: **ITS (Espacio Intergénico Transcrito):** Este marcador se usa comúnmente para clasificar especies de hongos. Aunque las secuencias ITS son útiles para distinguir entre especies, las diferencias dentro del género *Aspergillus* pueden ser sutiles, lo que requiere el análisis de otros genes adicionales. **Rpb2 y Calmodulina:** Estos genes son fundamentales en la clasificación dentro de los grupos de *Aspergillus*, ya que presentan suficiente variabilidad genética para permitir la distinción entre especies

estrechamente relacionadas, como *A. neoniger* y *A. uesalvadorensis*. Genes de biosíntesis de aflatoxinas: En el caso de *A. uesalvadorensis*, se analizan los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas, tales como aflR y nor-1, que son esenciales para la producción de estas toxinas. Esta característica molecular es específica de las especies del grupo Flavi. Por otro lado, el análisis molecular de *A. neoniger* revela una secuencia genómica relacionada con la biosíntesis de ocratoxinas. Los genes responsables de la descomposición de materia orgánica, como los que codifican para las enzimas hidrolíticas, están presentes en *A. neoniger* y adaptados para descomponer una mayor variedad de sustratos. Sin embargo, a nivel molecular, *A. neoniger* no posee los sistemas de biosíntesis de aflatoxinas presentes en las especies de la sección Flavi. Finalmente, *A. uesalvadorensis* muestra una alta homología genética con otras especies de la sección Flavi, especialmente en los genes relacionados con la biosíntesis de aflatoxinas. Las secuencias de genes específicos de esta sección, como los asociados con las enzimas que sintetizan aflatoxinas (por ejemplo, aflA, aflJ, aflR), permiten distinguir a *A. uesalvadorensis* de otras especies dentro del género *Aspergillus*.

4. Diferencias en la Secuencia del Gen ITS. Los marcadores ITS (Internally Transcribed Spacer) (Nisson, 2008) son comúnmente utilizados para clasificar las especies de hongos a nivel molecular. Entre *A. neoniger* y *A. uesalvadorensis* hay diferencias significativas en la secuencia ITS que se correlacionan con su agrupamiento en diferentes secciones del género *Aspergillus*. Estas diferencias indican evolución divergente entre ambos grupos. *A. neoniger* suele mostrar una secuencia ITS más próxima a otras especies de la sección Nigri como *A. niger*, que tiene una evolución adaptada a condiciones de descomposición general y producción de otras micotoxinas. *A. uesalvadorensis*, muestra una secuencia ITS que la agrupa más estrechamente con especies de la sección Flavi, como *A. flavus* y *A. parasiticus*, que son conocidos por la producción de aflatoxinas en los segmentos cortos de la cadena DNA lineal y la otra circular de las siguientes especies:

	<i>Aspergillus neoniger</i>	<i>Aspergillus uesalvadorensis</i>
Grupo de Especie	Grupo de <i>Aspergillus niger</i>	Se clasifica dentro de la sección Nigri.
Sección taxonómica	Nigri	Flavi

Genoma	Presenta un genoma más pequeño comparado con otras especies del grupo <i>Aspergillus</i> . 35% similar al de estudio	Su genoma es ligeramente más grande que el de <i>A. neoniger</i> y tiene características únicas en términos de genes.
Genes biosíntesis de toxinas	Relacionado con Ocratoxinas	Relacionados con Aflatoxinas
Secuenciación Molecular	Secuencias de genes ribosomales (como ITS) muestran una alta homología con otras especies de <i>Aspergillus</i> .	Se diferencia notablemente en las secuencias ITS y otras regiones genéticas, mostrando menor similitud con <i>A. neoniger</i> .
Presencia de genes específicos	Posee genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas como la Ocratoxinas y la citrinina.	Menor cantidad de genes de biosíntesis de micotoxinas. En cambio, se enfoca más en la producción de enzimas celulíticas.
Filogenia Molecular	Analizada por secuencias de ADN ribosómico y genómico, se agrupa con otras especies de la sección Nigri.	Está más estrechamente relacionada con especies de la sección Flavi, con algunas variaciones genéticas clave.
Mutaciones y Variabilidad	Alta homogeneidad genética dentro de la especie, con pocas mutaciones significativas en las secuencias de genes.	Presenta más variabilidad genética, con ciertos polimorfismos que le permiten adaptarse a diferentes ambientes.
Filogenia	Más cercano a <i>A. niger</i> y especies sección nigri	Más cercano a <i>A. flavus</i> y especies sección flavi.

Tabla 2. Características comparativas entre las especies del género *Aspergillus*.

En la Tabla 2, se muestra que el tamaño de los genomas de *Aspergillus neoniger* y *Aspergillus uesalvadorensis* es relativamente similar (alrededor de 30-40 Mb), aunque el genoma de *A. uesalvadorensis* es ligeramente más grande. Sin embargo, pueden existir diferencias en la distribución de genes, elementos transponibles o secuencias repetitivas, factores que influyen en la plasticidad genética de cada especie. El ADN de *Aspergillus uesalvadorensis*, al igual que en la mayoría de los hongos del género *Aspergillus*, es de tipo circular, aunque algunos otros hongos tienen ADN lineal. Además, al igual que otros eucariotas, también posee ADN mitocondrial. Los hongos del género *Aspergillus* tienen un genoma nuclear compuesto por cromosomas lineales que contienen la información genética responsable de la síntesis de proteínas y de otras funciones celulares esenciales. En el caso de *A. uesalvadorensis*, los estudios filogenéticos y de secuenciación del genoma han confirmado que esta especie pertenece a la sección Flavi dentro del género *Aspergillus*. Esta sección incluye otras especies capaces de producir aflatoxinas, micotoxinas que afectan tanto la

salud humana como la seguridad alimentaria. El genoma nuclear de *A. uesalvadorensis* está compuesto por varios cromosomas, y su secuenciación ha proporcionado información valiosa sobre sus rutas metabólicas, incluida la biosíntesis de aflatoxinas y otras toxinas. Los estudios genómicos han demostrado que posee genes que codifican para las enzimas necesarias para la producción de estas sustancias, que pueden activarse en condiciones ambientales específicas, como alta humedad y temperaturas elevadas. En cuanto al ADN mitocondrial, este es generalmente más pequeño que el nuclear y contiene genes relacionados con la respiración celular y la producción de energía. Sin embargo, el genoma mitocondrial en los hongos, incluida *A. uesalvadorensis*, puede presentar una mayor variabilidad en comparación con el genoma nuclear. En resumen, el ADN de *Aspergillus uesalvadorensis* es de tipo eucariota, tanto en su forma nuclear como mitocondrial. Las especies *Aspergillus neoniger* y *Aspergillus uesalvadorensis* son ambas miembros del género *Aspergillus*, pero pertenecen a grupos diferentes y presentan diferencias significativas en cuanto a su taxonomía, características biológicas, y distribución. algunas de las principales diferencias:

1. Taxonomía y clasificación. *Aspergillus neoniger*: pertenece a la sección Nigri del género *Aspergillus*, que es conocida por incluir especies que suelen ser de color oscuro (negras o gris) y son principalmente saprófitas, aunque algunas pueden producir micotoxinas. *Aspergillus uesalvadorensis*: Perteneciente a la sección Flavi, que incluyen especies que se caracterizan por la producción de aflatoxinas, micotoxinas altamente tóxicas. Es una especie más asociada a ambientes cálidos y húmedos.
2. Producción de micotoxinas. *A. neoniger*: Esta especie no es tan conocida por producir aflatoxinas, pero sí otras micotoxinas. En algunos casos, puede producir Ocratoxinas A, una toxina que también afecta la calidad de los alimentos y la salud humana y animal. *A. uesalvadorensis*: Es más conocida por su capacidad para producir aflatoxinas, en particular la aflatoxina B1. Esta especie se encuentra a menudo en productos agrícolas como maíz, maní y otras semillas oleaginosas, donde puede crecer en condiciones de alta humedad y temperaturas cálidas. El *A. neoniger*: Su distribución es más amplia y se encuentra comúnmente en el ambiente, particularmente en material vegetal en descomposición, y se ha aislado de una variedad de fuentes, incluidas muestras de aire y alimentos. Es más cosmopolita y no está restringida a una región geográfica específica. *A. uesalvadorensis*: como su nombre indica, fue aislada por primera vez en El Salvador, aunque también se encuentra en otras regiones tropicales y subtropicales de América Central en Asia en desiertos. Está principalmente asociada a productos agrícolas de la región. Características morfológicas: *A. neoniger*: Esta especie forma colonias que varían de color negro esclerosado a gris oscuro. Sus esporas son oscuras y se desarrollan en condiciones ambientales menos específicas. *A. uesalvadorensis*: Las colonias de *A. uesalvadorensis* suelen presentar colores que van del amarillo al negro café, y su coloración madura se asocia con la formación de esporas en estructuras llamadas conidióforos. Estas características morfológicas son más similares a las de otras especies

dentro de la sección Flavi, las cuales producen pigmentos en tonos amarillos o naranjas. Metabolismo y Producción de Micotoxinas: *A. neoniger*: Su metabolismo está centrado en la descomposición de materia orgánica, y algunas especies de esta sección tienen la capacidad de descomponer diversos tipos de sustratos vegetales. Es una especie más versátil en cuanto a su nutrición. *A. uesalvadorensis*: Como miembro de la sección Flavi, tiene la capacidad de producir aflatoxinas bajo condiciones específicas de humedad y temperatura. Esta producción también está asociada con la síntesis de melanina para su protección, lo cual tiene implicaciones ecológicas y económicas debido a los riesgos de contaminación de cultivos. Aunque *A. neoniger* puede producir algunas micotoxinas como las ocratoxinas, su impacto directo en la salud humana y animal no es tan significativo como el de *A. uesalvadorensis*. Sin embargo, su capacidad para crecer en productos agrícolas en descomposición lo convierte en un riesgo potencial para la calidad de los alimentos.

Por su parte, *A. uesalvadorensis* es de particular interés debido a su poca capacidad para producir aflatoxinas, que no son carcinógenas y hepatotóxicas, lo que lo convierte en un hongo relevante en el ámbito de la seguridad alimentaria y la salud pública. El genoma de *A. neoniger* presenta un 35% de similitud con el de *A. uesalvadorensis*.

Característica	DNA Circular	DNA Lineal
Forma	Círculo cerrado (forma circular)	Secuencia lineal (cadena recta)
Ubicación	Común en procariotas, mitocondrias y cloroplastos	Común en eucariotas (cromosomas) y virus
Tipo	Plásmidos, cromosomas bacterianos	Cromosomas eucariotas, virus lineales
Estructura	Una sola cadena cerrada	Dos cadenas que se unen por extremos (telómeros)
Replicación	Se replica de manera bidireccional desde un origen	Replicación a partir de múltiples orígenes
Tamaño	Generalmente más pequeño (kilobases a megabases) en algunos con gigabases.	Más grande (gigabases)
Topología	Puede estar superenrollado (enrollado sobre sí mismo circular) sin 5' o 3' o ser lineal según método.	No tiene enrollamiento, pero puede formar estructuras secundarias

Estabilidad	Estabilidad alta debido a la forma cerrada	Menos estable en comparación, más susceptible a daños
Número de copias	Generalmente existen muchas copias en una célula	Una copia por célula (en el caso de cromosomas)
Proteínas asociadas	Pocas proteínas asociadas, aunque hay algunas que ayudan con la organización del DNA (e.g., histonas en cloroplastos y mitocondrias)	Asociado a muchas proteínas, como las histonas que forman la cromatina, no mitocondrias.
Función	Usado para almacenamiento de información genética en bacterias y organismos con DNA organoléptico	Contiene la información genética en los cromosomas de eucariotas

Tabla 3. Diferencias generales entre DNA circular y DNA lineal de las especies del *Aspergillus*.

En la Tabla 3 se pueden observar algunas diferencias clave entre el ADN circular y el lineal. La principal diferencia radica en la organización y estructura de cada tipo de molécula, aunque ambas comparten la misma secuencia de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina, A, T, C y G). ADN Circular: En este tipo de ADN, la secuencia de nucleótidos está organizada en una cadena continua que forma un círculo cerrado, sin extremos libres. Esto significa que las bases en ambos extremos de la cadena están conectadas, creando un "loop" cerrado. La estructura se caracteriza por un solo ciclo cerrado, sin extremos, lo que lo distingue del ADN lineal. Además, el ADN circular suele experimentar superenrollamiento, lo que implica que las hebras de ADN están enrolladas más allá de su forma natural debido a la tensión estructural. En cuanto a la replicación, el proceso comienza en un origen de replicación y continúa en ambas direcciones hasta completar la copia del ADN. ADN Lineal: En este tipo de ADN, las cadenas tienen extremos, lo que significa que las secuencias tienen un inicio y un final bien definidos. Su estructura es lineal y tiene dos extremos libres (3' y 5'), lo que permite que la replicación ocurra en direcciones opuestas. Este tipo de ADN es común en los cromosomas eucariotas, y las secuencias suelen estar empaquetadas con proteínas como histonas. En la replicación del ADN lineal, varios puntos de origen de replicación se activan, y las cadenas se copian en ambas direcciones, con los extremos 5' y 3' en los extremos de la cadena lineal. En el caso de *A. uesalvadorensis*, su ADN podría presentarse en forma circular y/o lineal, mientras que el ADN lineal sería característico de *A. neoniger*.

Conclusiones: 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. Una nueva subespecie de hongo del género *Aspergillus* se encontró en las semillas de nacascal que son autóctonas en 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 uessalvadoriensis*. A la que se le llamará en el futuro **nombre científico binomial:** *Aspergillus uessalvadoriensis* A. Vásquez 2006. Del género *Aspergillus* y especie se deriva el acrónimo **ues** que significa **Universidad de El Salvador** junto con *salvadoriensis* del país **El Salvador**.

Agradecimiento y reconocimientos. A autoridades de la Universidad de El Salvador y Facultad de Medicina UES por su apoyo moral, Lic William Armando Merino Microbiologo molecular como pares evaluadores y Lic Gerardo Rivas como apoyo técnico.

Declaración de transparencia.

El autor declara no tener conflictos de intereses en aislamiento de caracterización fenotípica de *Aspergillus* sp de El Salvador y caracterización genotípica de la especie *A. neoniger* porque así lo reportaron.

Referencias

1. Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micología*; 17: S79-S84.
2. Alcalá, L et al. (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 Mycology* 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). *Klinicheskaia 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. 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 Use 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 MicrobiolJan;21(1):14-22. doi: 10.1016/j.tim.2012.09.005. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23084572; PMCID: PMC3534798.
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* 10:285-293.
25. Illumina, "An introduction to Next-Generation Sequencing Technology." 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 de qPCR. Online.
31. Lifereder. (18 de agosto de 2023). *Aspergillus*. Recuperado de: <https://www.lifereder.com/aspergillus/>.
32. Loredó, A. (1997) , Tesis, Análisis genético de *Aspergillus spp* y su implicación en la identificación de hongos alatoxigenicos.
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
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 ofBrief 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.Doi: 10.1128/jcm-01344-06.
49. The Aspergillus Website. (2007) Fungal Resec trust.
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.

RESUMEN MACRO Y MICROSCÓPICO DE HONGOS DEL GÉNERO ASPERGILLUS. 2009

NOMENCLATURA DE ESPECIES DE ASPERGILLUS	CONIDIOS DE COLOR	COLOR MANCHA REVERSO	DIÁMETRO DE LA COLONIA	FORO DE CONIDIO	LONGITUD DE CONIDIA	EXTENSO CONIDIOS	FORMA DE CONIDIA	ORNAMENTACIÓN DE CONIDIOS
1 uessalvadorensis	Aspecto algodonoso plano, de color negro a gris	negro	9-10	Rugoso 300, hifas sin septos	3-5	1.96-2	Mazo, botella o cactus	celebridad
2 níger	Aspecto lanoso, verde, negro, blanco, amarillo	Amarillo-negro	25-30	400-3000 hifas con septos	4-5		Elipsoide, esférico	suave
3 clavatus	Aspecto de fieltro, verde azulado	Marrón blanco.	21-24.5	Largo liso, hifas con septos	3-4.5	2.5-3.5	Elipsoide	suave
4 giganteus	De blanco a crema, oliva, verde	cafetería	35-42	hifas con septos	3.5-4.5	2.4-3	elipsoide	suave
5 Nidulanos	Aspecto aterciopelado, de blanco a crema, amarillo, verde	Púrpura oscura.	25-30	Muy corto, liso. hifas con septos	3-3.5	3-4	Globoso y subgloboso	rugosa
6 Flavus	Aspecto aterciopelado y empolvado, color amarillo verdoso	Marrón rojizo	42-49	800 variable, rugoso. hifas con septos	3.5-4.5	3.5-4.5	globoso	suave
7 Terreus	Aspecto aterciopelado, de blanco a crema, amarillo, verde	White marrón	24.5-35	250 corto liso. hifas con septos	1.8-2.4		globoso	suave
8 versicolor	Aspecto aterciopelado Blanco a crema, amarillo, café, negro	Amarillo, café	10-15	600 largo liso. hifas con septos	21-28	3-3.5	globoso	suave
9 fumigatus	Aspecto plano y polvoriento	Amarillo, café	40-60	300 largo liso. hifas	2.5-3	2-3.5	subgloboso	suave

		con septos								
10	Orizae	De blanco a crema, amarillo, negro, gris a beige	Blanco crema amarill o	2.5	35-42 hifas con septos	7-10	3,5-4,0 μm,	Ovoide, subglobosa	Suave	
		FIALIDES DE FORMA	VESÍCULA APICAL	VESÍCULA LARGA	ANCHURA DEL VESÍCULA	FORMA DE VESESCULA	ESTIPIDE ANHE LADO	ANCHO STIPIE	ORNAMENTACION DE STIPIE	RAMA DE PATRÓN
1	uesalvado rensis	Una serie	presente	52-66	50-48	Globosa	100-300	2-2	irregular	No
2	níger	biseriada	Presente	30-75	75-80	Piriforme	1500-3000	15-20	Suave	No
3	clavatus	uniseriado	Presente	200-250	40-60	Clavado	1500-3000	20-30	suave	No
4	giganteus	biserializado	Presente	100-600	30-180	vesículas clavadas	10000 - 20000		Serie Uni	No
5	Nidulanos	biserializado	presente	8-10	8-10	Globosa	70-150	2.5-5	suave	No
6	Flavus	Una o dos series	presente	15-25 μm por 4.5-6.0 μ	20-45	Globosa	400-800	25-45	Sauve	No
7	Terreus	biserializado	presente	2-2,5 μm	12-20	Globosa	100-250	4.5-6	suave	No
8	versicolor	biserializado	presente	4,16 milímetros	12-16	Globosa, subglobosa	500-700	5-10	suave	No
9	fumigatus	uniseriado	Presente	10 μm	18-30	rugosa	300-500	5-8	rugosa	Verical
10	Orizae	Uniserial, biserial, biserial,	presente	100-200 milímetros	50-75	Globosa	4000-5000	6-12	suave	No

FUENTE: ADAPTADO DE CENTRO DE BIODIVERSIDAD FÚNGICA, ASOCIACIÓN EUROPEA DE MICOLOGÍA, National Center PARA LA INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA. SITIO WEB DE ASPERGILLUS. INSTITUTO AMPLIO. BASE DE DATOS DE GENOMA DE ASPERGILLUS. [Aspergillus Genome Resources NCBI.](#)

Artículos

Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Aspergillus uessalvadoriensis* en cepa orgánica descubierta en la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador. El Salvador. C.A. 2006- 2024

Dr. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, PhD

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

ORCID. ID <https://orcid.org/0000-0001-5643-8317>

Colaboradores:

- Dra Vianney de Abrego/ Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.
- Lic Marvin Stanley Rodríguez. / Molecular Biology laboratory CENSALUD UES.
- Dra Sandy Ruiz. /UBM. México.
- MACROGEN, Inc. Public Biotechnology Company. South Korea./ Yubin Hong/ Jaewon Sim.

Correspondence: Antonio Vásquez, antonio.vasquez@ues.edu.sv

Resumen: la caracterización morfológica y las técnicas moleculares de ADN permitieron la identificación de la muestra de *Aspergillus* enviada a MACROGEN KOREA DEL SUR. **Objetivo:** Realizar caracterización fenotípica y genotípica por el método Next-Generation Sequencing al género *Aspergillus*. **Metodología:** El tipo de estudio es exploratorio de corte experimental. Se llevó a cabo 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 los años 2006, se llevó a cabo acta notarial 2007, estudios de microscopía simple y microscopía electrónica de barrido y PCR del hongo encontrado en México 2008 y publicado en revista La Universidad en 2008, luego se realizó la extracción de gDNA, qPCR, cADN en 2024 en MACROGEN INC. por Metagenome Shotgun Sequencing Reports. **Resultados:** Se extrajo el genoma gDNA 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 quantum qDNA se obtuvieron los 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul y cDNA. De la extracción de gADN 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. qPCR se obtuvieron los 624 pb a una concentración de 103.24 nM y 41.87 ng/ul con la librería TruSeq Nano DNA (350_META).cDNA librería se utilizaron 33 kits de librerías. Total, de bases obtenidas fueron 11,705,895,990 pb, total, de lecturas fueron 77,522,490. Contenido de nucleótidos GC % 49.7 y AT % 50.30, contenido de bases GC fue 49.7% y AT fue 50.3, Contenido de bases métricas Q 20 :95.1 y Q 30: 88.3, Calidad de datos por ciclos Q30 valor alto. Se utilizaron formatos FASTQ y FASTA para codificación y secuenciación de pares de bases completa. Raw data Valor. 38,761.245 n, calidad y recorte del adaptador. (Quality and adapter trim.) fue 32,535,420, Eliminación de contaminantes fue de 30,961,740, Control de calidad o qcPassed de 79.88 indica que fue aceptado como buen desempeño del proceso. De la taxonomía Krona se reportó *Aspergillus neoniger*, Heatmaps especie reportan neoniger. **Conclusiones:** Se encontró por el método de secuenciación NGS *Aspergillus neoniger*, pero en estudios anteriores del año 2006 se denominó de la especie *uessalvadoriensis*.

Palabras clave. *Aspergillus sp, Nacascot, uessalvadoriensis, neoniger*

INTRODUCCION

El estudio inicial del hongo *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano **Antonio Micheli** en su obra *Nova Plantarum* quien nació en Florencia, Italia, en 1697 (Cruz, 2023). En la actualidad, ha generado mucho interés no solo por sus implicaciones en la salud sino también en las industrias alimentaria, química y biológica. Se inician investigaciones generales sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel nacional conocida como la semilla de Nacascal, muy utilizada en alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país. Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita de 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 de negro-café las vasijas y curtido de la piel del ganado, Los taninos al fermentarse pueden extraerse 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 observar las vasijas el tono café es del tanino de la semilla y el negro proviene del hongo mas hierro que contiene 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 raras soportan temperaturas de más de 100 a 300 °C. Actualmente el *Aspergillus* es un género amorfo, que comprende entre 260 y 837 especies (Geiser, 2007, Hawksworth, 2011) 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 tenga los primers según especies a mezclar los pares de bases. La

pigmentación de los hongos se debe a la síntesis de varios tipos de pigmentos y moléculas cromóforos como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas entre otros. (Gmoser, 2017). Los pigmentos de melaninas tienen una función principal en la protección de las esporas de los hongos contra los aumentos de temperatura, la radiación y la desecación. (Nitiu,2022) Las melaninas están presentes en la mayoría de los hongos, encontrándose en casi todos los hongos patógenos. (Vega,2021) El hábitat natural de las especies de *Aspergillus* es el heno, 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 fenotipos 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 en 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,seqADN en su análisis molecular del género *Aspergillus* para determinar el tipo de especie autóctona que circulan en la zona norte de nuestro país.

Objetivo: Objetivo: Realizar caracterización fenotípica y genotípica. por el método Next-Generation Sequencing del género *Aspergillus*.

Hipótesis: H₁. La caracterización fenotípica y genotípica del ADN ayuda a identificar especies de microorganismos en el medio ambiente. H₂ La caracterización fenotípica y genotípica del ADN no ayuda a identificar especies de microorganismos en el medio ambiente.

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*. Se desarrolló su estudio en dos fases: **I: Caracterización Fenotípica.** Se recolectaron cinco lotes de semillas de *Caesalpinia coriaria* de la zona norte, se realizó purificación y selección de las semillas de acuerdo a su apariencia y color. A continuación, los inóculos se elaboraron 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 en microscopio óptico simple a lo largo de semanas llevando hoja de cotejo. Se llevó al laboratorio para la observación por microscopía de barrido del *Aspergillus* tomando microfotografías electrónicas en CENSALUD. En México se hizo un 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 de ADN y la otra simple, se enviaron a Corea del Sur en los laboratorios de MACROGEN INC para la extracción, análisis e identificación de g,q,c,ds,seqADN.

2. Preparación de la suspensión de esporas y microcultivo. Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivo en donde se identificaron las conidias o esporas en donde se extrajeron por método simple bajo el microscopio y se sembraron de nuevo, la cual se utilizó para realizar los inóculos en el medio de cultivo Sabouraud en tubo y placa, el hongo se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al que previamente se le agregaron 50 ml del medio, se incubó durante 48 hrs a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente durante 5 min con la ayuda de un agitador magnético. Se paso también al tubo en Sabouraud y se agito para una homogeneización para asegurar que las esporas estén bien suspendidas. Si las esporas tienden a sedimentarse, puede ser útil utilizar un mezclador o agitar manualmente. El recuento de esporas se realizó con una

cámara Neubauer para una concentración adecuada se requiera. (Bustillo, 2010). **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 ésta se coloca el portaobjeto, y sobre éste el bloque del medio de cultivo Sabouraud. La muestra se inocula sobre el bloque en cuatro cuadrantes, mediante el asa de platino en forma de L sobre el bloque del medio ya inoculado se coloca una laminilla cubreobjetos e incuba por 7 días a 25°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una lámina con una o dos gotas de Azul Lactofenol y se observa al microscopio con objetivo 100x las estructuras características de la especie aislada. (Casas, 2010)

2. Área de muestreo y recolección. El hongo se aisló a partir de semillas de nacascal de la zona norte. Las semillas café-negras 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 fúngicas. La caracterización morfológica se realizó en cultivos en Sabouraud e incubadas a 37° C por 72 horas en aerobiosis en tubos y luego a temperatura ambiente x 7 días. Con observación microscópica simple en lactofenol azul de algodón a 10 x, 40 x y 100x, y luego se selló con un cubreobjetos. La visualización de las estructuras se llevó a cabo bajo un microscopio óptico. Para determinar la afiliación taxonómica se utilizó la base de datos en línea.

4. Aislamiento y purificación de muestras. En el material vegetal no se utilizó la limpieza de semillas. Se raspó y el material se retiró y se 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 de nutrientes) 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 ADN. En general, se utilizaron métodos para la secuenciación del ADN. Se utilizó el método de la secuenciación de Sanger por 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 los nucleótidos para determinar la secuencia. En cuanto a la microbiología, el estudio molecular se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que hayan sido previamente amplificados, o secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria. La secuenciación a través de *Illumina* se caracteriza básicamente por la ejecución de los siguientes procesos: a. La amplificación de los fragmentos de ADN para la generación de clústeres (colonias del mismo fragmento) se realiza mediante el método de PCR puente. b. La detección de bases en la secuenciación se realiza a través de marcadores fluorescentes. Por lo tanto, la plataforma *Illumina* permite la secuenciación por fragmento de ADN en ambos extremos. El fragmento se secuencia amplificado por ambos extremos en lugar de un solo extremo. Incluyendo gDNA, qDNA, dsDNA, cDNA y seqADN para luego analizarlos en paquetes informáticos. (MACROGEN.2024)

6. Extracción gADN. Los genes de gADN son actualmente una de las formas más estudiadas en el genoma de los hongos, 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 el calor a temperatura controlada por el termociclador u otra forma. Además, debe concentrar las moléculas diana del 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 (Palomares, 2007), que son los más comunes, pero dependerá del laboratorio en su método de extracción. En MACROGEN INC se extrajo de la siguiente manera: "Cantidad de ADN: Realizado por el método del sistema QuantiFluor® dsDNA utilizando la microplaca multimodo Victor Nivo. Lector. Macrogen cuantifica el material genómico inicial mediante el uso de cuantificación basada en fluorescencia, utiliza tintes específicos de ADN de doble cadena, este método cuantifica dsDNA con mayor precisión que el espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Evaluación del estado del ADN: se utiliza el Bioanalyzer 2100 (o el 4200 TapeStation). Verifique la integridad del ADN genómico utilizando un bioanalizador Agilent, Technologies 2100 (o 4200 TapeStation). El número de integridad del ADN (DIN) determina el grado de fragmentación de una muestra de ADN genómico midiendo la distribución de señales de varios tamaños. 2100 instrumento Bioanalizador (Agilent, Parte# G2939BA) 4200 Sistema TapeStation (Agilent, Parte# G2991BA)3. Verificación del tamaño del ADN para secuenciación de lectura larga. Tamaño promedio (BP): Macrogen utilizó el sistema de pulso Femto para determinar el tamaño real. En general, los pasos utilizados fueron 22 en total. Procariota/ Eucariota Powerprotocolo del kit

de ADN Powersoil Pro Transfer una cierta cantidad de célula ($\geq 1 \times 10^9$) a un tubo de 1,5 ml. (AXYGEN) A. Placa - Raspe aproximadamente 10 ~ 20ul de muestra B. Pellet - Pellet completamente derretido por vórtice y gire hacia abajo para usar aproximadamente 30ul ~ 50ul.- Demasiadas muestras resultarán en una lisis deficiente y un ADN insuficiente. Centrifuga 2 min a velocidad máxima.3-1. Procariota: Después de eliminar el sobrenadante, agregue 50 mM de EDTA 500ul, tampón de lisozima 100ul, lisozima 10ul y afloje mediante pipeteo.3-2. Eucariota: Después de eliminar el sobrenadante, agregue 50 mM de EDTA 500ul, lyticase 20ul y afloje mediante pipeteo. Incubar 30 minutos ~ 120 minutos a 37 ° C. Centrifuga 3 min a velocidad máxima. Retire todo el sobrenadante excepto el pellet. - Úselo cuando el pellet esté blando y sea difícil eliminar el sobrenadante. (dividido en varios tubos)- Si se agregan demasiadas muestras durante el paso 1, el pellet no se separará bien. En este caso, retire y use solo el sobrenadante tanto como sea posible. Añada 800 µl de solución CD1 al tubo PowerBead Pro. Transfiera todas las muestras al tubo PowerBead Pro. Asegure los tubos PowerBead Pro horizontalmente con un soporte de tubo adaptador de vórtice y el vórtice a la velocidad máxima durante 10 minutos. Tubos de centrifuga a 15.000xg durante 1 min. Transfiera el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Añadir 200 µl de solución CD2 y vórtice durante 5 s. (Antes de transferir el sobrenadante, añadir la solución CD2 al tubo limpio). Tubos de centrifuga a 15.000xg durante 1 min. Evitando el pellet, transfiera hasta 700 µl de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Añadir 600 µl de solución CD3 y vórtice durante 5 s (Antes de transferir el sobrenadante, añadir la solución CD3 al tubo limpio.)-Centrifuga: cargue 650 µl del lisado en una columna de centrifugación MB y centrifugue a 15,000 xg durante 1 min. Deseche el flujo. Repita el paso 10 hasta que se haya procesado toda la muestra. Agregue 500 µl de solución EA.

Centrifugar durante 1 min s a 15,000xg. Descarte el flujo a través. Añadir 500 µl de solución C5. Centrifuga durante 1 min a 15.000xg. Descarte el flujo a través. -Vacío-10. Coloque la columna de pin MB en la aspiradora.11. Coloque las muestras en columna y opere la bomba.12. Agregue 500 µl de solución EA y haga funcionar la bomba.13. Agregue 500 µl de solución C5 y haga funcionar la bomba. Transfiera la columna al tubo de recolección vacío y centrifugue a velocidad máxima durante 1 min. (para que se seque) Transfiera la columna al tubo de 1,5 ml y agregue 30-100 µl de solución C6. Centrifuga a velocidad máxima 1 min para elución". (MACRÓGEN, 2024)

7. Técnica de qPCR. Llamado DNA cuantitativo medido por fluorometría que capta los nucleótidos. Después de haber cumplido con los requisitos de extracción de gADN en el control de calidad, el qADN se fragmentó y cuantificó degradándolo. El método de control de calidad del ADN en MACROGEN fueron: 1. Cantidad de ADN: Realizado por el método QuantiFluor® dsDNA System utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo. Macrogen cuantifica el material genómico de partida mediante el uso de cuantificación basada en fluorescencia. utiliza 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 genero *Aspergillus spp* en su evolución genómica a sido variable en su tamaño, en la que tienen un rango promedio de tamaño de genoma de 27 a 39 Mb o mas y un numero de genes promedio entre 9000 a 14000 genes. El que tiene mayor tamaño es *A. sojae* 39.5 y el que tiene mayor número de genes es *A.niger* con 14,165 . (Gibbons, 2013). Generalmente, el tamaño del genoma bacteriano suele estar en el rango de 1 a 5 Mb, el tamaño del genoma de las bacterias oscila típicamente entre 1 y 10 millones de pares de bases. La mayoría de los virus tienen genomas que oscilan entre unos

pocos kilobases a unas pocas decenas de kilobases que son los de menor tamaño, lo que equivale a menos de 0.1 Mb. Esto depende del tipo de virus, no hay un número único de pares de bases para todos los virus. En general, el tamaño del genoma de los hongos se encuentra típicamente en el rango de unos pocos megabases (Mb) a más de 100 Mb. Algunos hongos filamentosos pueden tener genomas de cientos de millones de pares de bases. Así por ejemplo el genoma de *Aspergillus niger* tiene aproximadamente 30-40 millones de pares de bases y consta de alrededor de 8,000-10,000 genes. Hoy el tamaño de un genoma se mide directamente por *electroforésis* (técnica para separar fragmentos de ADN) en pares de bases (pb) y sus múltiplos Kilobases (Kb ó Kpb) de 1.000 pares de bases, y Megabases (Mb ó Mpb) de 1.000.000 pb.

8. cADN library y dsDNA. El cADN llamado también ADN complementario forma de ADN que se sintetiza a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de retro transcripción. La construcción de las librerías en MACROGEN toma un promedio de 4-5 semanas. Resumen del flujo de trabajo en su construcción: 1. Pedido de cebadores de amplicón: el protocolo incluye las secuencias de pares de cebadores para la región V3 y V4 que crean un solo amplicón de aproximadamente ~ 460 pb. El protocolo también incluye secuencias de adaptadores de voladizo que se deben anexar a las secuencias del par de cebadores para que sean compatibles con los adaptadores de índice y secuenciación de *Illumina*. *Illumina* no vende estos cebadores. Deben ser solicitados a un tercero. 2 preparar la biblioteca: el protocolo describe los pasos para amplificar la región V3 y V4 y, mediante una PCR de ciclo limitado, agregar adaptadores de secuenciación de *Illumina* y códigos de barras de doble índice al objetivo del amplicón. Utilizando el complemento completo de los índices Nextera XT, se pueden agrupar hasta 96 bibliotecas para la secuenciación. 3

secuencia en MiSeq: mediante lecturas emparejadas de 300 pb y reactivos MiSeqv3, los extremos de cada lectura se superponen para generar lecturas completas de alta calidad de la región V3 y V4 en una sola ejecución de 65 horas. La producción de MiSeqrun es de aproximadamente > 20 millones de lecturas y, suponiendo 96 muestras indexadas, puede generar > 100.000 lecturas por muestra, comúnmente reconocidas como suficientes para estudios metagenómicos. 4. Analice en MSR o BaseSpace: el flujo de trabajo de Metagenomics es una opción de análisis secundaria integrada en MiSeqReporter (software en el sistema) o disponible en BaseSpace (software basado en la nube). El flujo de trabajo de metagenómica realiza una clasificación taxonómica utilizando la base de datos Greengenes, mostrando la clasificación a nivel de género o especie en un formato gráfico. Este protocolo se puede utilizar para secuenciar regiones alternativas del gen 16S rRNA y para otras secuencias de amplicones específicos de interés. Cuando se utiliza este protocolo para la secuenciación de amplicones que no sea ARNr 16S, utilice la opción Generar FASTQWorkflow (análisis secundario). Para obtener más información, consulte Flujo de trabajo de metagenómica de MiSeqReporter. Es una colección de secuencias de ADN generadas a partir de la secuencia de ARN mensajero (ARNm). Estas bibliotecas contienen solo ADN codificante de genes, excluyendo las secuencias de ADN que no codifican. Se trata, por tanto, de una colección de clones, cada uno de los cuales contiene un vector en el que se ha insertado un fragmento de ADN derivado del total de ADN o ARN de la célula o tejido. Estos clones contienen todas las secuencias existentes en la fuente original de ADN, es decir, deben contener muestras de todo el ADN del organismo o muestra de estudio. Es posible buscar en la biblioteca un clon con un fragmento de ADN de interés utilizando métodos de detección sensibles capaces de detectar este fragmento entre millones de

clones diferentes. Una biblioteca de ADN es una colección de fragmentos de ADN que se han clonado en vectores para que se puedan identificar y aislar los fragmentos de ADN que les interesan para su posterior estudio. Básicamente, hay dos tipos de bibliotecas: bibliotecas de ADN genómico y bibliotecas de cADN. Las bibliotecas de ADN genómico contienen grandes fragmentos de ADN en bacteriófagos o cromosomas artificiales derivados de bacterias o P1 (BAC y PAC). Las bibliotecas de cADN generalmente contienen fragmentos mucho más pequeños que las bibliotecas de ADN genómico y por lo general, se clonan en vectores de plásmidos. En resumen, aislamos el genoma completo, luego hacemos un corte en segmentos con enzimas de restricción para obtener el ADN de inserción, luego lo vinculamos al vector e introducimos la célula al huésped y finalmente lo analizamos y almacenamos. La preparación de la biblioteca de secuenciación se realiza de forma automatizada. Es una forma de ADN que se sintetiza a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de retrotranscripción. Este proceso se lleva a cabo utilizando una enzima llamada transcriptasa inversa o proteasa, que convierte el ARNm en cDNA. Al crear cDNA a partir de ARNm, se puede estudiar qué genes están activos en una célula en un momento dado y en qué cantidad, ya que el cDNA refleja el perfil de expresión génica de la célula. El **dsDNA** o ADN de doble hebra, sirve para la calidad que forma parte esencial para obtener resultados precisos en la secuenciación. En el proceso de secuenciación, es fundamental que el ADN esté intacto y en forma de doble hebra para que las plataformas de secuenciación puedan leer correctamente la información genética. dsDNA en MacroGen se refiere al tipo de ADN que la empresa utiliza en sus procesos de secuenciación y análisis, asegurando que la muestra sea adecuada para estos procedimientos. File Size se refiere al tamaño del archivo en bytes para generar, almacenar y compartir archivos de datos

relacionados con la secuenciación, como archivos de lectura (reads) o resultados de análisis. **FASTQ** es un formato de archivo utilizado para almacenar lecturas de secuenciación de ADN junto con su calidad. Es un formato común en bioinformática, especialmente en el análisis de datos de secuenciación de próxima generación (NGS). Cada entrada en un archivo FASTQ generalmente contiene cuatro líneas en comandos en simbología de ejecución en su programación, que se obtienen las lecturas de ADN, que se almacenan en archivos FASTQ para su posterior procesamiento, análisis y alineación contra genomas de referencia. (MACROGEN.2024)

9. seqDNA. Es la secuenciación del DNA que identifica la secuencia de nucleótidos en una muestra de ADN. MacroGen, utiliza para la secuenciación NGS (Next Generation Sequencing) apoyado con Illumina, que es una tecnología que nos permite segmentar DNA en fragmentos y secuenciarlos. Estos fragmentos se ensamblan posteriormente gracias al análisis bioinformático permitiendo conocer la secuencia de todo el genoma. Para la secuenciación primero se realiza una lisis celular, para que se libere el DNA, luego se hacen 2 síntesis de cadenas, una amplificación del cDNA y por último la amplificación de las librerías. Los resultados se dan entre 4 a 5 semanas para una secuenciación masiva, que en muchas veces depende del tipo de muestra a estudiar en tamaño de bases. (MACROGEN.2024)

10. Puntuación de calidad de Phred. Es una medida utilizada en bioinformática para evaluar la calidad de las secuencias de ADN obtenidas a través de métodos de secuenciación, como la secuenciación de nueva generación (NGS). Esta puntuación se introduce en archivos de secuenciación, como los formatos FASTQ, y cada base de la secuencia tiene una puntuación correspondiente que indica la confianza de

que la base leída es correcta, se calcula utilizando la siguiente fórmula: $[Q = -10 \log_{10} P]$.

11. Análisis bioinformático. En el mercado existen secuenciadores masivos que permiten leer en paralelo millones a miles de millones de secuencias o fragmentos del ADN (*reads*) tal como MACROGEN usa esta tecnología, que anteriormente era laboratorial paso a uno computacional, en el campo de la bioinformática. Básicamente, el proceso para obtener las secuencias genómicas a partir de datos de NGS se compone de dos fases. La primera fase basados en la secuenciación, como la extracción de los ácidos nucleicos y la preparación de la librería y añadir adaptadores con secuencias conocidas para después poder identificar el origen de las secuencias. La segunda fase en computadora comprende el preprocesamiento, ensamblaje de los reads y el análisis de las secuencias ensambladas mediante herramientas bioinformáticas. La elección de la plataforma utilizada para secuenciar los datos NGS va a condicionar la fase de análisis, ya que cada tecnología presenta unas características específicas, como el tipo de read (Single End, Paired End, Mate Paired), errores de secuenciación o cobertura.

12. Deliverables. Utilizan el FASTQ para lecturas y md5sum in linux systems programs. Esta técnica se emplea para la purificación y separación de ADN, asegurando que las muestras estén libres de contaminantes y en condiciones óptimas para los procesos de secuenciación. El procedimiento seqDNA generalmente incluye etapas de lisis celular, purificación y concentración del ADN. Esto permite obtener ADN de alta calidad. Utilizan MD5sum que es un comando utilizado para calcular y verificar el valor hash MD5 de un archivo y asegurarse de que los archivos de datos genéticos no se

corrompan durante la transferencia o almacenamiento. (MACROGEN.2024)

13. Lista de descargas o download list. Es una sección en el portal de usuario de Macrogen donde se encuentran todos los archivos de datos secuenciados solicitados. Esta lista incluye lecturas crudas (Raw Reads): Datos de secuenciación sin procesar, como los archivos en formato FASTQ: Archivos que han sido analizados y pueden incluir alineamientos, ensamblajes y resultados de análisis (por ejemplo, archivos en formato BAM, VCF, etc.). e informes relacionados con secuencias. Se puede seleccionar y descargar los archivos desde esta lista. Su propósito sea una herramienta clave para acceder, gestionar y descargar los datos de secuenciación que se ha solicitado, permitiendo trabajar con los resultados del proyecto de manera eficiente.

14. Calidad por ciclo. El término Quality by Cycle o 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 realiza en ciclos. Durante cada ciclo, se añade 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, una base (A, T, C o G) se incorpora en la cadena de ADN, y un fluoróforo o una señal óptica detecta la base añadida. Este proceso se repite múltiples veces, y en cada ciclo se detecta y se registra en una base.

15. Síntesis Reporte Secuenciación del genoma.MACROGEN/Plataforma Illumina.

Flujo de trabajo experimental. MACROGEN. Korea del Sur. Se refiere al proceso de preparación de las muestras biológicas (como ADN, ARN o proteínas) antes de que se realicen análisis genéticos, como la secuenciación. La preparación de muestras suele implicar varios pasos, que son: Extracción: que consiste en aislar el material genético de las células u otros tejidos.

Purificación: Eliminar contaminantes y asegurar que el ADN o ARN extraído es de alta calidad. **Cuantificación:** Medir la concentración y calidad del material genético, utilizando técnicas como la espectrofotometría. **Fragmentación:** Dividir el ADN o ARN en fragmentos de tamaño adecuado para posteriores análisis. **Amplificación:** En algunos casos, puede ser necesario amplificar la muestra para obtener suficiente material para el análisis. Los adaptadores, se refiere a un proceso en el que se añaden adaptadores de secuenciación a los fragmentos de ADN. Los adaptadores son oligonucleótidos que se unen a los extremos de los fragmentos de ADN. Su función es reconocer el ADN, permitir la amplificación, insertar códigos que permitan su identificación. Proceso final de preparación de la biblioteca o librerías de ADN o ARN antes de la secuenciación. Durante la secuenciación de genomas, transcriptomas o amplicones, se requiere que las muestras de ADN o ARN sean procesadas para crear una biblioteca o library que contenga fragmentos de estas moléculas, los cuales son esenciales para el análisis posterior. La generación de clústeres utilizando amplificación por puente (bridge amplification), esto se refiere a un proceso utilizado en la secuenciación de ADN y en la preparación de bibliotecas de ADN. Aquí las moléculas de ADN son clonadas en una superficie sólida (como una placa de flujo) para formar clústeres clonales. Cada clúster contiene miles de copias de una sola molécula de ADN, lo que permite una lectura más precisa y sensible de la secuencia de ADN. La secuenciación por síntesis, es una de las metodologías utilizadas en la secuenciación de ADN, esta tecnología permite la lectura de las bases del ADN mediante un proceso en el que se sintetizan las cadenas de ADN y se identifican las bases incorporadas en cada ciclo de síntesis. El proceso básico de secuenciación por síntesis generalmente incluye los siguientes pasos: **Preparación de la muestra:** El ADN que se va a secuenciar se fragmenta y se prepara mediante la adición de

adaptadores que son necesarios para la amplificación y el posterior análisis. **Amplificación:** Las secuencias de ADN se amplifican, a menudo utilizando técnicas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para obtener suficientes copias para el análisis. **Secuenciación:** En esta etapa, cada ciclo de síntesis implica la adición de nucleótidos marcados (cada uno con un fluoróforo diferente). A medida que se añaden nucleótidos, se genera una señal fluorescente que es capturada por un equipo de lectura. La intensidad de la fluorescencia indica qué base (A, T, C o G) se ha incorporado a la cadena en ese ciclo. **Análisis de datos:** Después de completar los ciclos de síntesis, los datos generados se analizan para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN. Por último, generación de datos en bruto, se refiere a la producción de datos iniciales que resultan de la secuenciación de ADN. Estos datos brutos son las lecturas directas obtenidas a partir de las muestras biológicas antes de que se realicen procesos de análisis, filtrado o interpretación. Los datos en crudo típicamente incluyen: **Lecturas de secuenciación:** Las secuencias nucleotídicas asignadas a cada fragmento de ADN secuenciado. **Calidad de las lecturas:** Información sobre la calidad de las secuencias obtenidas, lo que indica la fiabilidad de los datos. **Archivos en formatos específicos:** Como FASTQ, que contienen tanto las lecturas como sus correspondientes puntajes de calidad. (MACROGEN,2024). Las muestras se preparan de acuerdo con el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El flujo de trabajo que se ilustra a continuación muestra el método común de preparación de bibliotecas basado en la ligadura. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Primero se extrae el ADN para proceder a la construcción de una biblioteca. La fragmentación del ADN se realiza en orden de 5' a 3' combinando las fragmentaciones y el ligando y amplificado con un cebador de

PCR para complementar la construcción final de la biblioteca. La secuencia se lleva a cabo mediante tecnología de síntesis y se realiza una generación de datos. Paso 1. Preparación de la biblioteca. Preparación de la muestra El ADN/ARN se extrae primero de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptadores 5' y 3'. Alternativamente, la marcación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. Construcción final de la biblioteca. A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recorta hasta los extremos de cada adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. Generación de clústeres mediante amplificación de puentes. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en grupos clonales distintos a través de la amplificación de puentes. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. Llamada Secuenciación Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) La tecnología SBS de Illumina utiliza un método basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras molde de ADN. Dado que todos los dNTP reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base

de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitivas y homopolímeros. Los sistemas químicos de cuatro, dos y un canal que utilizan química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos. El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada de bases, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ utilizando bcl2fastq, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas. Los pasos previos a la preparación de la biblioteca incluyen la extracción, cuantificación y fragmentación del ADN, mientras que las evaluaciones de la calidad, la cuantificación y la estandarización de la biblioteca son pasos posteriores a la preparación de la biblioteca. El kit de preparación de ADN de Illumina ofrece una cobertura genómica constante y una calidad de datos, desde la secuenciación del genoma completo (WGS) hasta pequeños plásmidos microbianos. Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. En general, los pasos básicos para hacer las bibliotecas consisten en preparar el ARN o el ADN para el análisis de NGS son: 1) Fragmentación, 2) Fijación de adaptadores e índices a los extremos de los fragmentos complementarios a las plataformas Illumina®, y 3) En algunos casos, selección de fragmentos específicos para refinar el tamaño de la biblioteca, eliminando adaptadores u otros artefactos de la preparación de la biblioteca.

El kit de preparación de ADN de Illumina cuenta con un flujo de trabajo optimizado que combina la extracción, cuantificación y fragmentación de ADN, así como la normalización de bibliotecas, para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas más rápido y flexible del conjunto de soluciones de Illumina. La química de etiquetado con bolas admite una amplia gama de cantidades de entrada de ADN, diversos tipos de muestras y muchas aplicaciones diferentes, incluida la secuenciación del genoma humano completo, la metagenómica ambiental, la investigación de plantas y animales, la elaboración de perfiles tumorales.

2. Generación de clústeres. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puentes. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación.

Paso 3. Secuenciación. La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de ADN molde. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de la secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitivas y homopolímeros. La tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) utiliza colores para la identificación de bases. Las bibliotecas de NGS son compatibles con la plataforma Illumina a través de una biblioteca de cebos llamados Agilent SureSelect personalizada, una plataforma comúnmente utilizada para la secuenciación clínica dirigida. Cada fragmento termina con una etiqueta fluorescente, que se distingue por diferentes colores correspondientes a los nucleótidos A, C, G y T, la prueba detecta sustituciones de ADN, pequeñas inserciones y deleciones, y

variaciones en el número de copias ubicadas en las secuencias codificantes, por ejemplo, como el uso de colores para. A = Adenina (azul) T = Timina (yellow) G = Guanina (verde) C = Citosina (carmín) o escoger Verde, amarillo, naranja, rojo. La NGS hacen facilitando estos fragmentos se disciernen tras la separación por electroforesis capilar, de ahí que también se conozca como secuenciación por electroforesis capilar (CES). El estudio exhaustivo de todas las especies presentes en una muestra mixta, donde la NGS puede identificar especies utilizando la secuenciación de amplicones 16S o profundizar en genomas completos con la secuenciación de meta-escopeta. El método para la técnica de análisis de fragmentos: Los fragmentos de ADN se marcarán con colorantes fluorescentes durante la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador. Se pueden detectar múltiples tintes fluorescentes de diferentes colores en una muestra (Multiplex). Uno de los colores del tinte se utiliza para un estándar de tamaño etiquetado presente en cada muestra. El estándar de tamaño se utiliza para extrapolar los tamaños de los pares de bases de los picos del producto de muestra. Los fragmentos se separarán por tamaño mediante electroforesis capilar. Los datos se analizan mediante un software para determinar el tamaño y el genotipo.

Paso 4. Análisis. Generación de datos brutos: 1. Estadísticas de datos sin procesar. Informe el número total de bases, lecturas, GC (%), Q20 (%) y Q30 (%) se calculan para las 20 muestras o más. Calcular bases totales (bp) : Número total de bases secuenciadas. Total, de lecturas: Número total de lecturas. Para la secuenciación de extremos emparejados de Illumina, este valor se refiere a la suma de read1 y read 2. El GC: Expresado generalmente como porcentaje, representa la cantidad de pares Guanina-Citosina en la molécula de ADN o genoma que está siendo investigado, en forma similar con AT que expresa la cantidad de pares de Adenina

Timina en su molécula de ADN. En genética, GC, Contenido GC o Porcentaje GC (contenido de guanina y citosina) es una característica del genoma de un organismo o de cualquier pedazo de ADN o ARN. G y C denotan guanina y citosina, respectivamente. Expresado generalmente como porcentaje, representa la cantidad de pares Guanina-Citosina en la molécula de ADN o genoma que está siendo investigado. La fracción restante de cualquier molécula de ADN contendrá bases A (adenina) y T (timina), de forma que el contenido GC da también el contenido AT. Paso 2. **Descarga de datos.** Sobre el análisis detallado de resultados de control de calidad y análisis taxonómico. Paso 3. **Estadísticas de control de calidad.** Resumen de datos del informe (datos brutos, calidad, eliminación de contaminantes). Hecho en gráfico de barras y estadística de datos (nombre de la muestra, datos sin procesar, calidad, eliminación de contaminantes, lectura pasada de QC elaborado en un tablero. Paso 4. **Análisis de la taxonomía.** A partir de la muestra enviada, se analiza la composición biológica o diversidad alfa y beta microbiana. Paso 5. **Método.** Qué es un análisis de flujo de trabajo o diagrama de flujo donde se sintetizan los pasos a realizar para realizar un análisis de la muestra en particular. Paso 6. **Entregables.** Los datos de este pedido se entregarán a través de archivos pdf u otros. Hay muchos archivos compresores, archivos de texto que contienen la suma md5 de los entregables. **El apéndice** tiene preguntas frecuentes de comprobación de md5 en un sistema Windows. y descripción del archivo de resultados. Su archivo de lista de entregables de gran tamaño en formato Windows y FASTQ Phred Quality Score Q se calcula con $-10\log_{10}$. La puntuación de calidad de Phred expresa numéricamente la precisión de cada nucleótido. Paso 7. **Cuantificación: Los secuenciadores** pueden manejar una amplia gama de concentraciones de ADN, sin embargo, con cantidades muy bajas de ADN, la calidad de los datos se verá significativamente afectada. El uso de la absorbancia UV para cuantificar soluciones de

ADN diluidas tiende a dar resultados muy inexactos. Una buena manera de cuantificar el ADN es ejecutar una alícuota en un minigel y comparar la intensidad con el control de una concentración conocida. También hay escaleras de concentración que están disponibles comercialmente. Para cada reacción, proporcione 10 ng/100 bases y al menos 20 ng/ μ l de solución en agua desionizada, proporcione al menos 10 μ l para cualquier posible resecuenciación. Se recomienda la medición con electroforesis en lugar de las mediciones basadas en espectrofotómetros. Paso 8. **La preparación de los cebadores** debe proporcionarse en agua desionizada a la concentración requerida. Suministre cebadores a una concentración de (10 pmole/ μ l = 60 ng/ μ l) en agua desionizada a un volumen superior a 20 μ l. Los cebadores suministrados por los clientes deben ser desalados o purificados. (MACRÓGEN, 2024)

Resultados y Análisis.

D. Caracterización fenotípica del *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 miden aproximadamente de 3 a 4 cm, ápice redondeado, semillas de color marrón con apariencia negra, de las cuales crece un hongo cuyo parecido es a un posible *Aspergillus sp.* El árbol *Caesalpinia coriaria* contiene taninos, triterpenos, glucósidos y flavonoides. El hongo se reproduce exclusivamente en las semillas del árbol 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 los artesanos salvadoreños. (Vásquez, 2010). 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 μm de largo con conidios moderados o esporas internas de 1 a 3 micras, de color marrón a negro. Es un hongo filamentoso hialino, saprófito, perteneciente al filo Ascomycota.

Características macroscópicas: Cuando se cultivan en medio especial de Saboraud producen una coloración negra con producción de pigmento en el tubo en la región posterior en los tubos antes de 7 días. En placa y tubo Cultivo de agar Saboraud: la colonia su micelio es blanco con un aspecto columnar y luego se vuelve negro. La textura de las colonias, parecen de algodón o terciopelo, no hay esclerotes. El reverso de la colonia es negro o negro pigmentado dependiendo del agente oxidante, altura del micelio bajo, apariencia de la colonia es negro polvoriento. Es un hongo filamentoso.

Características microscópicas: El conidióforo de *Aspergillus* tiene tres partes bien diferenciadas: vesícula globosa terminal con fiálide uniseriada sin metúla, estípote tubular y célula del pie que une el conidióforo con el micelio. Los conidióforos son de paredes lisas y rugosas y se agrupan formando una masa compacta, hialina o pigmentada y miden de 3 a 5 μm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. En su interior se observan cientos de esporas o conidios. La espora es esférica e irregular, aseptada, ameroporosa, coloreada y oscura del tipo feospora columnar. La vesícula es globosa con 52-66 μm de diámetro con una longitud de estípote de 100-300 μm , un ancho de estípote de 2-2 μm , ornamentación irregular y produce fiálides a su alrededor. Las fiálides son monoseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo, son cortas y miden 8 micras de longitud, de las que brotan los conidios, que son globosos y rugosos de 4 a 5 μm de diámetro, de color café marrón o marrón a negro. El diámetro de la colonia es de 9-10 μm , los conidios son columnares y tienen una longitud de 3-5 μm y un ancho de 1,96-2 μm . Cabezas de conidios lisos con una pared redonda e irregular, dispuestos en

columna; estípotes de paredes delgadas lisos y pronunciados, de color marrón a negro; no se observa columela; hay abundantes conidios que se desprenden de la cabeza; Tiene una fila de fiálides. El esporangio es una estructura peridial globosa simple, el esterigma es negro. Los conidios marrones maduros son esféricos con proyecciones en forma de espinas en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas, formando espículas en número mayor de diez. Los conidios tienen un aspecto esférico en forma de mazo con espículas, de los extremos emergen filamentos largos 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 llenan formando masas marrones internas. El conidióforo es largo, liso, uniseriado, con abundantes esporas. En general, la espora es alargada e irregular, aseptada, ameroporosa, coloreada y oscura del tipo feospora, de gran tamaño, cuyo diámetro es de 1 a 3 μm ; 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 llenan formando masas internas de color marrón, la apariencia de la colonia es de color negro polvoriento. El micelio es corto o aplanado y delgado y de color 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 la especie *niger* como la descubierta, la vesícula de la especie *niger* está irradiada su cabeza con conidios redondos y la otra descubierta tiene forma de mazo alargada sin irradiación. A 100x se puede observar que los conidios del *niger* son redondos con paredes gruesas y centro liso

biseriada, con metula y radiada ((Samson, 2014). y 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 se tiñen con lactofenol azul algodón y los de *niger* sí (Vásquez, 2010). El *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 filálidos. 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. (Salazar, 2012) . Las hifas siguen su camino en un codinidóforo que en su extremo terminal termina en una cabeza conidial globosa de la que emergen los filidos y se desprenden las esporas o conidios para volver a su ciclo. Cada hifa, en su extremo, forma cabezas conidiales globosas que pueden producir más de 500.000 conidios. (Lifeder, 2023). Estos conidios a 100x tienen una apariencia rugosa 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 conidióforo hacia el extremo hasta llegar a la vesícula donde se acumulan, ejerciendo un efecto mecánico de presión hacia el exterior desde donde emergen de los filálidos hacia el exterior, esto es constante una y otra vez. Las hifas son estructuras cilíndricas filamentosas que forman el cuerpo de los hongos pluricelulares. Están formados por una fila de células alargadas envueltas por una

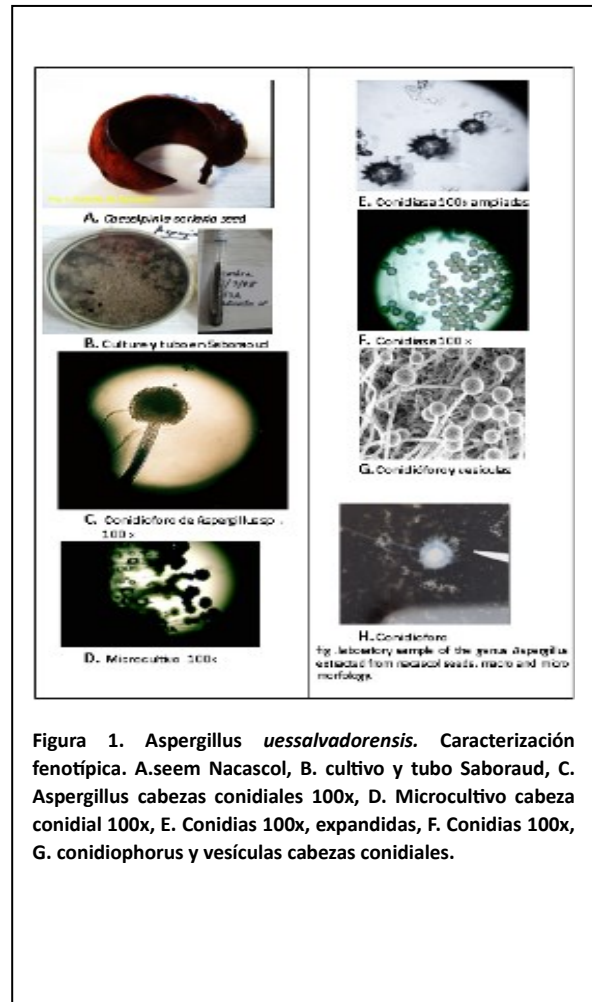


Figura 1. *Aspergillus uessalvadorensis*. Caracterización fenotípica. A.seem Nacascol, B. cultivo y tubo Sabouraud, C. *Aspergillus* cabezas conidiales 100x, D. Microcultivo cabeza conidial 100x, E. Conidias 100x, expandidas, F. Conidias 100x, G. conidiophorus y vesículas cabezas conidiales.

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 que constituyen el punto de partida para el desarrollo del micelio del hongo. Las hifas uniseriada 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*. (Bolet,2005), (Raeper, 1998),(Cao, 2022), (Marchese,2018) principalmente *Aspergillus*

flavus con aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y *Asperillus parasiticus* ambos relacionados con Aspergiloma Pulmonar o Absceso Pulmonar o también diversos cánceres a hígado, riñón, páncreas, colorrectal. (UNAM,2013). El hongo en estudio produce micotoxinas y péptidos bioactivos relacionados con las enfermedades pulmonares Aspergilosis. El crecimiento en el tubo con Saboraud después de semanas se vuelve plano de color negro aterciopelado. 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 rodeada por un halo casi negro. Cuando se observa bajo un microscopio de 40 x, se observan más de 20-30 conidios marrones abundantes por campo que no se tiñen con lactofenol azul 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 *niger*, pero en nuestro caso no ocurre. Con el tiempo, más de un mes, se vuelve negro aterciopelado. En la Figura 1 se muestra la caracterización fenotípica anteriormente descrita.

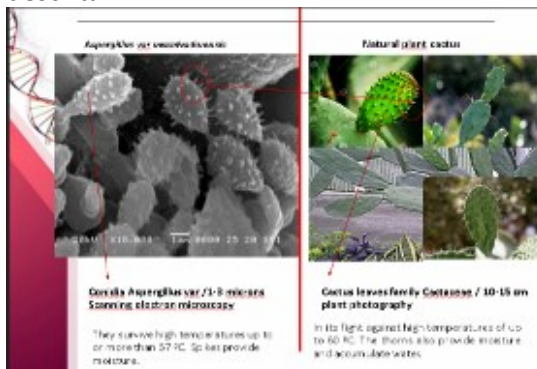


Fig 2 . Comparación de especies con planta de cactus natural. *Aspergillus uessalvadoriensis*

En la Fig. 2. La comparación de la especie con conidios espículas con la planta natural de cactus que también se observan espículas. Estos le confieren resistencia al calor y aportan humedad. Pueden sobrevivir a temperaturas superiores a 60-100 °C o más. Las espinas o espículas le protegen contra del calor proporcionándole humedad. En la fig. 3. Por el método de microscopía electrónica de barrido en laboratorio, se encontró que dos semanas después del cultivo, los conidios emergen de las fiáldes uniseriadas en columna de la vesícula. Hubo un rápido crecimiento de esporulación a los cinco minutos, a una hora había millones de esporas en 10 campos. Se observa el conidióforo hialino rugoso con cabeza conidal e hifas, en la fig C se observa elongación de las hifas acumuladas con filamento y ramificación. Hay conidios en forma de raqueta fig G. Este *Aspergillus* en condiciones de temperatura le

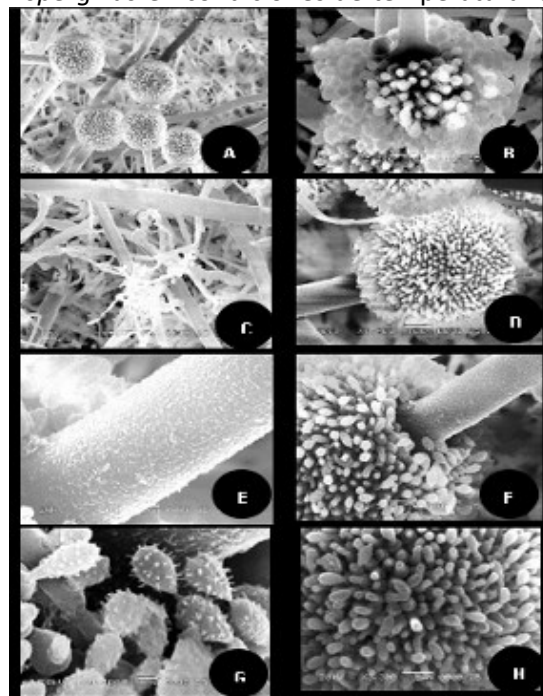


Fig. 3. *Aspergillus uessalvadoriensis* Microfotografía electrónica de barrido. Cortesía de CENSALUD por Dra Vianney de Abrego. A.Morfología *Aspergillus*, B. vesícula, C: Zapata, elongación de las hifas con filamento y ramificación D. Cabeza de conidios, E. codióforo rugoso, F. vesícula

globosa y filide, G. conidios, H. cabeza de conidiales columnar y conidióforo.

favorece las altas temperaturas ya que una humedad relativa detiene el crecimiento de hongos que producen estas toxinas como aflatoxinas, al exponerlo al calor crece y es termorresistente. 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 protegerlo. Su composición química se basa en proteínas y glucoproteínas en un 10%, lípidos en un 8%, minerales como el calcio, el magnesio y el fósforo. Tienen componentes de quitina, quitosanos, peptidoglicanos y mánanos. En el laboratorio, la quitina se suaviza con un 40% de hidróxido de potasio para su estudio morfológico. Los hongos no tienen celulosa en la mayoría de ellos, a diferencia de los vegetales. (Garraway, 1984) (Vega,2021). El *Aspergillus* tiene un ciclo biológico muy sencillo, en el que se forman las esporas para su reproducción y tras su germinación se forman las hifas, que serán las formas invasoras 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. (Abarca, 2000, Atlas, 2006). 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 pueden ser inhalados fácilmente. Resisten las altas temperaturas debido a su duro caparazón, algunos contienen melanina que los protege del calor y pueden recorrer kilómetros a distancia a otras zonas y colonizar. Crecen rápidamente en menos de 5 días y ya han madurado. En la Fig.4 se observan las cabezas de las especies *A.niger* y *A.uessalvadoriensis*, en las que se observan las diferencias de *A.niger* su cabeza es redonda, radiada y biseriada con métula, mientras que *A.uessalvadoriensis* tienen forma de mazo alargada columnar en su extremo uniseriada sin métula.

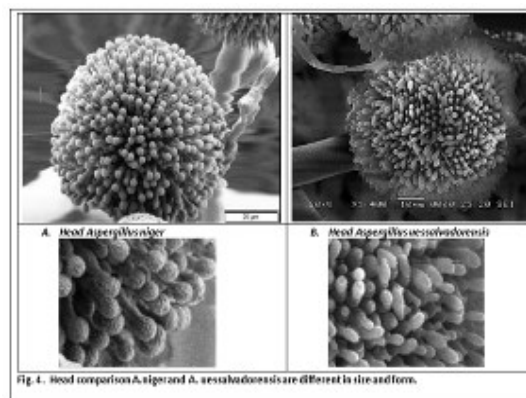


Fig 4. Cabezas: vesícula globosa radial de la especie *A.niger* y vesícula globosa columnar de *A.uessalvadoriensis*.

Múltiples especies y variedades del género *Aspergillus* circulan por todo el mundo, se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican 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* y otros. (Alcalá, 2018), (Ruiz,2018) En general del género *Aspergillus* tiene entre 30-40 megabases (Mb), que equivale a unos 30-40 millones de pares de bases (pb) a considerar en una secuenciación.

C. Caracterización genotípica.

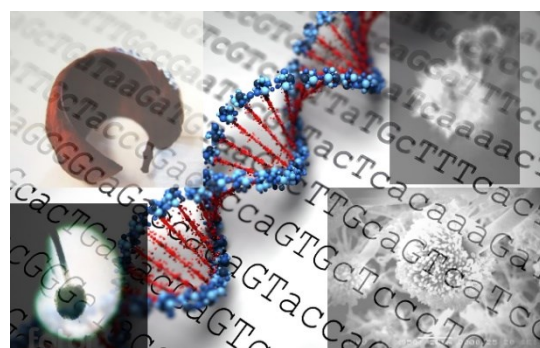


Fig. 5 . Evolución estudio fenotípico y genotípico.

A la izquierda semilla nacascal, a la derecha conidia a 100x, abajo conidióforo a 100x,al centro el gDNA y a la derecha microfotografía electrónica de barrido de conidoforo.

En la figura 5 Se tiene la evolución del estudio desde el origen de la semilla, el aislamiento del hongo a la observación a 100x conidia, luego a la izquierda el conidióforo a 100x, al centro la secuenciación gDNA y a la derecha microfotografía electrónica del conidióforo y al final la secuenciación gDNA.

-PCR preliminar .

En la Fig. 6. Se observa la PCR de la muestra de la especie, en la que se destaca en primer lugar que es del género *Aspergillus spp.* En 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 con la muestra de estudio.

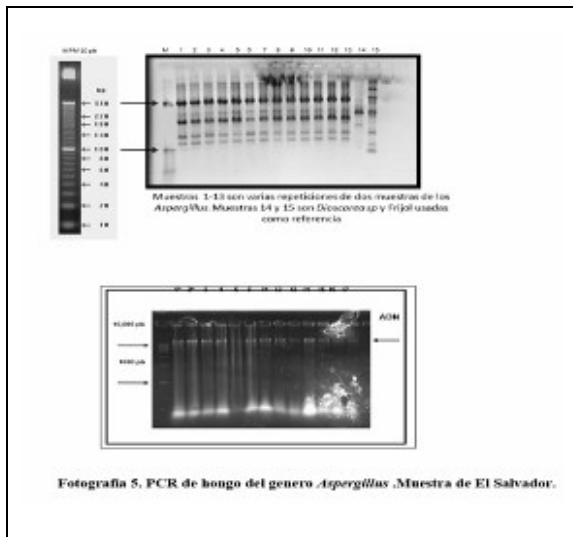


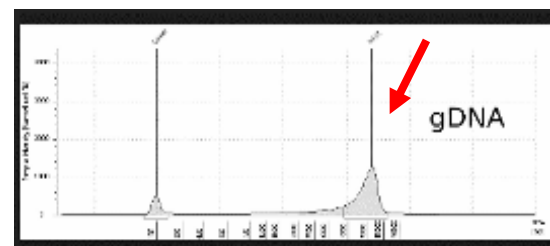
Fig. 6. Muestra PCR de diferentes especies. El Salvador. *Aspergillus uessalvadorensis*
Fuente: Instituto de Biología Molecular. México.

-PCR

Un gráfico de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se refiere a la representación gráfica de los resultados de un experimento PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real. Este tipo de gráfico muestra cómo la cantidad de ADN amplificado aumenta a lo largo de los ciclos de la PCR, y es fundamental para

analizar la expresión génica, detectar mutaciones, o cuantificar ADN o ARN en una muestra. El Eje X: Representa el número de ciclos de PCR. A medida que avanzan los ciclos, la cantidad de ADN amplificado aumenta exponencialmente, si el ADN diana está presente. El Eje Y: Representa la cantidad de fluorescencia detectada, que es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. En qPCR, los gráficos muestran la intensidad de fluorescencia a lo largo de los ciclos, lo que permite cuantificar el ADN. Las curvas de amplificación representan cómo el ADN se amplifica durante los ciclos. Una curva típica comienza plana, luego sube exponencialmente y finalmente se aplanamente nuevamente indicando que los reactivos se agotan. El ciclo umbral (Ct) es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN; un Ct más bajo indica una mayor cantidad inicial de ADN. Si se compara la expresión de un gen específico en diferentes muestras, el gráfico de PCR muestra cuál muestra tiene una mayor o menor expresión del gen en algunos experimentos, la presencia o ausencia de un producto de PCR específico puede indicar la presencia de una mutación.

-Extracción de gDNA.



gDNA extraction *Aspergillus*

Fig 7. Extracción de gADN *Aspergillus sp* MACROGEN INC. 2024

Análisis. En la fig. 7. Se observó la extracción de gADN, del TapeStation gDNA Screen Tape 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. Hace referencia al ADN extraído de células o micelio, el cual contiene la información genética completa de un organismo con base a la cantidad, calidad, o características del ADN total extraído de una muestra antes de la secuenciación. Los cebadores deben estar especialmente diseñados para garantizar una alta especificidad y generar amplicones que varían en tamaño de 100 a 150 pb. Después el genotipado se llevó a cabo en los laboratorios de MACROMEDIA INC. Corea del Sur, cumple con un protocolo de calidad estándar para procesar el proyecto de investigación, el cual consta de las siguientes etapas: preparación de la muestra, preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis bioinformático. En cada uno de los pasos se cumple el control de calidad de la muestra, el control de calidad de la biblioteca y el control de calidad de los datos para finalizar el proyecto terminado. con certificación de Illumina CSpRo™ certificación para laboratorios de secuenciación e Illumina Genome Network. “Para determinar el método DNA QC METHOD se realizó mediante el método del sistema QuantiFluor® dsDNA* utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo**. MacroGen cuantificó el material genómico de partida mediante cuantificación basada en fluorescencia. Dado que la cuantificación basada en fluorescencia utiliza colorantes específicos de ADN de doble cadena, este método cuantifica el dsDNA con mayor precisión que el basado en espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Se utilizaron los siguientes aparatos: * Sistema QuantiFluor® dsDNA (Promega, cat. n.º E2671). ** Lector de microplacas multimodo VICTOR Nivo (PerkinElmer, n.º de pieza HH35000500). Para la evaluación del estado del ADN: se utiliza el bioanalizador 2100*** (o 4200 TapeStation****). Se verificó la integridad del ADN genómico utilizando un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies (o 4200

TapeStation). Para determinar el método RNA QC METHOD se realizó mediante el método de ensayo de ARN RiboGreen Quant-it™* utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo**. MacroGen cuantificó el material genómico de partida mediante cuantificación basada en fluorescencia. El reactivo de ARN RiboGreen Quant-it™ también se une al ADN. Por lo tanto, se recomendó utilizar un pretratamiento con ADNasa sin ARNasa para una medición precisa de la concentración. * Kit de ensayo de ARN RiboGreen Quant-it (Invitrogen, cat. n.º R11490) ** Lector de microplacas multimodo VICTOR Nivo (PerkinElmer, n.º de pieza HH35000500). Para la evaluación del estado del ARN: se utilizó el bioanalizador 2100*** (o el TapeStation 4200****). Se comprobó la integridad total del ARN utilizando un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies (o el TapeStation 4200). El uso de ARN degradado puede provocar bajos rendimientos, sobre-etiquetado del extremo 5' de la molécula de ARN o crear fallas del protocolo, por lo que se utilizó muestras de ARN de alta calidad. *** 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Part# G2939BA).**** 4200 TapeStation System (Agilent, Part# G2991BA)“. (MACROGEN,2024)

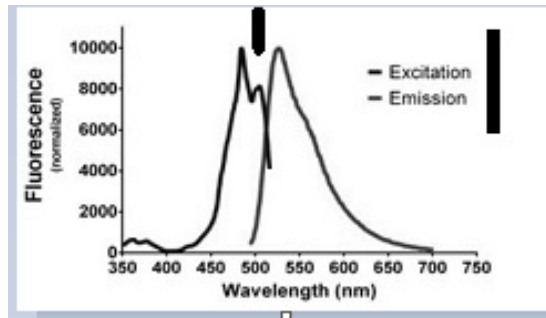
Interpretación. Una alta concentración: Indica una buena cantidad de ADN extraído, lo cual es esencial para la secuenciación. Si no hay suficiente ADN, la calidad de la secuenciación puede verse comprometida.

Baja concentración: Puede indicar problemas con la extracción o que la muestra tiene baja cantidad de ADN. El gADN genómico es el ADN que contiene la información genética completa de un organismo, incluyendo todos los genes y regiones reguladoras presentes en su genoma. Hasta este momento se desconoce que especie podría ser.

-Técnica de qPCR.

fragmentación del ARN durante la preparación. Es decir, se refiere a ADN complementario (complementary DNA). Este tipo de ADN se genera a partir del ARN mensajero (mRNA) mediante un proceso llamado transcripción inversa. El cDNA se usa para crear una biblioteca de secuenciación. Los fragmentos de cDNA se preparan añadiendo adaptadores en sus extremos. Estos adaptadores permiten que los fragmentos se unan a la superficie del flujo de celda y se amplifiquen durante el proceso de secuenciación.

-dsDNA



Se refiere al ADN de doble cadena, si tiene una alta Concentración: Un valor alto en el gráfico indica una buena cantidad de ADN de doble cadena, lo cual es ideal para la secuenciación. Por ejemplo, concentraciones superiores a 10 ng/μL son generalmente consideradas 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, la ADN de doble cadena se desnaturaliza en ADN de cadena simple para permitir la lectura de las secuencias de nucleótidos. Durante la secuenciación, se lleva a cabo una amplificación y lectura de estos fragmentos de ADN para determinar la secuencia correcta de nucleótidos. En MacroGen es el FASTQ Files que contienen las secuencias de nucleótidos leídas directamente de la máquina de secuenciación, acompañado de información de calidad.

- Informe de SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA (Shotgun Metagenomic Sequencing Report): Resultado de datos. *Aspergillus sp* (MACROGEN)

Este informe está formado por las siguientes partes a analizar:

2.0-Estadística de datos sin procesar. (Raw Data Statistics.)

El apartado consta de:

A-Flujo de trabajo experimental. MacroGen.

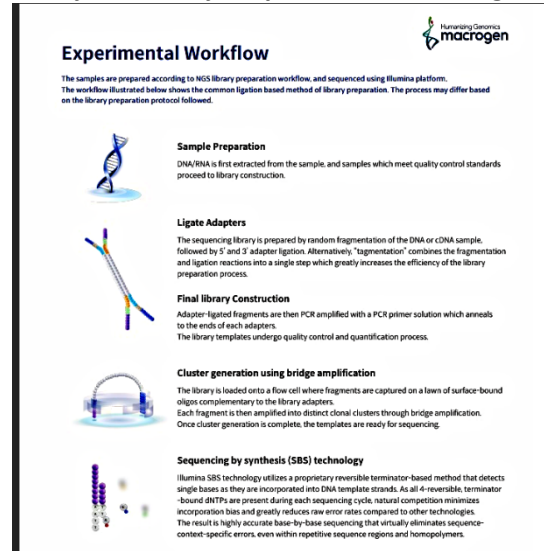


Fig. 10 . Flujo de trabajo de MacroGen.

En este apartado las muestras se preparan según el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Así por ejemplo: **Preparación de la muestra.** Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. **Adaptadores Ligase.** La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptador 5' y 3'. Alternativamente, la "marcación" combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. **Construcción final de la biblioteca.** A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recogen en los extremos de cada

adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. **Generación de clústeres mediante amplificación de puentes.** La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de la biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puente. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. **Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS).** La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de ADN molduras. Dado que todos los dNTP 4 reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros. **Química de cuatro, dos y un canal.** Los sistemas que utilizan la química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos. **Generación de datos brutos.** El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada base, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ

utilizando bcl-convert, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas.

E. Tabla de datos brutos.

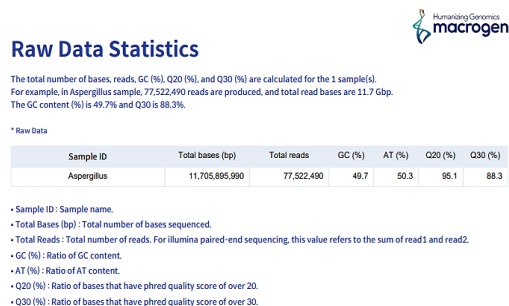


Fig 11. Tabla de datos brutos. Macrogen.

El raw data statistics o estadística de datos brutos, consta de: muestra ID, total de bases, total de lecturas, %GC, %AT, %Q20, %Q30 y calidad de ciclo, que se detalla a continuación:

1.1-Muestra ID:

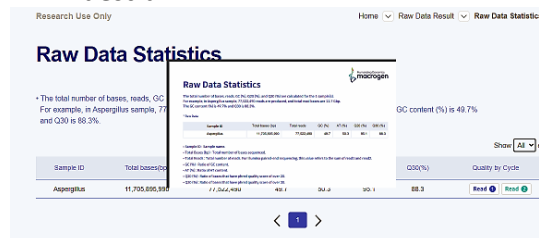


Fig. 12 . Identificación de muestras.

Es un código único asignado a cada muestra para distinguirla de otras en el mismo experimento. Cada muestra se registra con ID es decir es una identificación única para cada muestra y permite darles seguimiento durante cada etapa del proceso, es una clave para la identificación genómica.

Valor. La muestra enviada se identificó como Aspergillus.

Interpretación. Se refiere a un identificador único asignado a una muestra específica que se envía para análisis. Este ID permite rastrear y gestionar las muestras a lo largo de todo el proceso de análisis, desde la recepción y el procesamiento hasta la entrega de los resultados. Es determinante para asegurar que los datos y los resultados obtenidos se asocien correctamente con la muestra correspondiente, evitando confusiones y

asegurando la precisión en la investigación o diagnóstico que se lleve a cabo.

1.2-Total de bases de un genoma: bp

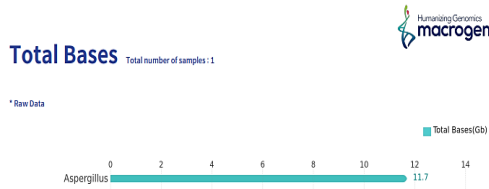


Fig 13 . Total de bases obtenidas. MacroGen Valor. 11,705,895,990 pb

Análisis: Este valor indica 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 analizada. Es decir recuento de cuantas Guaninas, Citocinas y Adeninas y Timinas en la muestra. Es decir 5,735,889,035.1 fueron GC que contienen este número de nucleótidos que contienen la base nitrogenada GC y 5,852,947,,995 fueron AT es decir que hay este número de nucleótidos que contiene la base nitrogenada AT. En porcentaje el total de bases secuenciadas en Gb expresada en porcentaje fue del 11.7, es decir la cantidad total de nucleótidos o base nitrogenadas presentes en la muestra de ADN. En su efecto el 11.7 la cantidad total en picomoles presentes en la muestra analizada.

Interpretación. Se refiere al conteo total de nucleótidos presentes en el genoma de la muestra, se asocia con la secuenciación de genomas de alta capacidad, esto implica que se están analizando y contabilizando todas las bases (A, T, C y G) que componen el ADN de la muestra. Si es alto el valor indica una gran cantidad de datos secuenciados, lo que generalmente mejora la capacidad para capturar una imagen completa del microbiota presente. Si es bajo indica cobertura insuficiente y limitar la capacidad para detectar especies raras o en baja abundancia. Las bases se identifican así: Adenina (A): color

Verde. Citosina (C): Azul. Guanina (G): Negro. Timina (T): Rojo. Un gráfico de calidad con un pico verde sugiere que las secuencias en esa región son confiables y tienen pocas probabilidades de contener errores. Un gráfico de color amarillo suele indicar una calidad media o intermedia en los datos de secuenciación o análisis genético. Esto significa que las lecturas o señales en esa región pueden no ser tan confiables. Un gráfico de color rojo esto sugiere que las lecturas en esa región tienen una alta probabilidad de contener errores o ser poco confiables. En otros acápites un color negro indica Guanina, naranja es Timina, amarillo es Adenina y verde es Citocina.

1.3-Total lecturas:

Raw Data Statistics

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 1. For example, in Aspergillus sample, 77,522,490 reads are produced, and total read base: The GC content (%) is 49.7% and Q30 is 88.3%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases (bp)	Total reads
Aspergillus	11,705,895,990	77,522,490

Fig. 14 . Total, de lecturas. MacroGen. Valor. 77,522,490.

Análisis: El número 77,522,490 entonces el valor total sería 77,522. Esto podría indicar que en total se han registrado 77,522 lecturas (o “reads”). Se producen lecturas 77.522.490 y las bases de lectura totales son de 11,7 Gbp. En otras palabras el 66 % de lecturas de ADN es la proporción de secuencias fueron leídas exitosamente de los fragmentos de ADN que han sido secuenciados y luego se ensamblan o se alinean para reconstruir la secuencia completa. Este porcentaje indica también que se ha secuenciado correctamente y ha generado datos de calidad y el resto 34 % podría corresponder a lecturas fallidas o de baja calidad o que no pudieron ser alineadas o ensambladas correctamente

Interpretación. Se refiere al número total de lecturas o reads en inglés. Que son generadas durante el proceso de secuenciación de una muestra de ADN. Las lecturas son fragmentos de ADN que se han secuenciado, y cada

lectura representa una parte del material genético que ha sido analizado. Un mayor número de lecturas generalmente indica una mayor cobertura del genoma, lo que puede resultar en una mayor precisión y confiabilidad en los resultados del análisis. De tal forma que es una métrica importante para evaluar la calidad y la cantidad de datos obtenidos en un experimento de secuenciación. Indica si hay altos valores: hay una cantidad significativa de datos secuenciados, lo que generalmente mejora la capacidad de capturar una imagen completa del microbiota presente.

1.4-GC/AT Content:

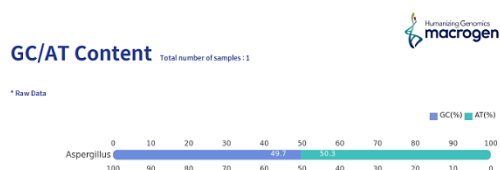


Fig. 15 . Contenido de nucleotidos. Macrogen.

Valor. GC % 49.7 y AT % 50.30

Análisis: Indica que hay 49.7 % de Guanina-Citocina y un 50.30% de Adenina-Timina.

Interpretación. Se refiere al contenido de las bases nitrogenadas guanina (G), citosina (C), adenina (A) y timina (T) en una secuencia de ADN. Es un indicador de la composición de la secuencia y puede influir en propiedades como la estabilidad del ADN y la temperatura de fusión (Tm). Un alto contenido GC indica una mayor proporción de guanina y citosina en las secuencias. Si es alto el contenido AT indica una mayor proporción de Adenina y Timina.

1.5-GC Contenido:

GC/AT Content Total number of samples : 1

* Raw Data



Fig. 16 . Contenido de bases GC. Macrogen

Valor. The GC content (%) is 49.7%

Análisis: Indica un contenido de 49.7 % de GC en una secuencia de ADN sugiere un equilibrio considerable entre los pares de bases GC y AT, lo que puede influir en la estabilidad y propiedades de la secuencia de ADN. Porcentaje GC: Indica que el 50% de las bases en la secuencia de ADN son guanina o citosina, mientras que el 50% restante son adenina o timina. Este porcentaje es una medida del equilibrio entre estos dos tipos de pares de bases en una secuencia.

Interpretación. Es el porcentaje de Guanina y Citosina en una secuencia de ADN. Un alto contenido de GC generalmente sugiere una mayor estabilidad de la doble hélice, debido a la formación de tres enlaces de hidrógeno entre G y C, en comparación con los dos enlaces de hidrógeno formados entre A y T.

1.6-AT Contenido:

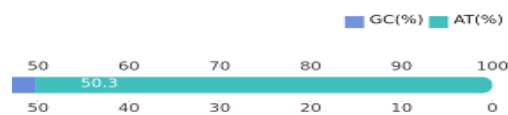


Fig. 17 . Contenido de bases AT. Macrogen.

Valor. 50.3

Análisis: El valor "55.0 AT %" se refiere al porcentaje de contenido de pares de bases adenina-timina (AT) en una secuencia de ADN. Es decir que la composición del ADN las bases adenina (A) y timina (T) se emparejan entre sí mediante dos enlaces de hidrógeno. El contenido AT en una secuencia de ADN se refiere a la proporción de bases adenina y timina en comparación con las bases guanina

y citosina. Un porcentaje AT de 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, existiendo un equilibrio en las pares de bases.

Interpretación. Es el porcentaje de adenina y timina en la secuencia indica un bajo contenido de GC y un alto contenido de AT pueden hacer que la cadena de ADN sea menos estable y más propensa a desnaturalizarse a temperaturas más bajas. El contenido de GC/AT puede ser importante para evaluar la calidad de una secuencia y para interpretar ciertos resultados, como la eficiencia de amplificación en PCR o la predicción de la estructura secundaria del ARN.

1.7-Las métricas Q20 y Q30:

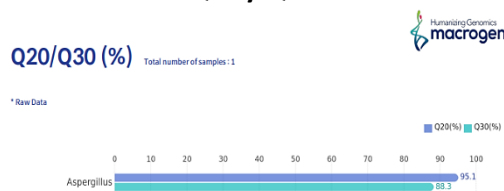


Fig. 18 . Contenido de bases métricas. Macrogen

Valor. Q 20 95.1 y Q 30 88.3

Análisis: Un valor de Q 20 de 95.1 nos indica que tiene un score alto, lo cual es bueno, porque si fuese bajo indicaría baja calidad lo que no sucedió.

Interpretación. Altos valores indican que una alta proporción de las bases tiene un score de calidad alto, lo que sugiere lecturas precisas y fiables. Una baja proporción de bases con scores Q20 o Q30 indica una menor calidad de las lecturas, con una mayor probabilidad de errores en las bases. Una alta proporción de bases Q30 es especialmente deseable, ya que indica una secuenciación de alta calidad con bajos niveles de error. Q20: porcentaje de bases con una calidad de valor phred o medida logarítmica igual o superior a 20. Esto

es la probabilidad de encontrar 1 base incorrecta de cada 100 bases, o una precisión de 99%. **Q30:** Indica que el 99.9% de las bases secuenciadas tienen un 99.9% de probabilidad de ser correctas. Este es un estándar de calidad más alto que el Q20 y se considera excelente. Q30: porcentaje de bases con una calidad de valor phred igual o superior a 30. Esto es la probabilidad de encontrar 1 base incorrecta cada 1000 bases, o una precisión de 99.9% **Q20:** Indica que el 95% de las bases secuenciadas tienen un 95% de probabilidad de ser correctas. Se considera que una lectura Q20 es de buena calidad. El valor Q20 representa un nivel bajo de errores en la secuenciación. También nos indica el porcentaje total de las lecturas que alcanzan esos umbrales de calidad. Por ejemplo, si se indica que el 90% de las lecturas tienen una calidad Q30, significa que el 90% de las bases secuenciadas son altamente confiables. En otras palabras, Q20: con 99% de precisión (1 error por cada 100 bases). Q30: con 99.9% de precisión (1 error por cada 100 bases).

1.9-Calidad por ciclo:

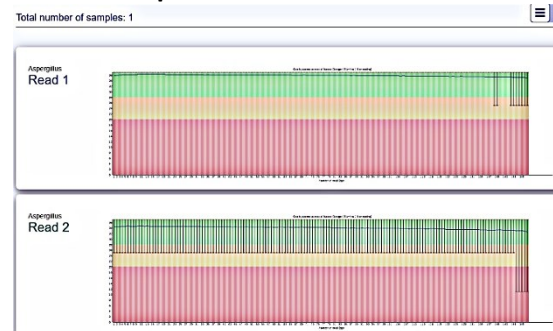


Fig. 19. Calidad de datos por ciclos Macrogen

Valor: Q30 valor alto, intermedio entre Q20 y Q30, y Q30 menor a Q20 indica valor bajo.

Análisis: En la lectura 1 lectura 2 indica grado de identificación en cada uno de esos ciclos. Se representa comúnmente en un gráfico donde el eje X muestra los ciclos en las posiciones en la secuencia, y el eje Y muestra una medida de calidad, a menudo en forma de puntaje de calidad como el valor Q. Es un análisis de calidad realizado por FASTQC para lecturas brutas del genoma del Aspergillus. En

la parte alta se refiere a la calidad. En la parte baja se observa en sentido 5" a 3 " y viceversa en sentido contrario. Eje X son las bases y el eje Y el valor de Q30 Los colores representan la calidad , así el verde indica calidad alta, amarillo indica calidad intermedia y calidad baja el rosado. Un valor alto de calidad por ciclo sugiere que la secuenciación es precisa y que se identifican correctamente las bases en ese ciclo específico. Un valor bajo podría indicar problemas con la lectura en ese punto, como errores de secuenciación o problemas con la muestra.

Interpretación. Se refiere a la calidad de los datos generados, se evalúa en relación con cada ciclo de secuenciación. Esto significa que la calidad de los datos se monitoriza continuamente a medida que se realiza la secuenciación, permitiendo detectar y corregir errores en tiempo real, lo que a su vez asegura que los resultados finales sean más precisos y confiables. Es un punto crítico de control ya que la calidad de los datos puede influir significativamente en las interpretaciones y conclusiones que se derivan de estudios genéticos, ya que asegura la calidad a lo largo de cada ciclo.

F. Entregas. Deliverables.

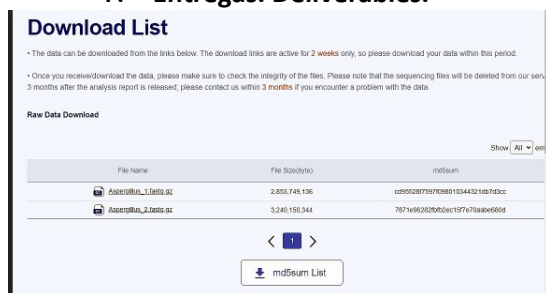


Fig 20. Entregas. Macrogen.

Valor. Los datos se pueden descargar desde los siguientes enlaces. Los enlaces de descarga están activos solo durante 2 semanas, así que descargue sus datos dentro de este período. Una vez que reciba/descargue los datos, asegúrese de verificar la integridad de los archivos. Tenga en cuenta que los archivos de secuenciación se eliminarán de nuestro servidor 3 meses

después de que se publique el informe de análisis.

Raw Data Download

Interpretación- Es una Lista de descargas. Los datos para este pedido se entregan en PDF al usuario o cliente. Están en plataforma por 3 meses. Se da también una Información del disco duro **HDD**. El siguiente diagrama muestra cómo se guardan los entregables dentro del disco duro para ayudarlo a navegar por los archivos. Se envían en Excel, Note Pade/ Block de notas y archivos comprimidos para revisión por el usuario.

D.Apéndice o Appendix.

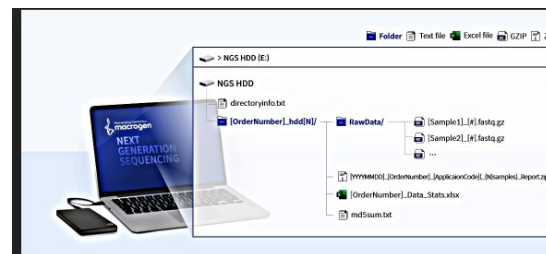


Fig. 21. Apendice

Valor. Los datos NGS tienden a tener un tamaño de archivo grande, lo que hace que sea más probable que se corrompan durante la transferencia de archivos. Por lo tanto, es importante que verifique la suma md5 de los archivos después de recibirlos para asegurarse de que lo que recibió es lo que le dimos.

Este comprende **FAQ**, se refiere a "Frequently Asked Questions" (Preguntas Frecuentes). (Macrogen,2024)

FASTQ es un formato de archivo utilizado para almacenar datos de secuenciación de ADN. Es un estándar en bioinformática para representar tanto las secuencias de nucleótidos como las calidades de las secuencias obtenidas durante el proceso de secuenciación. Para poder leer las lecturas de las bases de nucleótidos los archivos se convierten en otro programa llamado **FASTA** de lectura fácil para leer toda la secuenciación completa en proceso de curar. El archivo pesa 13.5 Gb.

Valor. Nombre de la muestra enviada fue Aspergillus.

Interpretación. Este nombre fue adjudicado por el cliente a los servicios de MacroGen , para que pueda ser identificado durante todo el tiempo que dure la secuenciación en cada paso.

2.2-Datos brutos (Raw data)

Data Statistics	
Sample name	Raw data (n)
Aspergillus	38,761,245

Valor. 38,761.245 n

Análisis: La cantidad de 38,761.245 n es el numero de lecturas o fragmentos de ADN que fueron generados durante el experimento. Este numero lo da la maquina de secuenciacion.

Interpretación. Raw data (datos en bruto): Son los datos originales y sin procesar que se obtienen directamente del equipo de secuenciación. Estos datos aún no han sido sometidos a pasos de procesamiento como recorte de calidad, eliminación de adaptadores, remoción de contaminantes, o cualquier otro tipo de filtrado.

2.3- Calidad y recorte del adaptador. (Quality and adapter trim.)

Data Statistics		
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420

Fig. 26. Recorte.

Valor. 32,535,420

Análisis. Indica que 32,535,420 fueron eliminados adaptadores no deseados.

Interpretación. Quality trim (recorte por calidad): Esto se refiere al proceso de eliminar las partes de las lecturas de ADN que tienen baja calidad. Las secuencias de baja calidad, generalmente en los extremos de las lecturas, se eliminan para evitar errores en el análisis posterior. Los adaptadores son secuencias cortas de ADN que se añaden a las muestras

durante la preparación para la secuenciación. A veces, estos adaptadores pueden quedar en las lecturas secuenciadas y necesitan ser eliminados porque no son parte del ADN de interés. Este proceso asegura que solo las secuencias relevantes del ADN sean analizadas.

2.4-Eliminación de contaminantes. (Contaminant removal).

Data Statistics			
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)	Contaminant Removal (n)
Aspergillus	38,761,245	32,535,420	30,961,740

Fig, 27. Eliminación de contaminantes o Contaminant removal.

Valor. 30,961,740

Análisis: Se refiere que 30,961,740 es un valor alto que fueron identificadas como contaminantes y eliminadas 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 se está trabajando con una muestra de otro organismo. La remoción de contaminantes es un paso crucial en el análisis de datos de secuenciación para asegurarse de que los resultados sean precisos y reflejen únicamente las secuencias de interés. Esto ayuda a mejorar la calidad y la fiabilidad de los datos finales utilizados en estudios posteriores.

Interpretación. Es el control de calidad, se refiere a: Verificación de la calidad de las muestras. Permitiendo tener que las muestras de ADN o ARN estén intactas y libres de contaminantes. Si los valores son altos indican una buena cobertura, lo que sugiere que la muestra ha sido secuenciada suficientemente para capturar la mayoría de las especies presentes. Si los valores son bajos: Podría indicar que la muestra no está completamente representada, lo que puede llevar a una subestimación de la diversidad.

2.5-Control de calidad de lectura anterior. (QC passed read).

Data Statistics				
Sample name	Raw data (n)	Quality & Adapter trim (n)	Contaminant Removal (n)	QC Passed reads (%)
Aspergillus	30,761,245	31,585,420	30,961,740	79.88

Fig. 28. Control de calidad o qcPassed.

Valor. 79.88 indica que fue aceptado como buen desempeño del proceso.

Interpretación. Calidad de Producto: En un contexto de fabricación o control de calidad, que suele referirse a control de calidad. El valor 79.88 qc passed podría significar que un porcentaje del 79.88% de los productos o unidades han pasado el control de calidad. Esto indicaría una tasa de éxito o conformidad de las unidades revisadas.

3.0-Análisis taxonómico:

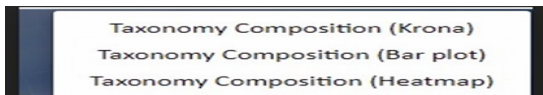


Fig. 29. Contenido del analisis taxonomico. Macrogen

Comprende el estudio del analisis de la composición taxonómica Krona, la composición taxonomica Bar plot, La composición taxonomica Heatmap, la Diversidad Alfa y la Diversidad Beta. Se detalla a continuación:

Interpretación. Se refiere a que las secuencias obtenidas se comparan con bases de datos de referencia, como GenBank o bases de datos especializadas en taxonomía. Se utilizan algoritmos y herramientas bioinformáticas (como BLAST, Kraken, y otros), se identifican las secuencias correspondientes a diferentes taxones. Esto ayuda a clasificar las secuencias en diferentes niveles taxonómicos como reino, phylum, clase, orden, familia, género y especie. A cada ítem se elabora un gráfico. Se genera un informe que incluye las especies identificadas, su abundancia, y cualquier otra información relevante como la presencia de especies raras y otros.

3.1-Taxonomía Krona:

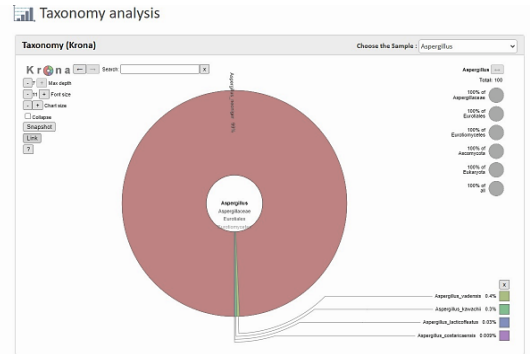


Fig. 30. Taxonomia Krona del analisis taxonomico. Macrogen

Análisis: Se tiene que del reporte de secuenciación, el 99 % se identificó *Aspergillus neoniger*. *Aspergillus vadensis* 0.4%, *Aspergillus kawachii* 0.3%, *Aspergillus lacticoffeatus* 0.03% y *Aspergillus costaricensis* 0.009 %.

Interpretación. El gráfico se compone de varios círculos concéntricos. Donde cada círculo representa un nivel taxonómico diferente (por ejemplo, dominio, filo, clase, orden, familia, género, especie). Los Segmentos Radiales: Los segmentos de cada anillo concéntrico representan taxones específicos en ese nivel jerárquico. Por ejemplo, el círculo más interno podría representar dominios (Bacteria, Archaea, Eucariotes), y los círculos sucesivos representan subdivisiones más específicas. El tamaño de los Segmentos: El tamaño de cada segmento dentro de un anillo concéntrico indica la abundancia relativa del taxón representado en esa categoría. Cuanto más grande sea el segmento, mayor será la abundancia de ese grupo en la muestra es una herramienta de visualización de datos que se utiliza para representar la composición taxonómica de muestras biológicas, especialmente en el ámbito de la metagenómica. Krona permite generar gráficos interactivos parecidos a pastel o radar que muestran la diversidad y la abundancia de diferentes grupos taxonómicos en forma de gráficos circulares o de anillos (doughnut charts), donde cada segmento representa un taxón y su tamaño es proporcional a su

abundancia. Esta forma de análisis puede ser utilizada para analizar datos de secuenciación masiva. Los segmentos más grandes indican una mayor proporción de esa categoría en comparación con los segmentos más pequeños.

3.2 -Diagrama de barras de taxonomía: Bar Plot

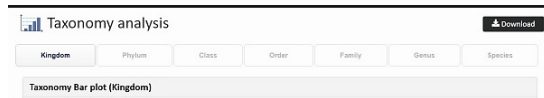


Fig. 31. Taxonomía de Barras del análisis taxonómico. Macrogen

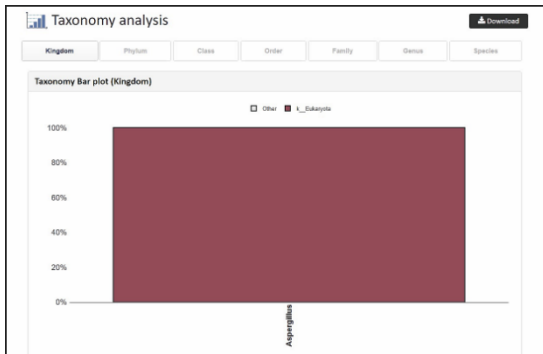
Este apartado comprende Barras de Reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Genero y Especie. Se detalla a continuación.

Interpretación. Es una representación visual utilizada en el análisis de datos metagenómicos, especialmente en estudios de microbiomas. Indica que este tipo de gráfico permite visualizar la composición taxonómica de las comunidades microbianas presentes en una muestra. Cada barra en el gráfico representa un grupo taxonómico (como reino, phylum, orden, clases, especies, géneros, familias) y su longitud corresponde a la abundancia relativa de ese grupo en la muestra analizada. Los colores distintivos: Generalmente, cada taxón o grupo se representa con un color diferente, lo que facilita la visualización y comparación de las diferentes especies o grupos presentes en la muestra. Estos gráficos son especialmente útiles para comparar las comunidades microbianas entre diferentes muestras, permitiendo observar diferencias en la diversidad y composición. Cada barra está dividida en segmentos de diferentes colores, donde cada color representa un taxón específico (especie, género, familia, orden, clase, familia y phylum). la longitud de cada segmento dentro de una barra indica la proporción del taxón en esa muestra. Así por ejemplo un color podría estar asociado con una especie particular, mientras que otro color representa una especie diferente. , las barras de diferentes colores podrían indicar

distintas condiciones experimentales, tiempos de muestreo o ubicaciones geográficas. El análisis se puede hacer según la lectura, puede ser: Verde: Alta calidad. Amarillo: Calidad media, que requiere revisión. Rojo: Baja calidad, generalmente descartada. Cada color en un barplot puede representar una categoría taxonómica específica, como diferentes especies, géneros o familias. Por ejemplo, un color podría estar asociado con una especie particular, mientras que otro color representa una especie diferente. Su Interpretación. Es por distribución de Colores: los colores en las barras para identificar los diferentes taxones presentes y su abundancia relativa. Un segmento largo indica un taxón dominante en esa muestra. O por comparación entre Muestras: Se puede comparar las barras entre diferentes muestras para ver cómo varía la composición taxonómica se refiere generalmente a una representación gráfica que muestra datos de manera comparativa. Un gráfico de barras podría ser utilizado para analizar aspectos de los resultados obtenidos, como la abundancia de diferentes especies, la calidad de la secuenciación, la distribución de variantes genéticas. En un gráfico de barras, cada barra representa una categoría o un grupo y su altura indica la cantidad o el valor de esa categoría. Un gráfico de barras podría mostrar la cantidad de lecturas o secuencias asignadas a diferentes especies en una muestra ambiental. Si tiene diversidad Alta: Si una muestra tiene muchos colores y cada segmento tiene una longitud similar, eso indica una alta diversidad taxonómica o diversidad Baja: Si hay una muestra tiene uno o dos colores predominantes y los otros segmentos son muy pequeños, eso indica baja diversidad taxonómica.

-Diagrama de barras de Reino. (bar plot kingdom).

Fig. 32 .Diagrama de barras de Reino del análisis taxonómico. Macrogen



Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus*, es clasificada como del **Reino Fungi**. Son **Eucariotas** porque su reproducción es por esporas.

Interpretación. Si hay abundancia de Reinos: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes reinos. O referirse a Comparación entre Muestras: una muestra podría tener una mayor proporción de un reino específico en comparación con otra muestra.

-Diagrama de Barras de Phylum. (Bar plot Phylum)

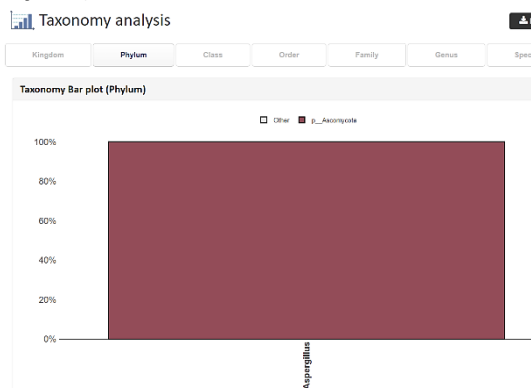


Fig. 33. Diagrama de barras de Phylum del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como del **Phylum Ascomycota**.

Interpretación. Se refiere a una representación gráfica que muestra la abundancia relativa de diferentes filos de

organismos presentes en una muestra biológica. El eje X suele representar los diferentes filos (plural de phylum), que son categorías taxonómicas en la jerarquía de los organismos. El eje Y muestra la abundancia relativa de cada filo, que puede ser en términos de porcentaje, número de lecturas, o alguna otra medida de abundancia. Es útil para identificar cuáles filos son predominantes en una muestra específica. Abundancia de Filos: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes filos.

- Diagrama de barras de Clase. (bar plot Class.)



Fig. 34 .Diagrama de barras de Clase del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus uessalvadorensis* es clasificada como de la **Clase Eurotiomycetes**

Interpretación. Se refiere a grupos taxonómicos o clases de expresión génica, que se representan en el gráfico de barras. Cada barra en el gráfico podría representar la cantidad de ADN de una especie específica para cada categoría. Si hay abundancia de Clases: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre las diferentes clases.

-Diagrama de barras de Familia. (bar plot Family).



Fig. 35. Diagrama de barras de Familia del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como de la **Familia Aspergillaceae**

Interpretación. Podría referirse a un conjunto de gráficos de barras que se utilizan para representar datos en diversas aplicaciones relacionadas con la biología, la genética o la bioinformática. Permite identificar cuáles muestras tienen perfiles similares o diferentes. Esto puede ayudar a agrupar muestras con características similares.

-Diagrama de Barras de Orden (bar plot Order).

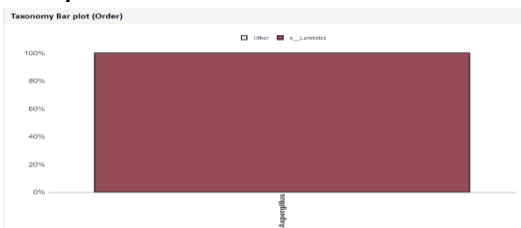


Fig. 36. Diagrama de barras de Orden del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como de **Orden Eurotiales**

Interpretación. Podría referirse a un conjunto de gráficos de barras que se utilizan para representar datos. Una abundancia de Órdenes: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre los diferentes órdenes. Si hay una comparación entre Muestras: Puedes comparar la composición de los órdenes entre diferentes muestras o condiciones experimentales. Por ejemplo, si

un orden es más abundante en una muestra en comparación con otras, esto puede indicar una característica distintiva de esa muestra.

-Diagrama de barras de Genero (bar plot Genus).

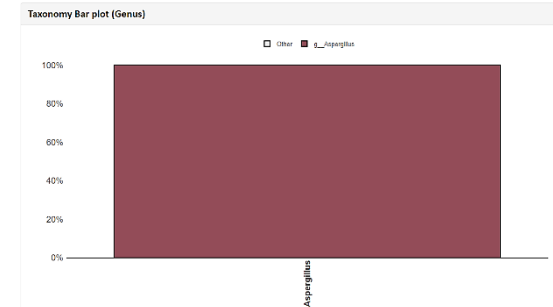


Fig. 37. Diagrama de barras de Genero del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador de *Aspergillus* es clasificada como del **género Aspergillus**.

Interpretación. Se refiere a una representación gráfica que muestra la abundancia o la frecuencia de diferentes géneros de organismos en una muestra o conjunto de datos. Cada barra representa un género específico y su longitud es proporcional a su abundancia relativa en la muestra analizada.

- Diagrama de barras de Especies (bar plot de species).

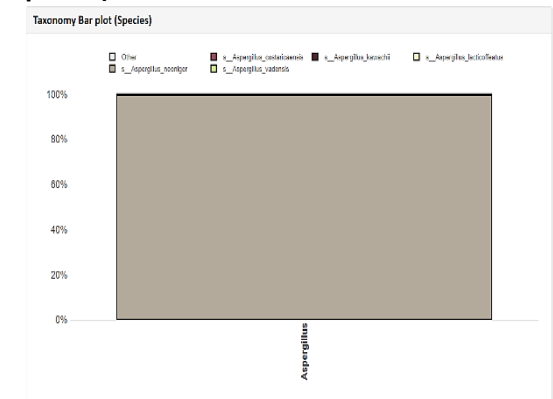


Fig. 38. Diagrama de barras de Especie del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la **Especie neoniger** por estar registrada en 2014. Pero se hace la observación con pruebas documentales, periciales y testimoniales que se realizaron estudios

preliminares de aislamiento en 2006 de caracterización macroscópica y microscópica de *Aspergillus* de este mismo hongo en los años 2006, estudios de microscopía simple y microscopía electrónica de barrido y PCR del hongo encontrado en 2008 y publicado en revista *El Universitario* en 2008, luego se realizó la extracción de gDNA, qPCR, cADN en 2024 por MACROGEN INC. Metagenome Shotgun Sequencing Reports. Se aclara que según las normas internacionales de taxonomía actuales vigentes, puede aceptarse el término subespecie porque aun no se ha definido y aceptado por nombre de secuenciación DNA, si hay referencias documentadas de que se llamó anteriormente dicha especie por diferencia genética, nicho ecológico (semilla) y Geolocalización como es la zona norte de Morazan de El Salvador, perfectamente puede adjudicarse la subespecie derivada de la especie y género. En consulta por email al máximo exponente de designación de nomenclaturas taxonómicas, el **Dr. Wreuter Werner**² se cita "Si el nombre de la especie fue publicado válidamente en primer lugar, con una descripción adecuada y un tipo, entonces su publicación posterior basada en una secuencia de ADN (que actualmente no se acepta en lugar de una descripción) no tiene estatus en la nomenclatura. Actualmente no es posible validar el nombre de un nuevo taxón (por ejemplo, una subespecie con el mismo epíteto final) citando la secuencia de ADN como el tipo. Las propuestas correspondientes fueron rechazadas en el reciente Congreso Botánico Internacional en Madrid, pero se designó un comité especial para estudiar la cuestión de los "tipos de ADN". De lo contrario, lo mejor que puede hacer es transferir el nombre de la especie actual (no ADN) al rango de subespecie, manteniendo su tipo original. Si ese tipo es insuficiente para una identificación precisa,

tiene la libertad de designar un epítipo (de nuevo un espécimen normal, pero del cual se ha secuenciado el ADN)."

Interpretación. El método de secuenciación sirve para identificar qué especies están presentes y en qué cantidades. Ejes: El eje X generalmente representa las diferentes especies (o grupos taxonómicos), mientras que el eje Y representa las abundancias (que pueden ser cuentas absolutas o proporciones) de esas especies. Barras: Cada barra del gráfico representa la abundancia de una especie específica. La altura de la barra indica la cantidad o proporción relativa de esa especie en comparación con las demás. Abundancia de especies: La altura total de cada barra muestra la abundancia general en la muestra, mientras que los segmentos de diferentes colores dentro de cada barra muestran cómo se distribuye esa abundancia entre las diferentes especies.

3.3-Taxonomía de mapas de calor. (Heatmap taxonomy)

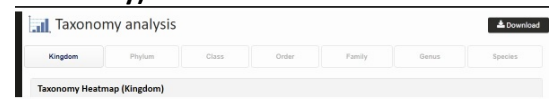


Fig. 39 .Diagrama de Mapas de calor del análisis taxonómico. Macrogen

Este diagrama comprende un mapa de calor clasificadas por Reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Género y Especie. Se detalla a continuación.

Interpretación. Se refiere a una representación visual de la diversidad y abundancia de diferentes taxones de organismos presentes en una muestra biológica. Es una herramienta gráfica que utiliza colores para representar valores cuantitativos en una matriz, lo que permite identificar patrones y comparaciones de manera visual. Los ejes suelen representar diferentes taxones a nivel de especie, género o familia, mientras que los colores indican la abundancia de cada taxón en la muestra

² Nomenclatural Advisor to Flora of North America. Author Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas: (Código de Melbourne).

analizada. Cada celda en el heatmap tiene un color que representa el nivel de expresión si es rojo para alta expresión y verde para baja expresión. Los genes que muestran un patrón similar de expresión en diferentes muestras pueden estar regulados conjuntamente o tener funciones relacionadas. Indican también la intensidad de la correlación entre muestras. Un color más cálido si es rojo puede indicar una alta correlación, mientras que un color más frío como el azul puede indicar una baja correlación. Permite identificar cuáles muestras tienen perfiles similares o diferentes.

-Mapa de calor de Reino. (Heatmap Kingdom).



Fig. 40. Diagrama de calor Reino del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del **Reino Eucaryote**.

Interpretación. Sugiere un enfoque en la representación de datos mediante mapas de calor (heatmaps), que son útiles para mostrar frecuencias o intensidades de diferentes parámetros en un formato visual que permite una fácil interpretación. Si un reino tiene una gran presencia en muchas muestras, su fila correspondiente tendrá un color más oscuro en la mayoría de las columnas, indicando que es el grupo dominante.

-Mapa de calor de Phylum. (Heatmap Phylum).

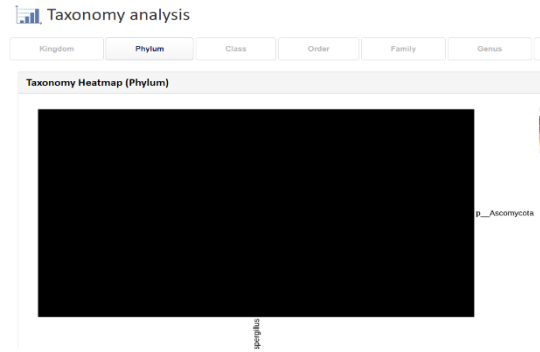


Fig. 41. Diagrama de calor Phylum del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del **Phylum Ascomycota**.

Interpretación. El heatmap phylum o mapa de calor por filo es una representación gráfica que muestra la abundancia relativa de diferentes filos de organismos en una muestra determinada, como una muestra de microbiana. El heatmap permite identificar patrones en la composición del microbioma entre diferentes muestras. Representa Ejes: Generalmente, en el eje horizontal se encontrarán las diferentes muestras analizadas, mientras que en el eje vertical se listarán los diferentes filos de organismos, la intensidad o el color de cada celda en el mapa de calor representa la abundancia relativa de ese filo en la muestra correspondiente. Por lo general, los colores más oscuros o intensos indican una mayor abundancia, mientras que los colores más claros indican una menor abundancia.

-Mapa de calor Clase. (Heatmap Class.)

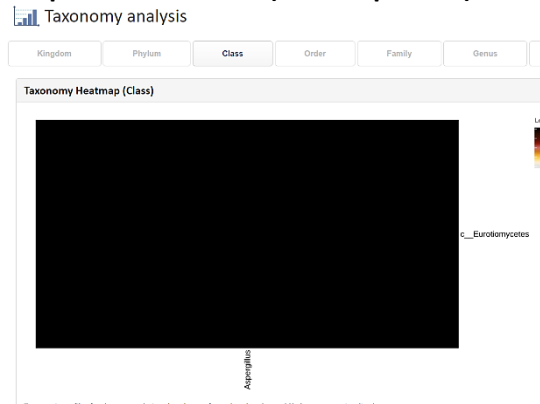


Fig. 42. Diagrama de calor Clase del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la **Clase Eurotiomycetes**.

Interpretación. Se refiere a una herramienta de análisis en el contexto de la bioinformática, es utilizada para visualizar datos de variaciones genéticas o expresiones de genes mediante gráficos de calor (heatmaps). En un hitmap, cada celda del gráfico representa la magnitud de una asociación o una medida de interés, donde los colores indican diferentes niveles de expresión o actividad. Las áreas o genes que muestran mayor actividad suelen representarse con colores más intensos. Los colores más oscuros o intensos: Representan una mayor abundancia relativa de esa clase en la muestra. Colores más claros o apagados: Representan una menor abundancia relativa.

-Mapa de calor de Orden. (Heatmap order.)

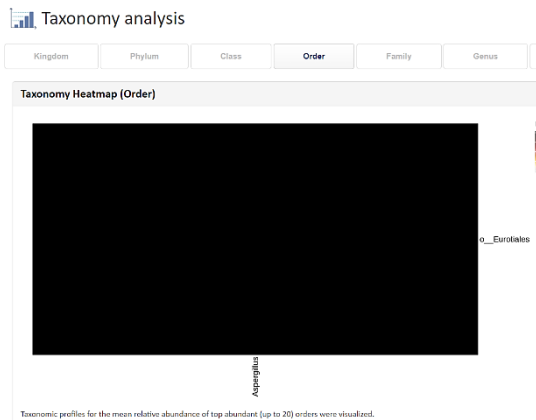


Fig. 43. Diagrama de calor Orden del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la Orden Eurotiales.

Interpretación. Se refiere a la forma en que se organizan los datos en el hitmap. Esto puede incluir el agrupamiento de genes o muestras similares, lo que facilita la visualización de patrones o correlaciones en los datos. Si una fila (orden) tiene colores consistentemente más oscuros en varias columnas (muestras), esto indica que ese orden es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Familia (Heatmap Family.)

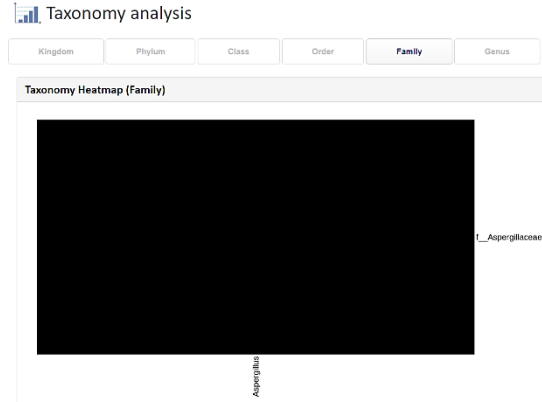


Fig. 44. Diagrama de calor Familia del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la Familia Aspergillaceae.

Interpretación. Si hay dominancia de Familias: Si una fila correspondiente a una familia específica es consistentemente más oscura en varias columnas, esto indica que dicha familia es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Genero. (Heatmap Genus.)

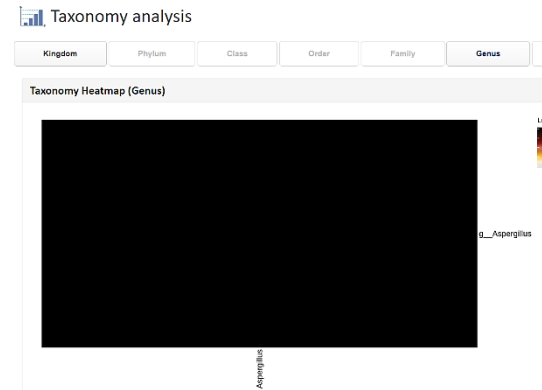


Fig. 45. Diagrama de calor Genero del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como del Genero Aspergillus.

Interpretación. Se refiere a que si utiliza colores para representar datos en una matriz, donde cada celda corresponde a la abundancia de un género particular en diferentes muestras o condiciones. Esto permite identificar patrones en los datos, como la prevalencia de ciertos géneros en

diferentes condiciones experimentales o en distintas muestras biológicas. Dominancia de Géneros: Si una fila correspondiente a un género específico es repetitiva más oscura en varias columnas, esto indica que dicho género es dominante en esas muestras.

-Mapa de calor de Especie. (Heatmap Species).

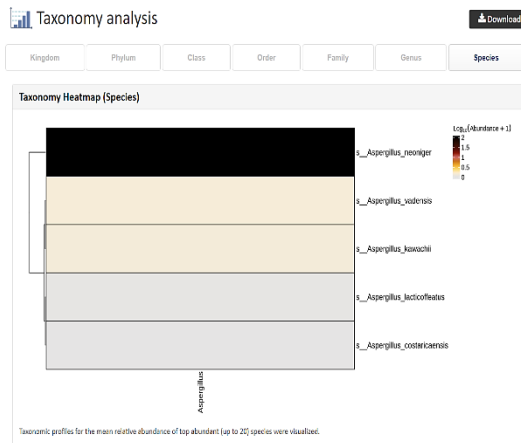


Fig. 46. Diagrama de calor Especie del análisis taxonómico. Macrogen

Análisis: De la muestra enviada de El Salvador es clasificada por secuenciación como de la especie **neoniger**. En la que se observa de otras especies presenta con mayor frecuencia. Se aclara que desde el 2006 se inicio estudio morfologico, en 2007 se hizo acta notarial , en 2008 se registro en CNR y publicacion en repositorio el 2008, por lo que se dio a la espera de la secuenciacion. Pero otros investigadores en el 20011 encontraron una especie llamada neoniger y que en 2014 se secuenció esta especie y se utilizo como base de primer para comparar con otras especies.

Interpretación. Se refiere a un tipo de análisis que muestra la distribución y la abundancia de diferentes especies en un conjunto de datos, generalmente relacionado con datos genéticos o metagenómicos. En este tipo de análisis, se utilizan representaciones gráficas para visualizar cuántas veces se encuentra cada especie en las muestras analizadas. Al utilizar la escala de colores: Los colores indican la abundancia relativa de cada especie en las muestras. Si hay colores más oscuros o

intensos: Indican una mayor abundancia relativa de esa especie en la muestra. O colores más claros o apagados: Indican una menor abundancia relativa. La variación en la intensidad del color permite identificar visualmente qué especies son más abundantes y comparar estas abundancias entre las diferentes muestras.

-Descripción del archivo de resultados.

FORMATO FASTQ: Es un formato utilizado para almacenar datos de secuenciación de ADN. El formato FASTQ contiene información de las secuencias de nucleótidos y sus respectivas calidades. Es ampliamente utilizado en bioinformática y en la secuenciación de nueva generación (NGS). Se utiliza similar a un Block de notas o note pad con extensión txt que en cualquier computadora se puede leer los electroferogramas, que tiene 60 caracteres por región, cuando es para secuenciación de fragmentos pequeños de DNA como 500 pb.

MD5sum: Es un comando utilizado para calcular y verificar el valor hash MD5 de un archivo. El valor hash MD5 es una representación de tamaño fijo (128 bits) de los datos originales, lo que permite verificar la integridad de los archivos. Sirve para comprobar integridad de archivos y evitar errores de transferencia. Se asegura que los archivos de datos genéticos no se corrompan durante la transferencia o almacenamiento. Al calcular el hash MD5 de un archivo en el momento de la creación y luego volver a calcularlo después de la transferencia, puede comprobarse que el archivo no ha sido alterado.

4.-Metodología. (Methods)

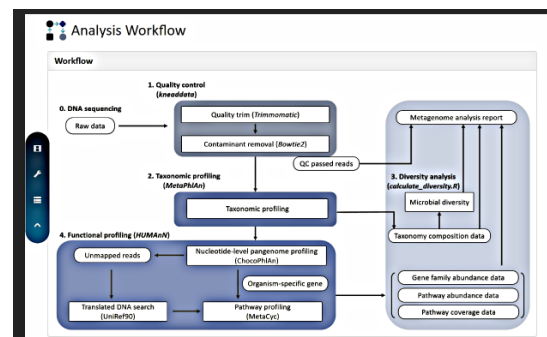


Fig. 47. Metodo empleado.

Se refiere a los pasos utilizados para llegar a los resultados obtenidos provenientes de 1. Control de calidad, 2.Taxonomía, 3.Diversidad alfa y beta y 4. Perfilado funcional.

5.Análisis molecular. *Aspergillus* de la muestra enviada de El Salvador.

Para el analisis molecular se utilizaron los programas BLAST Basic Local Alignment Search Tool,MEGA 11 Molecular Evolutionary Genetics Analysis, CLUSTAL OMEGA Multiple Sequence Alignment program , Nucleotid BLAST program, GENE BANK Genetic Sequence database y otros no menos importantes.

Por análisis de estudios moleculares con el programa Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA). Se determinó que la cepa es del género *Aspergillus* pero su especie es similar pero no igual a la reportada por tipo DNA. Ver Fig 48. Se utilizo las siguientes secuencias de Bases:

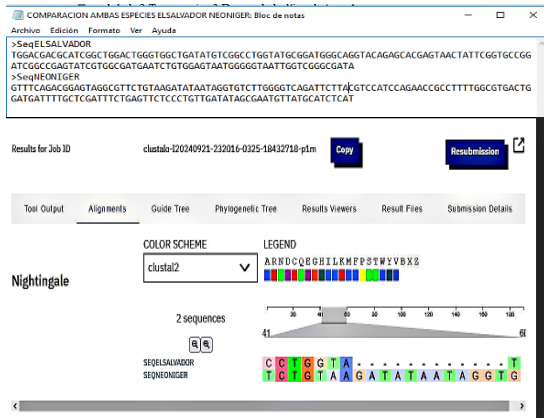


Fig 48. Comparación genoma de las especies de El Salvador y la reportada por tipo DNA según la secuencia de bases.

En la fig 48 se observa que un segmento de secuencias de DNA de El Salvador 1 con la secuencia de la especie neoniger 2 no es igual. La similitud entre las bases Citocina y Guanina se puede observar en el grafico no es un mayor porcentaje que varia en rango entre 40 a 60 la de El Salvador en relación a la cepa neoniger que esta entre 41 a 60 nucleotidos de Pb. Es decir que coinciden CC,GG y AA en un 0.15% con la de la especie neoniger

reportada por tipo ADN. Los espacios en blanco son huecos que no coinciden con la especie neoniger.



Fig 49. Comparacion Clustal 0(1.2.4) multiple secence alignment entre las dos especies EL SALVADOR y especie neoniger.

En la fig 49 se tiene por comparacion Clustal alineamiento multiple entre las dos secuencias en donde se observa la distribución de las bases entre ellas hay diferencias en los nucleotidos 56-54,116-55,151-80 en la comparación de la secuencias entre ellas, la secuencia entre GC y AT se diferencian. Un asterisco indica que coinciden ambas nucleotidos, dos asteriscos es débil la relación. Los espacios en blanco no se han conservado puede que haya habido inserción o deleción.

-Por arbol filogenético se tiene que ambas especies proceden de un origen o árbol filogenético común que son del genero *Aspergillus*. Ver fig. 50.

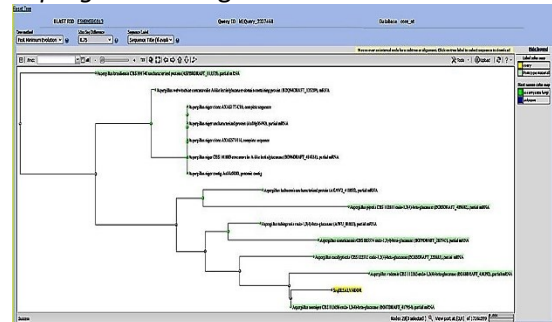


Fig. 50. Phlogenetic tree o árbol filogenético entre las especies.

Se observa a la izquierda el ancestro común que es el del genero *Aspergillus* y a la derecha los cladus. Se denota que de las especies de

niger, neoniger y la de EL SALVADOR en amarillo tienen un nodo con especie neoniger pero que se diferencian por lo que han evolucionado alejándose del genero original ,demostrado por la secuencia de bases anterior son diferentes especies.Las ramas indican relacion entre ellas y la longitud o distancia del ancestro de las ramas representa la cantidad de cambio evolutivo. La del El Salvador ha evolucionado.

Las secuencias en formato FASTA utilizados, son:

```
-----FORMATO FASTA
>uessalvadorensis
TAGTGGCTGGTTACATCCGTGAGCGAATTAATACTCAATCTTATACTCTG
TACTCCATATTTGAGTTTCTCCAAAGTATCATTCTCTGAGGCCAAAGG
TAACACCTCTCCGGACTAGTGAAGTCTTTGGAAGGACTTTGGGGAAACG
TTGGACGACGCATCGGTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCTGGATG
CGGATGGCCAGGTACAGAGCACGAGTAATTCGGTGCCGGATCGGCCG
AGTATCTGGCGGATGAATCTGTGGAGTAATGGGGTAATTTGGTGGCGA
TAGTTTCAGACGGAGTAGCGTTCTGTAAGATATAATAGGTGCTTTGGGG
TCAGATTCTACGT
>neoniger
GGGGTAATTGAATCCGTGAGTGAAGCTAGCCCCGACATGGGGAAGGG
TAAgttgggaggaggaggatcggaccatggctgcagggcagggggggg
gtgggggtgtgTTAATGGTCTGAATGACTCGGTAAGAGAGAAGATTGTG
AGTGAGATTGTGAGAAGTATGATTTTCATCTGGCCAAAGTGAAGAACGAC
CACAAAATATCTGTGAGtagtgccagcagcagcagcagcagaaggatGT
CAGGCTCGCTGAGATTACTGTTTTCCGGATTATTCGCGCTGGGAATTTCT
CCATGGCATGACTTGAACCTCTTCCGCCGAGACAGGCTTAGCGCAGGCG
AGGCAGCTGGGATCCACATCTGTTTGGAGTGGTATCTGACTGCTAA
>niger
GATCTCGGAAGACAAGAAAGATGGAGCGGAAACGAAACTGGTTAGT|
TTACTAAACTTTGGCATCTCCATCTGGCCCATGGAAATACCAGTGACC
CTCCTCCAGGGCCGCTCTGGCGATGAAGTGCACGACTATGGCTACAATT
TTACGAACACACGACGCCACTCAAACAGTAGCGCTAGGGCATTGCGGAC
TTCAAGACAAGATTGAGGCGGTTGAACAGAGCCAGTTTTTGAAGAAAA
CGTGATGGGCCCGGATGCCCTTCTCCGATGACGACATGGTAAGAAAAAC
TTGATAGCATCAACAGCGATAACACCGAAGGTAGTGAAGTCAATTTGAAAC
```

-Tipo de relacion entre las especies uessalvadoriensis, neoniger y niger.



Fig 51. Relación entre las especies de El Salvador, neoniger y niger.

En la fig 51 se observa que las tres especies no coinciden en la secuencia, sino que unicamente en 8 casos alineados que estan señalados con un asterisco coinciden en la secuencia de GGG, CCC, AAA,TTT conservando una relación pero el resto de bases son diferentes. Por lo que las tres especies no son iguales en los lineamientos, por lo que pudieron haber tenido mutaciones o regiones no conservadas.

```
neoniger      TGGTCTGA--ATGACTCGGGTAAGAGAGAGATTGTGAGATTGTGAGAA----- 166
uessalvadorensis TGAGCGAATTAATACTCAATCTTA---TACTCTGTCTCATATTGATGTTCTCCCA 75
niger        TGGTT---AGTTTACT-----A---AACTTGT-----GGATCTCCCA 72
**          : : ***          : : *

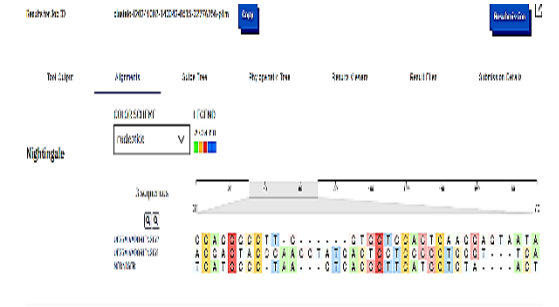
En el contexto de biología molecular y genética, "neoniger" parece ser una designación para una especie o grupo relacionado con las otras secuencias que mencionas, como uessalvadoriensis y niger. Las secuencias que has compartido son comparaciones de ADN o AIN entre estas especies. Aquí hay un desglose de lo que se ve:
1. Secuencias de nucleótidos: Cada línea representa una secuencia de nucleótidos (A, T, C, G) de diferentes especies.
2. Puntos y asteriscos: Los símbolos como . y * indican grados de similitud entre las secuencias.
   - . Un * indica que las bases son idénticas.
   - . y * indican similitudes menores (cambios en la secuencia que son más tolerables).
En el caso que presentas, se puede observar que hay cierta similitud entre "neoniger" y las otras secuencias, aunque también hay diferencias. Esto puede ser indicativo de la relación evolutiva entre estas especies o grupos.
```

Fig. 52. Relación entre las especies de uessalvadoriensis, neoniger y niger.

Se observa que hay diferencias porque la secuencias no hay similitud, en la que las especies han evolucionado en forma diferente en los pares de bases, en forma filogenética si hay diferencias marcadas. Coinciden en TTT, GGG,AAA,CCC en los nucleotidos 166,75,72, lo demas no estan alineadas.

-Comparación de tres secuencias: Aspergillus uessalvadoriensis y neoniger

```
-----
>uessalvadoriensis1
CAGAGGACGAGTACCGAAGGTATGACTGGTCCGGCTCCGTTACCCCACT
TGTTGTGCTTCCCGATCAGTTAACATGTCAGAGACTTAGTCTATCGGC
ACCGTGTCTGCGTAGTCAGACTCCCTGAAGGTGAGGGAGATAGTCTGGA
>uessalvadoriensis2
CCGAAATCATTGAATTGAATGGCCAAATGGCCAGGGCCTTGGTGGTGAC
TCAAGGAGTAATACATTGCTGTGGTTGTATGTACAAAAGTACAGTCCGT
AACTATATCTAACCAAGCCCTCTGTGGAGTCTCAGGAGCAGATAAAGAAG
G
>NEONIGER
TCATGCCCTAACTACGGTTCATGCTCTAACTACGGTTCATGCTTAACTCAC
GGTAAATGCCCTAACTACGGTTCATGCTCTTATCTCATGTTCCATGGGACCC
TTTCGACCGGAGCCGAGCCTTGATTT
```



nucleótidos que corresponde a "uessalvadoriensis1". Los guiones al final indican que hay partes de la secuencia que no están disponibles o son desconocidas. neoniger: Este es el nombre de otra especie o grupo taxonómico. La secuencia CCGAGCCTTGATTC se relaciona con "neoniger". Los Números (151, 150, 134): Estos números podrían representar la longitud de las secuencias de nucleótidos en cada caso. Por ejemplo, "151" podría ser la longitud de la secuencia para "uessalvadoriensis2", "150" para "uessalvadoriensis1" y "134" para "neoniger". En resumen, parece ser un resumen de secuencias de ADN de diferentes muestras o especies, posiblemente en un contexto de investigación genética.

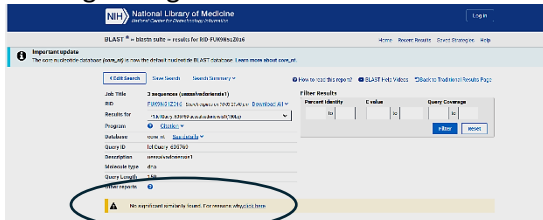


Fig. 55. Secuencias comparadas en programa Blast.

En la Fig. 55 se observa que al comparar las secuencias de fragmentos de uessalvadoriensis con neoniger no se encontró ninguna similitud significativa.

-Marco de lectura abierto del Aspergillus muestra de El Salvador

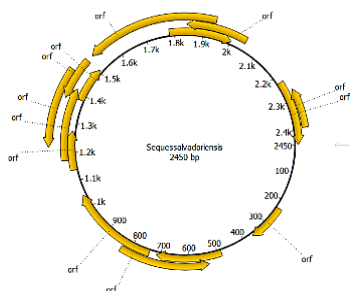


Fig. 56. Gráfico ORF de la secuencia Sequessalvadoriensis de 2450 bp

En la Fig 56 es un gráfico ORF (Marco de Lectura Abierto) circular implica interpretar la representación gráfica de los marcos de lectura en un contexto biológico, generalmente en estudios de genomas. Aquí

tienes algunos pasos para entenderlo: Estructura Circular: El gráfico suele ser circular, representando la secuencia de ADN. Los puntos o segmentos en el círculo corresponden a diferentes regiones del ADN. Marcos de Lectura: Busca los marcos de lectura abiertos, que están señalizados y se presentan como líneas o bloques. Cada ORF representa una posible secuencia de codificación para una proteína. Dirección: Observa 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, un ORF más largo tiene más probabilidades de codificar una proteína funcional. En un gráfico ORF circular, "1.7k" generalmente se refiere a la longitud de un marco de lectura abierto (ORF) que mide 1,700 pares de bases (bp) de longitud. La "k" representa "kilo", que en este caso significa mil. Esto implica que el ORF en cuestión podría codificar una proteína, y su longitud es relevante para entender 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 ORF circular, las flechas suelen tener significados específicos relacionados con la información genética representada. Según Dirección de Transcripción: Las flechas indican la dirección en la que se transcribe el ADN a ARN. Normalmente, apuntan de 5' a 3', que es la dirección en la que se sintetiza el ARN. Orientación del Gen: Pueden mostrar si el gen está en la cadena directa (sense) o en la cadena complementaria (antisense). Una flecha hacia fuera del círculo indica un gen en la cadena directa, mientras que una flecha hacia dentro puede representar un gen en la cadena complementaria. Señales de Promotor o Terminador: Algunas flechas pueden señalar la ubicación de promotores o terminadores, que son elementos reguladores que controlan la transcripción del gen. Relación entre ORF: En gráficos más

complejos, las flechas pueden conectar diferentes ORF o genes, indicando relaciones funcionales o de regulación entre ellos. En un gráfico ORF circular, las flechas que apuntan hacia la izquierda o hacia la derecha generalmente indican la dirección de transcripción de los marcos de lectura abiertos (ORF). Aquí te explico más sobre su significado: Flechas hacia la derecha: Indican que el ORF correspondiente se encuentra en la cadena de ADN en la dirección 5' a 3', lo que significa que se está transcribiendo desde esa cadena. Esto se considera la cadena sense o directa. Flechas hacia la izquierda: Indican que el ORF está en la cadena complementaria, transcribiéndose en la dirección 3' a 5'. Esta cadena se conoce como antisense. 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.

-Análisis build dotplot. (Gráfico de puntos) muestra *Aspergillus*

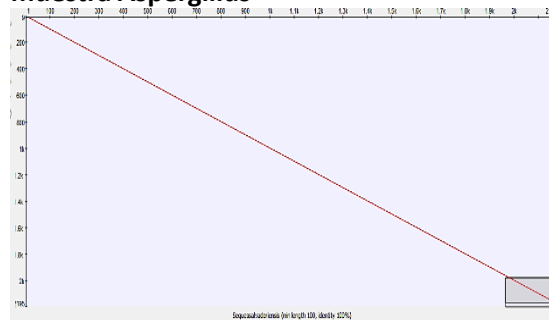


Fig. 57. Gráfico build dotplot de la secuencia *uessalvadoriensis*.

En la Fig 57 el análisis Wild Dotplot es una técnica utilizada en bioinformática y biología molecular para comparar secuencias de ADN, ARN o proteínas. Un dotplot (o "gráfico de puntos") es una representación visual que permite observar la relación entre dos secuencias. En un dotplot: Cada secuencia se representa en un eje (horizontal y vertical). Se coloca un punto donde las bases o aminoácidos de las dos secuencias coinciden. El análisis Wild Dotplot se refiere a un enfoque que utiliza un dotplot para identificar similitudes, divergencias y patrones en las

secuencias: Identificación de Regiones Conservadas: Los puntos agrupados en la gráfica pueden indicar regiones que han sido conservadas a lo largo de la evolución. Detección de Repeticiones: Las líneas diagonales o agrupaciones de puntos pueden revelar repeticiones o patrones dentro de las secuencias. Comparación de Genomas: Es útil para comparar genomas completos, identificando homología entre diferentes especies. Visualización de Variabilidad: Puede ayudar a identificar variaciones en secuencias, como inserciones, deleciones o sustituciones. Interpretación Diagonal: Una línea diagonal indica similitudes continuas entre las dos secuencias. Ruido o puntos dispersos: Puede indicar diferencias significativas o variabilidad entre las secuencias. Un dotplot es una representación gráfica que permite visualizar las similitudes y diferencias entre dos secuencias (de ADN, ARN o proteínas) colocando puntos en un gráfico donde coinciden elementos equivalentes. La línea recta invertida en build dotplot significa: Similitud Inversa: Una línea diagonal que se inclina hacia abajo (invertida) puede indicar que hay similitudes entre las secuencias en el sentido inverso. Esto puede ser indicativo de que una de las secuencias está en la dirección opuesta (3' a 5') o que se está considerando la secuencia complementaria. Reversibilidad: En algunos casos, puede señalar que hay secciones que son complementarias entre sí, sugiriendo que las secuencias son homologadas, pero en orientaciones opuestas. Repeticiones: A veces, una línea invertida también puede señalar regiones repetitivas que han sido reordenadas o invertidas en comparación con una de las secuencias. Estructura de Genes: En el análisis de genes, una línea recta invertida puede representar un gen que está orientado en dirección opuesta a otros genes en la misma región del genoma.

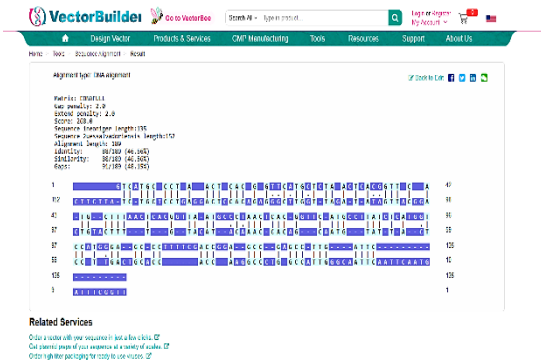


Fig 58. Analisis de las secuencias uessalvadoriensis y neoniger en programa VectorBuilder.

En la Fig 58 es una alineación de secuencias de ADN. Que significa: Números en la Parte Superior: Los números (135, 9) generalmente representan la longitud de las secuencias o la posición de alguna de las secuencias alineadas. Sin más contexto, es difícil decir con certeza qué significan, pero podrían indicar el inicio o la posición de las secuencias. Secuencias de ADN: Las líneas con letras (A, T, C, G) representan nucleótidos de ADN. Los guiones (-) indican posiciones donde hay inserciones o eliminaciones (gaps) en la alineación. Cada letra corresponde a un nucleótido: A: Adenina, T: Timina, C: Citosina, G: Guanina. Alineación: Las líneas con | representan coincidencias entre las secuencias alineadas. Cuantos más se encuentren, más similar es la secuencia en esa posición. Los espacios o puntos (.) pueden indicar que hay una diferencia en esa posición específica entre las secuencias. Interpretación General: Este tipo de alineación se utiliza para comparar dos o más secuencias de ADN y ver cómo se relacionan entre sí. Las similitudes pueden indicar homología, lo que sugiere que las secuencias provienen de un ancestro común o que tienen funciones biológicas relacionadas.

Los resultados de un alineamiento de secuencias de ADN entre dos secuencias: "neoniger" y "uessalvadoriensis". Significa: Alignment type: DNA alignment: Indica que se

trata de un alineamiento de secuencias de ADN. Matrix: EDNAFULL: Se refiere a la matriz de puntuación utilizada para evaluar la similitud entre nucleótidos. EDNAFULL es una matriz comúnmente usada para alineamientos de ADN, que asigna puntajes a las coincidencias y diferencias entre nucleótidos. Gap penalty: 2.0: Este es el costo asignado por introducir un espacio (gap) en el alineamiento. Un valor más alto significa que se penaliza más la introducción de gaps. Extend penalty: 2.0: Este es el costo adicional por extender un gap una vez que se ha introducido. También influye en la forma en que se manejan las inserciones y eliminaciones en la alineación. Score: 268.0: Este es el puntaje total del alineamiento. Un puntaje más alto indica un alineamiento más favorable entre las dos secuencias. Sequence 1 neoniger length: 135: Longitud de la primera secuencia (neoniger) es de 135 nucleótidos. Sequence 2 uessalvadoriensis length: 152: Longitud de la segunda secuencia (uessalvadoriensis) es de 152 nucleótidos. Alignment length: 189: La longitud total del alineamiento, que incluye las secuencias alineadas más los gaps. Identity: 88/189 (46.56%): Indica que hay 88 posiciones en las que las dos secuencias son idénticas, lo que representa el 46.56% de la longitud total del alineamiento. Similarity: 88/189 (46.56%): La similitud es la misma que la identidad en este caso, lo que sugiere que no hay diferencias en la forma en que se están contando (es decir, no se están considerando las similitudes basadas en propiedades químicas de los nucleótidos). Gaps: 91/189 (48.15%): Indica que hay 91 posiciones que son gaps en el alineamiento, representando el 48.15% del alineamiento total. Esto puede sugerir que hay una gran cantidad de diferencias entre las secuencias, o que las secuencias son más diversas en longitud. Resumen El alineamiento sugiere que las secuencias "neoniger" y "uessalvadoriensis" tienen un grado moderado de similitud (46.56%), pero también una alta proporción de gaps, lo que

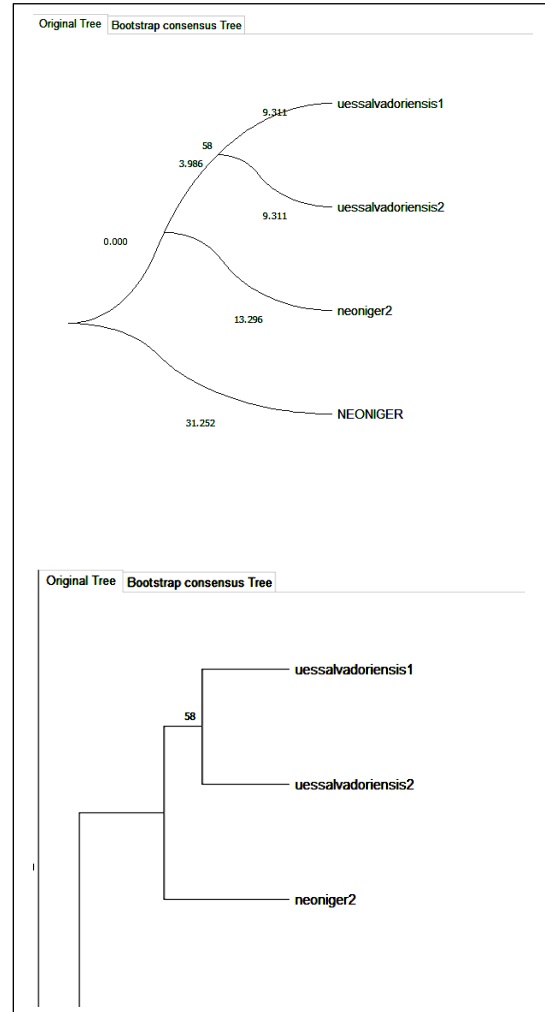
puede indicar variaciones significativas entre ellas.

	1	2	3
1. uessalvadoriensis1			
2. uessalvadoriensis2	1.17		
3. NEONIGER	1.58	1.87	

Fig. 59. A. Distancia de Filogenia de las especies uessalvadoriensis y neoniger.

En la Fig 59 A el valor estimado del parámetro de forma para la distribución Gamma discreta es 23,3524. El patrón y las tasas de sustitución se estimaron según el modelo Tamura-Nei (1993) (+G) [1]. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en las tasas evolutivas entre sitios (5 categorías, [+G]). Las tasas evolutivas medias en estas categorías fueron 0,73, 0,88, 0,99, 1,10 y 1,30 sustituciones por sitio. Las frecuencias de nucleótidos son A = 23,50 %, T/U = 26,50 %, C = 25,35 % y G = 24,65 %. Para estimar los valores de ML, se calculó automáticamente una topología de árbol. La máxima verosimilitud logarítmica para este cálculo fue -580,228. Este análisis involucró 3 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1.º, 2.º, 3.º y no codificante. Hubo un total de 156 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11. Indica una secuencia de ADN o ARN de diferentes muestras, probablemente de un análisis genético. Cada línea parece representar una secuencia diferente, con un nombre de especie o muestra seguido de la secuencia de nucleótidos y su longitud. uessalvadoriensis2 y uessalvadoriensis1 parecen referirse a muestras de una especie que podría ser endémica de El Salvador, dado el nombre. neoniger podría referirse a otra especie o muestra, posiblemente un organismo que ha sido estudiado en el mismo contexto. Los números al final de cada línea podrían indicar la longitud de la secuencia en bases. Los números (1.17, 1.58, 1.87): Estos podrían ser

valores que representan alguna medida, como la distancia genética, la divergencia entre las secuencias, o algún otro tipo de comparación (como tasas de sustitución o medidas de diversidad). En este contexto, Fig.



59. B. Distancia de Filogenia de las especies uessalvadoriensis y neoniger.

podrían indicar la similitud o diferencia genética entre las muestras. Los números como 1.17, 1.58 y 1.87, en el contexto de un análisis genético, generalmente se interpretan como medidas de distancia genética entre las secuencias de ADN de las muestras. Distancia genética: Estas cifras suelen representar la cantidad de cambios o diferencias nucleotídicas entre las secuencias. Un número más bajo sugiere una mayor similitud genética, mientras que un número más alto indica que las secuencias son más

diferentes. Escala: La escala de las distancias puede variar dependiendo del método utilizado para calcularlas (por ejemplo, distancia de Kimura, distancia de Jukes-Cantor, etc.). Es importante saber qué método se usó para interpretar correctamente los valores. Comparaciones: Si consideras que *uessalvadoriensis1* y *uessalvadoriensis2* tienen una distancia de 1.17, esto podría indicar que son bastante similares genéticamente. En cambio, si comparas *uessalvadoriensis1* con *neoniger* y obtienes una distancia de 1.58, esto sugiere que hay una diferencia notable entre ellos. Una distancia de 1.87 entre *uessalvadoriensis2* y *neoniger* indica una diferencia aún mayor, lo que podría significar que estas dos especies están más distantes evolutivamente. Interpretación evolutiva: Estas distancias pueden proporcionar información sobre la historia evolutiva de las especies, ayudando a construir árboles filogenéticos que muestren las relaciones entre ellas. En el contexto de filogenia, una "posición" de 58 generalmente se refiere a una ubicación específica en un árbol filogenético, que es una representación gráfica de las relaciones evolutivas entre diferentes especies o grupos. **En la Fig 59 B** Aquí hay algunas interpretaciones posibles: Número de posición: Puede indicar que una especie ocupa el puesto 58 en el árbol filogenético. Esto significa que, al contar desde la raíz del árbol hacia las hojas (las especies más modernas), esa especie en particular se encuentra en la posición 58 lo que indica que ha habido una divergencia evolutiva. Longitud de ramas: En algunos árboles filogenéticos, los números pueden estar relacionados con la longitud de las ramas, lo que indica la cantidad de cambios genéticos que han ocurrido en esa línea evolutiva. Identificación de secuencia: Si estás analizando un conjunto de datos, el número 58 podría ser una referencia a una secuencia específica, lo que facilita su identificación en el análisis. Análisis comparativo: Puede usarse para facilitar la comparación entre especies o grupos en estudios donde se han ordenado

según sus características genéticas. Se tiene *uessalvadoriensis1* - *uessalvadoriensis2*: La distancia es 18.62, lo que indica que hay una diferencia evolutiva relativamente pequeña entre estas dos secuencias. *uessalvadoriensis1* - *neoniger2*: La distancia es 20.29, que también indica una diferencia evolutiva moderada. *uessalvadoriensis2* - *neoniger2*: La distancia es 32.89, lo que sugiere una mayor diferencia evolutiva en comparación con los pares anteriores. Última fila (*neoniger*): Parece que hay un valor adicional que incluye una comparación con *neoniger*. Las distancias indican cómo se relacionan las secuencias de *neoniger* con las otras dos: *neoniger* - *uessalvadoriensis1*: 40.58, *neoniger* - *uessalvadoriensis2*: 42.65, *neoniger* - *neoniger2*: 50.41. Interpretación general: Los números más bajos indican que las secuencias están más estrechamente relacionadas evolutivamente, mientras que los números más altos sugieren una mayor divergencia. Esto podría usarse para inferir relaciones filogenéticas, como qué especies están más relacionadas entre sí y cómo han evolucionado a lo largo del tiempo.

-Protein GRAVY results. (Resultado de proteínas GRAVY) muestra *Aspergillus El Salvador*.

Results for 2450 residue sequence "*Sequessalvadoriensis*" starting ACGGACGTTA **es 0.741**

Se refiere al cálculo del índice GRAVY (Hydropathicity Value), que mide la hidropatía o la capacidad de una proteína para interactuar con el agua. Un valor GRAVY se calcula sumando los valores de hidropatía de los aminoácidos que componen la proteína. Para el resultado es **0.741**. Este valor positivo indica que la proteína tiene una tendencia a ser hidrófoba, es decir, tiene más aminoácidos que son menos solubles en agua. Las proteínas con valores GRAVY altos suelen ser menos solubles en soluciones acuosas y pueden tener funciones que requieren interacciones menos favorables con el agua, como las que se encuentran en membranas celulares. El término "Hidrófoba" se refiere a

la propiedad de una molécula o sustancia de ser repelente al agua. Las moléculas hidrófobas tienden a no disolverse en agua y, en cambio, prefieren interactuar entre sí. Esto se debe a su estructura química, que suele estar compuesta por grupos apolares o no cargados. En el contexto de las proteínas, los aminoácidos hidrófobos suelen encontrarse en el interior de la proteína, donde están protegidos del agua, mientras que los aminoácidos hidrofílicos (que atraen el agua) suelen estar en la superficie, interactuando con el medio acuoso. Esta disposición es importante para la estructura y función de la proteína, ya que influye en su plegamiento y estabilidad.

-Mutate for Digest results. (Mutar para obtener resultados de Digest). Aspergillus muestra El Salvador.

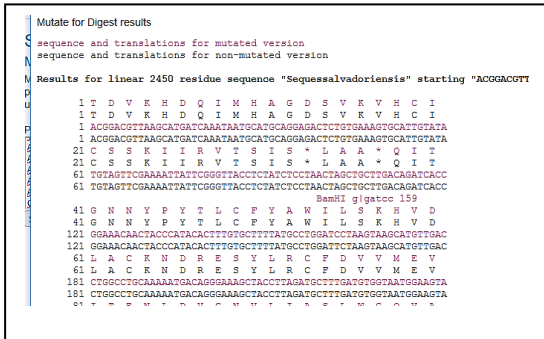


Fig 60. Gráfico Mutate for Digest results. Se refiere a un análisis que muestra las secuencias de proteínas y sus traducciones correspondientes, tanto para una versión mutada como para una versión no mutada de una secuencia específica. Desglose de los resultados: Secuencia lineal de 2450 residuos: Se está trabajando con la secuencia de la proteína Sequessalvadoriensis que comienza con ACGGACGTTA. Mutación: El análisis parece comparar dos versiones de la secuencia, una mutada y otra no mutada. Aunque no se especifican los cambios en extracto, estas mutaciones pueden implicar sustituciones de aminoácidos en la secuencia. Traducciones: A continuación, se presentan las traducciones de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos. Las letras representan aminoácidos específicos: Por

ejemplo, "T" corresponde a treonina, "D" a ácido aspártico, "V" a valina. Codones: Las líneas que muestran secuencias de nucleótidos indican cómo los codones de la secuencia se traducen en aminoácidos. Estructura: La estructura de los resultados sugiere que la comparación de aminoácidos en las posiciones dadas muestra si hay alguna diferencia significativa entre la versión mutada y la no mutada.

-Group Protein results. (Resultado de grupo de proteínas.). Aspergillus. El Salvador.

Group Protein results

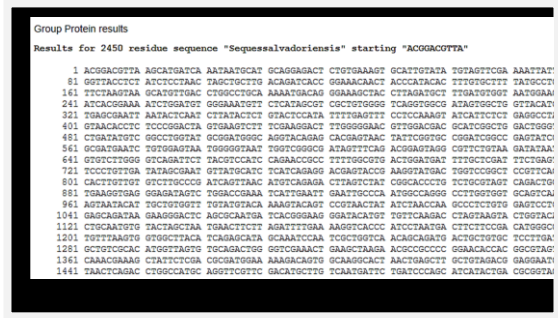


Fig 61. Group Protein results. Se refiere a un análisis que agrupa o presenta información sobre una secuencia de proteínas. En este caso, se están mostrando los resultados para una secuencia de 2450 residuos de la proteína Sequessalvadoriensis, comenzando con ACGGACGTTA. Desglose de los resultados: Secuencia de Nucleótidos: La información que proporciona incluye la secuencia completa de nucleótidos de la proteína. Cada línea muestra un fragmento de esta secuencia. Representación de Codones: La secuencia está escrita en bloques que pueden representar codones, que son grupos de tres nucleótidos que codifican un aminoácido. Organización: Los números al inicio de las líneas indican la posición dentro de la secuencia total. Esto es útil para referirse a partes específicas de la secuencia. Estudio de la Secuencia: Estos resultados son importantes para entender la composición y estructura de la proteína.

-CpG islands results. (Resultados de las islas CpG). Aspergillus El Salvador

```

CpG Islands results
Results for 2450 residue sequence "Sequessalvadoriensis" starting "ACGGACGTTA"
CpG island detected in region 340 to 539 (Obs/Exp = 0.80 and %GC = 50.50)
CpG island detected in region 341 to 540 (Obs/Exp = 0.78 and %GC = 51.00)
CpG island detected in region 342 to 541 (Obs/Exp = 0.78 and %GC = 51.00)
CpG island detected in region 343 to 542 (Obs/Exp = 0.84 and %GC = 51.50)
CpG island detected in region 344 to 543 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 345 to 544 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 346 to 545 (Obs/Exp = 0.83 and %GC = 52.00)
CpG island detected in region 347 to 546 (Obs/Exp = 0.81 and %GC = 52.50)
CpG island detected in region 348 to 547 (Obs/Exp = 0.89 and %GC = 52.50)
    
```

Fig. 62 CpG Islands results.

Se refiere a un análisis que identifica islas CpG en una secuencia de ADN. Las islas CpG son regiones ricas en pares de bases citosina (C) y guanina (G) donde los nucleótidos C están seguidos por nucleótidos G en el mismo sentido, y son importantes en la regulación de la expresión génica. Desglose de los resultados: Isla CpG detectada en la región 340 a 539:Obs/ Exp = 0.80: Este valor representa la relación entre la cantidad observada de dinucleótidos CpG y la cantidad esperada. Un valor menor a 1 sugiere que hay menos CpG de lo esperado, lo cual es común en muchas secuencias genómicas. %GC = 50.50: Esto indica que el 50.50% de los nucleótidos en esa región son guanina y citosina, lo que es un porcentaje relativamente alto y común en islas CpG. Isla CpG detectada en la región 341 a 540:Obs/Exp = 0.78: Similar al anterior, este valor indica que la cantidad de dinucleótidos CpG es también menor de lo esperado.% GC = 51.00: Indica un ligero aumento en el contenido de GC en esta región. Interpretación: Importancia Biológica: Las islas CpG a menudo están asociadas con promotores de genes y pueden ser cruciales para la regulación de la expresión génica. La metilación de las citosinas en estas regiones puede influir en si un gen se activa o se silencia.

-Group DNA results. (Resultado de grupos DNA) Aspergillus.

Results for **2450** residue sequence Sequessalvadoriensis starting **ACGGACGTTA**

Se refiere a un análisis que clasifica o agrupa secuencias de ADN en función de ciertas características, similitudes o criterios específicos. Se aplica a una secuencia de 2450

residuos del organismo Sequessalvadoriensis, comenzando con ACGGACGTTA. Desglose del significado: Group DNA results:Indica que se han agrupado o clasificado secuencias de ADN. Esto puede implicar la identificación de secuencias homólogas, la clasificación en familias de genes, o la agrupación según propiedades funcionales o estructurales. Results for 2450 residue sequence:Esto especifica que los resultados se basan en una secuencia de ADN que tiene 2450 residuos (nucleótidos), sugiriendo que se trata de una secuencia considerablemente larga. Starting ACGGACGTTA: Indica que la secuencia analizada comienza con "ACGGACGTTA", lo que proporciona un contexto específico para la agrupación o análisis. Implicaciones del análisis:Agrupar secuencias de ADN es útil para: Identificación de homologías: Encontrar genes o secuencias relacionadas evolutivamente en diferentes organismos. Estudios funcionales: Analizar funciones compartidas entre genes o secuencias agrupadas. Filogenética: Investigar relaciones evolutivas entre diferentes especies a través de sus secuencias de ADN.

-Proteins stats results. Muestra de El Salvador.

Results for 2450 residue sequence "Sequessalvadoriensis" starting ACGGACGTTA

Pattern:	Times found:	Percentage:
A	594	24.24
B	0	0.00
C	579	23.63
D	0	0.00
E	0	0.00
F	0	0.00
G	640	26.12
H	0	0.00
I	0	0.00
K	0	0.00
L	0	0.00
M	0	0.00
N	0	0.00
P	0	0.00
Q	0	0.00

R	0	0.00
S	0	0.00
T	637	26.00
V	0	0.00
W	0	0.00
X	0	0.00
Y	0	0.00
Z	0	0.00
Aliphatic G,A,V,L,I	1234	50.37
Aromatic F,W,Y	0	0.00
Sulphur C,M	579	23.63
Basic K,R,H	0	0.00
Acidic B,D,E,N,Q,Z	0	0.00
Aliphatic hydroxyl S,T	637	26.00
tRNA synthetase class I Z,E,Q,R,C,M,V,I,L,Y,W	579	23.63
tRNA synthetase class II B,G,A,P,S,T,H,D,N,K,F	1871	76.37

Fig 63 A. Resultados de las estadísticas de proteínas

En la Fig 63 A. El *Aspergillus* tiene que en La Proteína A: Se encontró 594 veces, lo que representa el 24.24% del total de observaciones. Proteína B: No se encontró en ninguna observación, lo que significa que su porcentaje es 0.00%. En resumen, la Proteína A es bastante común en los datos muestreados, mientras que la Proteína B no se ha detectado en absoluto. Los datos parecen ser estadísticas sobre la frecuencia de aparición de diferentes grupos de aminoácidos en proteínas o en un conjunto de datos específico. El grupo de los Alifáticos (G, A, V, L, I): Encontrados 1234 veces. Representan el 50.37% del total. Esto indica que estos aminoácidos son los más comunes en tu conjunto de datos. Aromáticos (F, W, Y): Encontrados 0 veces. Representan 0.00%. No hay presencia de estos aminoácidos en el conjunto. Azufre (C,M): Encontrados 579 veces. Representan el 23.63%. Estos aminoácidos son relativamente comunes. Básicos (K, R,H): Encontrados 0 veces. Representan 0.00%. Al igual que los aromáticos, no se han detectado. Ácidos (B,D,E,N,Q,Z):Encontrados 0 veces. También 0.00%. Ninguno de estos aminoácidos está presente. Alifáticos hidroxilados (S,T): Encontrados 637 veces. Representan el

26.00%. Son un grupo significativo en tu conjunto. tRNA sintetasa clase I (Z,E,Q,R,C,M,V,I,L,Y,W): Encontrados 579 veces. Representan el 23.63%. Un grupo importante, similar a los aminoácidos azufrados. tRNA sintetasa clase II (B,G,A,P,S,T,H,D,N,K,F): Encontrados 1871 veces. Representan el 76.37%. Este grupo es el más abundante en tu conjunto de datos. No se encontraron aminoácidos aromáticos, básicos o ácidos. Lo anterior es un análisis de la composición de aminoácidos en un conjunto de datos, posiblemente relacionado con secuencias de proteínas o muestras biológicas. La composición de aminoácidos en los hongos tiene un papel crucial en su biología y funciones. Aquí te explico cómo puede beneficiarle a un hongo tener la variedad de aminoácidos que se describen: Alifáticos (G, A, V, L, I): Función: Estos aminoácidos son clave para la formación de estructuras proteicas estables, contribuyendo a la hidrofobicidad y el plegamiento de proteínas. Su alta proporción puede ayudar al hongo a mantener la integridad de sus proteínas, favoreciendo su crecimiento y adaptación a diferentes entornos. Ausencia de Aromáticos (F, W, Y): Implicación: Aunque la ausencia de estos aminoácidos es inusual, podría sugerir que el hongo ha adaptado su metabolismo o su entorno para no requerir estas estructuras. Esto podría estar relacionado con su nicho ecológico o su manera de interactuar con su entorno. Azufre (C, M):Función: Los aminoácidos que contienen azufre son importantes en la formación de enlaces disulfuro, que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas. Esto puede ser crucial para las funciones enzimáticas y la resistencia a condiciones adversas. Ausencia de Básicos (K, R, H): Implicación: La falta de aminoácidos básicos puede limitar la capacidad del hongo para interactuar electrostáticamente con otras moléculas. Sin embargo, esto podría ser una adaptación a su entorno, donde no necesita estas interacciones para su supervivencia. Ausencia de Ácidos (B, D, E, N,

Q, Z): Implicación: La ausencia de aminoácidos ácidos puede sugerir que el hongo no necesita estas características para su metabolismo o podría estar utilizando otros mecanismos para regular el pH o llevar a cabo reacciones bioquímicas. Alifáticos Hidroxilados (S, T): Función: Estos aminoácidos son importantes para la formación de enlaces de hidrógeno y la estabilidad de las estructuras proteicas. Su presencia ayuda al hongo a mantener la función y estabilidad de sus proteínas en condiciones variadas. tRNA Sintetasa Clase I y II: Función: La presencia de aminoácidos relacionados con estas sintetasas sugiere que el hongo tiene una capacidad robusta para traducir proteínas. Esto es fundamental para la síntesis de proteínas necesarias para su crecimiento, reproducción y respuesta a cambios ambientales. En conjunto, la composición de aminoácidos refleja adaptaciones evolutivas del hongo a su entorno. La predominancia de ciertos grupos de aminoácidos puede facilitar su crecimiento y supervivencia en condiciones específicas, afectando su metabolismo, interacción con otros organismos y respuesta a factores ambientales. Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas, que son esenciales para casi todas las funciones biológicas en los organismos. Aunque los aminoácidos en sí mismos no se encuentran en las secuencias de ADN, la relación entre el ADN y los aminoácidos es crucial. Codificación de proteínas: El ADN contiene secuencias de nucleótidos que se organizan en genes. Cada gen se transcribe a ARN mensajero (ARNm), que luego se traduce en una secuencia de aminoácidos. Esta secuencia determina la estructura y función de la proteína resultante. Código genético: Cada grupo de tres nucleótidos (codón) en el ARNm corresponde a un aminoácido específico. Por lo tanto, la secuencia de ADN determina qué aminoácidos se ensamblan para formar una proteína. Funciones biológicas: Las proteínas desempeñan funciones estructurales, enzimáticas, de transporte, defensa, entre otras. Los aminoácidos son fundamentales

para estas funciones, y su diversidad permite la gran variedad de proteínas que existen en los organismos. En resumen, aunque los aminoácidos no están directamente en el ADN, su secuencia está codificada en el ADN y es esencial para la producción de proteínas y el funcionamiento de los organismos. Para interpretar los aminoácidos en las secuencias, se utiliza el código genético, que asigna un codón de tres nucleótidos a cada aminoácido. Primero, se transcribe la secuencia de ADN a ARN mensajero (ARNm), y luego este ARNm se traduce en una cadena de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Cada codón en el ARNm corresponde a un aminoácido específico, lo que permite ensamblar la proteína en el orden correcto.

Discusión.

La PCR fue inventada por Kary Mullis en el año 1983. El uso de la PCR para el diagnóstico de *Aspergillus* se ha reportado desde principios de la década de 1990. En 2006 se constituyó la Iniciativa Europea de PCR por *Aspergillus*, en la que propuso protocolos estandarizados para la evaluación clínica generalizada de la PCR por *Aspergillus* de forma rápida y oportuna en los criterios de diagnóstico de la enfermedad. (Blanco, 2010). Las técnicas de secuenciación moderna son de segunda y tercera generación. La Segunda generación produce gran cantidad de lecturas cortas de 25-400 bp de secuencias de ADN. En esta generación se destaca la empresa Illumina Inc, actualmente es la empresa que ofrece servicios de calidad y control estricto 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 desoxinucleotidos como terminadores de la cadena de ADN, donde impide seguir replicándose. Por lo que se divide en cuatro reacciones de secuencias separadas que contienen los cuatro desoxinucleotidos estándar que son: dATP, dGTP, dCTP, dTTP y la ADN polimerasa.

Terminan la elongación de la cadena lo que permite una fragmentación de ADN de varios tamaños de longitud. (Sanger, 1977). En cambio, la tecnología de Illumina utiliza el método de secuenciación por síntesis, permitiendo la lectura paralela de millones de fragmentos por medio de la detección de 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 del fluoróforo, creando una imagen de un terminador reversible marcado fluorescentemente a medida que se añade cada dNTP, y luego se separa para el ingreso de la siguiente base. Al finalizar, se obtiene una secuenciación base por base con datos de alta precisión y calidad. Los de Tercera generación son las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos conocidas como third-generation sequencing (TGS), las cuales permiten extensiones de hasta 2.3 Mb y no requieren de una amplificación preliminar. (Illumina, 2022) Existe una tecnología Single Molecule, Real-time (SMRT) que permite incorporar lecturas de unos 60.000 pares de bases (bp), que propone una ventaja de rastrear variaciones estructurales o que presentan dificultades en la amplificación de ciertas áreas del genoma de un estudio en particular. la secuenciación mediante nanoporos Su desventaja es que presenta la limitación de que se requiere de una gran cantidad de ADN, para poder secuenciar y obtener un resultado fiable. (Valderrama,2020). En otros estudios reporta que el tamaño de los genomas es variado entre las diversas especies de *Aspergillus* spp, estos 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 (Rokas, 2007) en nuestro caso fue de 15000 pb. En resumen, después de la extracción de gADN en el control de calidad, se lleva a cabo 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 este método, se utilizan moléculas fluorescentes para permitir la cuantificación de los productos amplificados, se mide y cuantifica la fluorescencia de las moléculas; normalmente, estas moléculas son tintes que se intercalan entre las bases de la doble hélice del ADN. (MERK,2024) La PCR en tiempo real es una técnica molecular que permite amplificar y cuantificar el ADN de forma rápida y precisa. Permite hacer miles de millones de copias de una región particular del ADN. En otras palabras, puede medir la cantidad de ADN amplificado que hay durante la prueba. Su método consiste en utilizar una sonda fluorescente que se hibrida con la secuencia amplificada y emite una señal fluorescente cuando se excita con luz a una longitud de onda específica. A medida que se amplifica el ADN, aumenta la cantidad de sonda fluorescente unida al ADN amplificado, esta intensidad de la señal fluorescente se mide en cada ciclo de PCR y se utiliza para cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. Actualmente, existen dos tipos de sondas para cuantificar la amplificación en un ensayo de qPCR: colorante fluorescente y sonda fluorescente. (LABBOX,2024). En nuestro estudio se utilizó 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. (Revista Microbiología, 2005) Otros estudios reportan que para caracterizar y diferenciar el género *Aspergillus* se han utilizado métodos basados en biología molecular, como el análisis de las secuencias que codifican los genes de los RNAs ribosómicos eucariotas 18S, 5.8S y 28 (Loredo,1997). 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 (Demeke, 1994) El *Aspergillus* es filamentoso compuesto por cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuestos a la levadura, que están compuestos por una sola célula redonda. (Conant, 1972). El *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, causando infección en el pulmón y los senos paranasales; su capacidad de 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 que son específicos de los hongos para diferenciar las diferentes especies del género *Aspergillus*. (Frisvad,2007). Un trabajo relacionado con la obtención de PCR y ADN de *Aspergillus* sp en muestras clínicas encontró que el uso de estudios moleculares como la PCR en tiempo real es un procedimiento confiable para la cuantificación y evaluación de la infección pulmonar por *A. fumigatus* en modelos animales. (Sabino,2020) En muestras biológicas existe una variedad de técnicas moleculares en el mercado internacional para obtener una secuenciación o tipificación de hongos. En nuestro estudio se encontró que la técnica utilizada por MACROGEN INC parecida al metodo de Sanger o metodo por secuenciación en cadena, es muy efectiva para obtener información en tiempo real para el estudio del gADN y el análisis molecular de un hongo en particular. De los métodos moleculares utilizados para los estudios taxonómicos en *Aspergillus* spp, destacan: el análisis de las secuencias de ADN que codifican para RNAs ribosómicos (rRNA) y espaciadores internos transcritos (ITS) así como la técnica RAPD. (Loredo,1997). Además, entre otros usos, la técnica RAPD se ha utilizado con otros organismos como

alternativa a los sRFLP, ya que proporciona información más fácil, rápida y fiable para mapear las características genéticas de cualquier especie. (Cuerno, 1992). En nuestro estudio se realizó análisis de ADN que utilizaron análisis de fragmentos de ADN, amplificados por PCR, que codifican para los genes de ARNr, tiene gran utilidad en la clasificación taxonómica del género *Aspergillus*, su ventaja radica en que estas secuencias de ITS se amplifican fácilmente por PCR, debido a que son repetitivas. Existen otros estandarizados como el micelio de *Aspergillus*, se probaron diferentes métodos de extracción de ADN como: el método de extracción de ADN y modificado para tejidos vegetales (Martínez-Soriano, 1993). En 1975 se comenzó a utilizar como método alternativo un nuevo método de identificación de hongos conocido como espectrometría de masas MALDI-TOF, basado en el perfil proteico específico de cada uno de ellos. En el caso de los hongos filamentosos, concretamente del género *Aspergillus*, una de sus limitaciones es su capacidad para identificar especies de forma multidiversa. Se trata de una técnica de ionización suave, que permite detectar proteínas. La 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). (Vidal, 2018). Otro método para identificar conidios e hifas para la detección de los ADN de *Aspergillus* que circulan en la comunidad es mediante PCR o amplificación por PCR denominada *Aspergillus*, mientras que el uso de muestras de sangre total con EDTA en caso de *Aspergilosis* pulmonar. En el caso de pacientes de alto riesgo que contengan elementos fúngicos intracelulares y extracelulares. (klings,2009) En otro estudio, concluyeron que la sensibilidad de la PCR plasmática fue menor que la de la PCR

realizada en muestras de sangre completa. (Loeffler, 2000). Actualmente existen kits comerciales sencillos que extraen ADN de solo 8,5 kb de tamaño, se recuperó en cultivos de caldo o agar, se usan aproximadamente 200 mg de micelio lavado, o se añade una placa de conidios (~1010) a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml para obtener una PCR de calidad. (Lee, 2004). Otros estudios son la hibridación basada en PCR en tiempo real, y la PCR LightCycler y para el análisis de polimorfismos de las regiones espaciadoras de genes ribosómicos mediante la técnica de secuenciación para la identificación de micromicetos. (Bogdanov, 2009). Para la construcción de las librerías se parte previamente de extracción del ADN a una concentración adecuada, luego a la cantidad óptima de ADN extraído y luego a la amplificación. El método de control de calidad de la biblioteca de MacroGen consta de 1. Tamaño de la biblioteca Check.To verificar el tamaño de los fragmentos enriquecidos con PCR, verifica la distribución del tamaño de la plantilla ejecutándola en un Bioanalizador Agilent Technologies 2100 utilizando un chip DNA 1000. 2. Comprobación de la cantidad de bibliotecas Illumina. Para lograr la máxima calidad de los datos en las plataformas de secuenciación Illumina, es importante crear densidades de agrupación óptimas en cada carril de cada celda de flujo. Esto requiere una cuantificación precisa de las plantillas de la biblioteca de ADN. Por lo tanto, cuantificamos las bibliotecas preparadas utilizando qPCR de acuerdo con la Guía del protocolo de cuantificación de qPCR de Illumina.2) Biblioteca PacBio Para generar una curva estándar de lecturas de fluorescencia y calcular la concentración de la muestra de la biblioteca, se utiliza la solución de cuantificación estándar Qubit. Para encontrar nuevas especies en una biodiversidad se recurre a descubrirlas en ecosistemas inexplorados como muestras biológicas y otros. Se procede a la clasificación e identificación taxonómica en su estudio, luego se procede a métodos más modernos como la

secuenciación ADN e identificación de la posible nueva especie ya que estas tienen una característica única o huella personal que la diferencia de otras. Utilizando secuencias cortas de ADN para identificar y clasificar especies. En nuestro caso se procedió primero a una clasificación taxonómica macro y microscópica del hongo y luego al estudio del ADN para complementar ambos métodos coherentemente y tipificar la especie de estudio. Basándose en la taxonomía se utiliza un sistema jerárquico para clasificar los organismos. Las principales categorías, de mayor a menor jerarquía, son: Dominio: La categoría más amplia, que agrupa a los organismos en tres dominios principales: Bacteria, Archaea y Eukarya. Reino: Dentro de los dominios, se encuentran los reinos, como Animalia, Plantae y Fungi. Filo (o Phylum): Agrupa a organismos con características corporales similares. Clase: Dentro de cada filo, se dividen en clases. Orden: Cada clase se divide en órdenes. Familia: Dentro de cada orden, los organismos se agrupan en familias. Género: Dentro de cada familia, los organismos se agrupan en géneros. Especie: La categoría más específica, que identifica a organismos que pueden reproducirse entre sí y producir descendencia con características genómicas de especie. (Hawksworth, 2011). Esto basado en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) vigente que regula la nomenclatura de plantas. Actualmente la tecnología de secuenciación de Illumina, es 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 de SBS de Illumina usa la química XLEAP-SBS. Se crea una imagen de un terminador reversible marcado con fluorescencia a medida que se añade cada dNTP y luego se corta para permitir la incorporación 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. La química XLEAP-SBS en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 están diseñados cuidadosamente para permitirle obtener más información en su laboratorio, con 14 configuraciones y longitudes de lectura de 1×50 pb a 2×300 pb, hace 1.800 millones de lecturas de un solo extremo por ejecución para potenciar las aplicaciones con mayor uso de datos en su secuenciador, estas lecturas de un solo extremo por ejecución 100 millones–1,8 mil millones Longitud máxima de lectura 2×300 pb. Hace hasta 384 combinaciones duales únicas (UD) y 96 combinaciones duales combinatorias (CD). procesa de 1-500 ng de ADN para genomas pequeños o 100-500 ng de ADN para genomas grandes. Tamaño de inserción de destino ~ 350 pb. La secuenciación de nueva generación (NGS) secuenciar miles de organismos en paralelo, con capacidad de combinar muchas muestras en una sola secuenciación y obtener una alta cobertura de secuencia por muestra, 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 de identificar utilizando otros métodos. El sistema Miseq hace Máximo de lecturas individuales por ejecución 25 millones y Longitud máxima de lectura 2×300 pb. (ILLUMINA, 2024) En nuestro estudio se utilizó esta técnica Illumina más Informe de secuenciación metagenómica de escopeta llamado Shotgun Metagenomic Sequencing Report tal como se describió anteriormente.

Conclusiones: 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. Una nueva subespecie de hongo del género *Aspergillus* se encontró en las semillas de nacascal que son autóctonas

en 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 uessalvadoriensis*. A la que se le llamará en el futuro **nombre científico binomial:** *Aspergillus uessalvadoriensis* A. Vásquez 2006. Del género *Aspergillus* y especie se deriva el acrónimo **ues** que significa **Universidad de El Salvador** junto con *salvadoriensis* del país **El Salvador**.

Agradecimiento y reconocimientos. A autoridades de la Universidad de El Salvador y Facultad de Medicina UES por su apoyo moral, Lic William Armando Merino y Dr. Carlos Ortega del laboratorio de virología molecular como pares evaluadores y Lic Gerardo Rivas como apoyo técnico.

Declaración de transparencia.

El autor declara no tener conflictos de intereses en aislamiento de caracterización fenotípica de *Aspergillus* sp de El Salvador y caracterización genotípica de la especie *A. neoniger* porque así lo reportaron.

Referencias

1. Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micología*; 17: S79-S84.
2. Alcalá, L et al. (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 Médica. (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). *Klinicheskaia 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. 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. doi: 10.1016/j.tim.2012.09.005. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23084572; PMCID: PMC3534798.
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 (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 de qPCR. Online.

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 alatoxigenicos.
33. Loeffler, J, et al. (2000). Comparison between Plasma and Whole Blood Specimens for Detection of Aspergillus DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
34. Marchese S, et al.(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
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 al. (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 ofBrief Report Molecular Detection of Aspergillus: Application of a Real-Time PCR Multiplex Assay in Tissue Samples.*
45. Sanger, F., Nicklen,S.,& Coulson, (1977).DNA sequencingwith 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*.Doi: 10.1128/jcm-01344-06.
49. The Aspergillus Website. (2007) *Fungal Resec trust*.
50. UNAM, (2013). Asociar 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*.

Capítulo II

g DNA y qDNA



Identificador GenBank: PRJNA1306032. Mycobank MB 860456. *Aspergillus uessalvadorensis* se llamará *Aspergillus salvadorensis*.



Original Sample QC

General Information

Order Number	HN00223869	Name of Customer	ANTONIO VASQUEZ HIDALGO	Date of Order	2024-07-31
--------------	------------	------------------	-------------------------	---------------	------------

Final QC Result of DNA sample(s)

Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2024-07-31	2024-08-01	1	1	0	0

Final QC Result of RNA sample(s)

Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

The QC criteria refer to the specification requirements of a single run. In any cases, we may encounter the shortage of sample volume or amount due to various reasons such as a library construction failure. In these cases a request of an additional sample will be inevitable.

Therefore, we recommend double the amount to be supplied at first place to minimize any delay of the whole procedure.

* **Pass:** Proceed with the library construction.

* **Fail:** Further processes are on hold until the replacement samples received.

We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.

* **Hold:** A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.

Macrogen does not proceed the next step until we have received your permission.

Approximately 5 μ l of sample is used for sample (library) QC purposes, and the final volume may be 6-7 μ l less than the volume you provided, considering pipetting errors. The SQC results of the low-concentration sample can be inaccurate. Please keep this in mind when checking the results.

QC Result of DNA

Arrival Date	2024-07-31	Experiment Date	2024-08-01	Tested by	KDS
Comment					

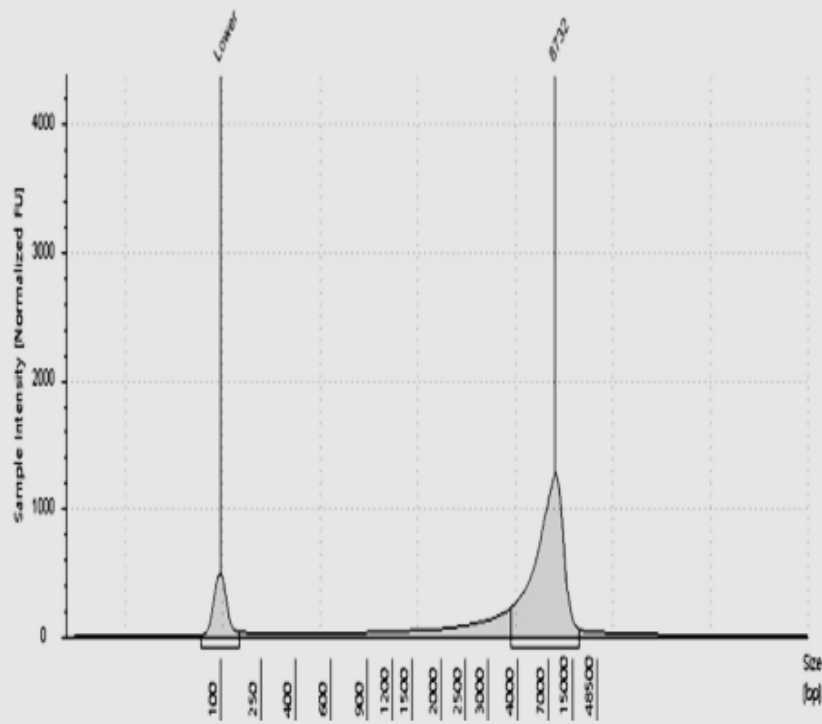


#	Sample Name	Conc. (ng/ μ l)	Final Volume (μ l)	Total Amount (μ g)	DIN	Result*
1	Aspergillus	12.297	30	0.369	6.4	Pass

Experiment
Condition

TapeStation gDNA Screen Tape

Click to Enlarge =>1:Aspergillus



DNA QC Method

1. Quantity of DNA: Done by QuantiFluor® dsDNA System* method using Victor Nivo Multimode Microplate Reader**.

MacroGen quantifies the starting genomic material by using fluorescence-based quantification.

Since fluorescence-based quantification utilizes double-stranded DNA-specific dyes, this method quantifies dsDNA more accurately than UV spectrometer-based, even in the presence of common contaminants.

* QuantiFluor® dsDNA System (Promega, cat.# E2671)

** VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer, Part# HH35000500)

2. Assessing the condition of the DNA: 2100 Bioanalyzer***(or 4200 TapeStation****) is used.

Verify genomic DNA integrity using an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (or 4200 TapeStation).

The DNA integrity number (DIN) determines the degree of fragmentation of a genomic DNA sample by measuring the distribution of signals of various sizes.

*** 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Part# G2939BA)

**** 4200 TapeStation System (Agilent, Part# G2991BA)

3. Size Check of DNA [For Long Read Sequencing]

Avg. Size(BP): MacroGen used the Femto Pulse System***** to determine the actual size distribution.

***** Femto Pulse System (Agilent, Part# M5330AA)

RNA QC Method

1. Quantity of RNA: Done by Quant-it™ RiboGreen RNA Assay* method using Victor Nivo Multimode Microplate Reader**.

MacroGen quantifies starting genomic material by using fluorescence-based quantification. The Quant-it™ RiboGreen RNA Reagent is also binds to DNA.

Thus using RNase-free DNase pretreatment is recommended for accurate concentration measurement.

* Quant-it RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen, cat.# R11490)

** VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer, Part# HH35000500)

2. Assessing the condition of the RNA: 2100 Bioanalyzer***(or 4200 TapeStation****) is used.

We check total RNA integrity by using an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer(or 4200 TapeStation).

Utilizing degraded RNA may cause low yields, over-labeling of the 5' end of the RNA molecule, or protocol failure. Therefore, using high-quality RNA samples is vital.

*** 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Part# G2939BA)

**** 4200 TapeStation System (Agilent, Part# G2991BA)

DNA QC Criteria

Platform	Library Type	Library Kit	Total Amount	DIN	cDNA(%)	GQN	Avg. Size(BP)	etc
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (350)	0.100µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (550)	0.200µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (LMW)	0.100µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (350)	1.000µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (550)	2.000µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nexera DNA XT	0.001µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel Methyl-Seq DNA library	0.200µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq ChIP-seq library	0.010µg	-	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Chromatin Genome library v2	1.000µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel-NGS 2S PCR-Free kit (350bp insert)	0.500µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel-NGS 2S PCR-Free kit (550bp insert)	1.000µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	mt DNA	0.100µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Accel-NGS 1S PCR-plus	0.100µg	-	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	bulk ATAC library	-	-	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (250)	0.100µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (450)	0.200µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	PCR free LMW	1.000µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Chromium Next GEM Single Cell ATAC library v1.1	-	-	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (350 META)	0.100µg	3	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (350 META)	1.000µg	3	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (550 META)	0.200µg	3	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nexera DNA XT (META)	0.001µg	3	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Illumina DNA Library	0.050µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Illumina DNA PCR-Free	0.500µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	NEB Enzymatic Methyl-seq library	0.200µg	7	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	xGen cDNA FFPE DNA library (for cDNA)	0.020µg	-	80	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	xGen cDNA FFPE DNA library (for FFPE)	0.200µg	-	-	-	-	



NGS Library QC

General Information

Order Number	HN00223869	Name of Customer	ANTONIO VASQUEZ HIDALGO	Date of Order	2024-07-31
--------------	------------	------------------	-------------------------	---------------	------------

Final QC Result of DNA sample(s)

Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2024-07-31	2024-08-07	1	1	0	0

Final QC Result of RNA sample(s)

Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

* **Pass** : Proceed with the library construction.

* **Fail** : Further processes are on hold until the replacement samples received.

We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.

* **Hold** : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.

MacroGen does not proceed the next step until we have received your permission.

As 3 ul was taken from the sample for sample (library) QC purposes, the indicated volume represents 3ul less than the total volume received.

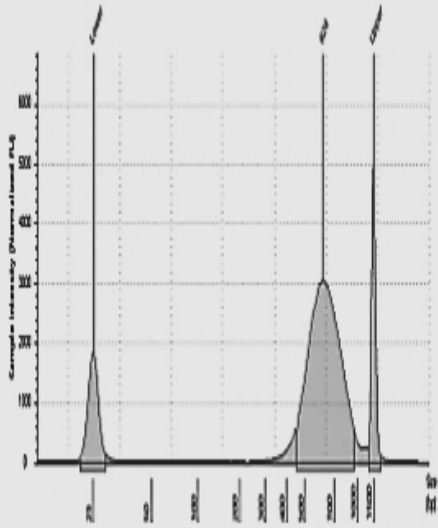
Library QC Result of DNA

Arrival Date	2024-07-31	Experiment Date	2024-08-07	Tested by	PSY
Comment	LightCycle qPCR				

#	Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	Result*
1	Aspergillus	TruSeq Nano DNA (350_META)	41.87	103.24	624	Pass

Experiment Condition	TapeStation D1000 Screen Tape
-------------------------	-------------------------------

Click to Enlarge ⇌ 1:Library : Aspergillus



Library QC Method

1. Library Size Check

To verify the size of PCR enriched fragments, we check the template size distribution by running on a Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer using a DNA 1000 chip.

2. Library Quantity Check

1) illumina library

In order to achieve the highest quality of data on Illumina sequencing platforms, it is important to create optimum cluster densities across every lane of every flow cell. This requires accurate quantitation of DNA library templates.

So we quantify prepared libraries using qPCR according to the Illumina qPCR Quantification Protocol Guide.

2) PacBio library

To generate a standard curve of fluorescence readings and calculate the library sample concentration, we use Qubit standard Quantification solution and calculator.

Library DNA QC Criteria

Platform	Library Type	Library Kit	Conc (molecules/)	Conc (nM)	Conc (ng/ul)	Size(bp) From	Size(bp) To	etc
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (350)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (550)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (designated insert)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (LMW)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (350)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (550)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nextera DNA XT	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA Methylation	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Aceel Methyl-Seq DNA library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq ChIP-seq library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Chromium GeneSeq library v2	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nextera mate pair library (gel free)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nextera mate pair library (gel plus)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Aceel-NGS 2S PCR-Free kit (350bp insert)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Aceel-NGS 2S PCR-Free kit (550bp insert)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	mt DNA	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Aceel-NGS 1S PCR-plus	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	baR ATAC library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (250)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (450)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	PCR free LMW	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Chromium Next GEM Single Cell ATAC library v1.1	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (350_META)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq DNA PCR Free (350_META)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Aceel-NGS 2S Plus	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	TruSeq Nano DNA (550_META)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Nextera DNA XT (META)	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Illumina DNA Library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	Illumina DNA PCR-Free	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	NEB Enzymatic Methyl-seq library	-	5	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	xGen cDNA FFPE DNA library (for cDNA)	-	10	-	-	-	
NovaSeq	Whole Genome library	xGen cDNA FFPE DNA library (for FFPE)	-	10	-	-	-	

NGS library QC criteria (DNA)

The values given below are for reference only and may change at any time without notice. For more information, please contact your Macrogen Europe representative.

Please note the difference between the criteria given in nM and those given in ng/μL – as well as the different values for client-prepared and Macrogen-prepared libraries.

1. Illumina sequencing

1.1 Whole genome

<i>Library prep kit</i>	<i>Concentration (nM)</i>	
	<i>Client-prepared</i>	<i>Macrogen-prepared</i>
Accel Methyl-Seq	10	5
Accel-NGS 1S PCR-free	10	5
Nextera DNA XT	10	5
TruSeq ChIP-Seq	10	5
TruSeq DNA PCR-free	10	5
TruSeq Nano DNA	10	10
TruSeq Nano DNA (designated insert)	10	5
TruSeq Nano DNA (low molecular weight)	10	5
Twist exome + refseq + mtDNA	10	5

1.2 Targeted

<i>Library prep kit</i>	<i>Concentration (nM)</i>	
	<i>Client prepared</i>	<i>Macrogen prepared</i>
MBD enriched library	10	5
SureSelect custom	10	10
SureSelect human methyl-seq	10	10
SureSelect mouse	10	10
SureSelect mouse methyl-seq	10	10
SureSelect V4	10	10
SureSelect V4+UTR	10	10
SureSelect V5	10	10
SureSelect V5+UTR	10	10
SureSelect V6	10	10
SureSelect V6+UTR	10	10
SureSelect V7	10	10



1.3 Modified libraries

Library prep kit	Concentration (nM)	
	Client prepared	Macrogen prepared
GBS library (single enzyme)	10	5
GBS library (double enzyme)	10	5
RAD library (single)	10	5
RAD library (double)	10	5
Other modified libraries	10	5

1.4 Amplicon

Library prep kit	Concentration (nM)	Concentration (ng/μL)
Metagenome amplicon		10
Target amplicon DNA		10
Prepared NGS library	5	

2. PacBio sequencing

2.1 Sequel I

Library prep kit	Concentration (ng/μL)	Size range (kbp)
16s full-length amplicon library	10	1.5 – 3
Amplicon library (1 to 5 kb)	10	1 – 5
Sequel microbial library	17	3 – 50
SMRTbell Express (10 kb)	17	10 – 50
SMRTbell Express (20 kb)	17	15 – 50

2.2 Sequel II

Library prep kit	Concentration (ng/μL)	Size range (kbp)
16s full-length amplicon library	20	1.5 – 3
Amplicon library (1 to 5 kb)	20	1 – 10
HiFi (10 to 25 kb)	20	15 – 20
Large insert (>15 kb cut-off)	20	15 – 20
Sequel microbial library	20	3 – 50
SMRTbell Express (10 kb)	20	10 – 50

NGS library QC criteria (DNA) | v20211012
© 2021 Macrogen Europe



Macrogen Europe BV, Meibergdreef 57, 1105 BA, Amsterdam, The Netherlands, T: +31 (0) 20 280 1846, E: ngs@macrogen-europe.com

Macrogen Standard Primers

No.	Primer Name	Sequence	Base
1	AD-R	AGATGGTGCACGATGCACAG	20
2	Alphafor	CATTTCCCAACAGCAC	17
3	AOX1-F	GACTGGTCCCAATTGACAAGC	21
4	AOX1-R	GCAATGGCATTCTGCATCC	21
5	BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18
6	CMV-F	CGCAATGGCGGTAGGCGGTG	21
7	DuetDown1	GATTATGCGGCGGTGTACAA	20
8	DuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC	20
9	EBV-R	GTGGTTTGTCCAACTCATC	20
10	EGFP-C	CATGGCTCTGCTGGAGTTCGTG	22
11	EGFP-CR	CGTCCATGCCGAGAGTG	17
12	EGFP-NR	CGTCCCGTCCAGCTCGACCAG	22
13	GAL1-F	AATATACCTCTATCTTAAACGTC	24
14	GalMAD	TACCACTACAATGGATG	17
15	GLprimer1	TGTAICTATGGTACTGTAACCTG	23
16	GLprimer2	CTTATGTTTTGGCGTCTTCCA	23

No.	Primer Name	Sequence	Base
17	HCO2198	TAAACTTCAGGGTACCAAAAAATCA	26
18	LC01490	GGTCAACAAATCATAAAGATATGG	25
19	M13F	GTAAACACGCGCCAGT	17
20	M13F-pUC(-40)	GTTTTCCAGTCACGAC	17
21	M13R	GCGGATAACAATTCACACAGG	22
22	M13R-pUC(-40)	CAGGAAACAGCTATGAC	17
23	pBAD-F	ATGCCATAGCATTTTATCCA	21
24	pBAD-R	GATTTAATCTGTATCAGG	18
25	pEF-upstream	ATGCGTCCGCGTAGAGG	18
26	pFastBac-F	GGATTATTCATACCGTCCCA	20
27	pFastBac-R	CAATGTGGTATGGCTGATT	20
28	pGEX3	GGAGCTGCATGTGTGAGAGG	20
29	pGEX5	GGCAAGCCACGTTTGGTG	18
30	pJET1_2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	23
31	pJET1_2-R	AAGAACATCGATTTCCATGGCAG	24
32	malE-F	TCAGACTGTCGATGAGC	18

Macrogen Standard Primers

No.	Primer Name	Sequence	Base
33	pQE-F	CCCGAAAAGTGCCACCTG	18
34	pQE-R	GTTCAGAGGTCATTAAGTGG	19
35	RVprimer3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	20
36	RVprimer4	GACGATAGTCATGCCCGCGG	20
37	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18
38	SV40-pAR	GAAATTTGTGATGCTATTGC	20
39	pE_C-R	CCTCTACAAATGTSGTATGG	20
40	T3	ATTAACCCCTCACTAAAG	17
41	T7	AATACGACTCACTATAG	17
42	T7promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	20
43	T7terminator	GCTAGTTATGCTCAGCGG	19
44	U6	CAGTGACGGGGAAAGAATAGTAGAC	25
45	35S-A	AAGGGTCTTGCGAAGGATAG	20
46	35S-B	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT	20
47	27F	AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG	20
48	337F	GACTCTACGGGGAGCGWGCAG	21

No.	Primer Name	Sequence	Base
49	518F	CCAGCAGCCCGGTAATACG	20
50	785F	GGATTAGATACCCTGGTA	18
51	800R	TACCAGGGTATCTAATCC	18
52	907R	CCGTCAATCMTTTRAGTTT	20
53	1100R	GGTTTGCCTCGTTG	15
54	1492R	TACGGYTACCTTTTACGACTT	22
55	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	19
56	NS8	TCCGCGAGTTCACTACGSA	20
57	NS24	AAACCTTGTACGACTTTTA	20
58	LR0R	ACCCGCTGAACCTAAGC	17
59	LR7	TACTACCACCAAGATCT	17
60	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19
61	ITS2	GCTGCGTCTTCATGATGC	20
62	ITS3	GCATCGATGAAGAACGACG	20
63	ITS4	TCCTCCGCTTATGATATGC	20
64	ITS5	GGAAATAAAGTCGTAACAAGG	22

* 47 -64 : Microbial Identification Primer
 Activar Windows
 Ve a Configuraci

Capítulo III

Shotgun metagenomic secuencing report

□ Order Information

Order	HN00223869
Institute	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Client Name	ANTONIO VASQUEZ HIDALGO
Number of Samples	1
Contaminant	GCA_027186245.1 (Coriaria nepalensis reference genome)

Quotation Order **Result** My Account Support Global - English vasqa07

My Order

My Account	My Order
------------	----------

NGS

[RESULT 1](#) [RESULT 2](#) [RESULT 3](#) [RESULT 4](#)
Basic Information Order information Billing information Result

RESULT 1 Basic Info

Basic Information

Order Number	HM0023859	Order Type	New Order
Ordered Date	07.31.2024	Order Status	Complete
Platform	NovaSeq	Arrival Date	07.29.2024
Completed Date	09.10.2024		

RESULT 2 Order Info

Sample Information

No	Sample Name	Tube ID	Sample Type	Prep
1	Aspergillus	Black tube glass, color black	gDNA	DNA extraction

1	Aspergillus	TruSeq Nano DNA (350_META)	Metagenome Shotgun Sequencing	TCTCTACT	CCCGGTC	Throughput:Run	LS1b>X200	10
---	-------------	----------------------------	-------------------------------	----------	---------	----------------	-----------	----

Analysis Information

Output File	FTP
Application Type	Metagenome Shotgun Sequencing
Basic	Taxonomic profiling - Read based, Raw data

RESULT 3 Billing Info

Billing Information

Actual User	Phone of Actual User		
Institution for Billing	Universidad de El Salvador	Phone	50376549089
PO Number	ATTN		vasquez7
Country	El Salvador		
Address	CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, TOMAS DE VERSA, LE 4 CASA A		

RESULT 4 Result

Work Status

Sample QC	Library QC	Sequencing	Analysis	Completed
Complete	Complete	Complete	Complete	Complete

Results

Work Status	File Name	Report
Analysis	HN20223969.7z	Download

Sample QC

Original_Sample_QC_H1N0223993_H1N2400150C0003.pdf

[Download](#)[List](#)[Print](#)

Questionnaire

Please fill out the survey. It will inspire us to provide you the better service.

E-mail *

Quality *

 Excellent Good Average Fair Poor

Turnaround Time *

 Excellent Good Average Fair Poor

Comment *

Please let us know if you have any complaints or comments about the Macrogen DNA Service.

[Participate](#)

Macrogen 107, 254, Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul (Gasan-dong, World Nerd on 1)

[Contact us](#)[Terms of Use](#)[Privacy Policy](#)[Site Map](#)[FAMILY SITE](#)

Macrogen Spain: Calle Martínez Velasco, 52, Edificio B, Planta Baja, Oficina 11/Polígono, Madrid, 28027 / Tel: +34 911 138 376 / info.spain@macrogen.com

Copyright © 2020 MACROGEN CO., LTD. ALL RIGHTS RESERVED.

Quotation Order Result My Account Support Global - English vasquez7

My Order

My Account	My Order
------------	----------

NGS

RESULT 1 Basic Information **RESULT 2** Order Information **RESULT 3** Billing information **RESULT 4** Result

RESULT 1 Basic Info

Basic Information

Order Number	HM0023869	Order Type	New Order
Ordered Date	07.31.2024	Order Status	Complete
Platform	NovaSeq	Arrival Date	07.29.2024
Completed Date	09.10.2024		

RESULT 2 Order Info



**Metagenome
Shotgun
Sequencing**
2024.09

**ANTONIO VASQUEZ
HIDALGO**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Order No. HN00223869

+ Workflow

+ Raw Data Result

+ Deliverables

+ Appendix



PDF Download

Research Use Only



Wait a second! Have you downloaded your data?

Your data will be deleted from our server after 3 months.
Make sure to download your data within this period and check the file integrity using md5sum,
before using the data. (Please refer to FAQ #1 for ways to check the md5sum value)



Raw Data Result

Raw Data Statistics

Total Bases

GC/AT Content

Q20/Q30 (%)

Quality by Cycle



Download List

Aspergillus_1.fastq.gz

Aspergillus_2.fastq.gz



Metagenome Shotgun Sequencing

Report

2024.09

Research use only

RAWDATA REPORT
R

Table of Contents

Order Information	3
-------------------	---

01 Workflow

Experimental Workflow	4
-----------------------	---

02 Raw Data Result

Raw Data Statistics	5
Total Bases	6
GC/AT Content	7
Q20/Q30 (%)	8

03 Deliverables

Download List	9
---------------	---

04 Appendix

FAQ	10
Result File Description	13

Order Information

Client Name	ANTONIO VASQUEZ HIDALGO
Client Organization	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Order Number	HN00223869
Application	Metagenome Shotgun Sequencing
Type of Read	Paired-end
Read Length	151
Library Kit	TruSeq Nano DNA Kit
Library Protocol	TruSeq Nano DNA Sample Preparation Guide, Part # 15041110 Rev. D
Type of Sequencer	illumina system

Capítulo IV

HN00223869 Raw Data



Research Use Only



**Metagenome
Shotgun
Sequencing**
2024.09

**ANTONIO VASQUEZ
HIDALGO**
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Order No. HN00223869

Wait a second! Have you downloaded your data?

Your data will be deleted from our server after 3 months.
Make sure to download your data within this period and check the file integrity using md5sum,
before using the data. (Please refer to FAQ #1 for ways to check the md5sum value)

Workflow

Raw Data Result

Deliverables

Appendix

PDF Download

Raw Data Result

Raw Data Statistics

Total Bases

GC/AT Content

Q20/Q30 (%)

Quality by Cycle



Download List

Aspergillus_1.fastq.gz

Aspergillus_2.fastq.gz

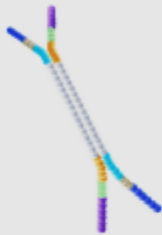
Experimental Workflow

The samples are prepared according to NGS library preparation workflow, and sequenced using Illumina platform. The workflow illustrated below shows the common ligation based method of library preparation. The process may differ based on the library preparation protocol followed.



Sample Preparation

DNA/RNA is first extracted from the sample, and samples which meet quality control standards proceed to library construction.



Ligate Adapters

The sequencing library is prepared by random fragmentation of the DNA or cDNA sample, followed by 5' and 3' adapter ligation. Alternatively, "tagmentation" combines the fragmentation and ligation reactions into a single step which greatly increases the efficiency of the library preparation process.

Final library Construction

Adapter-ligated fragments are then PCR amplified with a PCR primer solution which anneals to the ends of each adapters.

The library templates undergo quality control and quantification process.



Cluster generation using bridge amplification

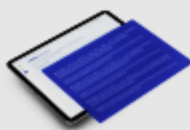
The library is loaded onto a flow cell where fragments are captured on a lawn of surface-bound oligos complementary to the library adapters.

Each fragment is then amplified into distinct clonal clusters through bridge amplification. Once cluster generation is complete, the templates are ready for sequencing.



Sequencing by synthesis (SBS) technology

Illumina SBS technology utilizes a proprietary reversible terminator-based method that detects single bases as they are incorporated into DNA template strands. As all 4-reversible terminator-bound dNTPs are present during each sequencing cycle, natural competition minimizes incorporation bias and greatly reduces raw error rates compared to other technologies. The result is highly accurate base-by-base sequencing that virtually eliminates sequence-context-specific errors, even within repetitive sequence regions and homopolymers.



Generation of Raw data

The Illumina sequencer generates raw images utilizing sequencing control software for system control and base calling, through integrated primary analysis software called RTA (Real Time Analysis).

The BCL/CBCL (base call) binary files are converted into FASTQ files using bcl-convert which is an Illumina provided package. Adapters are not trimmed away from the reads.

Raw Data Statistics

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 1 sample(s).
 For example, in Aspergillus sample, 77,522,490 reads are produced, and total read bases are 11.7 Gbp.
 The GC content (%) is 49.7% and Q30 is 88.3%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases (bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Aspergillus	11,705,895,990	77,522,490	49.7	50.3	95.1	88.3

- Sample ID : Sample name.
- Total Bases (bp) : Total number of bases sequenced.
- Total Reads : Total number of reads. For illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read1 and read2.
- GC (%) : Ratio of GC content.
- AT (%) : Ratio of AT content.
- Q20 (%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30 (%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

Total Bases

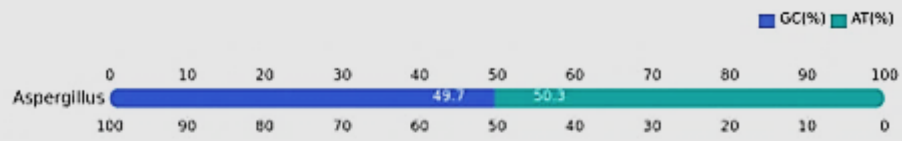
Total number of samples : 1

* Raw Data



GC/AT Content Total number of samples : 1

* Raw Data



Q20/Q30 (%)

Total number of samples : 1

* Raw Data



Download List

- The data can be downloaded from the links below. The download links are active for 2 weeks only, so please download your data within this period.
- Once you receive/download the data, please make sure to check the integrity of the files.
Please note that the sequencing files will be deleted from our server 3 months after the analysis report is released; please contact us within 3 months if you encounter a problem with the data.

* Raw Data Download

File Name	File Size(byte)	md5sum
Aspergillus_1.fastq.gz	2,853,749,138	cd95528f7597f098010344321db7d3ec
Aspergillus_2.fastq.gz	3,240,150,344	7671e96282fbfb2ec15f7e70aabe680d

FAQ

Q Why do I need to check the md5sum values, and how can I check it? (Windows system)

A NGS data tend to have a large files size which makes them more likely to be corrupted during file transfer. So it's important that you check the md5sum of the files after receiving them to make sure what you received are what we gave.

Checking md5 hash in a Windows system

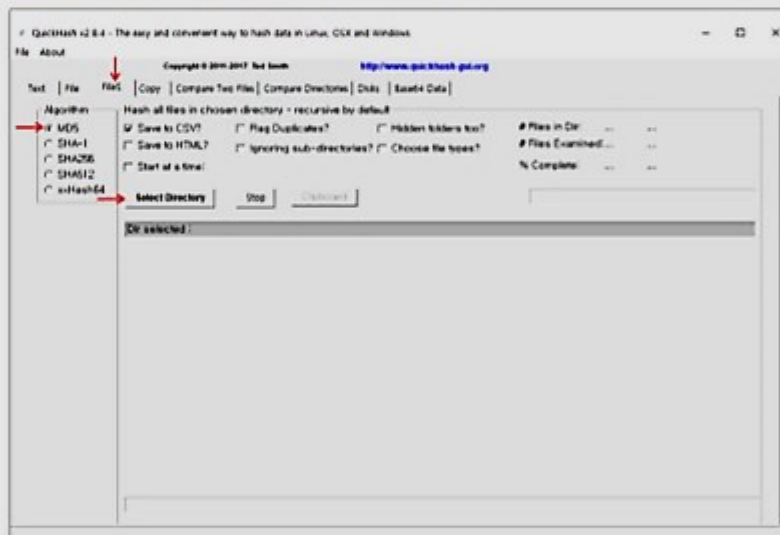
Windows does not provide a program for checking md5sum by default. An external program such as [QuickHash-Windows](#) can be used instead.

STEP 1 Download QuickHash-Windows from the website, and unzip the file.

STEP 2 Take a look at the UserManual pdf file inside the zip file, and execute the .exe file.

Quickhash-GUI.exe	2,090,414	6,505,472
lgk1te3-win32.d8	429,646	852,754
lgk1te3-win64.d8	717,149	1,742,848
UserManual.pdf	512,697	576,987

STEP 3 Click on the "FileS" tab, and select [MD5] as the Algorithm.



STEP 4 Click "Select Directory" and choose the directory where the files to be checked are located in. The output can be saved as a csv or txt file. The process may take some time depending on the performance of the system being used.

STEP 5 Compare the newly calculated md5 value with the md5 value provided to you through the Analysis Report.

Result File Description

Deliverables List

File Type	File Name	Description
FASTQ	 :Sample name_[read1] fastq.gz	Raw read1 sequence data
	 :Sample name_[read2] fastq.gz	Raw read2 sequence data
md5sum	[Order#]_resamples_md5sum_[DownloadLink].txt	<p>You can download this file by clicking on the "md5sum List" button found on the "Download List" page. The file is slightly different in terms of content, depending on how you're receiving your data. If you're receiving via download link, the file contains the following information: File name, File size, md5sum, FTP link. Otherwise, if you're receiving your data via MDO the file only contains: File name, File size, and md5sum.</p> <p>MD5 is a string of 32 hexadecimal values, which represents a "fingerprint" of a file. By comparing the supplied MD5 value to the actual value computed by the MD5sums utility, you can make sure that the file that you downloaded off of the internet has not been tampered with or modified from the original file stored in our server.</p>

FASTQ Format

Example:

FASTQ file consists of four lines.
 Quality score is represented with each character.
 One character matches its base with Phred+33

Line 1 Sequence identifier	@A00125:17:H2HFJDDXX:1:1101:3170:1000 1:N:0:ATGCCTAA
Line 2 Nucleotide sequences	GAACACCGATCACACTCAGATGCACATTTTCAGCTCCTTTTCTAACTGATTTGCCAAATTAATTCAAT
Line 3 Quality score identifier line - character '+'	+ FF--FFFFFF
Line 4 Quality score	@A00125:17:H2HFJDDXX:1:1101:9408:1000 1:N:0:ATGCCTAA TCTGCCAACCAAAATCATTTTCAGATGCAGCTTTTAACTGCTCAAGCACCATTCTGCTATCCTTCTT + FF

Phred Quality Score

Phred quality score numerically expresses the accuracy of each nucleotide. Higher Q number signifies higher accuracy. For example, if Phred assigns a quality score of 30 to a base, the chances of having base call error are 1 in 1000. Phred Quality Score Q is calculated with $-10 \log_{10}(p)$, where p is probability of erroneous base call.

Quality of phred score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10000	99.99%



HEADQUARTER

MacroGen Gangnam HQ

Business & Support Center
 MacroGen Bldg, 238, Teletas-ro,
 Gangnam-gu, Seoul, Republic of Korea
 Tel: +82-2-2180-7000
 Web: www.macrogen.com
 LIMS: dha.macrogen.com

MacroGen Genome Center

Laboratory & IT Center
 [06511] 1001, 10F, 254, Beoskot-ro,
 Guro-gu, Seoul, Republic of Korea
 [Gasan-dong, World Meridian 1]
 Tel: +82-2-2180-7000
 Email: L.ngkr@macrogen.com(Overseas)
 Email: Z.ngkr@macrogen.com
 [Republic of Korea]
 Web: www.macrogen.com
 LIMS: dha.macrogen.com

SUBSIDIARY

MacroGen Europe

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 Heibergstraat 57, 1105 BA, Amsterdam,
 the Netherlands
 Tel: +31-20-333-7563
 Email: ngse@macrogen.eu

MacroGen Singapore

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 3 D'Almeida Drive #05-10, Synapse,
 Singapore 130623
 Tel: +65-6339-0427
 Email: info-sg@macrogen.com

Psomagen (MacroGen USA)

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 1330 Plocard Drive, Suite 103, Rockville,
 MD 20850, United States
 Tel: +1-301-251-1007
 Email: Inquiry@psomagen.com

MacroGen Japan

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 1EF Time24 Building, 2-4-31 Aoml,
 Moto-ku, Tokyo 135-0064 JAPAN
 Tel: +81-3-5962-1124
 Email: ngjp@macrogen-japan.co.jp

BRANCH

MacroGen Spain

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 Av. Sur del Aeropuerto de Barajas,
 28. Office B-2, 28042 Madrid, Spain
 Tel: +34-911-138-378
 Email: info-spain@macrogen.com

MacroGen Belgium

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 Oerlebaan 70, 6229 EV Maastricht,
 Netherlands
 Tel: +31-20-333-7563
 Email: info.be@macrogen.eu

MacroGen Italy

**Laboratory,
 Business & Support Center**
 Viale Ortles, 22/4, 20139 Milano,
 MI, Italy
 Tel: +39-02-5666-0274
 Email: italy@macrogen-europe.com



TABLA I.

Taxonomy análisis. Bar Plot . Macrogen Inc. 2024

Fig.1. Kingdom

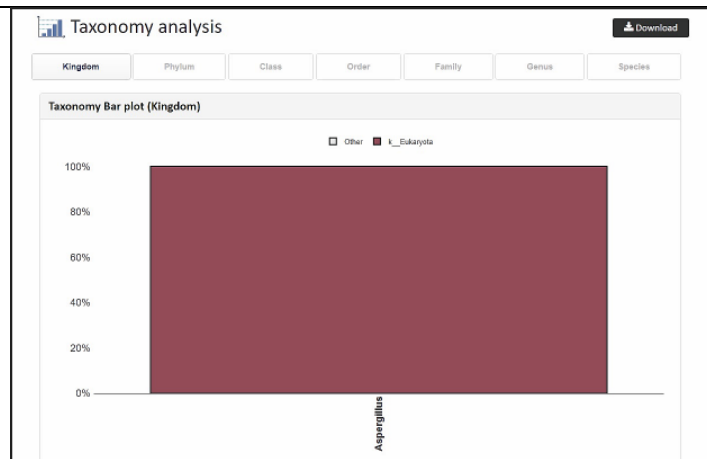


Fig.2. Phylum

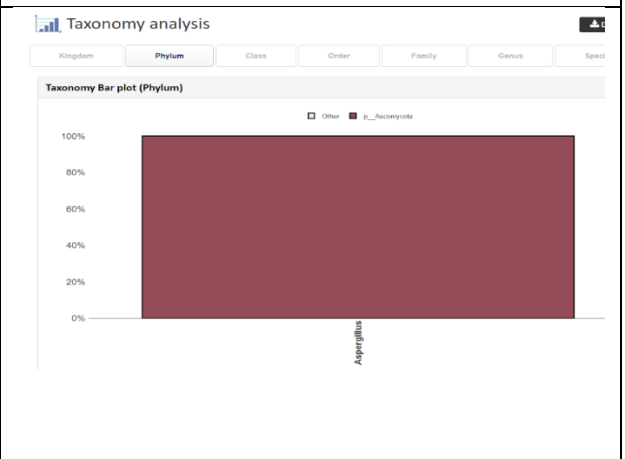


Fig.3. Class

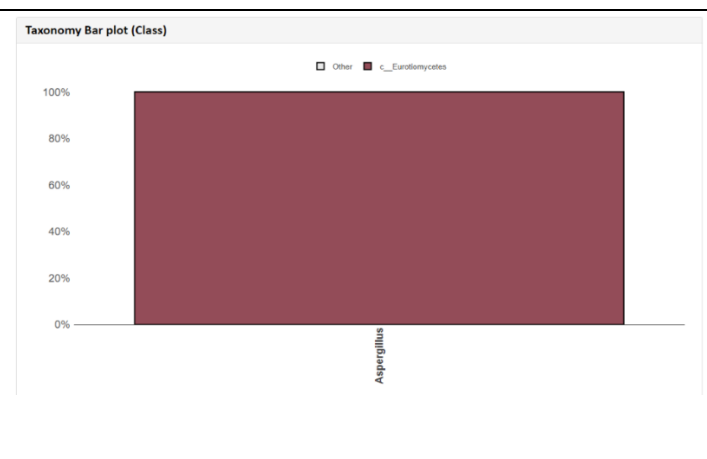


Fig.4. Order

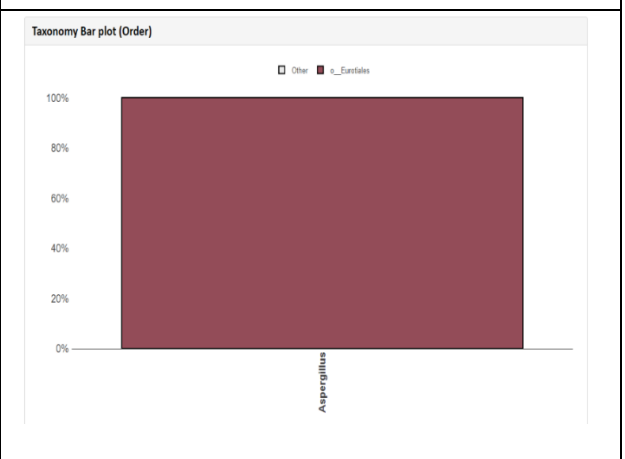


Fig.5. Family

Fig.6. Genus

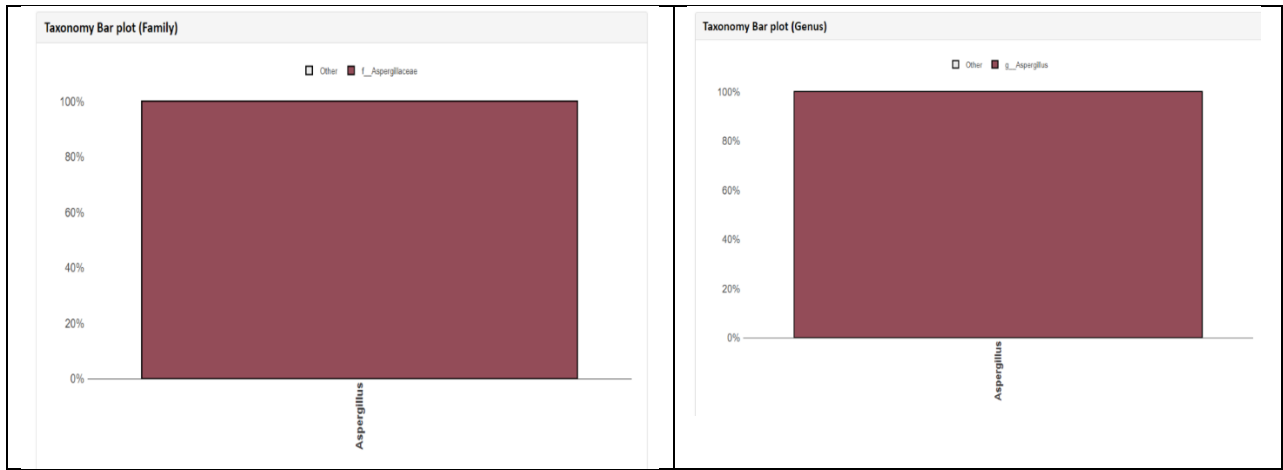


Fig.7. Species

Comentario.

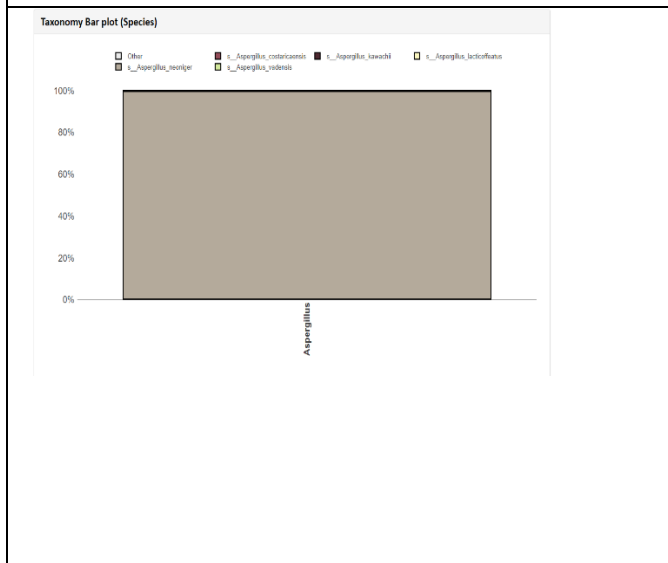


TABLA II.

Taxonomy análisis. Heat Map . Macrogen Inc. 2024

Fig.1. Kingdom

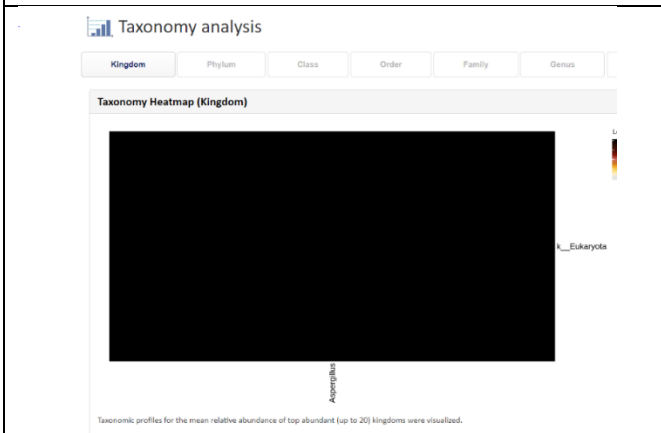


Fig. 2. Phylum

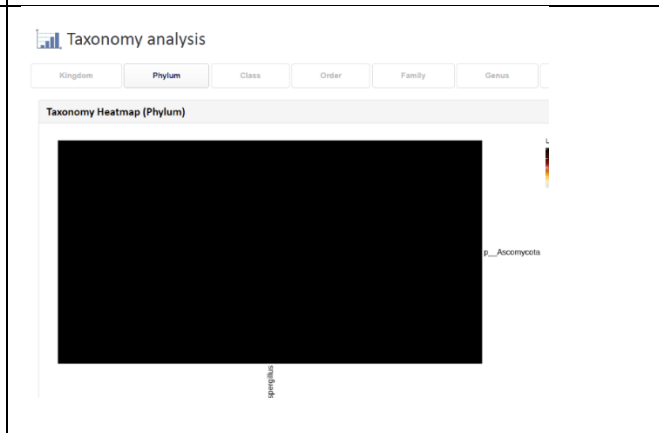


Fig.3. Class

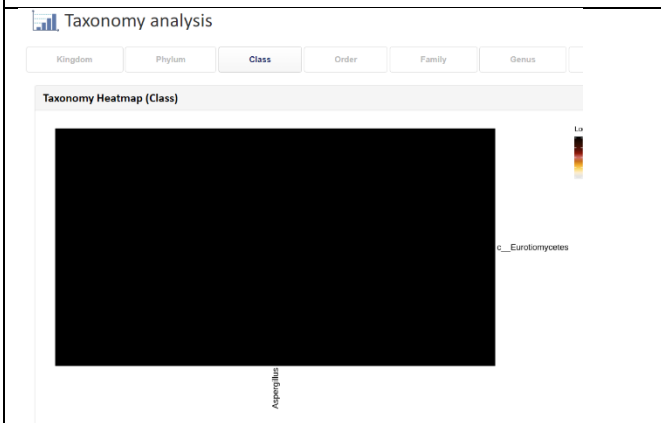


Fig.4. Order



Fig. 5. Family

Fig. 6. Genus

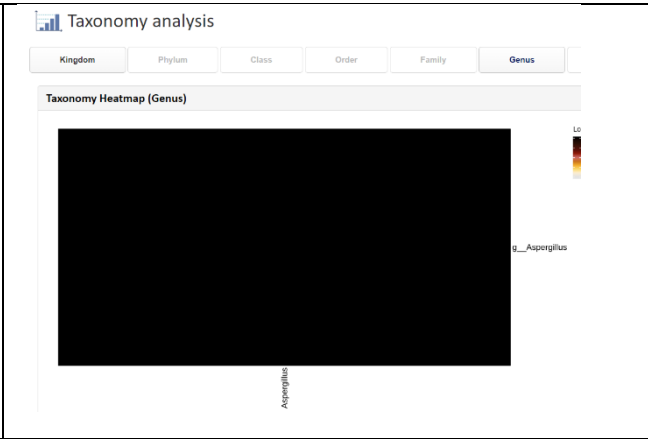
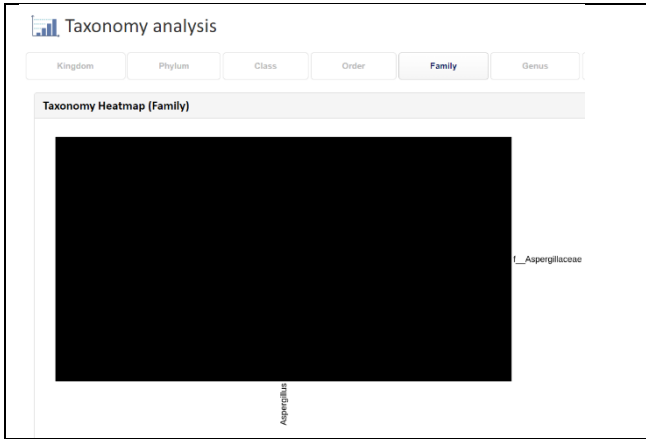
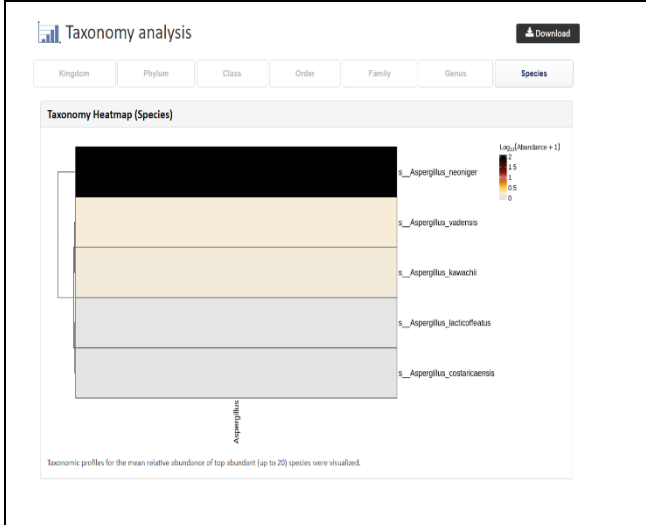


Fig.7. Species



Dr. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, PhD
Profesor de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador
ORCID. ID <https://orcid.org/0000-0001-5643-8317>
Correspondence: Antonio Vásquez, antonio.vasquez@ues.edu.sv

Resumen

Objetivo. Determinar por el método Next-Generation Sequencing Illumina identificar los genes relacionados a la pigmentación del hongo en la secuenciación DNA de enzimas y metabolitos secundarios. Así como en determinar las características fenotípicas y genotípicas en general la especie *A. uesalvadorensis*. **Metodología.** Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, MACROGEN Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios MACROGEN utilizaron los siguientes sistemas: el sistema EggNOG summary: Orthology Frequency within COG (Clusters of Orthologous Groups) Categories en la lectura de secuenciación. MetaCyc: Database offering detailed information on metabolic pathways, enzymes, compounds, and reactions, * UniRef: The UniProt Reference Clusters (UniRef) offer clustered sets of sequences derived from the UniProt Knowledgebase, including isoforms, and selected UniParc records, EggNOG: Relative Abundance in Hierarchical Categories of COG(Clusters of Orthologous Groups) using CPM, KEGG Orthology (KO) y KEGG summary: Orthology Frequency within Main and Sub-Categories. DNA-seq. **Conclusiones.** Se encontraron 14 enzimas y metabolitos secundarios en la producción de pigmentos negros producidos por el hongo por stress oxidativo.

Palabras clave: *Aspergillus salvadorensis*, Macrogen, metabolitos y enzimas.

Introducción

En nuestro medio no es común que un hongo produzca pigmentación de color negro con la presencia de la semilla de nacascal, tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del *Aspergillus salvadorensis*, que al contacto con el tanino de la semilla da el color característico negro o producir el colorante por sus propios medios. La semilla proviene del árbol conocido como nacascal tiene como nombre científico *Caesalpinia coriaria*. Pertenece a la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia* y especie *coriaria* por ser utilizado en la tinción de cueros de piel del ganado vacuno. Es una planta leguminosa con 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 foliolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro. En estas semillas crece un hongo al cual se denomina *Aspergillus salvadorensis*, sus esporas están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, pigmentadas, de diámetro pequeño, y de color negro. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo antes de las 24 horas al agregar al medio agar saboroud más sustancias oxidantes da el color característico de color negro al interactuar con el hierro o por si solas generar el pigmento ya que contiene metabolitos secundarios. Según el análisis fitoquímico preliminar del árbol de *Caesalpinia coriaria*, contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. **Justificación.** Se realizó inicialmente 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 fenotipos 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 en CENSALUD y luego en México resultados preliminares de PCR molecular, luego en 2024 en los laboratorios de MACROGEN INC en Corea del Sur método Illumina el estudio completo de extracción, cuantificación y secuenciación de g,q,c,ds,seqADN en su análisis molecular del género *Aspergillus* para determinar el tipo de especie autóctona que circulan en la zona norte de nuestro país. Se aclara que los laboratorios de secuenciación proveen datos crudos en general en millones de secuencias, pero hay que alinearlos para determinar la especie ya que según la filogenia puede ser producto de una mutación, delección en sitios conservados positivo, alineación moderada o débil, gaps, utilizando programas como GenBank, Clustal, Mega12, PHYTON y otros. **Objetivo:** Determinar por el método Next-Generation Sequencing identificar los genes relacionados a la pigmentación del hongo en la secuenciación DNA de enzimas y metabolitos secundarios. Así como en determinar las características fenotípicas y genotípicas en general la especie *A. uesalvadorensis*.

Diseño metodológico.

La investigación estuvo compuesta por cuatro fases: Primera fase: Recolección de las semillas de nacascal. Se recolectaron cinco lotes de semillas de *Caesalpinia coriaria* de la zona norte, se realizó purificación y selección de las semillas de acuerdo a su apariencia y color. A continuación, los inóculos se inocularon 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 en microscopio óptico simple a lo largo de semanas llevando hoja de cotejo. Segunda fase: Extracción y preparación del tanino de la semilla y el hongo. Preparación de la suspensión de esporas y microcultivo. Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivo en donde se identificaron las conidias o esporas en donde se extrajeron por método simple bajo el microscopio y se sembraron de nuevo, la cual se utilizó para realizar los inóculos en el medio de cultivo Sabouraud en tubo y placa, el hongo se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al que previamente se le agregaron 50 ml del medio, se incubó durante 48 hrs a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente durante 5 min con la ayuda de un agitador magnético. Se paso también al tubo en Saboraud y se agito para una homogeneización para asegurar que las esporas estén bien suspendidas. Si las esporas tienden a sedimentarse, puede ser útil utilizar un mezclador o agitar manualmente. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer para una concentración adecuada se requiera. (1). Se hizo un Micro cultivo preparando en 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 ésta se coloca el portaobjeto, y sobre éste el bloque del medio de cultivo Saboraud. La muestra se inculo sobre el bloque en cuatro cuadrantes, mediante el asa de platino en forma de L sobre el bloque del medio ya inoculado se coloca una laminilla cubreobjetos e incuba por 7 días a 25°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una lámina con una o dos gotas de Azul Lactofenol y se observa al microscopio con objetivo 100x las estructuras características de la especie aislada. (2) El hongo se aisló a partir de semillas de nacascal de la zona norte. Las semillas café-negras fueron identificadas, recolectadas y almacenadas en bolsas herméticas para su posterior análisis a temperatura ambiente, siendo en su mayoría de color negro. No requiere medidas especiales para su transporte y conservación. En el material vegetal no se utilizó la limpieza de semillas. Se raspó y el material se retiró y se depositó en medios de cultivo ASD (agar dextrosa Sabouraud) para su aislamiento y diferenciación. Tercera fase: Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inóculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud para cultivo. 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 de nutrientes) 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. **Caracterización morfológica de muestras fúngicas.** Se realizó en cultivos en Saboraud 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. Método de ADN. En general, se utilizaron métodos para la secuenciación del ADN. En la cuarta fase, Caracterización molecular. Se hizo la identificación por medio de la secuenciación los metabolitos secundarios encontrados en la cadena DNA, proporcionados por MACROGEN INC 2025 Corea del Sur, así como el resultado de enzimas, proteínas y metabolitos secundarios del hongo *A. uesalvadorensis*. El preparado consistió en 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. 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 del hongo. 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 ADNg. qDNA, dsDNA, cDNA y seqDNA y luego analizarlos en paquetes de computadora de alta

capacidad. ⁽³⁾ 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 químico, enzimático o mecánico ⁽⁴⁾, que son los más comunes, pero dependerá del laboratorio en su método de extracción. 7. Técnica qPCR. Llamado ADN cuantitativo medido por fluorimetría 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 método QuantiFluor® dsDNA System 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 MB y el que tiene el mayor número de genes es *A. niger* con 14,165 MB. [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 incrustada. 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. ^(MacroGen, 2024). Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios MACROGEN utilizaron los siguientes sistemas: el sistema EggNOG summary: Orthology Frequency within COG (Clusters of Orthologous Groups) Categories en la lectura de secuenciación. MetaCyc: Database offering detailed information on metabolic pathways, enzymes, compounds, and reactions, * UniRef: The UniProt Reference Clusters (UniRef) offer clustered sets of sequences derived from the UniProt Knowledgebase, including isoforms, and selected UniParc records, EggNOG: Relative Abundance in Hierarchical Categories of COG (Clusters of Orthologous Groups) using CPM, KEGG Orthology (KO) y KEGG summary: Orthology Frequency within Main and Sub-Categories.

Resultados.

La caracterización morfológica y genotípica del hongo se caracteriza en resumen así: **Características macroscópicas:** colonia en agar saboraud es de color blanco, luego cambia a verde y después se hace negro, el reverso del bisel pigmentado de color, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento húmeda de color negro. **Características Microscópicas:** Esterigmas. La cabeza de la conidia es negra, conidióforo rugoso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas abundantes de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro, las cabezas conidiales lisas de una pared redonda e irregular, dispuesta en forma de cadenas uniseriadas; estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro; la vesícula o columella; hay conidias abundantes; tiene una hilera de fiálides de donde emergen las conidias. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas formando espículas en número mayor de diez. La conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una coraza sólida que no tiñe con lactofenol azul algodón. Las esporas inmaduras asexuales son esféricas de pared delgada, incolora, de tamaño grande que se encuentran en el conidióforo en la que están próxima al pie son inmaduras y luego al final llegan a la vesícula son maduras y bajo presión son expulsadas hacia afuera en las fiálides.



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

En la Foto 1 Se observa que el *Aspergillus salvadorensis* cultivado en Agar Sabouraud (SDA) se vuelve negro, lo que es una fuerte evidencia de la producción de melanina. La diapositiva describe las características macroscópicas de la colonia de *A. salvadorensis* de la siguiente manera: Color de la colonia en Agar Sabouraud: es de color blanco luego cambia a verde y después se hace negro. Reverso de la colonia: pigmentado de color negro. Aspecto de la colonia: "es polvorienta de color negro". Las imágenes de las placas de Petri y el cultivo en tubo también confirman esta coloración oscura. En micología, esta transición a un color negro o marrón muy oscuro en la colonia o el reverso es el indicativo fenotípico más importante de la producción de melanina (un pigmento oscuro y protector) o de compuestos similares a la melanina. Por lo tanto, a diferencia de muchas especies de *Aspergillus* que son de color amarillo o verde claro. *A. salvadorensis* sí produce un pigmento oscuro (melanina) que se acumula en los conidios y el micelio a medida que madura la colonia.

Extracción del colorante en condiciones experimentales.

La extracción del colorante negro, generalmente melanina, producido por el hongo *Aspergillus* en condiciones de laboratorio es un procedimiento metódico que se inicia con el cultivo del microorganismo. Dado que este pigmento es inherentemente insoluble en muchos solventes, se requieren pasos específicos para su manejo y tratamiento. El proceso comienza con el Cultivo de *Aspergillus*, donde el hongo se siembra en un medio Agar Sabouraud, el cual aporta los nutrientes esenciales como fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (peptonas o sales). El cultivo se desarrolla en condiciones controladas, a una 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 se somete a factores de estrés ambiental como cambios de pH o radiación UV. Una vez que el hongo ha crecido y sintetizado la melanina en el medio, se procede a la Recolección y Preparación de 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 pudiera interferir con la extracción. Opcionalmente, se puede secar la biomasa a baja temperatura (40-50°C) en un horno para facilitar la etapa de extracción. La Extracción de la 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 unos 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 ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar un pH cercano a 7. Esta acidificación provoca la precipitación de la melanina, la cual se recupera posteriormente por filtración y se seca. Alternativamente, se pueden emplear otros métodos de extracción. Si la extracción alcalina es insuficiente, se pueden usar disolventes orgánicos como etanol o metanol; en este caso, la biomasa se mezcla con el solvente, se agita con un ligero calentamiento, y el pigmento se filtra, dejando que el disolvente se evapore para obtener la melanina seca. También, en ocasiones, se utiliza ácido clorhídrico concentrado junto con calentamiento para disolver y extraer la melanina, la cual se precipita y separa después. Después de la extracción, la melanina puede

someterse a una Purificación del Pigmento. Dependiendo del nivel de pureza requerido para su uso final, se pueden aplicar técnicas como la precipitación adicional, la diálisis para eliminar impurezas y otros metabolitos fúngicos, o la cromatografía en columna. Finalmente, el pigmento extraído y purificado pasa por el Secado y Almacenamiento. Se obtiene un polvo seco de melanina utilizando un liofilizador o un horno a baja temperatura (40-50°C). Este pigmento seco debe almacenarse en condiciones de oscuridad y sequedad para prevenir 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 solventes como etanol o metanol. El proceso concluye con la purificación, secado y almacenamiento del colorante, pasos que pueden ajustarse para optimizar la extracción según las necesidades de aplicación.

Características genotípicas: Informe de secuenciación genómica (Shotgun Metagenomic Sequencing Report): Este informe está formado por: Estadística de datos sin procesar. (Raw Data Statistics.). El apartado consta de: A. Flujo de trabajo experimental. Macrogen. Las muestras se preparan según el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Así por ejemplo: Preparación de la muestra. Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. Adaptadores Ligase. La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptador 5' y 3'. Alternativamente, la marcación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. Construcción final de la biblioteca. A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recogen en los extremos de cada adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. Generación de clústeres mediante amplificación de puentes. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de la biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puente. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS). La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de ADN molduras. Dado que todos los dNTP 4 reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros. Química de cuatro, dos y un canal. Los sistemas que utilizan la química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos. Generación de datos brutos. El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada base, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ utilizando bcl-convert, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas.

Metabolitos en secuenciación identificados.

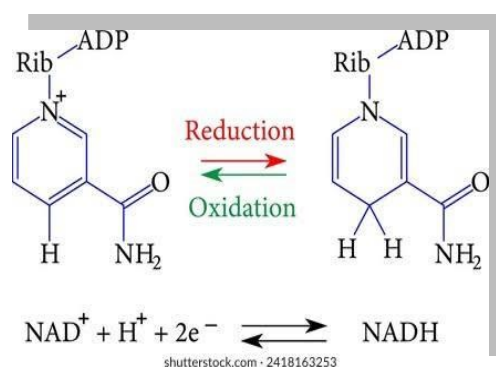


Fig 1. Molécula de NADH.

El Complejo I, también llamado NADH deshidrogenasa, es el complejo enzimático más grande de la cadena respiratoria. Su forma de "L" consta de dos partes principales: un dominio hidrofílico que se adentra en la matriz mitocondrial y se encarga de recibir los electrones del NADH, y un dominio transmembrana anclado en la membrana interna mitocondrial que contiene cerca de 60 hélices. En el interior de esta estructura se encuentran varios grupos que facilitan el transporte de electrones. El primero es el FMN (flavina mononucleótido), que acepta los electrones del NADH. A continuación, una serie de centros de hierro-azufre (Fe-S), ocho en mamíferos, transportan estos electrones hasta la ubiquinona (coenzima Q). Este flujo de electrones libera energía, la cual es utilizada para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico esencial para la síntesis de ATP.

Producción de Pigmentos en Hongos *Aspergillus*. Varias especies de hongos del género *Aspergillus* producen pigmentos como metabolitos secundarios.⁽⁵⁾ Este proceso suele activarse como respuesta a la falta de nutrientes o a condiciones de estrés ambiental. La síntesis de estos pigmentos se lleva a cabo principalmente a través de las vías metabólicas del policétido y del siquimato. La producción de pigmentos está muy ligada a la formación de esporas asexuales (conidios), que son las estructuras que contienen el color. El género *Aspergillus* genera una amplia gama de colores, incluyendo amarillos, anaranjados, rojos, marrones y negros. Un ejemplo destacado son las melaninas, pigmentos oscuros producidos por especies como *A. niger* y *A. fumigatus*. Estas melaninas cumplen una función protectora, defendiendo al hongo de los daños causados por la radiación UV y los radicales libres⁽⁶⁾. Además, en hongos patógenos, las melaninas ayudan a evadir el sistema inmunológico del huésped, lo que aumenta su capacidad de causar enfermedades.

Producción de pigmentos en *Aspergillus salvadorensis* y su relación con el metabolismo. La especie de hongo *Aspergillus uesalvadorensis* también es productora de pigmentos, como lo evidencia la observación de lotes de semillas de color negro. La aspergilina, un tipo de pigmento producido por este hongo, puede manifestarse en tonos negros o verde negruzco dependiendo de diversos factores.⁽⁶⁾ Estos factores incluyen la especie específica de *Aspergillus*, así como las condiciones ambientales como la nutrición, el pH, la temperatura y la presencia de otros compuestos. Además de los pigmentos oscuros, varias especies de *Aspergillus* producen antraquinonas, las cuales poseen propiedades biológicas como efectos antimicrobianos y antioxidantes.

Usos y contribución indirecta de la NADH deshidrogenasa. Los pigmentos fúngicos tienen una variedad de aplicaciones en biotecnología. Son utilizados como colorantes naturales en alimentos, bebidas y otras industrias como la textil y la cosmética. Adicionalmente, muchos de estos pigmentos tienen propiedades bioactivas, como actividad antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena, lo que los hace de gran interés para la industria farmacéutica. Aunque la NADH deshidrogenasa no produce pigmentos directamente, su contribución es indirecta pero crucial. Esta enzima, también conocida como complejo I, tiene dos funciones principales:

Producción de energía (ATP): Su función principal es generar la energía necesaria para todos los procesos metabólicos del hongo, incluyendo la síntesis de pigmentos.^(5,7)

Regulación del estrés oxidativo: *Aspergillus* posee versiones alternativas de esta enzima que ayudan a mantener el equilibrio redox y a controlar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), protegiendo al hongo del estrés ambiental. La producción de melanina puede ser una respuesta complementaria a este mecanismo de protección.

Regulación genética de la producción de pigmentos. La producción de pigmentos en *Aspergillus* es un proceso complejo regulado por la interacción de factores genéticos y metabólicos que responden a las condiciones del entorno. Los genes responsables de la producción de pigmentos suelen estar agrupados y su expresión es controlada por factores de transcripción. Un ejemplo clave de esto son los genes de la policétido sintasa (PKS), que participan en la síntesis de pigmentos como la **aspergilina** a través de rutas metabólicas específicas.

Síntesis y Regulación de Pigmentos en *Aspergillus*.^(8,9,10) La mayoría de los pigmentos en el hongo *Aspergillus*, como la melanina DHN (dihidroxi-naftaleno), son policétidos. Su producción comienza con enzimas conocidas como PKS (policétido sintasas), las cuales unen unidades de acetyl-CoA y malonil-CoA. Factores que controlan la producción de pigmentos. La producción de pigmentos está controlada por una interacción compleja entre factores genéticos y metabólicos:

Factores Genéticos. Genes de la vía de la DHN-melanina: En algunas especies de *Aspergillus*, los genes para la producción de melanina DHN están agrupados en el genoma. Estos genes contienen las instrucciones para las enzimas que transforman precursores simples en el pigmento final.

Genes reguladores: Existen factores de transcripción, como los genes *brlA* y *wA* en *Aspergillus nidulans*, que controlan la expresión de los genes de pigmentos. Por ejemplo, el gen *wA* en esta especie es responsable de cambiar el color de un pigmento de amarillo a verde.

Factores Metabólicos y Ambientales. La producción de pigmentos es un proceso metabólico secundario que se activa bajo condiciones específicas, principalmente cuando los nutrientes principales se agotan.

Disponibilidad de sustratos: La abundancia de los precursores metabólicos (acetyl-CoA y malonil-CoA) influye directamente en la cantidad de pigmento que se produce.^(11,12) Por ejemplo, el nacascal, al ser una fuente rica en carbohidratos, lípidos y proteínas, es un sustrato ideal para el *Aspergillus salvadorensis*.

Estrés ambiental: La pigmentación, especialmente la melanina, actúa como una

protección contra diversas formas de estrés, como: Estrés oxidativo: Los pigmentos funcionan como antioxidantes, neutralizando las especies reactivas de oxígeno. Radiación UV: La melanina absorbe la radiación UV, protegiendo el ADN de las esporas del daño. Metales pesados: Algunas especies de *Aspergillus* pueden modificar su pigmentación en respuesta a la presencia de metales pesados. Diferenciación Celular y Regulación por Estrés. La producción de pigmentos está estrechamente relacionada con la conidiación (formación de esporas), un proceso de diferenciación celular. La pigmentación de las esporas les confiere una mayor resistencia para sobrevivir en entornos hostiles. La regulación de este proceso es un mecanismo de defensa: las señales de estrés ambiental activan los factores de transcripción genéticos, lo que a su vez pone en marcha la producción de pigmentos. El agotamiento de nutrientes desencadena cambios metabólicos en los hongos, redirigiendo su energía del crecimiento hacia la producción de metabolitos secundarios, como los pigmentos. Este mecanismo de supervivencia prepara al organismo para la dispersión. ⁽¹³⁾ Uso de la Secuenciación Genética para el Análisis Metabólico. La secuenciación de ADN (como la proporcionada por MACROGEN) es una herramienta poderosa para predecir las rutas metabólicas y los genes implicados en la biosíntesis de estos metabolitos. Una vez que se obtiene la secuencia del genoma, se pueden usar herramientas bioinformáticas y bases de datos como KEGG y MetaCyc para mapear las rutas metabólicas y asociarlas con genes específicos. Ruta de melanina: Identificar genes de enzimas como la tirosinasa o la laccasa puede indicar que el organismo es capaz de producir melaninas. Ruta de antraquinonas: La secuenciación de genes de oxigenasas, hidroxilasas y transferasas puede sugerir la capacidad del hongo para sintetizar antraquinonas. Análisis de la Expresión Génica con DNA-seq. ^(14,15) Además de la secuenciación de ADN, la técnica DNA-seq es útil para estudiar la expresión de genes. Permite identificar cuáles genes están activos bajo ciertas condiciones, como la escasez de nutrientes o la exposición a factores ambientales que estimulan la producción de pigmentos. Por ejemplo, si un hongo como *Aspergillus* produce melanina en un ambiente determinado, los genes relacionados con la melanina se expresarán en mayor cantidad, lo cual puede detectarse en un análisis de DNA-seq. Predictores de Secuencia y Enzimas Específicas. La secuenciación genética también permite predecir la existencia de enzimas específicas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Polifenol oxidasa: En algunos hongos, esta enzima puede estar implicada en la formación de melaninas. Su gen puede ser identificado a partir de la secuencia genética. Laccasa: Esta enzima también puede ser identificada a partir de su secuencia génica, y su presencia está vinculada a la producción de ciertos pigmentos. En muchos hongos, la laccasa juega un papel importante en la formación de pigmentos oscuros. La identificación de genes que codifican para laccasas a partir de la secuenciación sería un buen indicativo de la producción de pigmentos como la melanina. ⁽¹⁶⁾ En nuestro caso no se estudiaron. La vía de deshidrogenasa juega un papel crucial en muchos procesos metabólicos dentro de las células, incluidos aquellos relacionados con la producción de metabolitos secundarios. ⁽¹⁷⁾ Aunque no está directamente vinculada a la síntesis de pigmentos como las melaninas, la actividad de las deshidrogenasas (enzimas que catalizan reacciones de deshidrogenación, es decir, la eliminación de átomos de hidrógeno) tiene implicaciones indirectas en la generación de metabolitos secundarios que pueden influir en la coloración de los hongos, como *Aspergillus*. En general estas deshidrogenasas son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de sustratos, lo que implica la transferencia de electrones de una molécula a un aceptor de electrones, generalmente NAD^+ o NADP^+ , convirtiéndolos en sus formas reducidas, NADH o NADPH . Este proceso es esencial para la respiración celular, la biosíntesis de compuestos y las reacciones redox de los metabolitos. Su Rol en la producción de metabolitos secundarios. la producción de pigmentos o metabolitos secundarios en *Aspergillus*, las deshidrogenasas pueden tener un rol indirecto pero fundamental, debido a su participación en reacciones de oxidación y reducción que proporcionan los precursores o activan las rutas metabólicas que producen pigmentos como melaninas o antraquinonas. En general la vía de deshidrogenasa es clave para la biosíntesis de varios metabolitos secundarios, ya que contribuye a la producción de NADH o NADPH , ^(18,19) que son esenciales para las reacciones redox que transforman precursores en metabolitos finales. Aunque no es directamente responsable de la coloración (como las melaninas o las aflatoxinas), las deshidrogenasas facilitan las reacciones de oxidación-reducción necesarias para la formación de estos pigmentos y otros compuestos que pueden afectar la coloración del hongo. En resumen, las deshidrogenasas son esenciales para activar o impulsar las rutas metabólicas que conducen a la síntesis de pigmentos, aunque no sean los responsables directos de la pigmentación. ^(20,21,22,23,24) Del análisis de la secuenciación de metabolitos productores de pigmentos, de la secuenciación se encontraron 6 metabolitos productores de pigmento originados por el hongo *Aspergillus uesalvadorensis*, que son:

Tabla I. Enzimas reducción de NADPH y la oxidación de NADH

NADPH-ferrihemoprotein reductase
NADH-quinone oxidoreductase subunit A [EC:1.6.5.3]
NADH-quinone oxidoreductase subunit B [EC:1.6.5.3]
NADH-quinone oxidoreductase subunit C [EC:1.6.5.3]
NADH-quinone oxidoreductase subunit D [EC:1.6.5.3]
NADH-quinone oxidoreductase subunit F [EC:1.6.5.3]

Fuente: MACROGEN KOREA DEL SUR. EggNOG , MetaCyc . 2025

En la Tabla I. Este texto describe el papel indirecto pero crucial de dos enzimas, la NADPH-ferrihemoprotein reductase y la NADH-quinone oxidoreductase (con sus subunidades), en la producción de pigmentos en hongos como *Aspergillus salvadorensis*. Resumen del Papel Enzimático en la Pigmentación. Las enzimas mencionadas no sintetizan pigmentos directamente, sino que actúan como facilitadoras esenciales al participar en el metabolismo redox (reacciones de oxidación-reducción) de la célula. 1. NADPH-ferrihemoprotein reductase. Función Principal: Cataliza la reducción de ferrihemoproteínas utilizando NADPH. Implicación en Pigmentación: Contribuye a los procesos metabólicos generales que requieren transferencia de electrones, lo cual es un prerrequisito para la biosíntesis de muchos compuestos, incluidos los pigmentos. 2. NADH-quinone oxidoreductase (Subunidades A, B, C, D, F). Función Principal: Cataliza la transferencia de electrones desde NADH a una quinona, siendo una parte clave de la cadena de transporte de electrones para la respiración celular y la generación de energía. Implicación en Pigmentación: Indirecta: Su actividad en el equilibrio redox celular es fundamental para las reacciones que conducen a la síntesis de metabolitos secundarios, como las melaninas y otros compuestos fenólicos (que suelen ser pigmentos). Manejo de Electrones: Están implicadas en la oxidación-reducción de compuestos intermediarios necesarios para la biosíntesis de pigmentos. Implicación en la Producción de Pigmentos. La producción de pigmentos oscuros en el hongo *Aspergillus uessalvadorensis*, probablemente melaninas, depende de una serie de reacciones redox. Rol del NADH/NADPH: Las enzimas son vitales porque gestionan la generación y el uso de NADH y NADPH. Estos compuestos son cofactores de transferencia de electrones cruciales en la formación de productos como las melaninas. Facilitación de la Biosíntesis: En el caso de la melanina, las deshidrogenasas (como las NADH-quinona oxidoreductasas) ayudan a mantener el equilibrio redox que permite la oxidación de precursores fenólicos (como la tirosina) hasta llegar a intermediarios complejos como la dopaquinona, que eventualmente forman la melanina. En esencia, estas enzimas son vitales para el ecosistema químico de la célula, creando el ambiente redox necesario para que las enzimas pigmentarias directas puedan llevar a cabo su trabajo.

Tabla II. Enzimas reducción de NADPH y la oxidación de NADH

NADH-quinone oxidoreductase subunit G

<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit H</i>
<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit I</i>
<i>Urate oxidase, dihydroliipoamide dehydrogenase</i>
<i>FMN-dependent NADH-azoreductase</i>
<i>COGO431 Nadp dependent fmn reductase</i>
<i>COGO655 Nad dependent fmn reductase</i>
<i>NADP oxidoreductase, coenzyme f420-dependent</i>

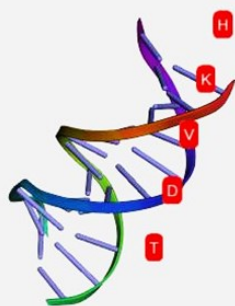
Fuente: MACROGEN KOREA DEL SUR. EggNOG , MetaCyc . 2025

En la Tabla II. Función y Significado de la NADH-Quinona Oxidorreductasa. La enzima NADH-quinona oxidorreductasa (o NADH deshidrogenasa), clasificada con el número EC:1.6.5.3, es un complejo proteico crucial. Identificación del Complejo Enzimático. El complejo está formado por múltiples componentes llamados subunidades (identificadas con códigos K como A, B, C, D y F). El hecho de que todas las subunidades compartan el mismo número EC (EC:1.6.5.3) confirma que todas forman parte del mismo complejo que cataliza la misma

reacción general. Esta enzima es una oxidorreductasa, es decir, maneja las reacciones de oxidación-reducción, actuando específicamente sobre grupos NADH y utilizando una quinona como aceptor de electrones. Rol Indirecto en la Producción de Pigmentos. Aunque la NADH-quinona oxidorreductasa no es la enzima que sintetiza directamente el pigmento, desempeña un papel crucial e indirecto en la producción de pigmentos, ⁽²⁵⁾ especialmente en hongos como el *Aspergillus salvadorensis*. Equilibrio Redox. El Complejo I es la principal función del hongo, siendo fundamental para la respiración celular y la generación de energía. Sin él, la célula no tendría la energía (ATP) ni la estabilidad química (homeostasis redox) necesarias para llevar a cabo rutas metabólicas costosas como la pigmento génesis (producción de pigmentos). Interacción con Precursores de Pigmentos. En hongos, esta enzima o similares (como las NADPH-quinona oxidorreductasas) pueden participar en el ciclo redox de quinonas, que son moléculas que actúan como precursores o subproductos de la biosíntesis de pigmentos. Existe una interacción bioquímica directa: algunos pigmentos quinónicos pueden incluso actuar como oxidantes o inhibidores del Complejo I, demostrando un vínculo estrecho entre el metabolismo energético y los pigmentos. En el caso del *A. salvadorensis* negro (probablemente melanina), el NADH/NADPH que manejan estas enzimas es esencial para la reducción de compuestos intermedios que finalmente se convierten en esos pigmentos oscuros. La Melanina DHN: El Escudo Protector Negro. El color negro o gris-verdoso de las esporas de *Aspergillus* se debe casi totalmente a la DHN-Melanina (1,8-dihidroxi-naftalina-melanina), un polímero final de color negro. Síntesis y Función Principal. Composición: La DHN-Melanina es un pigmento derivado de la vía de los policétidos, que son los precursores químicos. Enzima Clave: La enzima PksP (Policétido Sintasa) es la responsable de iniciar la síntesis del precursor principal (un heptacétido). Función: Este pigmento se deposita en la pared celular de las esporas, actuando esencialmente como un escudo protector para la supervivencia del hongo. Inducción por Estrés. El Disparador: La producción de melanina no es constante, sino que se induce (se activa) cuando el hongo se enfrenta a condiciones de estrés, especialmente el estrés oxidativo (causado por la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno o ROS, como los radicales libres). ⁽²⁶⁾ Mecanismo: La acumulación de ROS actúa como una señal celular crucial, activando los genes que permiten al hongo construir la maquinaria defensiva de melanina para sobrevivir. La Conexión con la Energía Celular (NDH). Aunque la enzima NADH-quinona oxidorreductasa (NDH), o Complejo I, no produce la melanina directamente, es fundamental para que la síntesis ocurra: La NDH es esencial porque genera la energía (ATP) y mantiene el equilibrio metabólico necesario. Sin la energía y la homeostasis que proporciona la NDH, la maquinaria enzimática de la DHN-melanina (como la PksP) no podría operar ni construir las defensas pigmentadas, lo que podría llevar a la muerte del hongo. En resumen, el estrés activa la maquinaria de la melanina, pero la NDH le proporciona el combustible para funcionar. ^(27,28,29,30)

Identificación de molécula del *Aspergillus salvadorensis*.

Fig.2. molécula DNA de *Aspergillus salvadorensis*. AI.2025



En la Fig 2 se observan Codones (3 bases) y los Aminoácidos (una letra) del *Aspergillus salvadorensis*. La imagen muestra una estructura tridimensional (3D) de un ácido nucleico, probablemente ADN o ARN. Se observa una doble hélice (lo cual es típico del ADN o ARN de doble cadena), y una gradiente de color arcoíris a lo largo de la cadena, que normalmente indica la dirección de la molécula (de 5' a 3'). Además, hay letras rojas (T, D, V, K, H) marcando ciertas posiciones específicas de la molécula. En estos no se encuentra los precursores cancerígenos en el hongo.

Discusión

El estudio inicial del hongo *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano **Antonio Micheli** en su obra *Nova Plantarum* quien nació en Florencia, Italia, en 1697 ⁽³¹⁾. En la actualidad, ha generado mucho interés no solo por sus implicaciones en la salud sino también en las industrias alimentaria, química y biológica. Se inician investigaciones generales sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel nacional conocida como la semilla de Nacascal, muy utilizada en

alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país. Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita de 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 de negro-café las vasijas y curtido de la piel del ganado, Los taninos al fermentarse pueden extraerse ácido gálico y glucosa. Además, las vasijas dan la característica especial de la arcilla negra, lo que les da un aspecto colonial y hermoso a las vasijas. Al observar las vasijas el tono café es del tanino de la semilla y el negro proviene del hongo más hierro que contiene 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 raras soportan temperaturas de más de 100 a 300 °C. Actualmente el *Aspergillus* es un género amorfo, que comprende entre 260 y 837 especies ^(32,33) 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 tenga los primers según especies a mezclar los pares de bases. La pigmentación de los hongos se debe a la síntesis de varios tipos de pigmentos y moléculas cromóforos como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas entre otros. ⁽³⁴⁾ Los pigmentos de melaninas tienen una función principal en la protección de las esporas de los hongos contra los aumentos de temperatura, la radiación y la desecación. ⁽³⁵⁾ Las melaninas están presentes en la mayoría de los hongos, encontrándose en casi todos los hongos patógenos. ⁽³⁶⁾ El hábitat natural de las especies de *Aspergillus* es el heno, semillas y el compost, utilizado como alimento para ganados vacunos. En el caso del *Aspergillus niger*. Las melaninas están compuestas de estructuras alifáticas y aromáticas de tipo indol o fenol y son sintetizadas por una amplia gama de organismos. Estos pigmentos, que son metabolitos secundarios, pueden tener diferente coloración y también pueden ser heterogéneos en cuanto a su organización estructural, composición y función. Sin embargo, todos estos pigmentos tienen propiedades sicoquímicas similares, que incluyen resistencia a la hidrólisis ácida, estructura amorfa y polidispersa, naturaleza polimérica, carga neta negativa y una estructura radicalaria estable ⁽³⁷⁾. Todas las melaninas, excepto la piomelanina, son insolubles en agua y disolventes orgánicos, siendo solo solubilizadas en solventes alcalinos. Estas propiedades químicas explican los roles multifuncionales de los pigmentos oscuros que les permiten a los hongos negros adaptarse a diversas condiciones ambientales. ^(27,35)

Conclusiones

Se encontraron 14 enzimas y metabolitos secundarios en la producción de pigmentos negros producidos por el hongo por stress oxidativo. Entre ellos: NADPH-ferrilhemoprotein reductase, NADPH-quinone oxidoreductase subunit A, NADPH-quinone oxidoreductase subunit B, NADPH-quinone oxidoreductase subunit C, NADPH-quinone oxidoreductase subunit D, NADPH-quinone oxidoreductase subunit F, NADH-quinone oxidoreductase subunit G, NADH-quinone oxidoreductase subunit H, NADH-quinone oxidoreductase subunit I, Urate oxidase, dihydroliipoamide dehydrogenase, FMN-dependent, NADH-azoreductase, COGO431 Nadp dependent fmn reductase, COGO655, Nad dependent fmn reductase, NADP oxidoreductase, coenzyme f420-dependent. La producen cuando hay stress oxidativo.

Abreviaturas

DNA	Deoxyribonucleic Acid
UES	University of El Salvador
CENSALUD	Center for Health Research
FASTA	Format for Nucleotide Sequences
MACROGEN	Macroscopic Phenotype of Gene
MALDITOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
MERK	Merck Sharp and Dohme
NGS	Sanger's Sequencing Techniques
ORF	Open Reading Frame
PCR	The polymerase Chain Reaction
SMRT	Single Molecule, Real-time
SMSR	Shotgun Metagenome Sequencing Report
SBS	Sequencing by Synthesis

Gratitud y reconocimiento

A autoridades de la Universidad de El Salvador y de la Facultad de Medicina de la UES por su apoyo moral, al Maestro William Merino de biología molecular como pares evaluadores. Equipos B1 MACROGEN, Inc. Empresa Pública de Biotecnología. Corea del Sur.

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. Bustillo A. Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. 2010. doi: 10.13140/RG.2.1.3594.5128.
2. Casas R. Micología general. 2nd Caracas: universidad central de Venezuela. Edic Biblioteca;2010
3. Macrogen, Inc. /Shaun Seonwoo Lee. /Public Biotechnology Company. South Korea [Internet]. 2024 [citado 3 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://dna.macrogen.com/>.
4. Palomares J. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8. Rev Iberoam Micol. 2007; [No proporciona datos de volumen/páginas].
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
6. Sarma SS, Latchoumycandane C, Varma A. Melanin Production in *Aspergillus*: A Mechanism for Environmental Survival and Virulence. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(4):571–80.
7. Bissett JM. Pigments and secondary metabolites of filamentous fungi: Fungal biotechnology for pigment production. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50(1):35–45. doi: 10.1111/ijfs.12689.
8. Keller NP, Hohn TM. Metabolic Pathways and Regulation of Fungal Secondary Metabolites. *Annu Rev Phytopathol*. 1997;35(1):351–73.
9. Carroll JA, Lattanzio V, Coccetti P, Gualandi A. Regulation of Pigment Biosynthesis in Fungi: Insights into Transcriptional Control. *Fungal Biol Rev*. 2011;25(2):97–104.
10. Kwon NJ, Park JK. Transcriptional Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis in *Aspergillus* Fungi. *Mol Microbiol*. 2009;73(5):905–20.
11. Bogre, L, Hirt, et al. NADH and NADPH in fungal secondary metabolism: role or redox states pigment production. *Fungal Biol Rev* 2003;17(4):140-51
12. Brown SH, Dodd DA. Impact of Nutrient Depletion on Secondary Metabolism in Fungal Systems. *Fungal Ecol*. 2014;10(3):163–70.
13. Dumas M, Lemaire A, Dubois P. Substrate regulation of secondary metabolite production in *Aspergillus* species. *Mycol Res*. 2012;116(6):595–601.
14. Saito T, Hoshino T, Yamashita T. Analysis of Pigment Biosynthesis Genes in *Aspergillus* Species Using DNA Sequencing. *Mycologia*. 2008;100(6):837–44.
15. Nagai Y, Ohta T, Kawano N. Role of Environmental Factors in Regulating Gene Expression and Secondary Metabolism in *Aspergillus* species. *Fungal Genet Biol*. 2018;118:74–81.
16. Xu F, Li Y. Laccase-Mediated Biodegradation of Lignin and Its Application in Pigment Synthesis in Fungi. *J Agric Food Chem*. 2010;58(9):5485–91.
17. Mehta SK, Gupta SK, Kaul S. Understanding the Genetics of Pigment Production in *Aspergillus*: Insights from DNA-seq Studies. *Microb Biotechnol*. 2012;5(4):453–63.
18. Hancock SM, Wood LB. Dehydrogenases in Fungal Metabolism: Key Enzymes in the Production of Secondary Metabolites. *Fungal Genet Biol*. 2007;44(4):292–301.
19. Zhao W, Zhang Y, Zhang J. Dehydrogenase Pathways in Fungal Secondary Metabolism: The Link to NADH and NADPH Production. *Microb Biotechnol*. 2015;8(2):221–30.

20. Gehring AM, Munkvold GP. Fungal secondary metabolites and their role in fungal pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* 2006;43(9):655–60. doi: 10.1016/j.fgb.2006.05.004.
21. Sazanov LA, Hinchliffe P. Structure and mechanism of the mitochondrial NADH:quinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2006;1757(12):1761–9. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.10.001.
22. Casas R. *Micología General*. 2nd ed. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca; 2010.
23. Mikolasch A, Bidochka MJ. Fungal pigments and their role in biological processes. *Mycol Res.* 2008;112(10):1147–56. doi: 10.1016/j.mycres.2008.05.001.
24. Kruppa MD, Bown LA. Fungal pigments and their industrial applications: A review. *Int J Biotechnol.* 2018;15(2):75–90. doi: 10.1007/s20093-018-0023-x.
25. Rodrigues AM, Vilela R. Fungal melanins and their role in virulence: Insights from *Aspergillus* spp. *Fungal Biol.* 2015;119(5):442–56. doi: 10.1016/j.funbio.2015.03.003.
26. Ishii T, Imai T, Takaki T. Structure and Function of NADH-Quinone Oxidoreductase Complexes: The Role of NADH Dehydrogenase in Cellular Respiration. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2007;1767(5):464–73.
27. Pradeep G, Babu G, Satyanarayana T. The Protective Role of DHN-Melanin in Fungal Survival and Virulence. *Fungal Pathog.* 2014;5(1):56–67.
28. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to fungal pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2003;29(4):241–52. doi: 10.1080/10408410390253660.
29. Hirst PJ, King JT, Sazanov AJ. Structure and mechanism of the mitochondrial NADH:quinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2011;1807(6):820–32. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.11.007.
30. Brakhage AA, Scherlach JC. Fungal secondary metabolites in *Aspergillus* and their applications in biotechnology. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):16490–510. doi: 10.3390/ijms140916490.
31. Vermelho AB, Santos AL. Biosynthesis of secondary metabolites in fungi: Implications for industrial applications. In: Sharma VK, Chisti Y, Kumar BD, editors. *Biotechnology of Fungal Metabolites*. New York: Springer; 2010. p. 287–320. doi: 10.1007/978-1-4419-7464-7_11.
32. Cruz R. Micheli y el género *Aspergillus*. *Rev Chilena Infectol [Internet]*. 2023 [citado 3 de octubre de 2025];40(2):169–71. Disponible en: [No se proporciona URL].
33. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2007;59:1–10.
34. Hawksworth DL. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Med Mycol.* 2011;49(Suppl 1):S70–6. doi: 10.3109/13693786.2010.515234.
35. Gmoser JA, Rabe S, Gündüz N, Sulyok M, Krska R. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol Biotechnol.* 2017;4(1):15. doi: 10.1186/s40694-017-0043-4.
36. Nitiu D. Pigmentos sintetizados por hongos negros y su impacto en el deterioro del patrimonio documental en papel. *Bol Soc Argent Bot.* 2022;57(1):169–84.
37. Vega G. La pared celular de hongos patógenos: su importancia en la supervivencia del hongo y el establecimiento de las infecciones fúngicas. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2021;41(1):1–11.
38. Lee J. Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3884. doi: 10.1128/jcm.42.8.3884-3884.2004.

Caracterización de *Aspergillus salvadorensis* aislado de semillas de *Caesalpinia coriaria*. El Salvador. *

Antonio Vásquez Hidalgo *^{ID}

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

Resumen

El estudio se centró en la identificación y caracterización fenotípica y genotípica del género *Aspergillus* mediante secuenciación de nueva generación (NGS), utilizando el sistema Illumina NovaSeq 6000 de MACROGEN SUR, Corea del Sur. La fase inicial consistió en la recolección de semillas de *Caesalpinia coriaria*. La segunda fase, iniciada en 2006, incluyó la caracterización macroscópica y microscópica inicial y el aislamiento de *Aspergillus*. Se extrajo el ADN genómico (ADNg), obteniéndose una concentración máxima de 12,297 ng/μl (con un volumen de 30 μl y una cantidad total de 0,369 ng), y un número de integridad del ADN (DIN) de 6,4. La máxima intensidad de la muestra se observó a los 15.000 pb durante el control de calidad del análisis de ADNg mediante TapeStation. El análisis de qPCR mostró un fragmento de qDNA de 624 pb a una concentración de 103,24 nM (41,87 ng/μl). Para la secuenciación, se obtuvieron un total de 11.705.895.990 pb y 77.522.490 lecturas totales utilizando la biblioteca de ADN TruSeq Nano. El contenido de nucleótidos fue de 49,7 % GC y 50,3 % AT. Los parámetros de calidad fueron excelentes, con un Q20 del 95,1 % y un Q30 del 88,3 %, lo que confirma la alta calidad de los datos. Tras el recorte de calidad y adaptadores, y la eliminación de contaminantes, el valor de los datos brutos se refinó de 38.761.245 N a 30.961.740. La taxonomía de Krona y los mapas de calor confirmaron el género *Aspergillus*. En conclusión. Se identificó con éxito la especie *Aspergillus* sp, que muestra una variedad de especies, lo que coincide con estudios previos de 2006 en los que se la denominó *Aspergillus salvadorensis*. Las secuencias ITS y BenA no corresponden a especies conocidas idénticas, lo que valida su identificación como el nuevo taxón *Aspergillus salvadorensis*.

Palabras clave

Aspergillus salvadorensis, *Caesalpinia coriaria*, ITS, BenA

Introducción

Un proyecto de investigación se centró en la semilla de Nacascal en El Salvador, la cual requiere la presencia del hongo *Aspergillus* sp. para ser pulverizada y utilizada en el teñido de cerámica (que produce una arcilla negra característica) y el curtido de cuero. El hongo facilita la extracción de taninos (para el color marrón) y contribuye al intenso color negro cuando se combina con el hierro de la arcilla. Las especies de *Aspergillus* son saprófitas comunes que se encuentran en la materia orgánica y presentan una alta adaptabilidad a la temperatura (típicamente 5 °C a 60 °C). Se trata de un género diverso que comprende entre 260 y 837 especies. La pigmentación fúngica, incluidas las melaninas, es crucial para la protección contra la temperatura y la radiación. El proyecto de investigación, que comenzó en 2006 con la fenotipificación y culminó en 2024 con la secuenciación de nueva generación (NGS) Illumina NovaSeq X Plus en Corea del Sur, tiene como objetivo extraer, identificar y caracterizar las especies nativas de *Aspergillus* que circulan en El Salvador mediante análisis fenotípico y genotípico. Materiales y métodos. Herramientas. La precisión de la secuenciación se evaluó por ciclo, donde cada ciclo representa la incorporación de una sola base (A, T, C o G), detectada por señales fluorescentes. La secuenciación ciclo a ciclo garantizó una alta precisión. Se identificaron genes asociados con enzimas, proteínas y metabolitos secundarios. El estudio para la caracterización del hongo *Aspergillus* se llevó a cabo en dos fases metodológicas: La caracterización fenotípica comenzó con la recolección de cinco lotes de semillas de Nacascal (*Caesalpinia coriaria*) de la zona norte, seguida de su purificación y selección. El inóculo se preparó en medio de cultivo Sabouraud y se observó el crecimiento a las 48 horas con un microscopio óptico a 40x y 100x. Esta fase incluyó la toma de microfotografías electrónicas en CENSALUD y la realización de una PCR preliminar en México. La caracterización genotípica se centró en análisis moleculares avanzados. Se enviaron tres muestras a los laboratorios de MACROGEN INC en Corea del Sur para la extracción, el análisis y la identificación de diversas formas de ADN, incluyendo ADN

genómico (gDNA), ADN cuasi-cuadrado (qDNA), ADN bicatenario (dsDNA), ADN complementario (cDNA) y ADN secuencial (seqDNA), con el objetivo de determinar la especie. Los procedimientos de laboratorio incluyeron la preparación de una suspensión de esporas a partir del cultivo, su resiembra y el recuento con una cámara de Neubauer para asegurar una concentración adecuada. También se realizó un microcultivo en una cámara húmeda estéril en CENSALUD, donde la muestra se incubó durante 7 días y se observaron las estructuras características con azul de lactofenol bajo un objetivo de 100x. (10,11,12) Se recolectaron semillas de Nacascal y se almacenaron a temperatura ambiente. Para la caracterización morfológica, las muestras de hongos se cultivaron en medio Sabouraud y se incubaron a 37 °C. Las muestras se incubaron a 42 °C durante 72 horas y luego a temperatura ambiente, observándose las estructuras con la misma tinción bajo un microscopio óptico. El aislamiento y la purificación se realizaron raspando el material de la semilla y depositándolo en agar dextrosa Sabouraud (ASD) hasta obtener aislados puros, que posteriormente se inocularon en medio líquido (PW) y se incubaron antes de secar la biomasa a 42 °C. En cuanto a los métodos de ADN, se utilizaron tanto la secuenciación Sanger como, principalmente, la plataforma Illumina. Illumina se caracteriza por amplificar fragmentos de ADN mediante PCR en puente para generar grupos y detectar bases con marcadores fluorescentes, lo que permite secuenciar los fragmentos desde ambos extremos. La extracción de ADN genómico (ADNg) tuvo como objetivo liberar el ADN intracelular mediante la ruptura de la pared celular del hongo, concentrando y purificando las moléculas objetivo sin degradación, mediante métodos químicos, enzimáticos o mecánicos. Finalmente, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) para el control de calidad y la cuantificación del ADN fragmentado. El control de calidad del ADN en MACROGEN se realizó utilizando el sistema QuantiFluor dsDNA y un lector de microplacas, que cuantifica con mayor precisión el ADN de doble cadena. Se observó que el género *Aspergillus* presenta un tamaño de genoma variable (aproximadamente de 27 a 39 Mb) con un promedio de 9000 a 14 000 genes, lo que equivale a aproximadamente 99 980 000 pb. La calidad por ciclo se refiere a la evaluación de la calidad de las lecturas de secuenciación en cada ciclo, donde una base incorporada se detecta y registra utilizando una señal óptica.

Resultados. Descripción taxonómica.

Etimología. El epíteto específico salvadorensis hace referencia a El Salvador, país donde se aisló la especie por primera vez. **Diagnóstico:** *Aspergillus salvadorensis* se diferencia de especies estrechamente relacionadas por una combinación única de caracteres morfológicos y moleculares. **Material examinado (Holotipo).** Aislamiento a partir de semillas de Nacascal, en la zona norte de Morazán, El Salvador, recolectadas en febrero de 2006 y depositadas en la colección de cultivos de la Universidad de El Salvador (UES-1) como cepa tipo. **Secuencias de referencia** depositadas en GenBank bajo los BioProyectos PRJNA1306032 y PRJNA1303219. **Hábitat y distribución:** Aislado de materia vegetal en semillas y suelo. El Salvador. Hasta el momento, solo se ha reportado en esta región. **Notas taxonómicas:** *Aspergillus salvadorensis* pertenece a la sección nigri del género *Aspergillus*, donde forma un clado monofilético distinto y bien sustentado. Diferencias consistentes en el ITS, β Las secuencias de β -tubulina, calmodulina y rpb2 respaldan su reconocimiento como especie independiente. La combinación de evidencia molecular, filogenética y morfológica justifica su designación como nueva especie. Además, produce un tinte negro a partir de hongos. Filogenéticamente, forma un linaje monofilético bien sustentado dentro del género *Aspergillus*, separado de especies relacionadas en análisis multilocus (ITS, BenA). Morfológicamente, presenta características distintivas en la coloración de las colonias, la morfología de los conidióforos y la ornamentación de las conidias. **Descripción.** Procedimiento de microcultivo. La etapa inicial consistió en el aislamiento y la observación fenotípica. Las semillas de Nacascal, de color marrón oscuro, se recolectaron y almacenaron a temperatura ambiente. En lugar de limpiarlas, el material raspado de las semillas se inoculó directamente en placas de agar dextrosa Sabouraud (ASD) para su aislamiento, y este proceso de purificación se repitió hasta obtener aislamientos fúngicos puros. Posteriormente, se identificaron las características taxonómicas mediante microscopía y bases de datos en línea. Para el análisis molecular, la biomasa fúngica se cultivó en medio líquido PW a 37 °C, secado a 42°C, y se almacenó. El objetivo principal de la extracción de ADN genómico (ADNg) era liberar el ADN intracelular mediante la ruptura de la pared celular del hongo (a través de métodos químicos, enzimáticos o mecánicos) y purificarlo eliminando los contaminantes sin degradar el ácido nucleico. Se utilizó la técnica de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para medir la concentración de ADN mediante fluorimetría (utilizando el sistema QuantiFluor dsDNA), que proporciona mayor precisión que la espectrometría. Una vez que el ADN cumplió con los requisitos de control de calidad, se fragmentó y se preparó para la secuenciación. Se mencionaron métodos generales como la secuenciación de Sanger y, más específicamente, la Plataforma Illumina NovaSeq 6000.

Esta tecnología implica la amplificación de fragmentos de ADN a partir de micelio en grupos mediante PCR en puente y la detección de bases utilizando marcadores fluorescentes. Esto permite la secuenciación desde ambos extremos y el análisis de diversos tipos de ADN (ADN genómico, ADN cuantitativa, ADN complementario, etc.). La fiabilidad de los resultados se garantiza evaluando la calidad de las lecturas en cada ciclo del proceso de secuenciación. La precisión de la secuenciación se evaluó en cada ciclo. La fiabilidad de los resultados de la secuenciación se garantizó mediante un meticuloso proceso de detección de bases. En cada ciclo de secuenciación, se añadió una sola base (A, T, C o G), y esta incorporación se detectó mediante señales fluorescentes, lo que aseguró una secuenciación precisa paso a paso. Para identificar los genes relacionados con enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, MACROGEN utilizó varias bases de datos especializadas. Estas incluyeron Egg-NOG, que clasifica los grupos ortólogos (COG); Meta-Cyc, que proporciona información detallada sobre rutas metabólicas, enzimas y reacciones; UniRef, que agrupa secuencias de proteínas, y KEGG, que se centra en la anotación de funciones génicas, permitieron clasificar los genes y las rutas metabólicas específicas de *Aspergillus salvadorensis**, mejorando así la comprensión de sus capacidades biológicas.

Extracción del pigmento negro (melanina): La extracción de melanina, el pigmento negro producido por el hongo *Aspergillus** en condiciones de laboratorio, es un procedimiento metódico debido a la insolubilidad inherente del pigmento. El proceso comienza con el cultivo controlado de *Aspergillus** en agar Sabouraud, que proporciona nutrientes esenciales como fuentes de carbono y nitrógeno. El cultivo se realiza a temperatura ambiente o ligeramente superior (aproximadamente 25 °C). °C a 30°C) con alta humedad. Someter el hongo a factores de estrés ambiental, como cambios de pH o radiación UV, estimula la producción de melanina. ⁽⁵⁵⁾**Descripción. Fenotípico.**^(5,8,51) El nacascol, cuyo nombre científico es *Caesalpinia coriaria*, pertenece a la familia *Caesalpiniaaceae*, género *Caesalpinia*. Es una planta leguminosa con un tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas dispuestas 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 miden de 3 a 4 cm de largo, tienen el ápice redondeado y son de color marrón oscuro. De ellas crece un hongo que podría asemejarse a una especie de *Aspergillus*. El árbol de *Caesalpinia coriaria* contiene taninos, triterpenos, glucósidos y flavonoides. El hongo se reproduce exclusivamente en las semillas del nacascol, de las cuales se extrae el tinte y posteriormente se cultiva in vitro para la producción del mismo por artesanos salvadoreños. El hongo presente en las semillas se describe como esterigmas. La cabeza de los conidios es negra, lisa; conidióforos de 1 a 4 μm. Mide aproximadamente 1 mm de largo y produce conidios moderados o esporas internas de 1 a 3 micras, de color marrón a negro. Es un hongo filamentoso hialino y saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Características macroscópicas: En medio de cultivo Sabouraud, desarrolla una coloración negra con pigmentación en la región posterior del tubo en un plazo de 7 días. En cultivo en placa y tubo de agar Sabouraud: la colonia y su micelio son blancos, de aspecto columnar, y luego se tornan negros, alcanzando un tamaño aproximado de 30-40 mm. El tamaño puede variar significativamente según el medio de cultivo y la temperatura de incubación empleados. La textura de las colonias es similar al algodón o al terciopelo; no presentan esclerocios. El reverso de la colonia es negro o presenta pigmentación negra, dependiendo del agente oxidante. El micelio es de baja altura y la colonia tiene un aspecto negro mate. Es un hongo filamentoso. (14,31,43) El hongo, un organismo hialino filamentoso saprofito perteneciente al filo Ascomycota, presenta características coloniales y estructurales distintivas: Cultivo: Al cultivarse en medio Sabouraud, la colonia muestra inicialmente micelio columnar blanco que posteriormente se torna negro. Su textura es algodonosa o aterciopelada, y no se observan esclerocios. En tubos de cultivo, el hongo produce un pigmento negro visible en el fondo en un plazo de siete días. El reverso de la colonia aparece negro o pigmentado, con un aspecto de micelio bajo, de color negro pulverulento. Características microscópicas: El conidióforo de *Aspergillus* tiene tres partes diferenciadas: una vesícula globosa terminal con una fiálide uniseriada sin metal, un estípite tubular y la célula basal que une el conidióforo al micelio. Los conidióforos son lisos y rugosos, y se agrupan formando una masa compacta, hialina o pigmentada, de 3 a 5 μm. μm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. En su interior se observan cientos de esporas o conidios. La espora es esférica e irregular, aseptada, ameroportosa, coloreada y oscura, del tipo feospora columnar, grande, con un diámetro de 1 a 3 μm. La vesícula es globosa con 52-66 μm de diámetro con una longitud de estípite de 100-300 μm, con un ancho de estípite de 2-2 μm, ornamentación irregular y produce fiálides a su alrededor. Las fiálides son monoseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo, cortas y de 8 micras de largo, de las cuales brotan las conidias, que son globosas y rugosas de 4 a 5 μm de diámetro, marrón o marrón a negro. El diámetro de la colonia es de 9-10 μm, las conidias son columnares y tienen una longitud de 3-5 μm y un ancho de 1,96-2 μm. Cabezas de conidios lisos con pared redonda e irregular, dispuestos en columna; estipes lisos, pronunciados, de pared delgada, de color marrón a negro; no se observa columela; abundantes conidios que se desprenden de la cabeza; presenta una hilera de fiálides. El esporangio es una estructura peridial globosa simple, con esterigma negro. Los conidios

maduros, de color marrón, son esféricos con abundantes proyecciones espinosas en toda la periferia; los centrales son escasos y forman espículas en número superior a diez. Los conidios tienen forma esférica de mazo con espículas, de cuyos extremos emergen largos filamentos dispuestos en cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una cubierta sólida y se caracteriza por no teñirse con colorantes. Las esporas asexuales inmaduras son esféricas, de pared delgada, incoloras y de gran tamaño, y posteriormente se agrupan formando masas internas de color marrón. El conidióforo es largo, liso, uniseriado y con abundantes esporas. En general, la espora es alargada e irregular. Las hifas no presentan septos y el micelio es continuo. La cabeza no es radiada, es columnar y uniseriada, de la cual se desprenden los conidios. Crece a temperatura ambiente de 37 °C. Las conidias/esporas asexuales inmaduras son irregulares, con una pared delgada e incolora de gran tamaño, que luego se rellenan formando masas internas marrones; la colonia tiene un aspecto negro pulverulento. El micelio es corto o aplanado, delgado y negro a medida que envejece. Se sugiere que esta especie de *Aspergillus* encontrada, dada su caracterización morfológica, es otra hallada en El Salvador. Al comparar la especie **Aspergillus niger** con la especie descubierta, la vesícula de la especie **Aspergillus niger** está irradiada y contiene conidias redondas, mientras que la de la especie descubierta tiene forma de mazo alargado sin irradiación. A 100x se observa que las conidias de **Aspergillus niger** son redondas, con paredes gruesas y un centro liso, biserial, metulado y radiado (46). Las de la nueva especie presentan espículas que emergen de la armadura. Se pueden observar ambas conidias, destacando que las de la nueva especie no se tiñen con azul de algodón lactofenol, mientras que las de **Aspergillus niger** sí (51). *Aspergillus* se reproduce asexualmente mediante la formación de conidios. Inicialmente, el micelio es blanco y, tras varias semanas a temperatura ambiente, se torna negro en 7 días, con un aumento progresivo de esporulación marrón. Estos conidios crecen en los extremos de las fiálides. Debido a la presencia de pigmentos, adquieren su color negro. Los hongos del género *Aspergillus* spp. se caracterizan por producir micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante la degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa contra otros microorganismos (43-14, 17). Las hifas se desarrollan en un conidióforo que, en su extremo terminal, termina en una cabeza conidial globosa de la cual emergen las fiálides y se desprenden las esporas o conidios para reiniciar su ciclo. Cada hifa, en su extremo, forma cabezas conidiales globosas que pueden producir más de 500.000 conidios (31). Estas conidias, observadas a 100x, presentan una apariencia rugosa similar a la de las pectorales, con una pared gruesa de espículas marrones que se proyectan hacia afuera, llenas e intactas, sin la coloración azul algodonosa del lactofenol. Desde la base de las hifas, cada conidia es empujada hacia el interior del conidióforo hasta alcanzar la vesícula donde se acumula, ejerciendo una presión mecánica hacia afuera desde su salida de las fiálides. Este proceso se repite constantemente. Las hifas son estructuras cilíndricas filamentosas que forman el cuerpo de los hongos multicelulares. Están compuestas por una hilera de células alargadas envueltas por una pared celular quitinosa. Las células que las componen pueden o no estar separadas entre sí por una pared celular transversal llamada septo. Estas conidias se consideran infecciosas y constituyen el punto de partida para el desarrollo del micelio del hongo. En resumen, pertenece al Reino Fungi, Filo Ascomycota, Género *Aspergillus*, Especie salvadorensis. Es un metabolito activo. (9,11, 34,35,36,40,41,47,48-50,51).

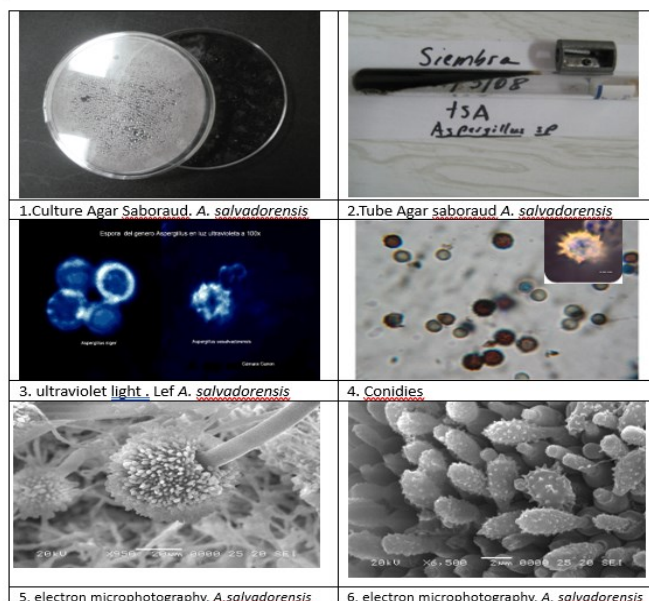


Figura 1. *Aspergillus salvadorensis*. Caracterización fenotípica. 1. Agar de cultivo Saboraud 2. Tubo de cultivo Saboraud 3. Luz ultravioleta 4. Cabezas conidiales de *Aspergillus* 100x, 5. Microfotografía electrónica 2550x y 6. Microfotografía electrónica 10000x.

Figura 1. Morfología del hongo y adaptación al calor. Se cultivó en agar Sabouraud, donde se observan colonias negras en la placa y en la parte posterior del tubo en las fotos 1 y 2. En la foto 3 se observa que, bajo luz ultravioleta, existe una diferencia cualitativa entre las especies *Niger* y *Salvadorensis*: en la primera se observa un halo alrededor y en la segunda, la presencia de espículas. No está teñido con lactofenol azul algodón, a diferencia de otras especies de hongos. En la foto 4 se observan conidios a 100x que reflejan espículas y una armadura compacta. En las fotos 5 y 6 se muestra una microfotografía electrónica en la que se observa un conidióforo y una vesícula, además de conidios con forma de cactus, a 2550x y 10000x respectivamente. (4)

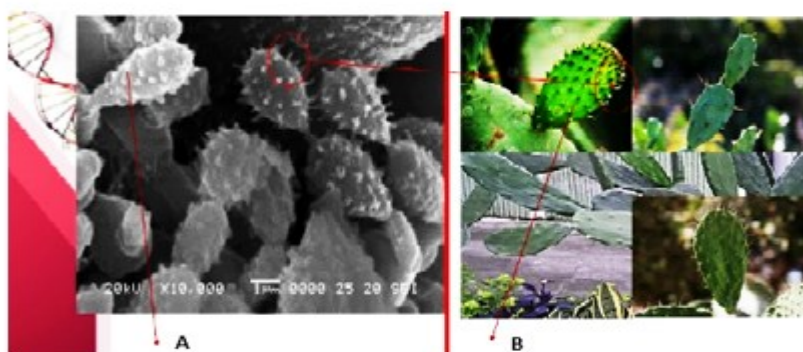


Figure 2. Comparison of species with natural cactus plant.

En la figura 2. La especie de *Aspergillus* estudiada muestra una adaptación al calor extremo, una característica que se compara visualmente con la de un cactus. Se cree que las conidias espiculadas del hongo (esporas cubiertas de finas proyecciones espinosas) le proporcionan resistencia al calor y ayudan a retener la humedad, lo que le permite sobrevivir a temperaturas superiores a 60-100 °C. Esta adaptación al calor es significativa porque, si bien la alta humedad suele

detener el crecimiento de hongos productores de toxinas como los que producen aflatoxinas, este *Aspergillus* en particular prospera con el calor. La microscopía confirmó una esporulación rápida y prolífica, con conidios que emergieron de las fiálides uniseriadas de la columna vesicular a las dos semanas de cultivo. Se registró una esporulación extremadamente rápida: se observaron millones de esporas en diez campos visuales en una hora. El cuerpo del hongo consta de un conidióforo hialino y rugoso con una cabeza globosa e hifas que se alargan y acumulan filamentos. Tiene forma de raqueta. También se observaron conidios en frascos. Características de las esporas y estructura biológica: El sencillo ciclo biológico de *Aspergillus* implica la formación de esporas para su reproducción, las cuales germinan en hifas, la forma invasiva del hongo. La alta tasa de esporulación y la elevada concentración ambiental se atribuyen a que las esporas se encuentran en angiosporas. El pequeño tamaño de los conidios, que varía entre 0,2 y 3,5 micras, es particularmente notable, ya que les permite ser inhalados fácilmente hacia los alvéolos pulmonares, que miden solo de 0,2 a 0,5 mm. La resistencia de las esporas a las altas temperaturas proviene de su dura cubierta externa, y algunas esporas contienen melanina para una mayor protección térmica. Esta resistencia les permite viajar largas distancias y colonizar nuevas áreas, madurando rápidamente en menos de cinco días. Las células fúngicas están protegidas por una pared rígida compuesta de aproximadamente un 80 % de carbohidratos, incluyendo quitosano, quitina, peptidoglicanos y mananos; pero, a diferencia de las plantas, carecen en su mayoría de celulosa. Esta pared también contiene proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales. Las proteínas se utilizan para el nitrógeno y el crecimiento, mientras que los carbohidratos y los lípidos proporcionan energía. En el laboratorio, la quitina se suele ablandar con hidróxido de potasio para su análisis morfológico. Comparación con especies relacionadas y genómica: Una comparación de la especie estudiada (*A. salvadorensis*) con *A. niger* reveló claras diferencias en las estructuras productoras de esporas. *A. niger* presenta una cabeza redondeada y radiada, biseriada (con dos filas de fiálides), mientras que *A. salvadorensis* tiene una cabeza alargada, columnar y en forma de mazo, uniseriada (con una sola fila de fiálides) y carece de vesícula. A nivel mundial, el género *Aspergillus* es muy extenso; Rapper y Fennell reportaron alrededor de 900 especies conocidas. Solo 12 especies se asocian comúnmente con enfermedades humanas. Generalmente, las especies de *Aspergillus* tienen un tamaño de genoma que oscila entre 30 y 40 megabases (Mb), lo que equivale a entre 30 y 40 millones de pares de bases (pb). *A. salvadorensis* tiene 11.705.895.990 pb. (1,2,3,4,5,6,7,8,9,18,19,20,12,49)

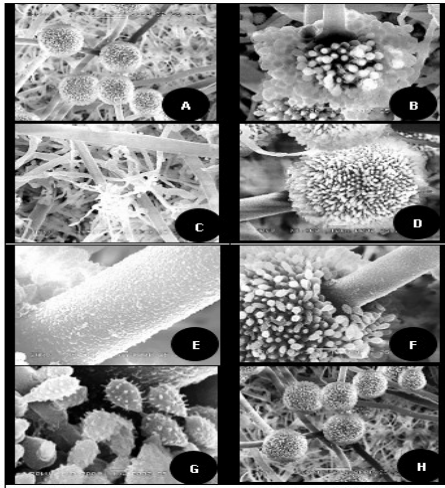


Figure 3. *Aspergillus salvadorensis* Scanning electron microphotography. Courtesy of CENSALUD by Dr. Vianney de Abrego. A. Morphology *Aspergillus*, B. vesicle, C: Zapata, elongation of hyphae with filament and branching D. Head of conidia, E. rough codiophore, F. globose and fialide vesicle, G. conidia, H. head of columnar. 1000x y 100,000x

LightCycle, arrojó una concentración de 103,24 nM y 41,87 ng/μl para un fragmento de 624 pb. Se utilizó la biblioteca TruSeq Nano DNA (350_META). Estos valores indican que el ADN se preparó y analizó para cumplir con altos estándares de pureza y calidad, un requisito previo para aplicaciones de biología molecular como la secuenciación. En general, concentraciones superiores a 10 ng/μLas concentraciones elevadas se consideran ideales para la secuenciación, ya que garantizan suficiente material genético para lecturas precisas. Por el contrario, las concentraciones bajas pueden requerir reextracción o concentración adicional. El número de pares de bases (pb) necesarios para secuenciar un hongo depende del objetivo del estudio; generalmente se requieren millones de pares de bases para una cobertura genómica completa, dado que los genomas fúngicos varían desde unos pocos megabases (Mb) hasta más de 100 Mb. Biblioteca de ADN complementario (ADNc): Para la siguiente fase, se utilizaron un total de 33 kits de biblioteca para ADNc. Esta técnica es fundamental para crear una copia de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero (ARNm) del organismo mediante transcripción inversa. El ADNc resultante se utiliza para construir la biblioteca de secuenciación. La construcción de la biblioteca de ADNc implica evaluar su calidad y representatividad. Visualizar los fragmentos del ADN bicatenario extraído es vital: los fragmentos cortos pueden indicar degradación del ARN, mientras que los fragmentos inusualmente largos sugieren problemas de fragmentación durante la preparación. En el proceso final, se añaden adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADNc para que puedan unirse a la superficie de la celda de flujo de la plataforma NovaSeq (concentración de 5 a 10 nM) y ser amplificados durante la secuenciación. (37,21,22)

ADN bicatenario

Sample ID	Total bases (bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Aspergillus	11,705,895,990	77,522,490	49.7	50.3	95.1	88.3

Raw Data Statistics

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 1 sample(s). For example, in *Aspergillus* sample, 77,522,490 reads are produced, and total read bases are 11.7 Gbp. The GC content (%) is 49.7% and Q30 is 88.3%.

* Raw Data

- Sample ID: Sample name.
- Total Bases (bp): Total number of bases sequenced.
- Total Reads: Total number of reads. For illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read1 and read2.
- GC (%): Ratio of GC content.
- AT (%): Ratio of AT content.
- Q20 (%): Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30 (%): Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

En la figura 3 se pueden ver microfotografías electrónicas de *Aspergillus salvadorensis* donde se puede ver el conidióforo en a, e, f, la vesícula en b, c, d y los conidios en f, g a 1000x y 100000x.

Técnica de qPCR.

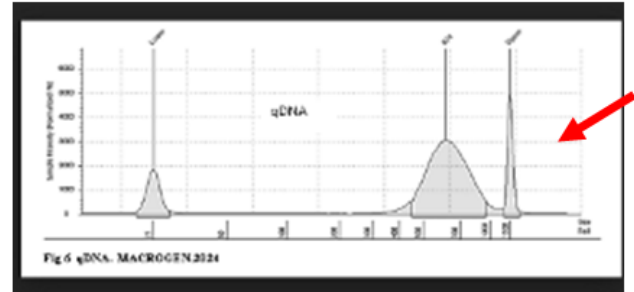


Figura 4. qDNA. Extracción de *Aspergillus salvadorensis* MACROGEN INC. 2024.

Figura 4. Cuantificación molecular y preparación de la biblioteca de ADN. Cuantificación y calidad del ADN (qDNA). El análisis de la muestra de ADN genómico (gDNA) de El Salvador, realizado mediante qPCR

LightCycle, arrojó una concentración de 103,24 nM y 41,87 ng/μl para un fragmento de 624 pb. Se utilizó la biblioteca TruSeq Nano DNA (350_META). Estos valores indican que el ADN se preparó y analizó para cumplir con altos estándares de pureza y calidad, un requisito previo para aplicaciones de biología molecular como la secuenciación. En general, concentraciones superiores a 10 ng/μLas concentraciones elevadas se consideran ideales para la secuenciación, ya que garantizan suficiente material genético para lecturas precisas. Por el contrario, las concentraciones bajas pueden requerir reextracción o concentración adicional. El número de pares de bases (pb) necesarios para secuenciar un hongo depende del objetivo del estudio; generalmente se requieren millones de pares de bases para una cobertura genómica completa, dado que los genomas fúngicos varían desde unos pocos megabases (Mb) hasta más de 100 Mb. Biblioteca de ADN complementario (ADNc): Para la siguiente fase, se utilizaron un total de 33 kits de biblioteca para ADNc. Esta técnica es fundamental para crear una copia de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero (ARNm) del organismo mediante transcripción inversa. El ADNc resultante se utiliza para construir la biblioteca de secuenciación. La construcción de la biblioteca de ADNc implica evaluar su calidad y representatividad. Visualizar los fragmentos del ADN bicatenario extraído es vital: los fragmentos cortos pueden indicar degradación del ARN, mientras que los fragmentos inusualmente largos sugieren problemas de fragmentación durante la preparación. En el proceso final, se añaden adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADNc para que puedan unirse a la superficie de la celda de flujo de la plataforma NovaSeq (concentración de 5 a 10 nM) y ser amplificados durante la secuenciación. (37,21,22)

Tabla 1. Datos brutos. Macrogen. 2025

Tabla 1. Análisis de datos de secuenciación y control de calidad. ADN bicatenario y bases totales. Se confirmó una alta concentración de ADN bicatenario (dsDNA), necesaria para una secuenciación precisa, con concentraciones superiores a 10 ng/μSiendo ideal, durante el proceso de secuenciación, este ADN bicatenario (dsDNA) se desnaturaliza en cadenas sencillas para leer la secuencia de nucleótidos, que luego se amplifica. Los datos de la secuencia final se almacenan en archivos FASTQ, que

contienen tanto las secuencias de nucleótidos como sus puntuaciones de calidad asociadas. El proceso de secuenciación produjo un resultado masivo de 11.705.895.990 pb (pares de bases), lo que indica el número total de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) presentes en la muestra analizada. Este total se traduce en 11,7 gigabases (Gb) o picomoles de nucleótidos. Específicamente, los datos mostraron 5.735.889.035,1 bases GC y 5.852.947.995 bases AT. Lecturas totales y puntuaciones de calidad. La secuenciación produjo un total de 77.522.490 lecturas. Este volumen de lecturas, junto con el total de pares de bases, sugiere que aproximadamente el 66 % de las lecturas de ADN se procesaron correctamente, generaron datos de alta calidad y pudieron alinearse o ensamblarse adecuadamente para reconstruir la secuencia final. El 34 % restante probablemente corresponde a lecturas de baja calidad o fallidas. El contenido de GC/AT mostró un equilibrio casi perfecto, con un 49,7 % de la secuencia compuesta por pares de bases guanina-citosina (GC) y un 50,3 % compuesta por pares de bases adenina-timina (AT). Esta composición equilibrada (a menudo denominada simplemente 50 % GC y 50 % AT) es un indicador clave de la estabilidad y las propiedades de la secuencia de ADN. Finalmente, las métricas Q20 y Q30 confirmaron la alta calidad de los datos de secuenciación. Una puntuación Q20 de 95,1 y una puntuación Q30 de 88,3 se consideran altas, lo que significa que muchas de las identificaciones de bases fueron altamente fiables y precisas. **Datos brutos:** Análisis de datos moleculares y control de calidad. ADN bicatenario y bases totales. Se confirmó una alta concentración de ADN bicatenario (dsDNA), necesaria para una secuenciación precisa, con concentraciones superiores a 10 ng/cm². μSe consideró óptimo. Durante la secuenciación, este ADN bicatenario se desnaturaliza para leer la secuencia de nucleótidos. Los datos de la secuencia final se almacenan en archivos FASTQ, que contienen tanto las secuencias de nucleótidos como sus puntuaciones de calidad asociadas. La secuenciación generó un total de 11 705 895 990 pb (pares de bases), lo que indica el número total de nucleótidos presentes en la muestra analizada, equivalente a 11,7 gigabases (Gb). Específicamente, los datos mostraron 5 735 889 035,1 bases GC y 5 852 947 995 bases AT. Lecturas totales y puntuaciones de calidad. La secuenciación produjo un total de 77 522 490 lecturas. Este volumen, en relación con el total de pares de bases, sugiere que aproximadamente el 66 % de las lecturas de ADN se procesaron correctamente, generaron datos de alta calidad y pudieron alinearse o ensamblarse correctamente. El 34 % restante probablemente corresponde a lecturas fallidas o de baja calidad. El contenido GC/AT mostró un equilibrio casi perfecto, con un 49,7 % de la secuencia compuesta por pares de bases guanina-citosina (GC) y un 50,3 % por pares de bases adenina-timina (AT). Esta composición equilibrada es un indicador clave de la estabilidad de la secuencia de ADN. Finalmente, las métricas Q20 y Q30 confirmaron la alta calidad de los datos de secuenciación. Una puntuación Q20 de 95,1 y una puntuación Q30 de 88,3 se consideran altas, lo que significa que la gran mayoría de las bases identificadas fueron altamente fiables y precisas. ⁽³⁵⁾

Análisis taxonómico: - Taxonomía de Krona:

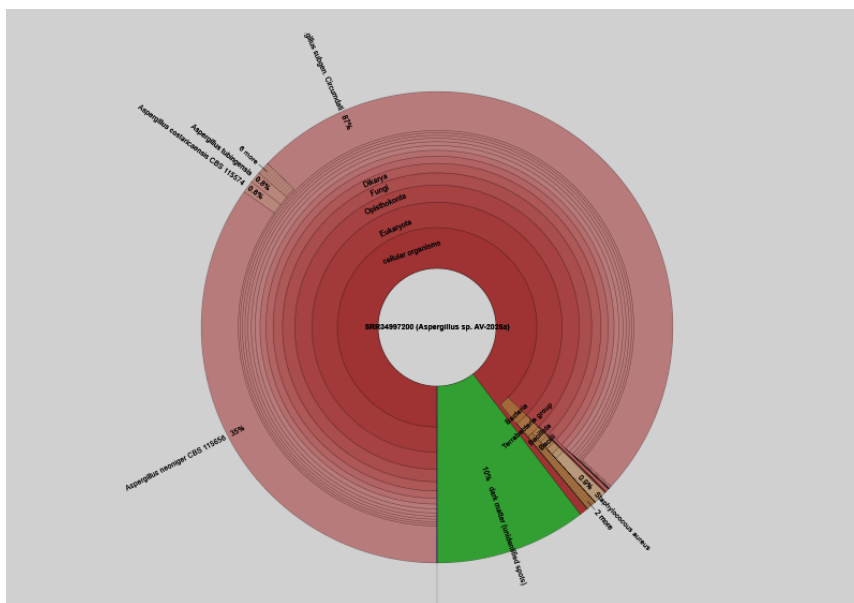


Figura 5. Taxonomía de Krona del análisis taxonómico. *Aspergillus salvadorensis*. 9,9 Gbases de 67,0 millones de GenBank 2025

En el análisis de la figura 5: 89,60 % de lecturas identificadas, 10,40 % de lecturas no identificadas, organismos celulares: 89,60 %, eucariotas: 87,40 %, opistocontas: 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 %. Identificación taxonómica y comparación molecular. Los datos de secuenciación, correspondientes al experimento con ID SRR34997200, se visualizaron mediante un gráfico radial de Krona, una herramienta interactiva para datos taxonómicos, generado a partir de un análisis de GenBank. Esta visualización confirmó que el organismo predominante es un hongo del género *Aspergillus*, específicamente la cepa AV-2025a. El gráfico organiza las secuencias jerárquicamente: la gran mayoría se asignaron a organismos celulares (en rojo), principalmente dentro del dominio Eukaryota, siguiendo el linaje a través de Fungi hasta el género *Aspergillus*. Una pequeña porción (en verde) representó otros dominios, como bacterias o secuencias no clasificadas, y un segmento aún menor (en azul, 0,00001 %) indicó virus. Asignación de especies y designación de nuevas especies. Dentro del grupo *Aspergillus*, una gran proporción de las secuencias (35%) mostró una alta coincidencia con la especie conocida *Aspergillus neoniger* CBS 115655 (que abarca 9,9 Gbases). Sin embargo, los investigadores observaron que esta alta coincidencia inicial (99% en algunos fragmentos cortos) se debió a la alineación con datos preprocesados en lugar de datos sin procesar. Un análisis más detallado determinó que la muestra, denominada *A. salvadorensis*, es una entidad genética distinta de *A. neoniger*. Si bien la secuencia de *A. salvadorensis* mostró un 89,60% de similitud en las lecturas con *A. neoniger*, la comparación general solo alcanzó un 38% de similitud. Esta baja similitud general sugiere que ambas no son lo suficientemente similares como para pertenecer a la misma especie, lo que respalda la afirmación de que *A. salvadorensis* es una nueva especie. El análisis también rastreó la secuencia a través de taxones superiores: Eukaryota (87,40%), Opisthokonta (87,34%) y Fungi (87,29%). Herramientas utilizadas para la confirmación. Para realizar el análisis molecular y confirmar la identidad, se utilizaron varios programas especializados, entre ellos BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local), MEGA 11 (Análisis de Genética Evolutiva Molecular) y CLUSTAL OMEGA (Programa de Alineamiento de Secuencias Múltiples). El análisis con CLUSTAL OMEGA confirmó específicamente que la cepa pertenece al género *Aspergillus*.

La secuencia corta que se analizará del ADN de *Aspergillus uesalvadorensis*, proporcionada por MACROGEN INC Corea del Sur, es: (una única cadena circular de un total de 67 millones de puntos, 9,9 Gb de bases y 4,3 Gb). Contiene:

Tabla 2. Secuenciación de ADN de *Aspergillus salvadorensis*.

La Tabla 2 presenta un análisis básico de la secuencia: 1. Longitud: La secuencia tiene 310 pares de bases (pb). 2. Composición de bases: El cálculo de la composición 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 %. N no tiene valor. Los valores son típicos de varias especies de *Aspergillus*. Región probable: ITS (Espaciador Transcrito Interno). Se realizó una comparación con las bases de datos de

ITS en NCBI BLAST utilizando herramientas como BLASTn para verificar si la secuencia coincide con otras regiones ITS conocidas de *Aspergillus uesalvadorensis* o especies relacionadas. Las regiones ITS se ubican entre los genes ribosómicos 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 STI completas típicas, 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 cebadores. Las especies más cercanas serían *A. neoniger* y *A. niger*, entre otras.

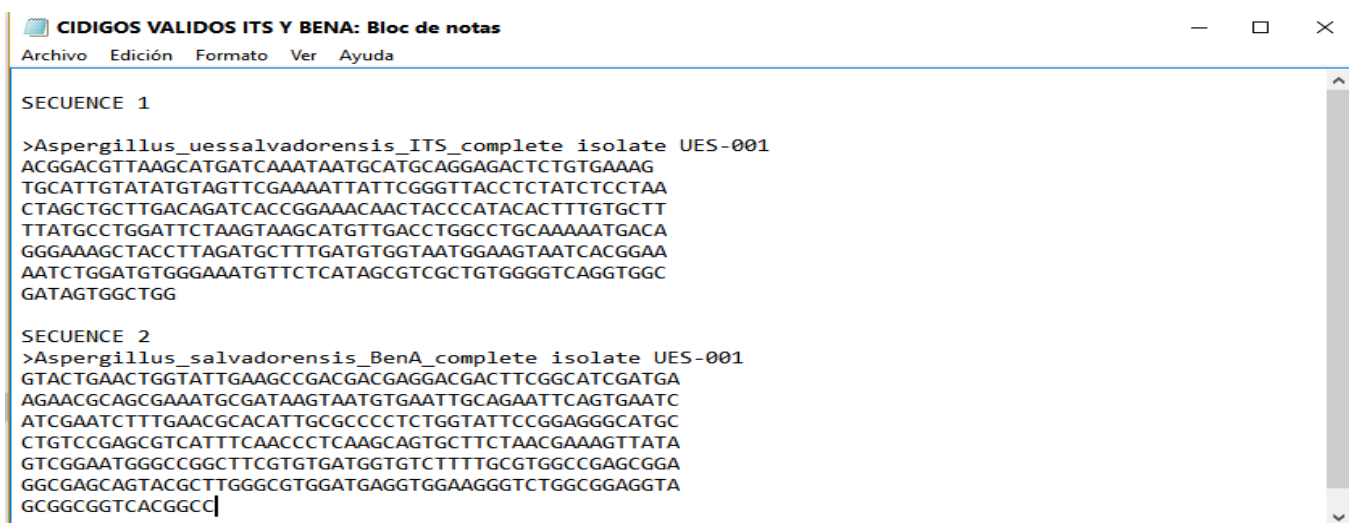
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus niger contig_An01c0190_genomic contig	<i>Aspergillus niger</i>	178	178	48%	5e-40	88.08%	68098	AM269966.1
Aspergillus costaricensis CBS 115574 P34-Arc-domain-containing protein (BO79DRAFT_190700). mRNA	<i>Aspergillus cost...</i>	171	171	29%	8e-38	100.00%	1220	XM_025680759.1
Aspergillus tubingensis P34-Arc-domain-containing protein (AIWU_05420). partial mRNA	<i>Aspergillus tubi...</i>	171	171	29%	8e-38	100.00%	963	XM_035500530.1
Aspergillus neoniger CBS 115656 P34-Arc-domain-containing protein (BO87DRAFT_374486). mRNA	<i>Aspergillus neo...</i>	171	171	29%	8e-38	100.00%	1179	XM_025622790.1
Aspergillus piperis CBS 112811 ARP2/3 complex 34 kDa subunit (BO85DRAFT_445474). mRNA	<i>Aspergillus pipe...</i>	171	171	29%	8e-38	100.00%	1197	XM_025659270.1
Aspergillus luchuensis ARP2/3 actin-organizing complex subunit Arc34 (ARC2). partial mRNA	<i>Aspergillus luch...</i>	165	165	29%	4e-36	98.91%	963	XM_041685395.1
Aspergillus eucalypticola CBS 122712 P34-Arc-domain-containing protein (BO83DRAFT_373938). mRNA	<i>Aspergillus euc...</i>	165	165	29%	4e-36	98.91%	1366	XM_025530082.1
Aspergillus vadensis CBS 113365 P34-Arc-domain-containing protein (BO88DRAFT_407660). mRNA	<i>Aspergillus vad...</i>	154	154	29%	8e-33	96.74%	1198	XM_025707496.1
Aspergillus welwitschiae Arp2/3 complex_34 kd subunit p34-Arc-domain-containing protein (BD094DRAF...	<i>Aspergillus wel...</i>	137	137	29%	8e-28	93.48%	1142	XM_026765104.1
Aspergillus niger uncharacterized protein (An01g05510). partial mRNA	<i>Aspergillus niger</i>	132	132	29%	4e-26	92.39%	963	XM_001388938.3
Aspergillus brasiliensis CBS 101740 uncharacterized protein (ASPBRDRAFT_40167). mRNA	<i>Aspergillus bras...</i>	132	132	29%	4e-26	92.39%	1386	XM_067624291.1

Tabla 3. Tabla de referencia de similitudes con la secuencia de *A. uesalvadorensis*. BLAST

En la Tabla 3 se muestra una búsqueda BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local), que indica las coincidencias entre la secuencia de consulta y las secuencias almacenadas en una base de datos. La especie más cercana resultó ser **A. neoniger**, con una puntuación total de 171, lo que indica una buena similitud general entre la consulta y esta coincidencia. La cobertura de la consulta, del 29% (solo el 29% de la secuencia se alineó con el ARNm), se considera baja. Esta coincidencia probablemente corresponde a una región local fortuita con similitud, y no a una identificación taxonómica sólida basada en el ITS y en el 48% de **A. neoniger**. La identidad de Perl (100%) en la región alineada y el valor E de 8e-38 son significativos, lo que indica que no se trata de una alineación casual. En conclusión, no hay evidencia sólida de que la secuencia ITS de **Aspergillus uesalvadorensis** corresponda a un gen codificante como el ARNm de **A. neoniger**. La coincidencia

podría deberse a regiones conservadas entre las especies de *Aspergillus salvadorensis* y *A. niger*, o simplemente a un fragmento con homología fortuita. Por lo tanto, la identidad de secuencia de *A. salvadorensis* no es del 100%, sino que se sitúa entre el 29% y el 48%, siendo *A. niger* y *A. niger* las más cercanas, aunque no representativas.

Secuencias ITS y BenA. La caracterización genotípica de las especies de hongos (inicialmente denominadas subespecies) se llevó a cabo utilizando las siguientes regiones genéticas: ITS/LSU. El método de identificación molecular que permitió la validación de una nueva especie consistió en el análisis de secuencias de ADN que codifican ARN ribosómicos (ARNr), específicamente las regiones ITS/LSU. ITS (Espaciador Transcrito Interno): Esta región, que incluye ITS1 e ITS2 separadas por el gen del ARNr 5.8S, sirve como marcador genético principal para la identificación de *Aspergillus*. La región ITS presenta una alta variabilidad entre especies, lo que permite la identificación a nivel de especie dentro del género. LSU (Subunidad Grande): Si bien el enfoque principal se centra en la región ITS, la secuenciación de hongos a menudo incluye el gen del ARNr 28S (parte de LSU) o el gen del ARNr 18S como regiones de anclaje para cebadores o para proporcionar un contexto filogenético más amplio. El análisis de secuencias de ADN ribosómico (ARNr) es una técnica molecular excepcional para estudios taxonómicos de especies. La información genotípica obtenida, incluyendo la secuenciación de estas regiones, se utilizó para registrar la nueva especie en bases de datos internacionales. Para la caracterización genotípica, se empleó la extracción de ADN genómico (ADNg) y su posterior análisis mediante secuenciación de nueva generación (NGS), comparando las secuencias obtenidas con las bases de datos disponibles para confirmar las diferencias genéticas con otras especies. Secuencia específica: El estudio menciona la obtención de un fragmento de 624 pares de bases (pb), que coincide con el tamaño de los amplicones de toda la región ITS (que suele variar entre 565 y 613 pb en otras especies).



```
CIDIGOS VALIDOS ITS Y BENA: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda

SECUENCIA 1
>Aspergillus_uessalvadorensis_ITS_complete_isolate UES-001
ACGGAGTTAAGCATGATCAATAATGCATGCAGGAGACTCTGTGAAAG
TGCAATTGTATATGTAGTTCGAAAATTATTGGGTTACCTCTATCTCTAA
CTAGCTGCTTGACAGATCACCGGAAACAAC TACCATACACTTTGTGCTT
TTATGCC TGGATTCTAAGTAAGCATGTTGACCTGGCCTGCAAAAATGACA
GGGAAAGCTACCTTAGATGCTTTGATGTGGTAATGGAAGTAATCACGGAA
AATCTGGATGTGGGAAATGTTCTCATAGCGTCGCTGTGGGGTCAGGTGGC
GATAGTGGCTGG

SECUENCIA 2
>Aspergillus_salvadorensis_BenA_complete_isolate UES-001
GTA CTGAACTGGTATTGAAGCCGACGACGAGGACGACTTCGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT CAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC TCTGGTATTCCGGAGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCAGTGTCTTAACGAAAGTTATA
GTCGGAATGGGCCGGCTTCGTGTGATGGTGTCTTTTGCCTGGCCGAGCGGA
GGCAGCAGTACGCTTGGGCGTGGATGAGGTGGAAGGGTCTGGCCGAGGTA
GCGGCGGTCACGGCC|
```

Cuadro 4. Secuencias *Aspergillus salvadorensis* de ITS y BenA. 2025

En la Tabla 4, la secuencia *>Aspergillus salvadorensis_ITS_aislado completo UES-001* representa un fragmento de ADN ribosómico nuclear que contiene la región ITS (Espaciador Transcrito Interno), un marcador molecular ampliamente utilizado para la identificación y clasificación filogenética de

hongos. La región ITS se ubica entre los genes de ARNr 18S (SSU) y 28S (LSU) en el ADN ribosómico y está compuesta por tres componentes: ITS1, el gen de ARNr 5.8S e ITS2. Estas regiones intergénicas presentan una alta variabilidad entre especies, lo que las hace útiles para distinguir diferentes taxones de hongos, especialmente dentro del género *Aspergillus*. La secuencia analizada (312 pb) muestra características típicas de la región ITS, como la presencia de motivos repetitivos y un contenido GC equilibrado (~49-50%), común en hongos filamentosos. Al comparar la secuencia con bases de datos conocidas, la alineación no mostró una coincidencia exacta con ninguna especie descrita previamente, aunque coincidencias parciales indicaron una similitud general con el género *Aspergillus*. Esto sugiere que la secuencia podría representar una variante intraespecífica no registrada o posiblemente una nueva especie de *Aspergillus*, a la que provisionalmente se le denomina *Aspergillus salvadorensis*. Para confirmar esto, se debe realizar un análisis comparativo adicional utilizando BLASTn y bases de datos específicas de ITS como UNITE o NCBI rDNA-ITS Fungi, comparando por separado las regiones ITS1, 5.8S e ITS2. En conclusión, la secuencia representa la región ITS completa del ADN ribosomal de un hongo del género *Aspergillus*, y el nombre provisional *A. salvadorensis* se basa en su distinción genética con respecto a otras especies conocidas del grupo.

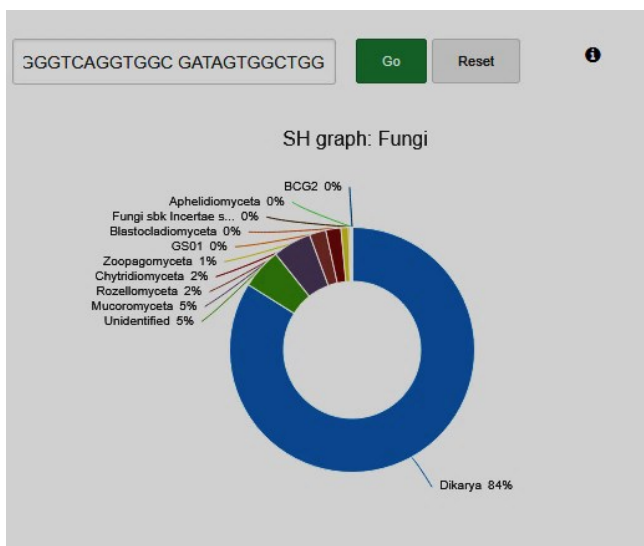


Figura 6. Secuencia de *Aspergillus salvadorensis*. UNITE. 2025

La secuencia >*Aspergillus salvadorensis*_ITS_complete isolate UES-001 corresponde a un fragmento de ADN ribosómico nuclear que contiene la región ITS (Espaciador Transcrito Interno), un marcador molecular comúnmente utilizado para la identificación filogenética y la clasificación de hongos. Esta región ITS se encuentra entre los genes de ARNr 18S (SSU) y 28S (LSU) del ADN ribosómico y consta de tres partes: ITS1, el gen de ARNr 5.8S e ITS2. Estas regiones intergénicas

presentan una variabilidad significativa entre especies, lo que las hace particularmente útiles para distinguir taxones fúngicos, especialmente dentro del género *Aspergillus*. La secuencia analizada (312 pb) muestra características típicas de la región ITS, como motivos repetitivos y un contenido GC equilibrado (~49-50%), característico de los hongos filamentosos. Al compararla con las bases de datos de secuencias existentes, la alineación no arrojó una coincidencia exacta con ninguna especie conocida. Sin embargo, las coincidencias parciales sugirieron una afinidad general con el género *Aspergillus*, lo que indica que la secuencia podría corresponder a una variante intraespecífica no registrada o a una posible nueva especie de *Aspergillus*, denominada provisionalmente *Aspergillus salvadorensis*. Para validar esta hipótesis, se deben realizar análisis comparativos adicionales utilizando BLASTn y bases de datos específicas de ITS, como UNITE o NCBI rDNA-ITS Fungi, comparando individualmente las regiones ITS1, 5.8S e ITS2. En resumen, la secuencia representa la región completa del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal de un hongo perteneciente al género *Aspergillus*. Debido a su distinción genética con respecto a otros miembros

conocidos de este grupo, se propone el nombre provisional *Aspergillus salvadorensis*. La segunda secuencia corresponde al gen *benA* (β -tubulina), identificado como el aislado UES-001 de *Aspergillus salvadorensis_BenA_complete*, recolectado en El Salvador. Este gen, que abarca 321 pares de bases (pb), codifica una proteína estructural clave que forma parte de los microtúbulos y sirve como marcador filogenético y taxonómico común en estudios de *Aspergillus*. El análisis de su composición de nucleótidos reveló un contenido de guanina-citosina (GC) del 54,8 %, una proporción típica de los genes codificadores de proteínas en hongos filamentosos. La secuencia no contenía bases ambiguas ni errores de secuenciación, lo que confirma su alta calidad. La traducción en los tres marcos de lectura mostró siete codones de inicio potenciales (ATG) distribuidos a lo largo de la secuencia y varios marcos de lectura abiertos (ORF) que varían de 74 a 81 aminoácidos. El ORF más largo, encontrado en el marco de lectura 3, se extendía a 81 aminoácidos y carecía de codones de parada prematuros, lo que sugiere una región codificante funcional. Las características de codificación, el equilibrio GC/AT y el tamaño del fragmento coinciden con las secuencias parciales del gen *benA* que se utilizan habitualmente en la taxonomía molecular de *Aspergillus*. Este gen se amplifica comúnmente con los cebadores universales Bt2a/Bt2b, produciendo fragmentos de entre 300 y 500 pb, lo que coincide con el tamaño observado. El análisis comparativo con secuencias consenso de β -tubulina de especies estrechamente relacionadas —como *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. neoniger*— reveló un alto grado de conservación en las regiones centrales, con variaciones menores que podrían reflejar divergencia interespecífica. Estas diferencias, junto con los resultados del marcador ITS, respaldan la hipótesis de que el aislado UES-001 representa una nueva especie de *Aspergillus*, denominada provisionalmente *Aspergillus salvadorensis* sp. nov.

Para validar esta propuesta, se recomienda un análisis filogenético multilocus que incorpore los genes *benA*, calmodulina (CaM) y ARN polimerasa II (RPB2), junto con la región ITS completa. Este enfoque permitiría determinar con mayor precisión la posición evolutiva del aislado y confirmar su estatus taxonómico como especie distinta dentro del subgénero *Nigri*.

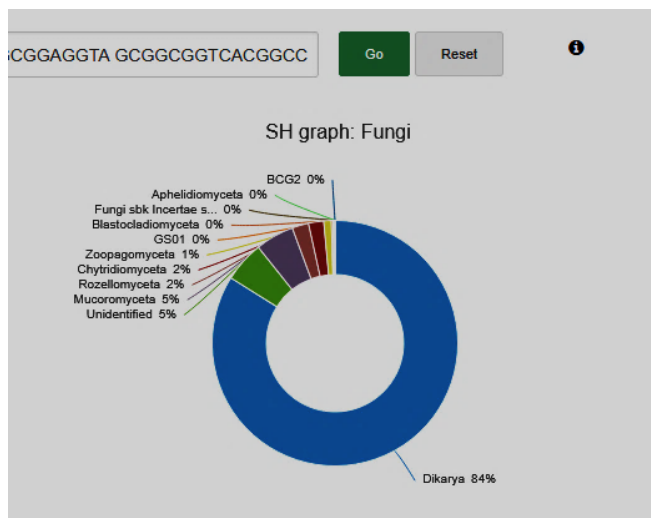


Figura 7. Secuencia de *Aspergillus salvadorensis*. UNITE. 2025

En la Figura 7, la caracterización molecular de las regiones ITS (Espaciador Transcrito Interno) y *benA* (β -tubulina) del aislado fúngico UES-001, recolectado en El Salvador, proporcionó una base precisa para determinar su posición taxonómica dentro del género *Aspergillus*. Estos dos loci son ampliamente reconocidos como marcadores filogenéticos complementarios en hongos filamentosos: la región ITS ofrece alta resolución para la identificación a nivel de especie, mientras que el gen *benA* ayuda a

dilucidar relaciones evolutivas más profundas dentro del género y a detectar variación intraespecífica. El análisis BLAST de la secuencia ITS completa del aislado UES-001 reveló similitud parcial con especies de *Aspergillus* dentro del clado *Nigri*, pero no se encontraron coincidencias

exactas (100%). Esto indica la presencia de una variante no registrada o posiblemente una nueva especie. La cobertura moderada y los valores de identidad de secuencia relativamente bajos (80-90%), considerablemente por debajo del umbral observado típicamente entre cepas conespecíficas (>97%), respaldan aún más esta interpretación. El análisis de la región *benA* confirmó su origen fúngico, mostrando agrupamiento dentro del reino Fungi y alineándose predominantemente con el clado Dikarya (84%), que abarca los filos Ascomycota y Basidiomycota. Las similitudes menores con Mucoromycota (5%), Rozellomycota (2%), Chytridiomycota (2%) y otros taxones probablemente se deban a ruido filogenético resultante de regiones conservadas del gen de la β -tubulina compartidas entre diversos linajes fúngicos. Los resultados congruentes obtenidos tanto del análisis ITS como del análisis *benA* respaldan firmemente la asignación del aislado UES-001 al género *Aspergillus*, muy probablemente dentro de la sección Nigri. Sin embargo, las notables divergencias de secuencia observadas en ambos marcadores, junto con la ausencia de coincidencias completas en las bases de datos de referencia (NCBI, UNITE, MycoBank), proporcionan evidencia convincente de que este aislado podría representar una especie previamente no descrita, propuesta aquí como *Aspergillus salvadorensis* sp. La divergencia genética observada podría estar asociada a procesos de adaptación ecológica o aislamiento geográfico, dado que la cepa se obtuvo en las condiciones ambientales particulares de El Salvador, una región tropical con alta diversidad microbiana. Este hallazgo amplía el conocimiento de la biodiversidad del género *Aspergillus* en Centroamérica y demuestra la importancia de integrar múltiples marcadores moleculares (ITS, *benA*, CaM) para la delimitación taxonómica precisa de nuevas especies. En conclusión, los resultados de las secuencias ITS y *benA* del aislado UES-001 proporcionan evidencia molecular sólida que respalda su clasificación dentro del género *Aspergillus*, pero con suficiente divergencia para ser considerado una entidad taxonómica independiente. Su nombre provisional, *Aspergillus salvadorensis*, refleja tanto su origen geográfico como su diferenciación genética con respecto a las especies del grupo descritas previamente.

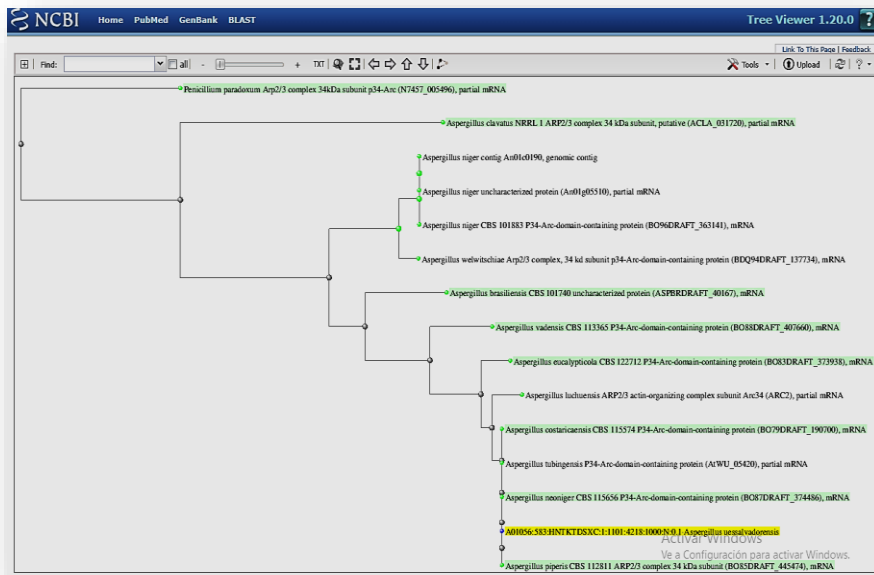


Figura 8. Árbol filogenético. Fuente: BLAST 2025

La Figura 8 ilustra la posición filogenética de *Aspergillus salvadorensis* con respecto a otras especies del género *Aspergillus*. El análisis muestra que esta especie está estrechamente relacionada con un subgrupo que incluye a *A. costarricensis*, *A. tubingensis* y *A. neoniger*, ya que comparten un nodo de ramificación común, lo que sugiere que descienden de un ancestro común más reciente. A nivel molecular, el análisis comparativo entre *A. neoniger* y *A. salvadorensis* destaca diferencias genéticas clave relacionadas con la biosíntesis de toxinas, la taxonomía filogenética y la homología genética general. *A. salvadorensis* es un miembro característico de la sección Flavi, que posee genes especializados en la producción de aflatoxinas, mientras que *A. neoniger*, perteneciente a la sección Nigri, porta genes asociados con otras funciones metabólicas, como la síntesis de ocratoxinas. *Aspergillus salvadorensis* es una especie fúngica productora de micotoxinas del género *Aspergillus*, identificada por primera vez en 2006 y nombrada en referencia a El Salvador, donde fue descubierta. La especie se detectó inicialmente durante estudios sobre hongos productores de tintes y posteriormente se investigó en contextos agrícolas. Su identificación fue significativa porque amplió la diversidad conocida de especies de *Aspergillus* en Centroamérica y subrayó su potencial como contaminante en productos agrícolas. La capacidad de *A. salvadorensis* para producir aflatoxinas —una clase de metabolitos secundarios altamente tóxicos— resalta su relevancia para la seguridad alimentaria y la salud pública, dados los riesgos que estas representan. Los compuestos representan un riesgo para los humanos y los animales.

The screenshot shows a BLAST search interface. The search title is 'LN890509.1 Aspergillus neoniger CaM gene for...'. The search parameters include Program: BLASTN, Database: core_nt, and Query ID: lcllQuery_6241461. The description is 'LN890509.1 Aspergillus neoniger CaM gene for Calmodulin...'. The filter results section shows 'Organism' with a search box and 'Filter' and 'Reset' buttons. The table below shows sequences producing significant alignments, with columns for Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per. Ident, Acc. Len, and Accession.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus phoenicis partial cam gene for calmodulin strain CBS 137.62	Aspergillus phoenicis	902	902	100%	0.0	100.00%	519	FN594555.1
Aspergillus tubingensis As.tub.otp 123 caM gene calmodulin partial sequence	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	554	LC844957.1
Aspergillus tubingensis isolate E259 calmodulin gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	670	PV006118.1
Aspergillus tubingensis voucher F2M3C-248 calmodulin gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	680	PV563418.1
Aspergillus tubingensis strain SFC20230725-M132 calmodulin (CaM) gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	552	OR394871.1
Aspergillus tubingensis strain CMXY1714 calmodulin (cmdA) gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	557	MG991443.1
Aspergillus tubingensis isolate AEMC12 calmodulin (CmdA) gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	608	FP228667.1
Aspergillus tubingensis isolate N48 calmodulin gene partial cds	Aspergillus tubingensis	902	902	100%	0.0	100.00%	543	OP426396.1

Tabla 5. Similitud de las especies *A. neoniger* y *A. salvadorensis*. Fuente: BLAST .2025

La Tabla 5 muestra la posición filogenética de *Aspergillus salvadorensis* dentro del género *Aspergillus*, indicando una estrecha relación evolutiva con un subgrupo que incluye a *A. costarricensis*, *A. tubingensis* y *A. neoniger*. Estas especies comparten un nodo de ramificación

Comparación de tres secuencias: *Aspergillus salvadorensis* y *neoniger*.



Tabla 7. Comparación de tres secuencias: salvadorensis y neoniger.

La Tabla 7 presenta secuencias de ADN o ARN obtenidas de diferentes muestras, probablemente derivadas de un análisis genético comparativo. Cada entrada corresponde a una secuencia individual, identificada por el nombre de la especie o muestra, seguida de su secuencia de nucleótidos y longitud total. Las etiquetas salvadorensis1 y salvadorensis2 parecen representar aislados de una especie potencialmente endémica de El Salvador, según su nomenclatura. Neoniger probablemente se refiere a una especie distinta pero relacionada, analizada dentro del mismo contexto filogenético o taxonómico. Los valores numéricos al final de cada línea indican la longitud de cada secuencia en pares de bases (pb). El análisis comparativo reveló dos regiones de coincidencia entre las secuencias de salvadorensis y neoniger, señaladas con asteriscos en la tabla. Estos segmentos compartidos muestran un nivel de conservación de aproximadamente el 40-60%, lo que sugiere una similitud genética moderada y una posible relación evolutiva entre los dos taxones.

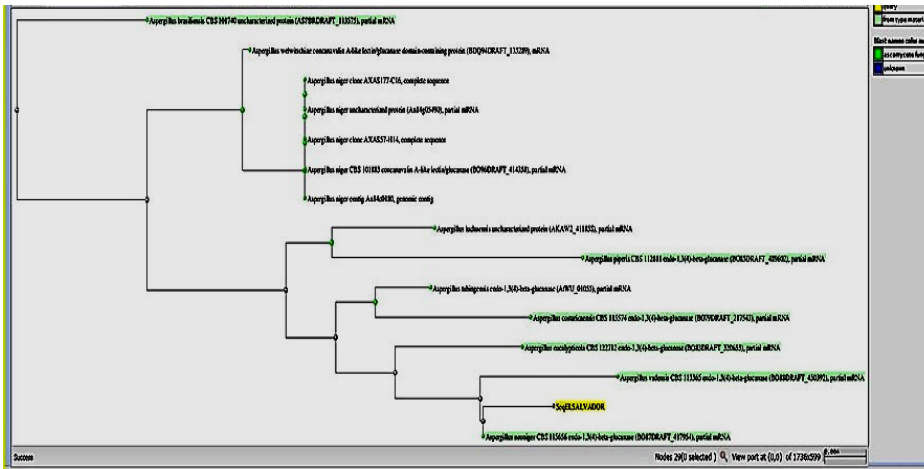


Figura 9. Árbol filogenético o árbol filogenético entre especies.

En la figura 9, a la izquierda se muestra el ancestro común del género *Aspergillus* y a la derecha los clados. Se observa que las especies de *Aspergillus niger*, *Aspergillus neoniger* y la de *El Salvador* (en amarillo) comparten un nodo con la especie *Aspergillus neoniger*, pero se diferencian por su grado de evolución a partir del género original, como lo demuestra la secuencia de bases anterior. Las ramas indican la relación entre ellas y su longitud o distancia a los ancestros representa el grado de cambio evolutivo.

Validación taxonómica, Explicando el cumplimiento del CCI (Art. 41.5). Se tiene: Especie registrada *Aspergillus salvadorensis* con los números: Registrada en MycoBank (MB#860453, MB#860456) y GenBank/NCBI (BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219) y como *Aspergillus salvadorensis* A. Vásquez Hidalgo, sp. nov. MycoBank nov: 849321. Etimología: Nombrada en honor a El Salvador, país donde se aisló la especie. Diagnóstico: Se diferencia de *Aspergillus niger* por producir conidios más pequeños y de pared rugosa (3,5–4,0 µm de diámetro frente a 4,5–5,5 µm), un crecimiento más lento en agar autolisado de levadura Czapek (CYA) a 37 °C y la ausencia de esclerocios. Descripción: Colonias en CYA que alcanzan los 40 mm de diámetro tras 7 días a 25 °C; reverso de color marrón amarillento. En MEA, colonias vellosas, de 45 mm de diámetro, con abundantes conidios. Conidióforos de pared lisa, estípites de hasta 800 µm. Vesículas globosas, de 30–40 µm. Métulas y fiálidas biseriadas. Conidias subglobosas, equinuladas, de 3,5 a 4,0 µm. Holotipo: El Salvador. Departamento de San Salvador Morazán, semillas de latitud 14.18333 y longitud -89.05 (holotipo UES 001).

Discusión.

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por el botánico italiano Antonio Micheli y publicado en su obra *Nova Plantarum* a principios del siglo XVIII (15). Desde su descubrimiento, *Aspergillus* ha adquirido importancia médica como uno de los géneros fúngicos más comunes asociados a

enfermedades humanas, en particular la aspergilosis pulmonar, que afecta principalmente a personas inmunocomprometidas. El diagnóstico de las infecciones por *Aspergillus* se revolucionó con el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis en 1983. Los métodos basados en PCR comenzaron a aplicarse a la detección de *Aspergillus* a principios de la década de 1990, mejorando significativamente la velocidad y la precisión de la identificación fúngica. Para mejorar la consistencia y la fiabilidad del diagnóstico, en 2006 se creó la Iniciativa Europea de PCR para *Aspergillus*, con el objetivo de estandarizar los protocolos de laboratorio y validar la PCR como herramienta clínica para la detección oportuna de enfermedades relacionadas con *Aspergillus*. Además de la PCR, se han desarrollado otras técnicas moleculares y bioquímicas para la identificación de hongos. Entre estas técnicas, la espectrometría de masas, en particular el método MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo), ha demostrado ser altamente eficaz. Esta técnica diferencia los microorganismos separando los iones según su relación masa/carga, lo que permite la identificación rápida y precisa de especies directamente a partir de muestras biológicas. (1,2,3,19,28,29,41,42,47,54,27). Tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS). La secuenciación moderna se divide en segunda y tercera generación, siendo Illumina Inc. líder en la secuenciación de segunda generación. Segunda generación (Illumina). El concepto fundamental de la secuenciación de nueva generación (NGS) se asemeja al principio de la secuenciación Sanger, que utiliza desoxinucleótidos como terminadores de cadena para fragmentar el ADN. Sin embargo, la tecnología de Illumina utiliza un método de secuenciación por síntesis (SBS) que permite leer millones de fragmentos en paralelo. Esto implica ciclos de síntesis secuenciales donde los nucleótidos se identifican mediante la excitación de un fluoróforo al añadirse un terminador reversible marcado fluorescentemente. Este proceso permite la secuenciación base a base con alta precisión. Sistemas como NextSeq 1000 y 2000 ofrecen lecturas de gran longitud (hasta 2×300 pb) y hasta 1800 millones de lecturas de extremo único por ejecución, lo que los hace ideales para aplicaciones a gran escala. El estudio utilizó esta técnica Illumina SBS, combinada con la secuenciación metagenómica de tercera generación (TGS). Las técnicas de secuenciación de tercera generación (TGS) permiten lecturas mucho más largas, de hasta 2,3 Mb, sin necesidad de amplificación previa. Un ejemplo es la tecnología de secuenciación de molécula única en tiempo real (SMRT), que puede incorporar lecturas de aproximadamente 60 000 pb, lo que ofrece una ventaja para el seguimiento de variaciones estructurales. Sin embargo, la secuenciación por nanoporos, un método TGS, generalmente requiere una gran cantidad de ADN para obtener resultados fiables. (5, 21-52). Genómica y análisis molecular de hongos. El tamaño de los genomas de *Aspergillus* es variable. En los estudios publicados, el tamaño del ADN genómico (ADNg) suele oscilar entre 28,81 y 33,289 kb, con un número de genes que varía entre 9630 y 12 074. En el laboratorio, la extracción de ADNg se complementa con una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), un método estándar para cuantificar los niveles de expresión génica. El equipo de qPCR mide la intensidad de fluorescencia emitida por una sonda en cada ciclo. Si bien la sensibilidad de los ensayos de qPCR es limitada, técnicas como la selección de genes multicopia ayudan a determinar la cantidad total de ADN analizado. Otros métodos moleculares empleados para caracterizar y diferenciar *Aspergillus* incluyen el análisis de genes de ARN ribosomal (18S, 5.8S, 28S) y la técnica RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) para distinguir entre cepas (16, 26, 30, 32, 33, 44, 45). El género *Aspergillus* abarca una amplia variedad de especies de hongos que se distinguen por sus características morfológicas y fisiológicas. Estas especies se pueden diferenciar según varios aspectos morfológicos, como la forma y el color de sus conidióforos, la estructura de las conidias, su tipo de crecimiento y la disposición de las esporas. A continuación, se destacan algunas de las principales características que permiten la identificación y diferenciación de las especies de *Aspergillus*. Los conidióforos son elementos clave en la morfología de las especies de *Aspergillus*, ya que son las estructuras responsables de sostener y liberar las esporas. En especies como *Aspergillus fumigatus*, el conidióforo es un tubo estrecho y erecto que se ramifica en su extremo, formando una cabeza que

alberga las esporas. En contraste, especies como *Aspergillus niger* tienen conidióforos más gruesos y cilíndricos, con una cabeza esférica y esporas densas. *Aspergillus flavus*, por otro lado, tiene conidióforos más cortos y ramificados. El color y la forma de las conidias desempeñan un papel esencial en la identificación de las especies. En *Aspergillus niger*, las conidias son negras y se disponen densamente en la cabeza del conidióforo, lo que le confiere al hongo un aspecto oscuro. En cambio, *Aspergillus fumigatus* produce conidias pequeñas, de color verde azulado, distribuidas de forma más dispersa. *Aspergillus flavus*, por su parte, se caracteriza por conidias amarillas o verdes, dispuestas en espiral y con una forma más redondeada que las de otras especies. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* crece rápidamente en condiciones ambientales óptimas, formando colonias verdes compactas en los medios de cultivo. Otras especies, como *A. niger*, forman colonias negras de textura rugosa y crecimiento más lento, mientras que *A. flavus* desarrolla colonias de color verde amarillento que presentan un patrón de crecimiento más irregular que *A. fumigatus*. La formación y distribución de las esporas también varían entre las especies del género. *A. niger* tiende a agrupar sus esporas densamente, mientras que *A. flavus* las dispersa más ampliamente. En especies como *A. terreus* y *A. clavatus*, los conidióforos son más cortos y presentan una ramificación más compleja, lo que influye directamente en la morfología general de las colonias que forman. El color y la textura de las colonias de *Aspergillus* son características fundamentales para la identificación de las especies. Por ejemplo, *A. niger* produce colonias negras con una textura gruesa debido a la alta concentración de esporas oscuras. *A. fumigatus* genera típicamente colonias suaves y pulverulentas de un característico color verde, mientras que *A. flavus* presenta colonias de color amarillo verdoso con una superficie algo irregular. Aunque todas las especies del género comparten una organización estructural básica compuesta por conidióforos y conidios, las sutiles diferencias en forma, coloración, disposición espacial y patrón de crecimiento permiten una diferenciación precisa entre ellas (1, 2, 3, 40, 46). En cuanto a su patogenicidad, *Aspergillus* es un hongo filamentoso formado por cadenas de células llamadas hifas. Puede causar diversas afecciones patológicas en humanos debido a varios factores biológicos. El pequeño tamaño de sus conidios facilita su inhalación, lo que le permite alcanzar e infectar los pulmones y los senos paranasales. Su capacidad de crecer rápidamente a 37 °C le permite adaptarse fácilmente al cuerpo humano, mientras que su fuerte adherencia a las superficies epiteliales y su capacidad para invadir los vasos sanguíneos favorecen la colonización de los tejidos y la infección sistémica. Para distinguir entre las especies de *Aspergillus*, los investigadores suelen analizar muestras orgánicas o estudiar metabolitos fúngicos específicos que sirven como marcadores bioquímicos de diferenciación taxonómica...^(13,17,25).

Conclusiones. La investigación culminó con el descubrimiento de una nueva subespecie de hongo del género *Aspergillus*, hallada específicamente en las semillas de la planta nativa nacascal, originaria del norte del país. La taxonomía propuesta para la especie recién identificada es la siguiente: Dominio: Eukaryota, Reino: Fungi, División: Ascomycota, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Género: *Aspergillus*, Especie: *Aspergillus salvadorensis*. El nombre científico binomial propuesto para futuras referencias es *Aspergillus salvadorensis* A. Vásquez 2006. El nombre de la especie, *salvadorensis*, hace referencia al país El Salvador.

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. Par evaluador Master Willian Merino Biología Molecular departamento de Microbiología de Facultad de Medicina.

Contribuciones de los autores: Antonio Vásquez Hidalgo es el único autor. El autor leyó y aprobó el manuscrito final.

Conflictos de interés. El autor declara no tener conflictos de interés. Se aclara que el artículo fue publicado en otra revista con el nombre de *Aspergillus uessalvadorensis*, pero el correcto es *Aspergillus salvadorensis* según la clasificación taxonómica mundial de los hongos. En la versión publicada del artículo «Caracterización fenotípica y genotípica de *Aspergillus uessalvadorensis* en una cepa orgánica descubierta en la Universidad de El Salvador (2006-2024)», publicado en *Plant SciencePG* (Volumen 13, Número 1). Recibido: 21 de enero de 2025. Aceptado: 12 de febrero de 2025. Publicado: 18 de marzo de 2025. El basónimo de la nueva combinación, *Aspergillus uessalvadorensis*, estaba incompleto en las páginas 1-16. Por lo tanto, la nueva combinación propuesta no es válida según el Art. 41.5 del Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas. Esta combinación se valida aquí, con la corrección ortográfica necesaria del epíteto. La fecha de publicación válida para este nombre debe ser el 26 de septiembre de 2025, en lugar del 18 de marzo de 2025, fecha de publicación del artículo original. El nombre correcto es *Aspergillus salvadorensis* MycoBank MB 860456 para la validación. Tenga en cuenta que el número de MycoBank se refiere específicamente a esta publicación de validación y es diferente del número de MycoBank publicado para la combinación no válida. Lamentamos este error y solicitamos que se cite este nombre junto con esta corrección para fines formales. Agradecemos a la Dra. Konstanze Bensch de MycoBank por señalar este descuido. Por lo tanto, el artículo se volvió a publicar sin que el autor indicara conflictos de interés.

Referencias

1. Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micología*; 17: S79-S84.
2. Alcalá, L et al. (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 Médica. (2006). Departamento de Microbiología. Universidad de Panamá.
5. Baker, S. (2006). Genómica de *Aspergillus niger*: pasado, presente y futuro. *Micología Médica*, septiembre, 44, 517-521.
6. Bille, G. et al. (1998). Especies de *Aspergillus* aisladas de muestras clínicas: criterios clínicos y microbiológicos sugeridos para determinar su importancia. *Clinic. Microbiology Infect.* 4: 700-716.
7. Bogdanov, KV e Ignat'eva, SM (2009). *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*, (10), 42–44.
8. Broad Institute. (2007). Base de datos comparativa de *Aspergillus*.
9. Bolet, M. y todos. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd* v.24 n.1 Ciudad de la Habana.
10. Bustillo, Álex. (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 al. (2022). Aflatoxina B1: metabolismo, toxicología y su implicación en el estrés oxidativo y el desarrollo del cáncer. *Toxicol Mech Methods*.
12. Casas, R. (2010) *Micología General*. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Caracas. En línea.
13. Conant, S. y col. (1972). *Micología*. 3ª edición. Interamericana. México.

14. Couri, S. et al. (2006). Procesamiento digital de imágenes como herramienta para monitorizar el crecimiento de biomasa en fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger* 3TSB8: resultados preliminares. *Journal of Microscopy*, vol. 224, pt., pp. 290-297.
15. Cruz, R. (2023) Micheli y el género *Aspergillus*. *Rev. niño. infectol.* [en línea]. 2023, vol. 40, n. 2, págs. 169-171.
16. Demeke, T y RP Adams. (1994). El UBe del análisis PCR-RAPD en la taxonomía y evolución de las plantas., p. 179-191.
17. Frisvad, J. (2007). Perfiles de metabolitos secundarios, perfiles de crecimiento y otras herramientas para el reconocimiento de especies y micotoxinas importantes de *Aspergillus*, *Estudios en Micología*, Volumen 59, Páginas 31-37.
18. Garraway, M. (1984). *Nutrición y fisiología de los hongos*". John Wiley & Sons, Inc. (Canadá), 22-48.
19. Gassiot C. et al. (2000) *Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia*. *Acta Médica*. 9(1-2): 67-72.
20. Geiser y cols. 2007 Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007). El estado actual del reconocimiento e identificación de especies de *Aspergillus*. *Estudios de Micología* 59: 1–10.
21. Gibbons JG, Rokas A. (2013). La función y evolución del genoma de *Aspergillus*. *Trends Microbiol* enero; 21(1): 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.005> Publicado en línea el 17 de octubre de 2012
22. Gmoser, JA et al. (2017). Hongos ascomicetos filamentosos como fuente de pigmentos naturales. *Fungal Biol. Biotechnol.*
23. Hawksworth DL (2011). Nomenclatura de especies de *Aspergillus*: avances hacia un nombre único para cada especie. *Micología Médica* 49: S70–S76.
24. Horn, P., y A. Rafalski. (1992). Diagnóstico genético RAPD no destructivo de embriones de *Brassica* derivados de microsporas. *Plant Molecular Biology Reporter* 10285-293.
25. Illumina, "Introducción a la tecnología de secuenciación de próxima generación". www.illumina.com/technology/nextgeneration-sequencing.html (consultado el 3 de octubre de 2022).
26. *Revista de microbiología*, (2005). *Microbiología Aspergillus sp.*
27. Kilich, M. (2006). Identificación de *Aspergillus* clínicamente relevantes. *Micología médica*. 44, 5127-5131.
28. Klingspor, L. et al. (2009). PCR para *Aspergillus*: formidables desafíos y avances. *Micología Médica*, 47, S241-S247.
29. Lee, J. (2004). Método sencillo de extracción química para el aislamiento de ADN de *Aspergillus fumigatus* y otras especies de *Aspergillus*. *Journal of clinical Microbiology*.
30. Caja de laboratorio, (2024). Introducción a la técnica de qPCR. En línea. <https://labbox.es/>
31. Salvavidas. (18 de agosto de 2023). *Aspergilo*. 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 alatoxigénicos.
33. Loeffler, J., et al. (2000). Comparación entre muestras de plasma y sangre total para la detección de ADN de *Aspergillus* mediante PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
34. Marchese S, et al. (2018). Aflatoxinas B1 y M1: Propiedades biológicas y su implicación en el desarrollo del cáncer. *Toxinas*.
35. Macrogen, Inc. /Shaun Seonwoo Lee. /Empresa pública de biotecnología. Corea del Sur. (2024). <https://dna.macrogen.com/>
36. Martínez-Soriano, J. (1993). Detección de *Brucella abortus* mediante la reacción en cadena de

- la polimerasa. *Bioquímica* 18: 10-16.57.
37. <https://www.merckmillipore.com/GT/es/life-science-research/genomic-analysis/dna-preparation/PCR/qPCR/7Rub.qB.GXwAAAFEdVIXHZkB,nav?ReferrerURL=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. Argén. Bot.* 57: 169-184.
 39. Palomares, J. (2007). *Revista Iberoamericana de Micología* - ISBN: 978-84-611-8776-8.
 40. Rapaer Kb et al. El género *Aspergillus*. (1998) *Tratado de Micología Médica*. 3a ed. págs. 668-703.
 41. Rippon. JW. (1990). *Tratado de Micología Médica*. 3ª edición Interamericana. Mc Graw Hill México.
 42. Ruiz, I, (2018). Aspergilosis pulmonar. *Rev.Med .Electrón.* vol. 40 núm. 4.
 43. Salazar, C et al. (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* Detección molecular de *Aspergillus*: Aplicación de un ensayo multiplex de PCR en tiempo real en muestras de tejido.
 45. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, (1977). Secuenciación de ADN con inhibidores de terminación de cadena. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*.
 46. Samson, R. et al. (2014). Filogenia, identificación y nomenclatura del género *Aspergillus*. *Estudios en micología* 78: 141-173.
 47. Sarría C. et al. (2005) *Aspergilosis*. Servicio clínico de Medicina Interna. Madrid.
 48. Schaberciter-Gurtner et al. (2006). Diagnóstico molecular de infecciones por *Aspergillus* y *Candida*. *J. clinic Microb.*<https://doi.org/10.1128/jcm-01344-06>
 49. UNAM, (2013). Asociar diversos tipos de cáncer con alimentos contaminados por aflatoxinas. *Boletín UNAM-DGCS-420*.
 50. Vásquez H., A. (2010). Extracto acuoso de colorante negro natural a partir de las semillas de nacazol. *La Universidad* (10-11). págs. 113-118. ISSN 0041-8242.
 51. Valderrama, J et al. (2020). Métodos de secuenciación: tercera generación. *Encuentros en biología*. Volumen XIII.
 52. 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*.
 53. Vidal, M. (2018). Tesis. Ampliación y validación de una nueva base de datos para la identificación de *Aspergillus* spp. mediante EM MALDI-TOF.
 54. White, L., et al. (2010). PCR para *Aspergillus*: Un paso más cerca de la estandarización. *Journal of clinical microbiology*.
 55. Vásquez Hidalgo, A. (2025). Presencia de grupos de enzimas y metabolitos secundarios en la secuencia de ADN de *Aspergillus Salvadorensis* en la producción de pigmentos negros naturales. *IKR Journal of Agriculture and Biosciences (IKRJAB)*, 1(3), 107-117.

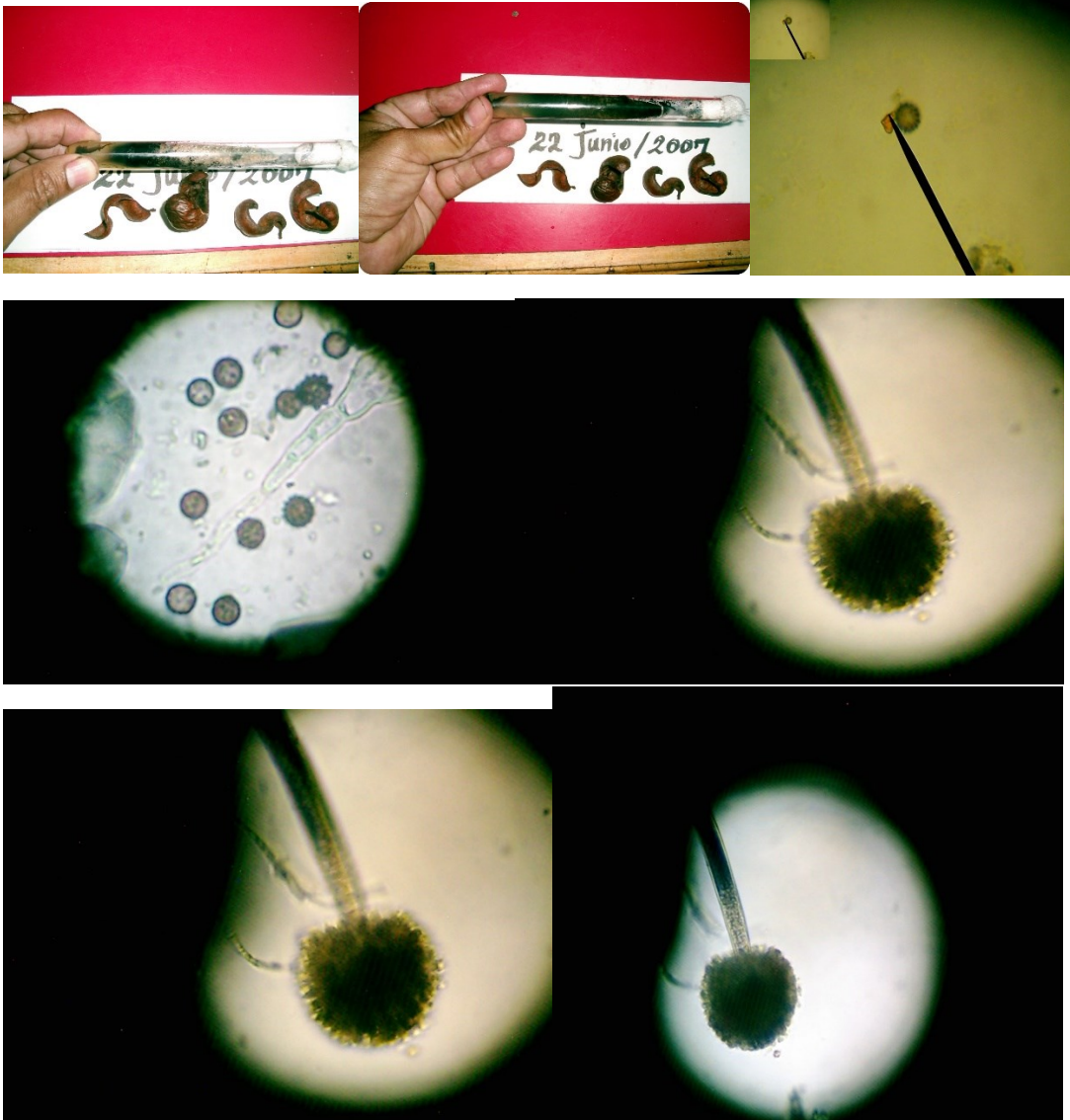
Capítulo V

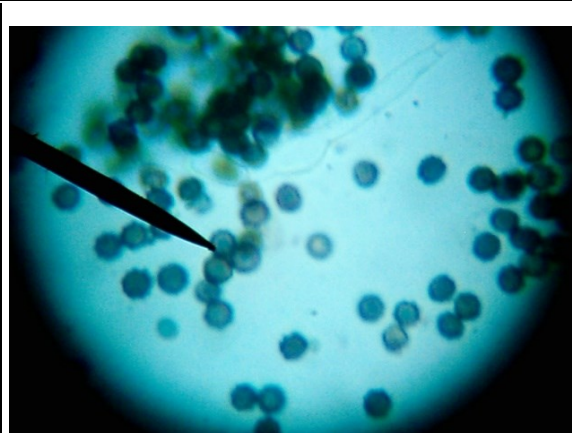
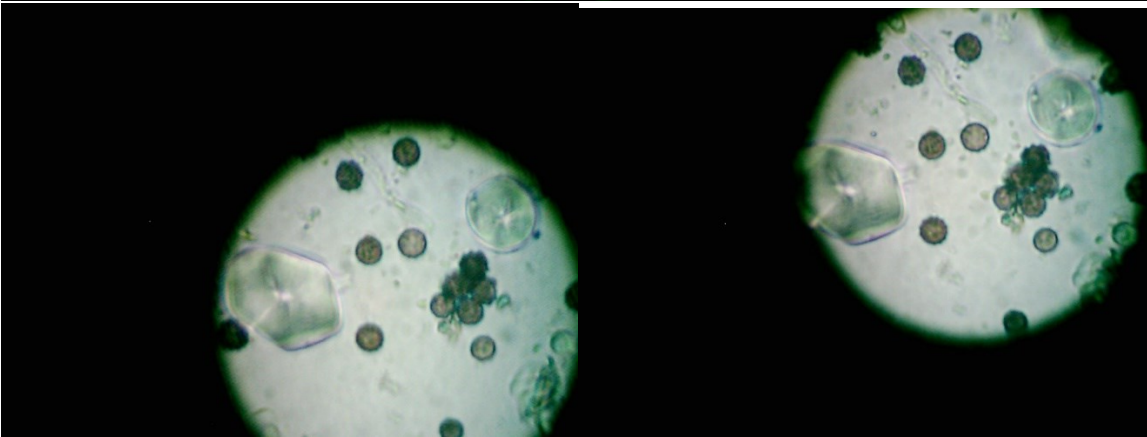
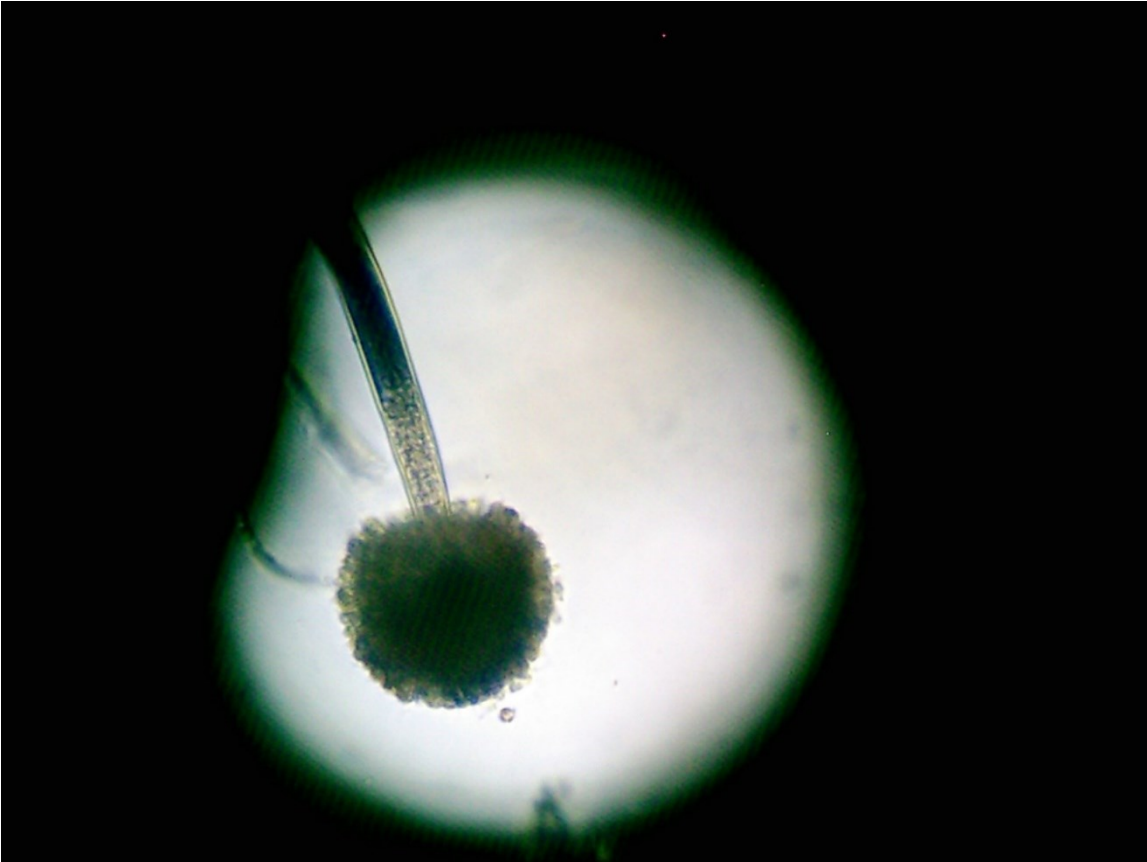
Fotografías características fenotípica *Aspergillus* de El Salvador

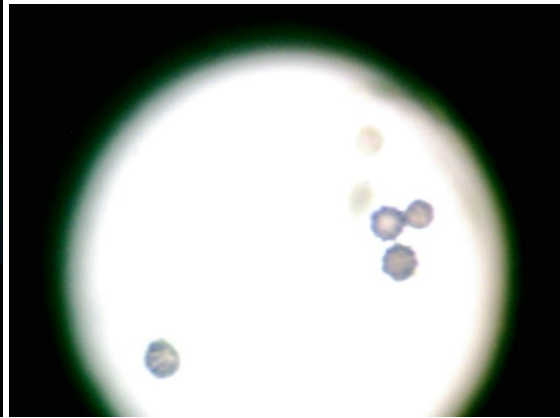
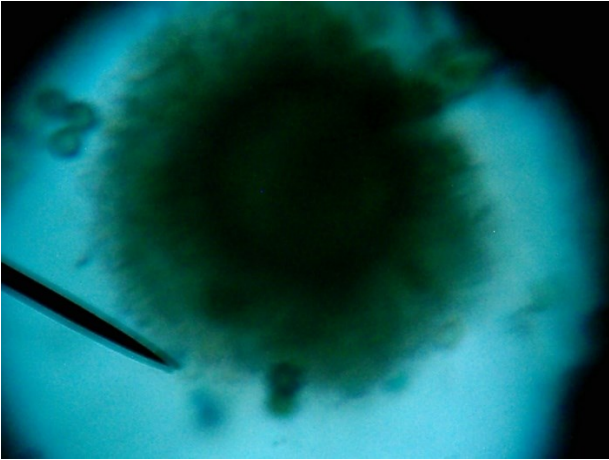
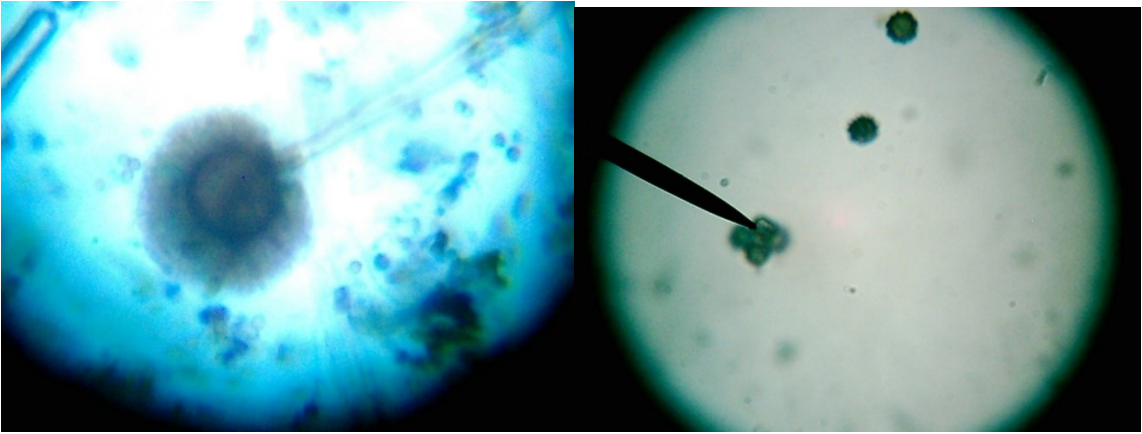


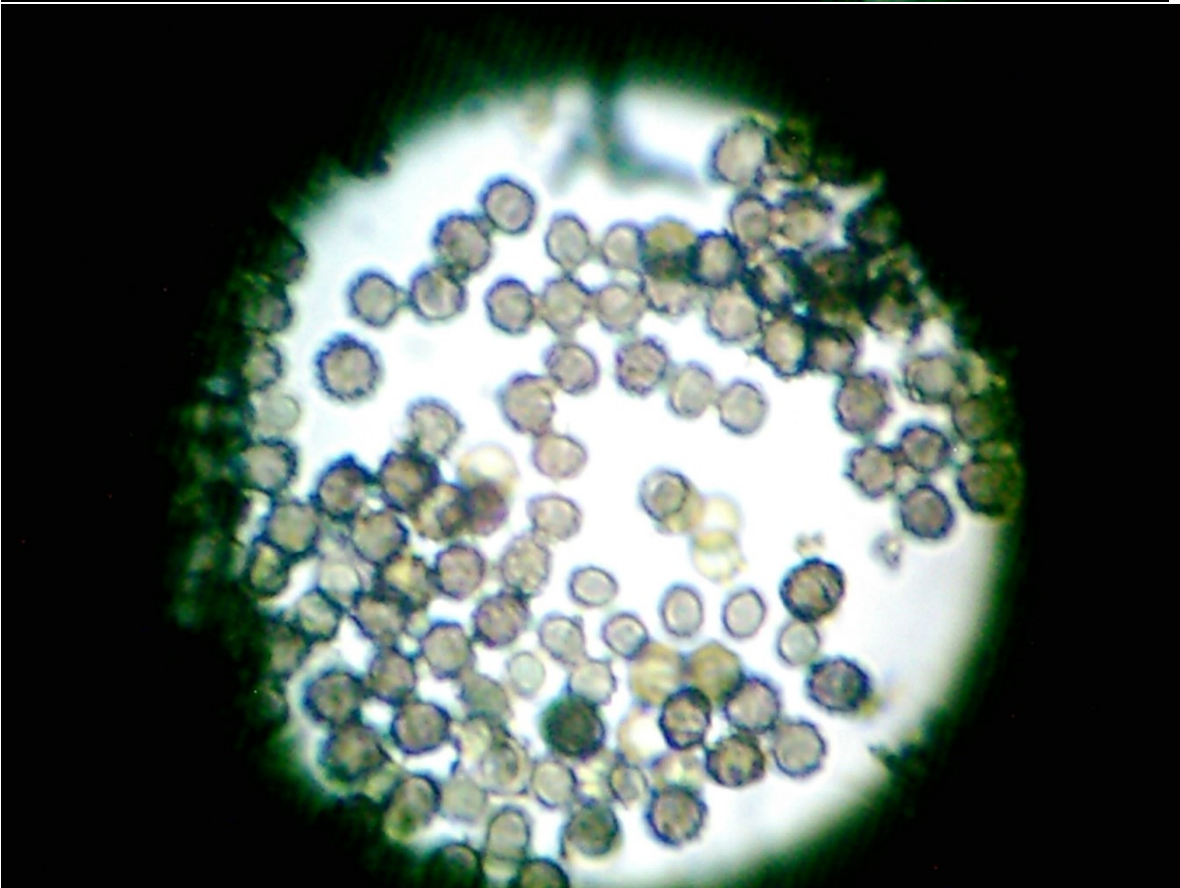
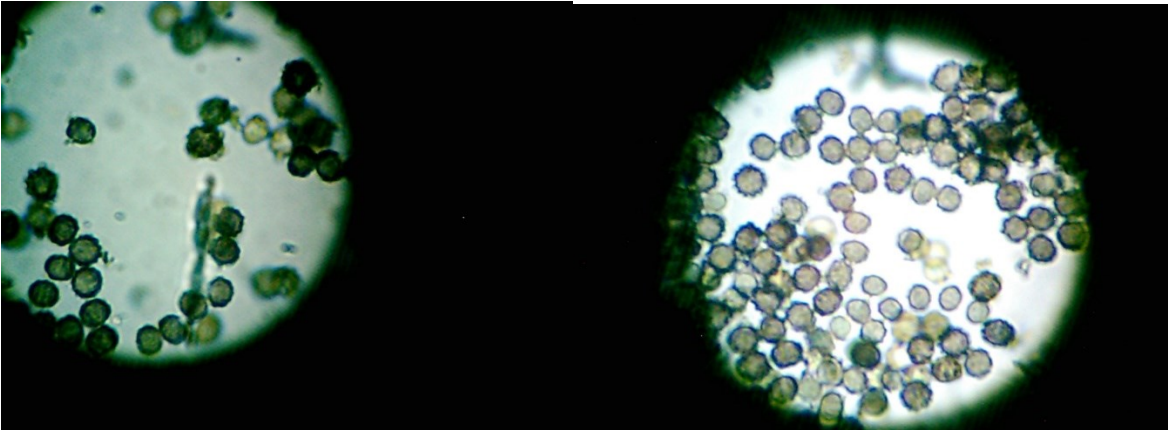
FOTOGRAFIAS MACRO Y MICROSCOPICAS DE ASPERGILLUS. 10X,40X Y 100X

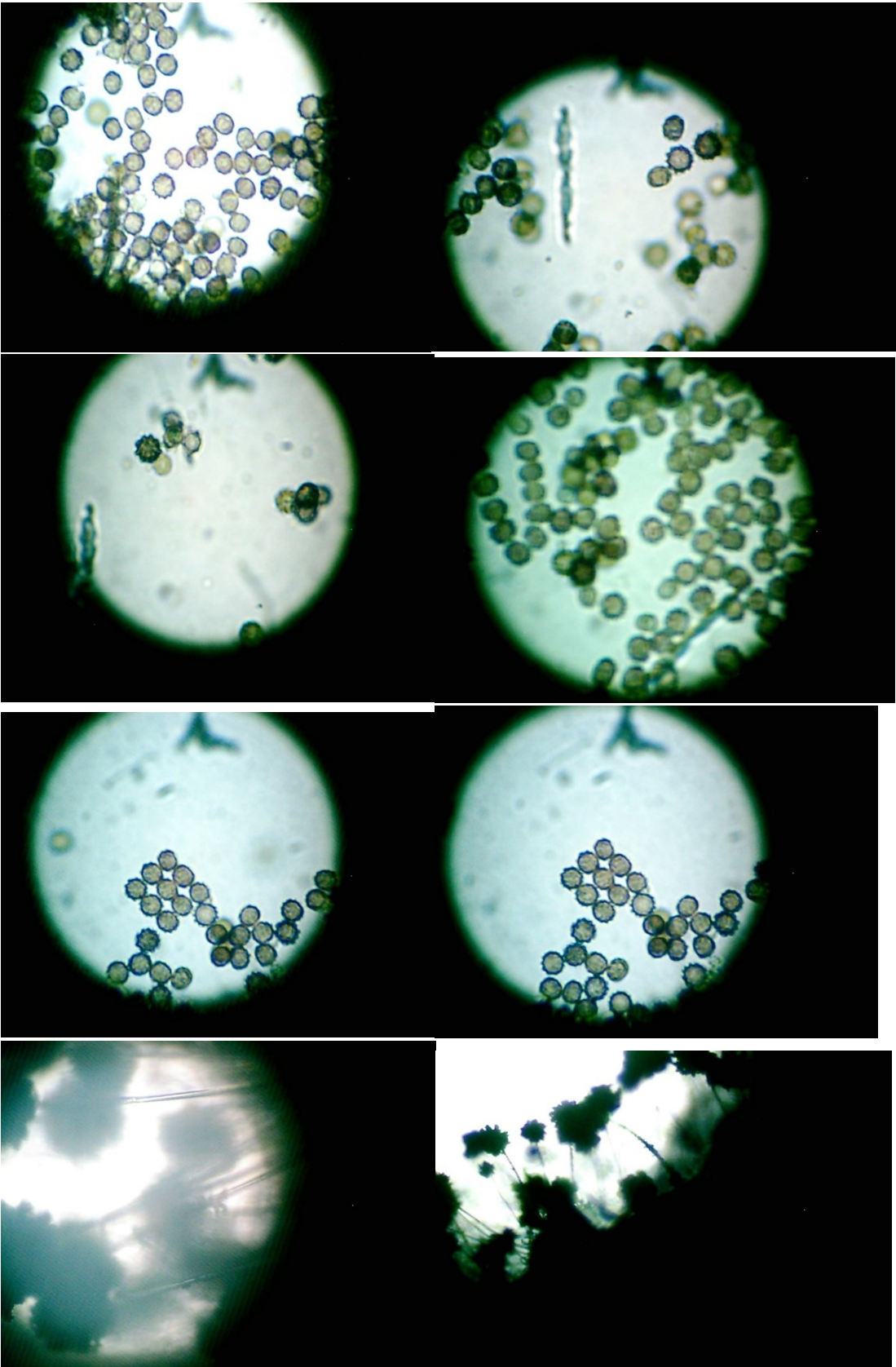
Años 2006-2007-2008 -2009

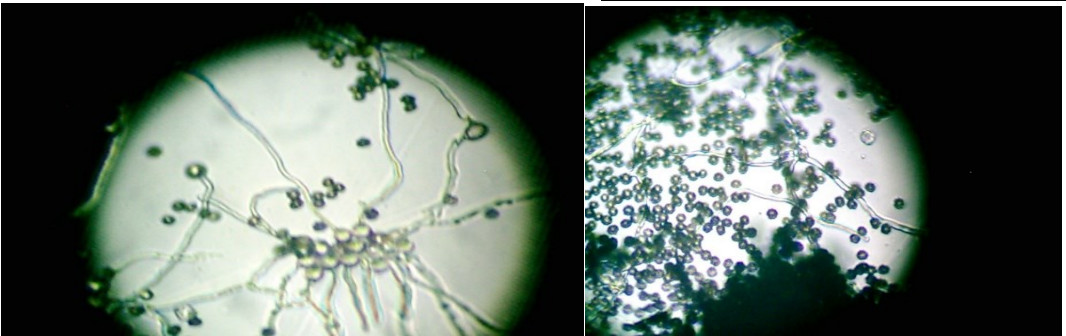
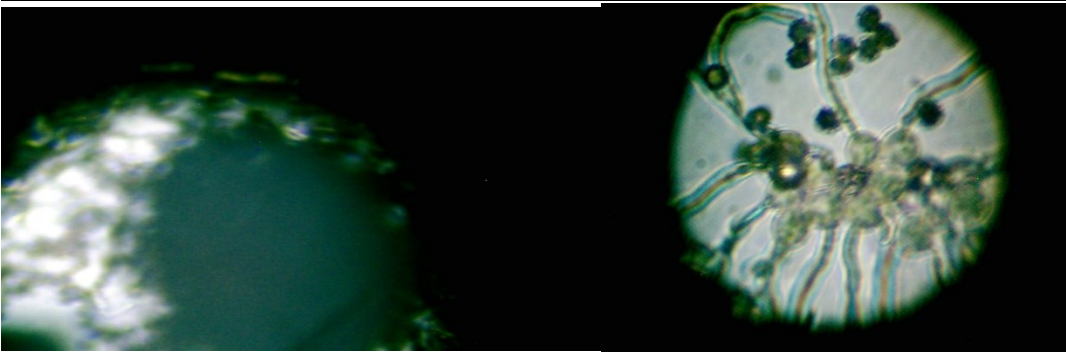


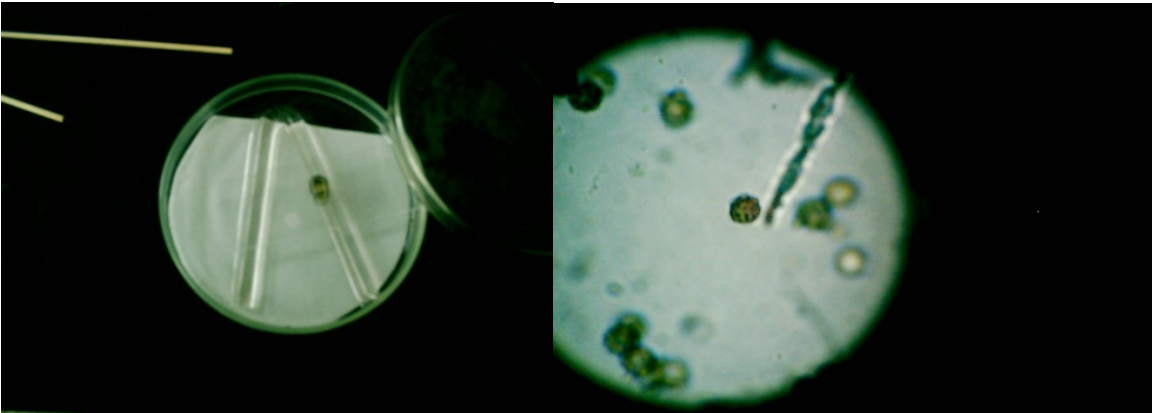
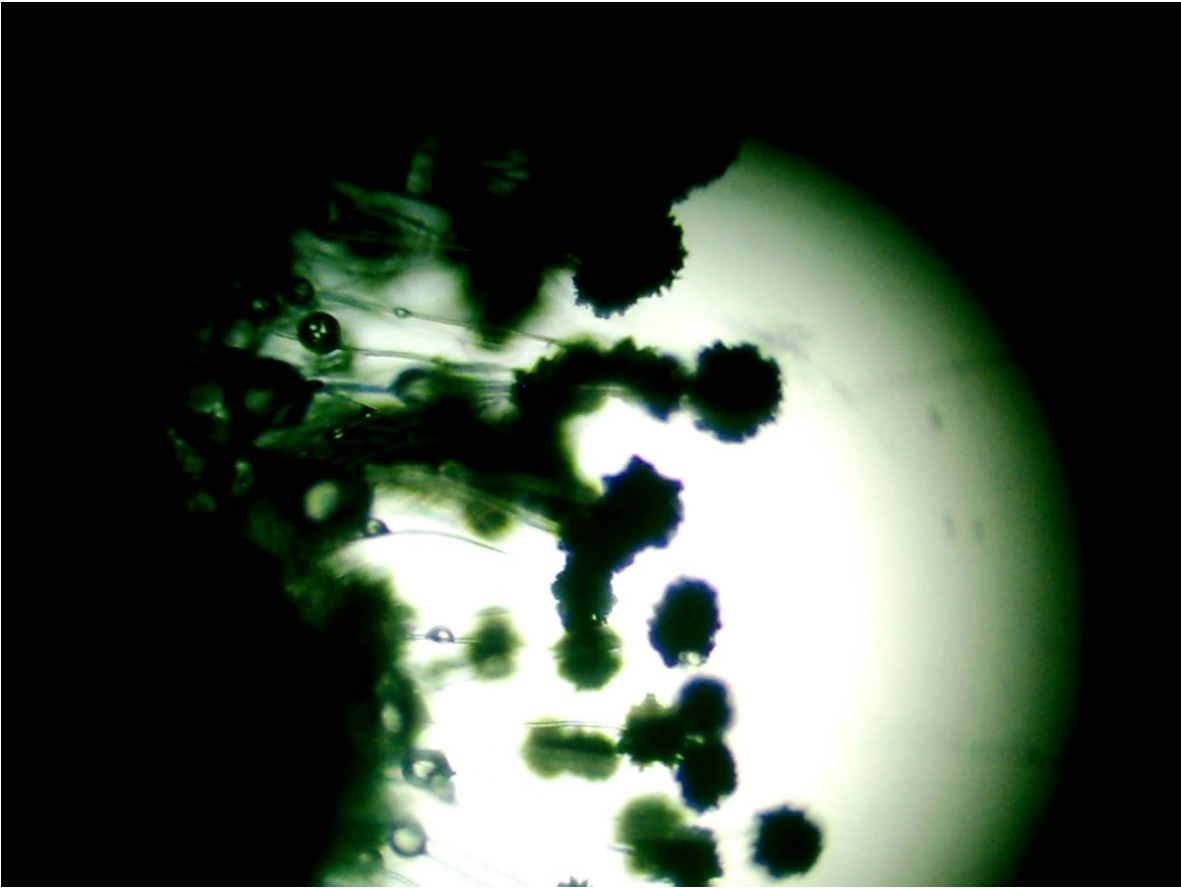
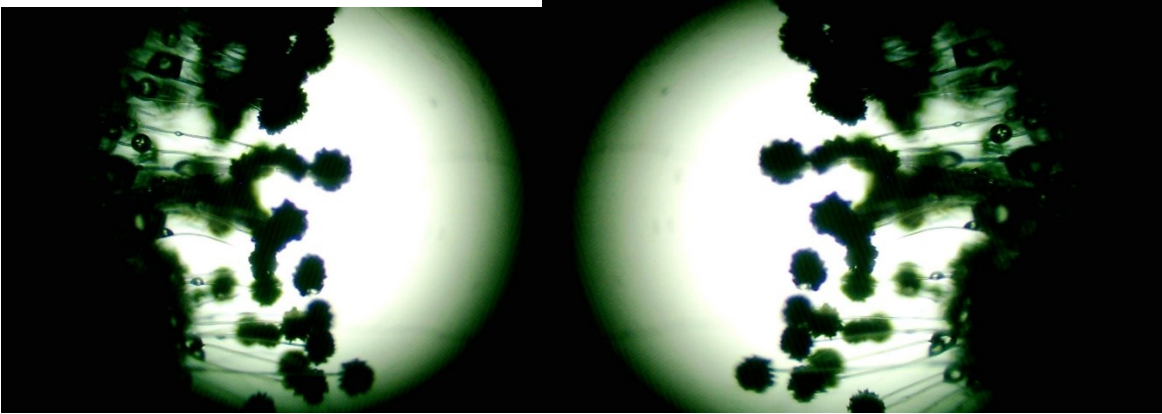












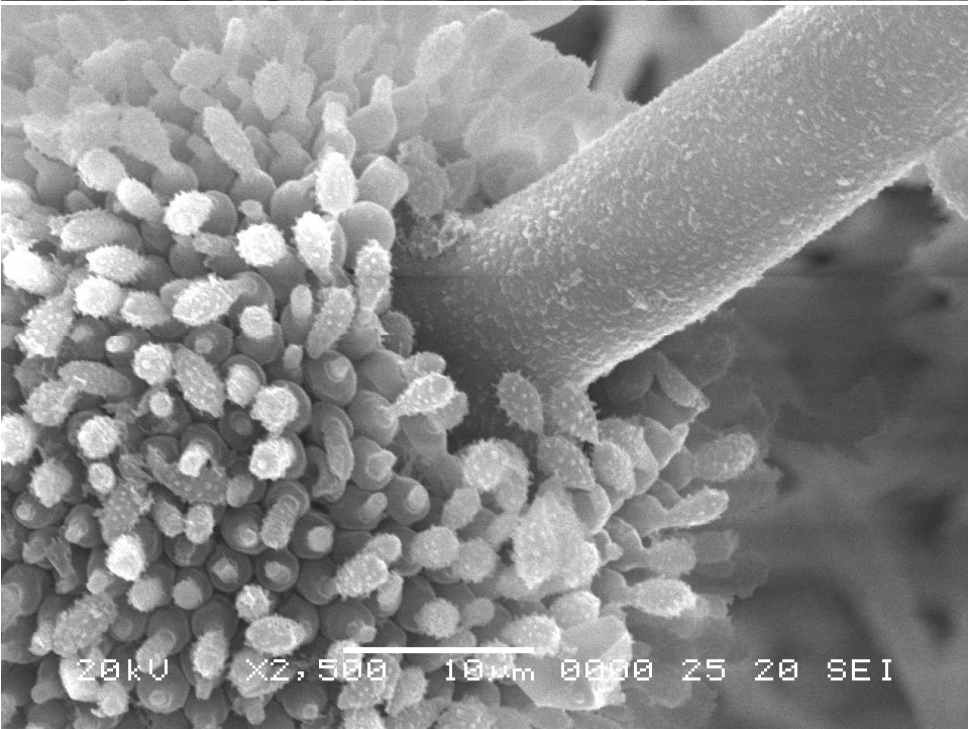
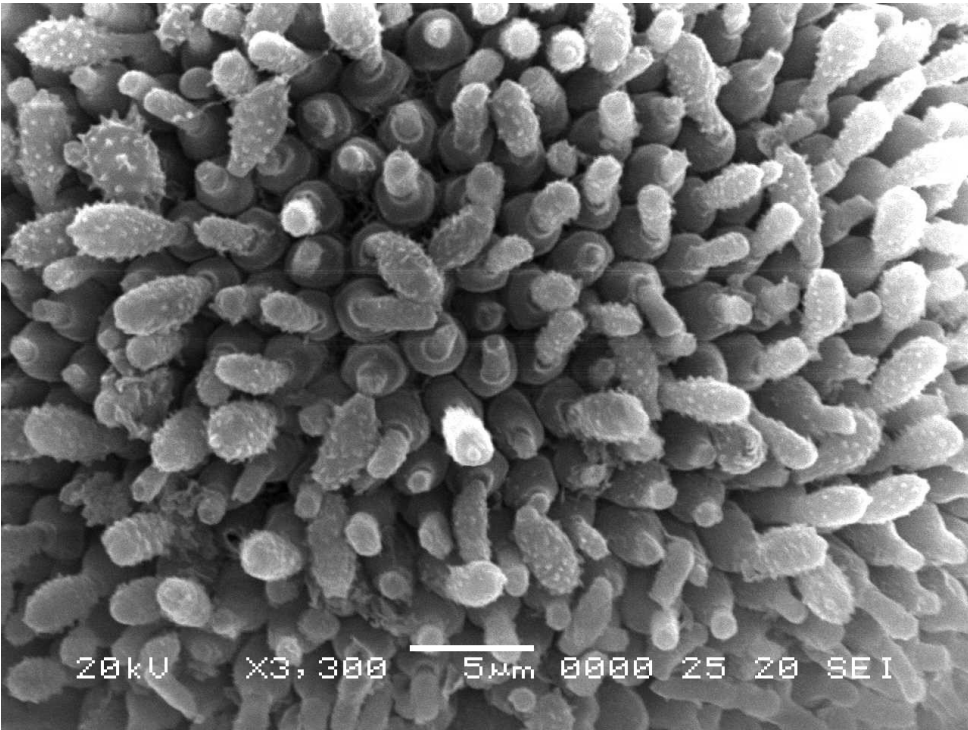
	NOMENCLATURA DE ESPECIES DE ASPERGILLUS	CONIDIOS DE COLOR		COLOR MANCHA REVERSO	DIÁMETRO DE LA COLONIA	FORO DE CONIDIO	LONGITUD DE CONIDIOS	EXTENSO CONIDIOS	FORMA DE CONIDIA	ORNAMENTACIÓN DE CONIDIOS
1	uesalvadorensis	Aspecto algodonoso plano, de color negro a gris		negro	9-10	Rugoso 300, hifas sin septos	3-5	1.96-2	Mazo, botella o cactus	celebridad
2	niger	Aspecto lanoso, verde, negro, blanco, amarillo		Amarillo-negro	25-30	400-3000 hifas con septos	4-5		Elipsoide, esférico	suave
3	clavatus	Aspecto de fieltro, verde azulado		Marrón blanco	21-24.5	Largo liso, hifas con septos	3-4.5	2.5-3.5	Elipsoide	suave
4	giganteus	De blanco a crema, oliva, verde		café	35-42	hifas con septos	3.5-4.5	2.4-3	elipsoide	suave
5	Nidulanos	Aspecto aterciopelado, de blanco a crema, amarillo, verde		Púrpura oscura	25-30	Muy corto, liso. hifas con septos	3-3.5	3-4	Globosa y subglobosa	rugosa
6	Flavus	Aspecto aterciopelado y empolvado, color amarillo verdoso		Marrón rojizo	42-49	800 variable, rugoso. hifas con septos	3.5-4.5	3.5-4.5	globoso	suave
7	Terreus	Aspecto aterciopelado, de blanco a crema, amarillo, verde		White marrón	24.5-35	250 corto liso. hifas con septos	1.8-2.4		globoso	suave
8	versicolor	Aspecto aterciopelado Blanco a crema, amarillo, café, negro		Amarillo, café	10-15	600 largo liso. hifas con septos	21-28	3-3.5	globoso	suave
9	fumigatus	Aspecto plano y polvoriento		Amarillo, café	40-60	300 largo liso. hifas con septos	2.5-3	2-3.5	subglobosa	suave
10	Orizae	De blanco a crema, amarillo, negro, gris a beige		Blanco crema amarillo	2.5	35-42 hifas con septos	7-10	3,5-4,0 µm,	Ovoide, subglobosa	Suave
		FIALIDES DE FORMA	VESÍCULA APICAL	VESÍCULA LARGA	ANCHURA DEL VESÍCULA	FORMA DE VESESCULA	ESTIPE ANHELADO	ANCHO STIPIE	ORNAMENTACIÓN DE STIPIE	RAMA DE PATRÓN
1	uesalvadorensis	Una serie	presente	52-66	50-48	Globosa	100-300	2-2	irregular	No
2	niger	biseriada	Presente	30-75	75-80	Piriforme	1500-3000	15-20	Suave	No
3	clavatus	uniseriado	Presente	200-250	40-60	Clavado	1500-3000	20-30	suave	No
4	giganteus	biserializado	Presente	100-600	30-180	vesículas clavadas	10000-20000		Serie Uni	No
5	Nidulanos	biserializado	presente	8-10	8-10	Globosa	70-150	2.5-5	suave	No
6	Flavus	Una o dos series	presente	15-25 µm por 4.5-6.0 µ	20-45	Globosa	400-800	25-45	Sauve	No
7	Terreus	biserializado	presente	2-2,5 µm	12-20	Globosa	100-250	4.5-6	suave	No
8	versicolor	biserializado	presente	4,16 milímetros	12-16	Globosa, subglobosa	500-700	5-10	suave	No
9	fumigatus	uniseriado	Presente	10 µm	18-30	rugosa	300-500	5-8	rugosa	Vertical
10	Orizae	Uniserial, biserial, biserial,	presente	100-200 milímetros	50-75	Globosa	4000-5000	6-12	suave	No

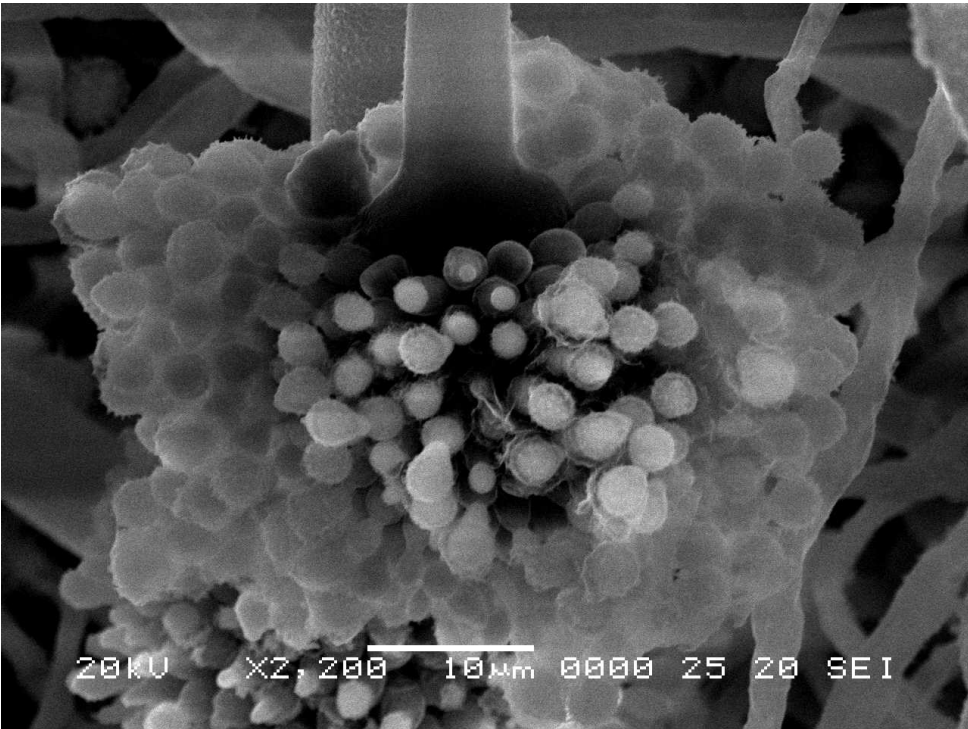
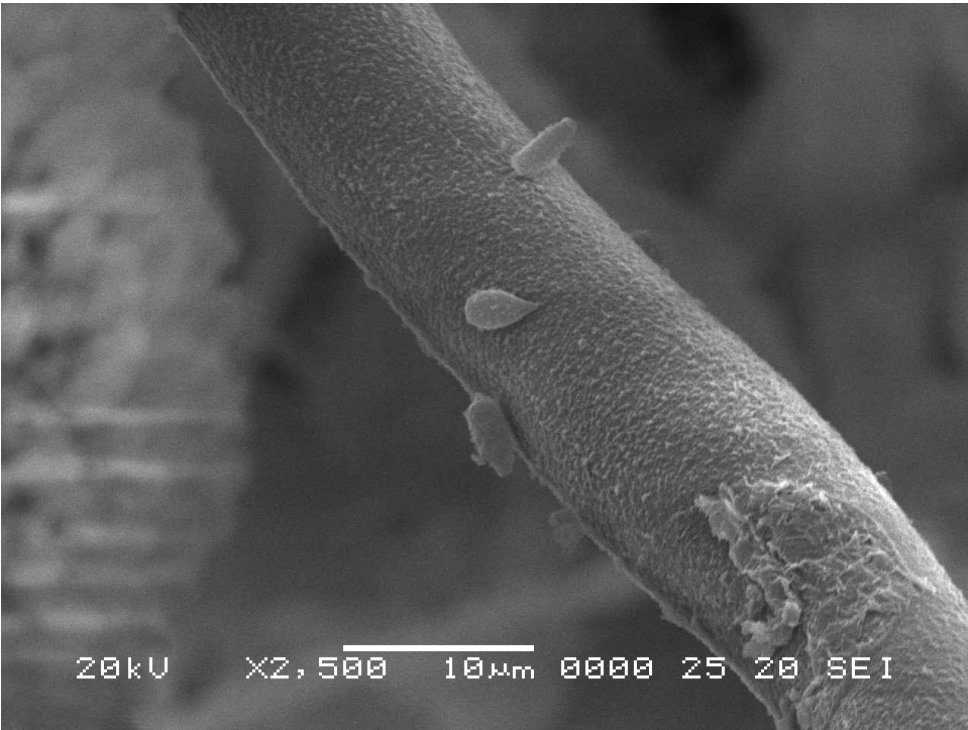
Capítulo VI

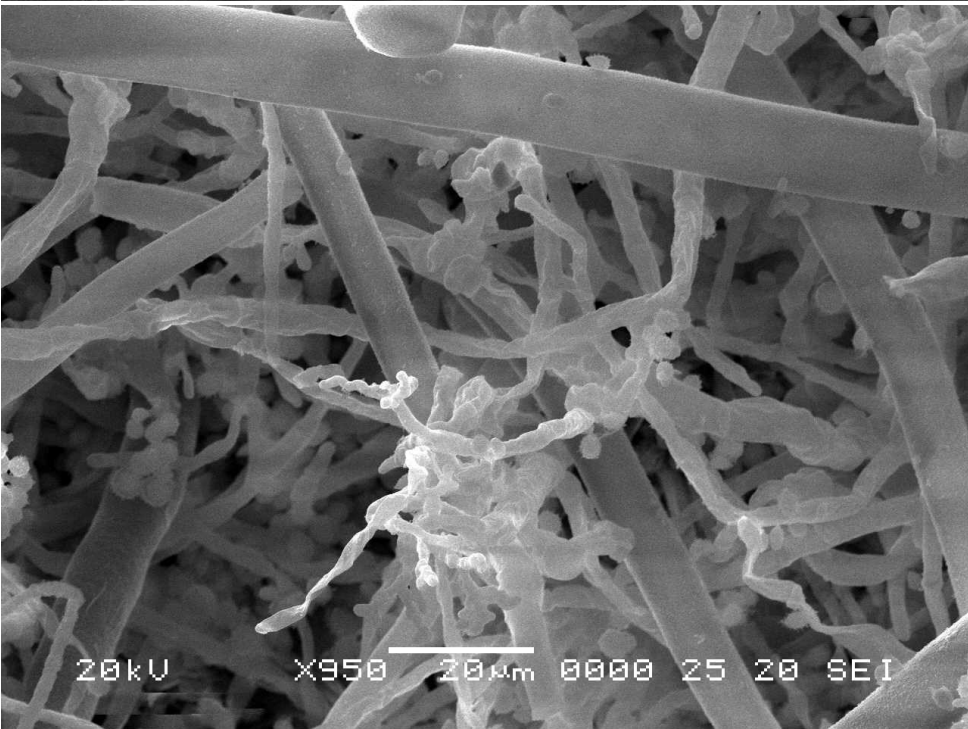
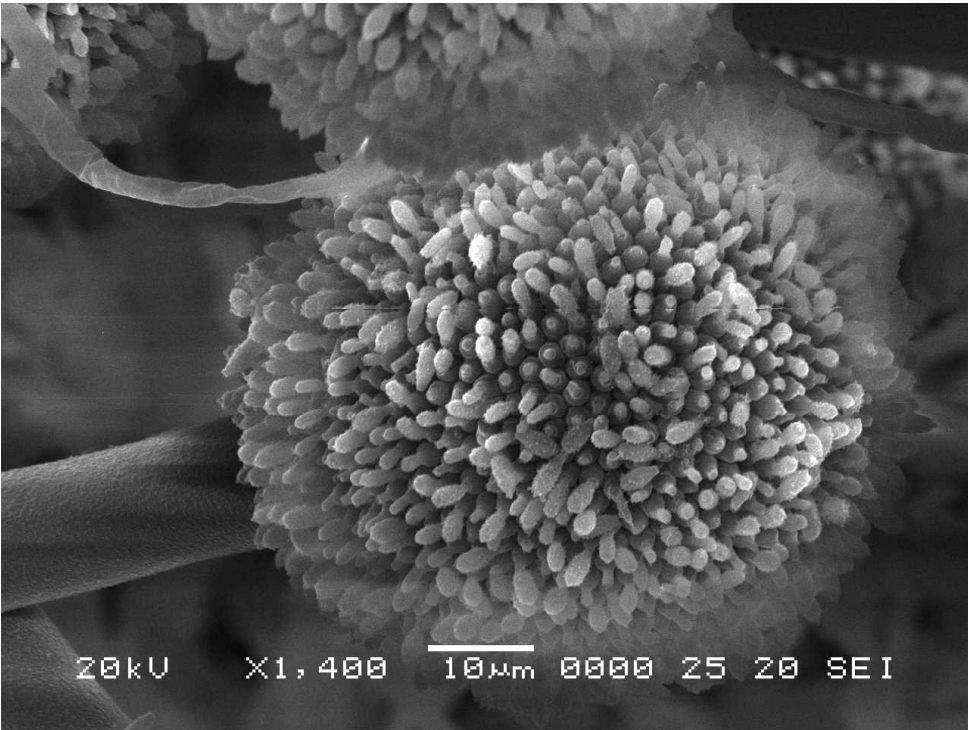
Microfotografías electrónicas *Aspergillus* de El Salvador

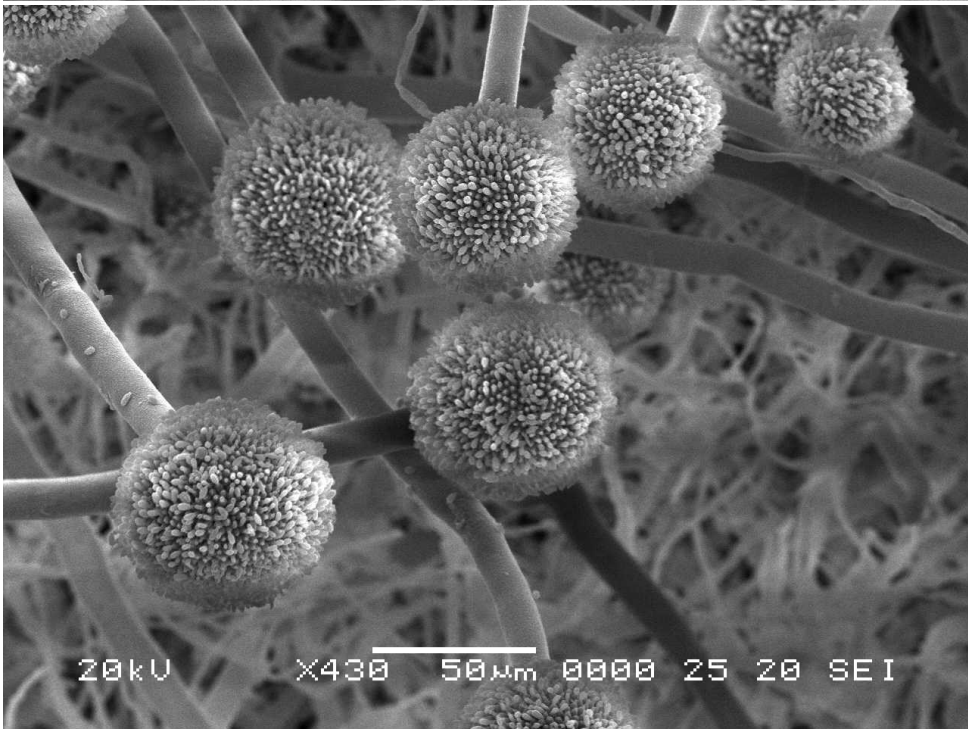
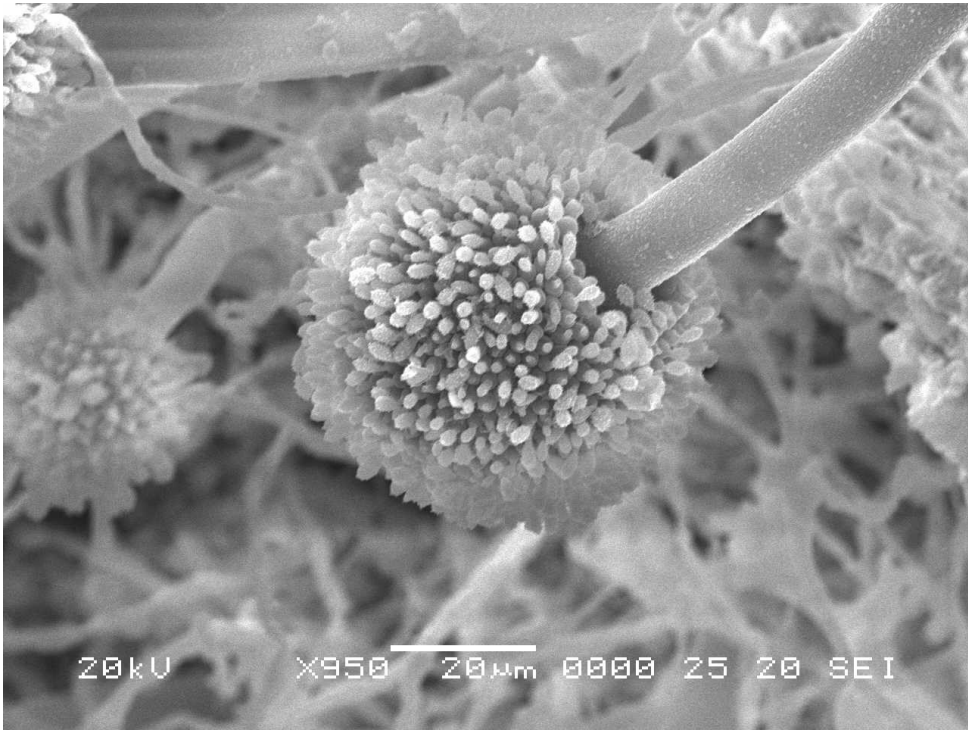


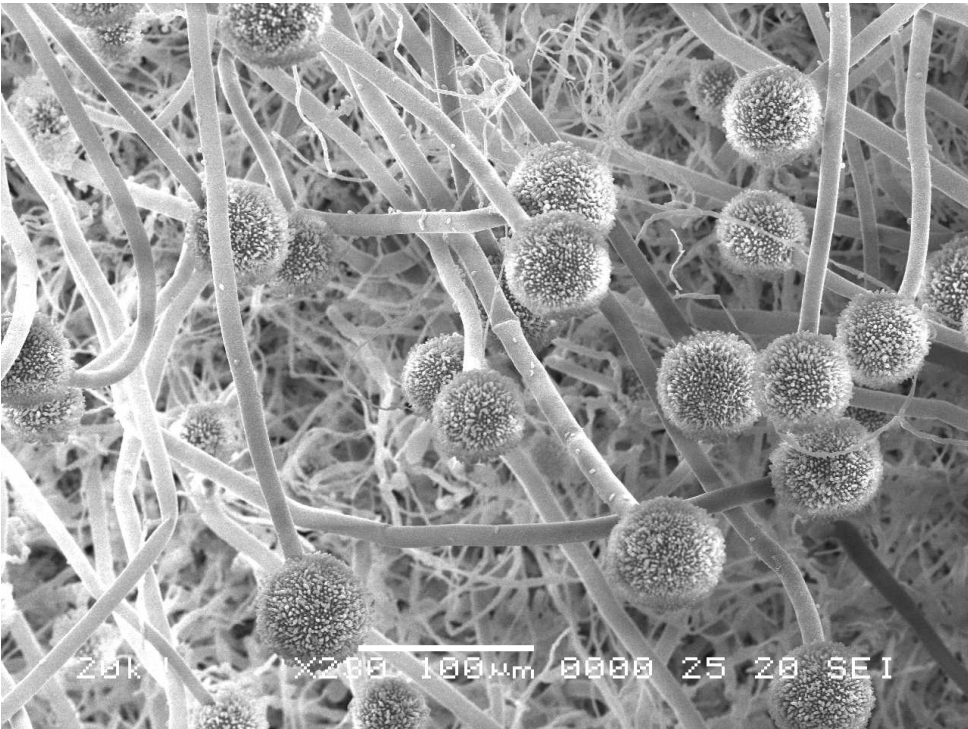
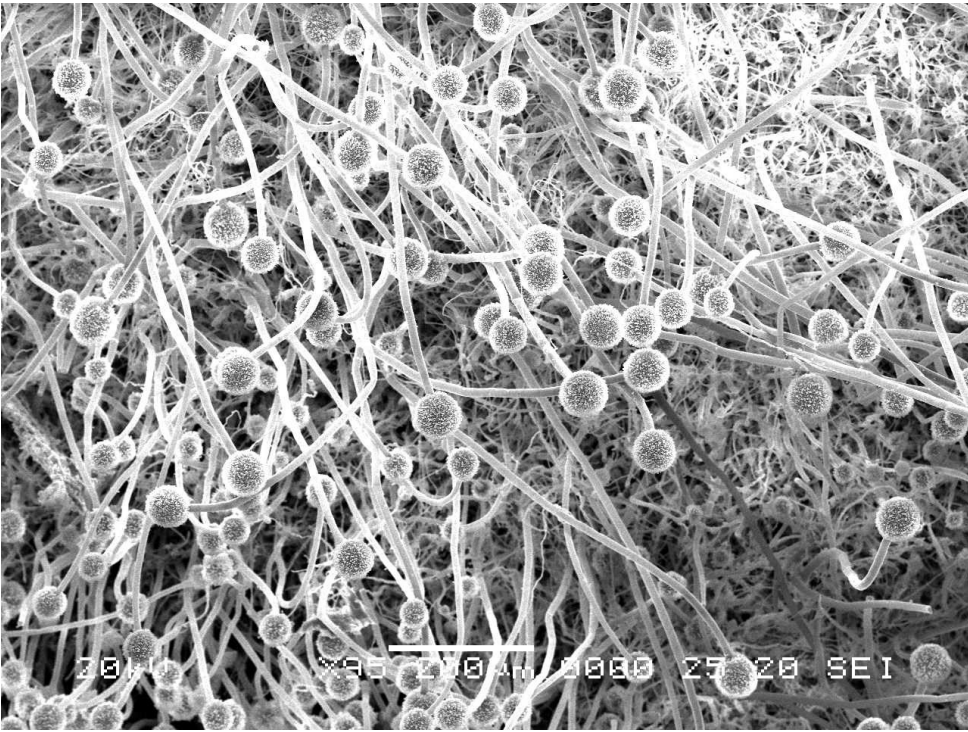
MICROFOTOGRAFIAS ELECTRONICAS. CENSALUD. Cortesía Dra. Vianney de Abrego

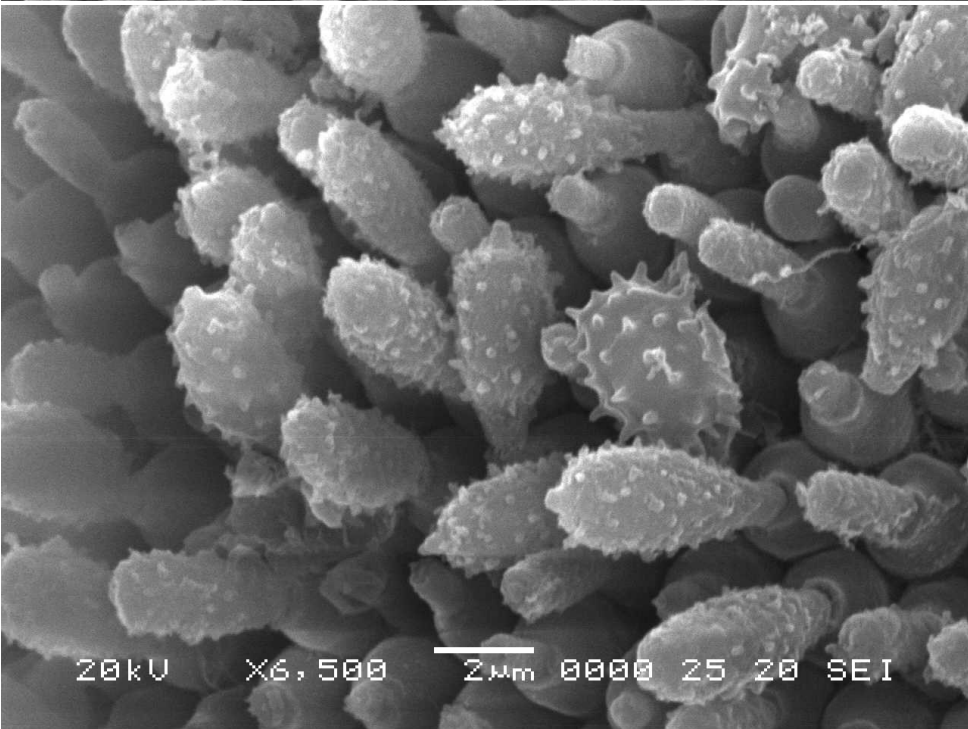
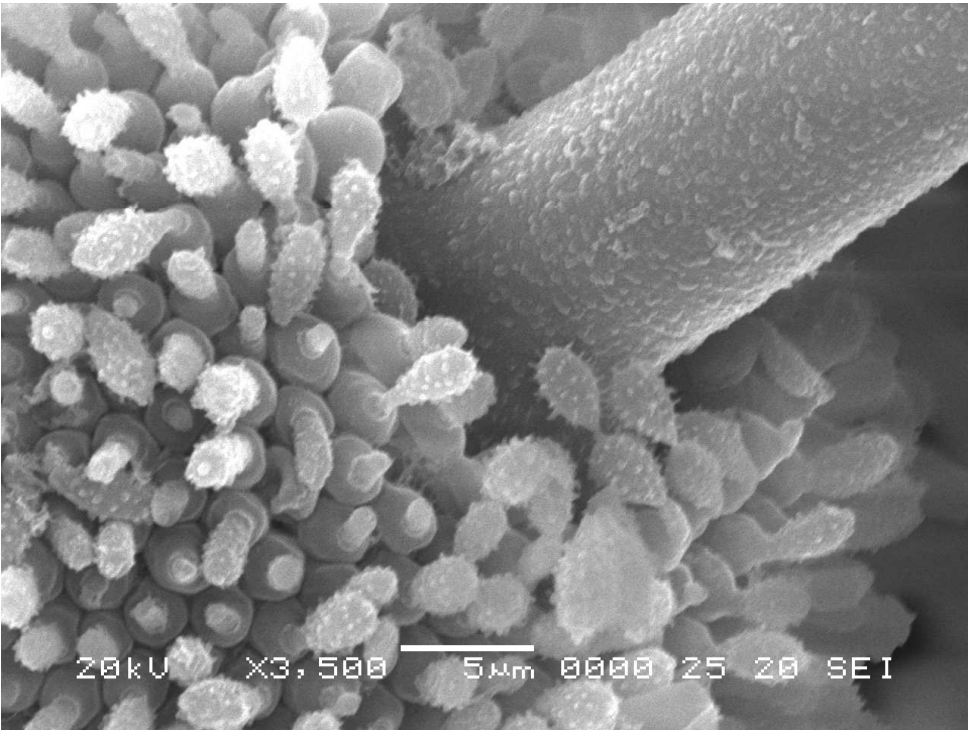


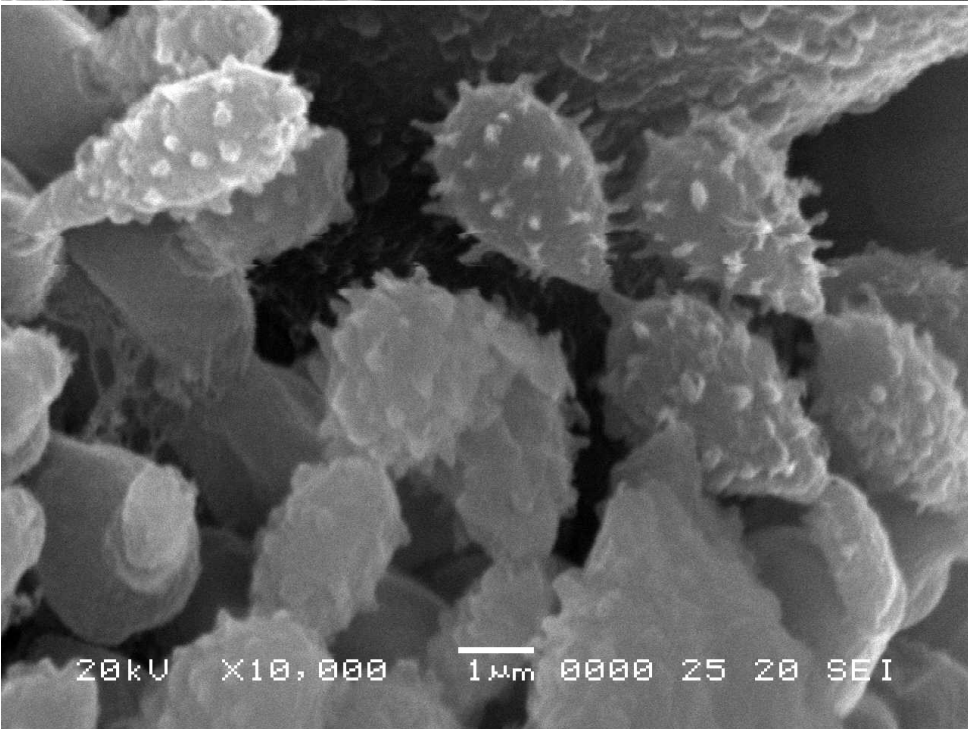
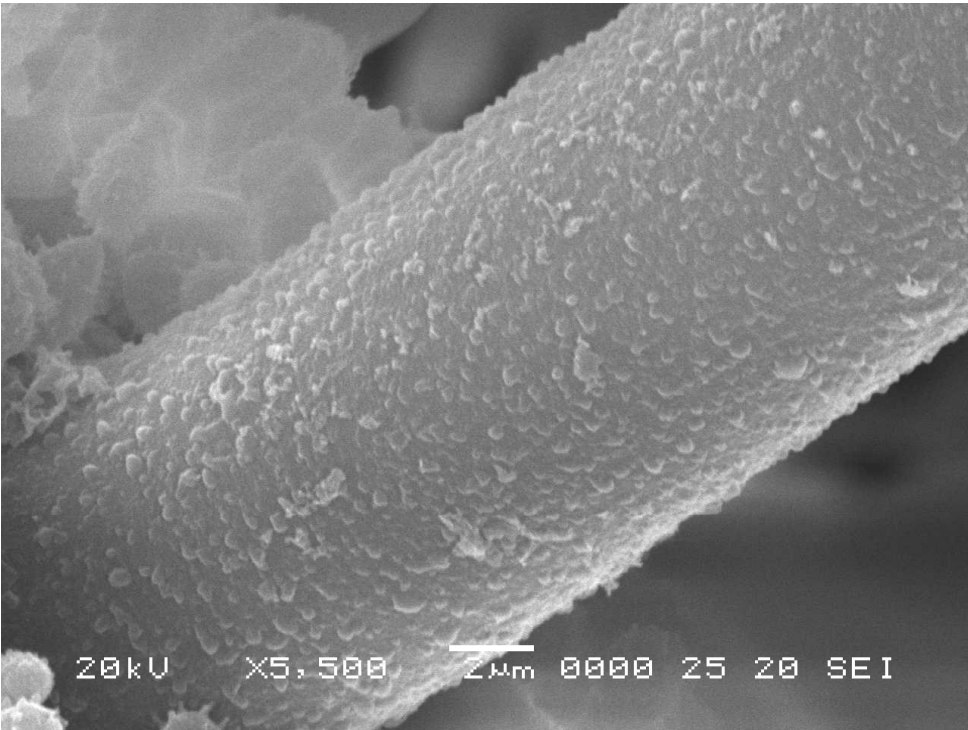


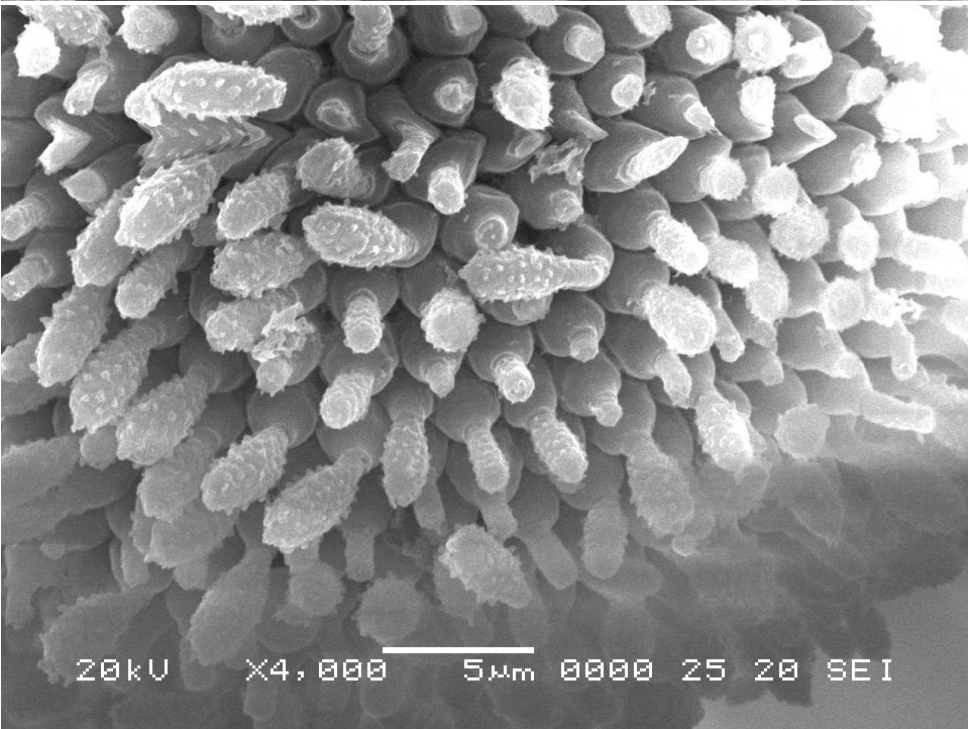
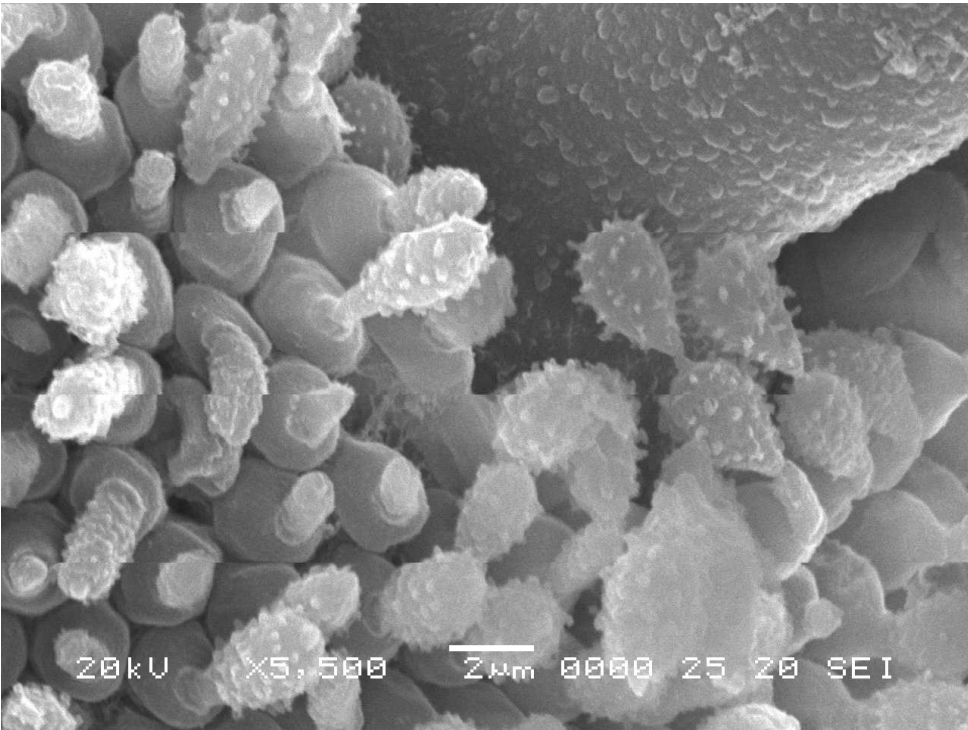












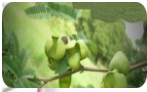
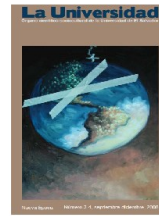
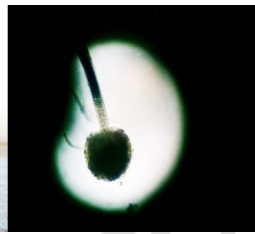


Fig 1. Semilla de Aspergillus



Phenotypic and Genotypic Characterization of *Aspergillus uessalvadorensis* in an Organic Strain Discovered at the University of El Salvador 2006 - 2024
Antonio Vásquez Hidalgo*
Published in Plant (Volume 13, Issue 1)

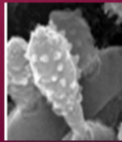
Dr. Antonio Vásquez Hidalgo
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de El Salvador



Nº 3 y 4, julio - diciembre 2022

La Universidad segunda época, Nº 3 y 4, julio - diciembre 2022

Aspergillus sp





Nº 52 **2007** LIBRO 1º

ESCRITURA PUBLICA DE:
CONSTANCIA DE INVENCIÓN

OTORGADA POR:
ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

A FAVOR DE:

ANTE LOS OFICIOS DEL NOTARIO:
LIC. ANTONIO ALBERTO SÁNCHEZ RAUDA

Lib. Santa Adela, 7ª Ave. Nte. Pje. 3. Edif. Quiñónez, 2ª Planta, S.S. TEL 2222-2003

Extracción de colorante y nombre especie



NOTARIO

NUMERO CONSENTA Y FOLIO: En la ciudad de San Salvador, a las once de la mañana del día ocho de julio del dos mil siete ante mí, ANTONIO SÁNCHEZ RAUDA, Notario de este domicilio, comparece el señor ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, [redacted] Medico de este domicilio, a quien conozco y lo identifico con su Documento Único de Identidad Numero cero dos uno nueve cinco cero siete ocho uno, y ME DICE: que comparece ante el suscrito notario a informar para que quede constancia del descubrimiento sobre una especie de hongos nuevo del género Aspergillus del año dos mil siete, que se cultivará en el futuro Aspergillus salvadorensis A. Vasquez de la que junto con la semilla de Nacassol (Cassipouira coriaria) se extrae un colorante negro, además informa que presento la invención con base al descubrimiento del hongo al Centro Nacional de Registros al servicio de Inscripción de Patentes de invención y modelo de utilidad el día tres de julio del año dos mil siete, con numero de expediente dos cero cero siete cero dos siete siete cero, con el título PROCESO ACCELERADO DE SINTESIS DE LABORATORIO DEL HONGO ASPERGILLUS spp. EN LA SEMILLA DE CASSEPIPIA CORIARIA (NACASSOL), PARA LA OBTENCIÓN DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE LA BIOCATALISIS DE UNA NUEVA ESPECIE DE ESPORA QUE SE DENOMINA ASPERGILLUS SALVADORENSIS A. VASQUEZ ENCONTRADA EN EL SALVADOR. Me informa que ha realizado una nueva forma de cultivo del hongo para extraer el colorante y preparar el colorante con Nacassol. Modo operativo de preparación del colorante: en condiciones de laboratorio con las medidas de bioseguridad adecuadas, se procede a extraer de las semillas la cantidad que se necesita, para en este caso se utilizan diez gramos de la semilla previo a limpiar, se mojan y se colocan en un beaker de quinientos milímetros agua de donde el agua destilada desecada cincuenta ml, se le agrega la semilla, luego se agita con espátula, luego se agrega dos ml metanol de sulfato de cincuenta ml, se le agrega la solución y se agita por tres minutos, para que produzca mayor estabilidad y calidad en el cual se produce un cambio de color de claro a negro. Se considera opcional hervir y llevar a temperatura de cien grados centígrados, lo que hace aumentar el proceso químico. Se prueba a temperatura ambiente. Para el preparado del color en medio de cultivo, primero se prepara el medio con un preparado de Agar Sabouraud compuesto por papaína treinta gramos, glucosa veinte gramos, agua destilada quinientos milímetros, al medio se agrega dos ml metanol de sulfato de cincuenta ml, se calienta y luego vierte a los tubos y placas de petri para



Introducción

- En nuestro medio ambiente la Salud es un valor agregado al capital humano .
- la semilla de Nacascal o Nacascolo, utilizada ampliamente en la alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país.
- Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita la presencia de un hongo del genero *Aspergillus sp*, para que pueda teñir junto con las propiedades del barro teñirse de color negro, las vasijas y de curtir la piel del ganado vacuno.



1. Composición química de la semilla:

Las semillas de **nacascal** tienen una **composición** rica en **carbohidratos**, **proteínas** y **lípidos**, lo que las convierte en una fuente excelente de **nutrientes** para varios tipos de hongos, incluido **Aspergillus**.

Específicamente:

- **Carbohidratos complejos**: Las semillas pueden contener **almidones o azúcares** que los hongos como **Aspergillus** pueden **descomponer** para **obtener energía**.
- **Proteínas y aminoácidos**: Las proteínas presentes en las semillas son importantes para los hongos, pueden **descomponerlas** para **obtener nitrógeno** y otros compuestos esenciales **para su crecimiento**.
- **Lípidos**: Las semillas también pueden tener **aceites y grasas** que algunos hongos pueden **descomponer** para obtener **energía**.

Esta alta disponibilidad de nutrientes hace que la semilla de nacascal sea un **sustrato atractivo** para **Aspergillus**.

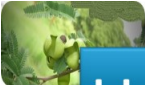


Fig. 1. Semilla de Nacascal

Resumen de los componentes principales del barro/arcilla:

1. **Minerales arcillosos** (caolinita, **ilita**, montmorillonita).
2. **Cuarzo** (**sílice**).
3. **Feldespatos**.
4. **Óxidos metálicos** (óxido de hierro, óxido de aluminio).
5. **Agua** (hidratación).
6. **Carbonato de calcio** (en algunas arcillas).
7. **Materia orgánica** y **carbono orgánico** (en algunas arcillas).
8. **Impurezas** (arena, limos, etc.).

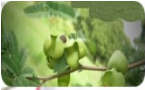




Usos y propiedades: Nacaccol

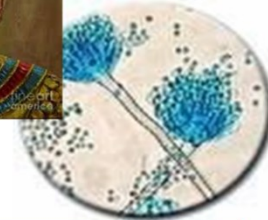


1. **Curtido de Cuero** : Los frutos son ricos en taninos, que se utilizan para curtir pieles y evitar su descomposición. Por esta razón, su nombre científico, *Caesalpinia coriaria*, hace referencia al cuero.
2. **Forraje** : Las hojas y frutos sirven como alimento para el ganado.
3. **Tinte** : Las semillas se utilizan para obtener un tinte negro. Teñido de artesanías.
4. **Carbón** : La madera es excelente para producir carbón vegetal.
5. **Medicina Tradicional** : En algunas regiones, la corteza y las hojas se usan en medicina tradicional para tratar diversas enfermedades como gastrointestinales, antiséptico, úlceras gástricas.
6. **las vainas del nacaccol**: Es conocido por ser un potente **astringente**, tónico y antipirético.
7. **Tanino**: Se ha investigado el uso de extractos de nacaccol para detectar sangramientos ocultos en heces y orina. el tanino reacciona con el hierro de la sangre, produciendo un color negro. (mi Inv publicada 2008) ****
8. **Glicósidos**: Son moléculas que se caracterizan por la unión de un azúcar a un compuesto no azucarado.
9. **Flavonoides**: Son pigmentos vegetales que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas.



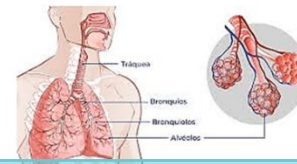
Generalidades del *Aspergillus sp*

- Hongo en naturaleza, vivienda, tierra, ventilación y agua y material orgánico en descomposición.
- Se reproducen a temperaturas altas. 15 a 53 °C
- Las esporas se diseminan por el aire y son inhaladas.
- Las **esporas por miles de años.** **Ramses II. siglo XIII A.C (hongo *Aspergillus flavus en tumbas*)**
- Tamaño esporas es **< 0,2 a 3.5 micras.**
- El **alvéolo pulmonar** es un saco de aproximadamente **0,2 a 0,5 mm de diámetro**
- Patógeno *oportunista.*



conidia < que diámetro alveolo

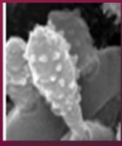
micra<mm



1 Milímetros = 1000 Micrómetros

Longitud			
	1	=	0.001
Micrómetro			Milimetro
Fórmula	divide el valor de longitud entre 1000		

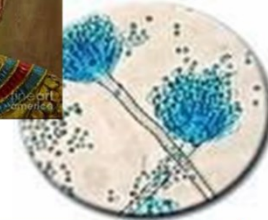
Longitud			
	0.2	=	200
Milimetro			Micrómetro
Fórmula	Multiplicar el valor de longitud por 1000		





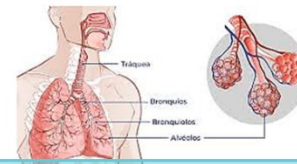
Generalidades del *Aspergillus sp*

- Hongo en naturaleza, vivienda, tierra, ventilación y agua y material orgánico en descomposición.
- Se reproducen a temperaturas altas. 15 a 53 °C
- Las esporas se diseminan por el aire y son inhaladas.
- Las **esporas por miles de años.** **Ramses II. siglo XIII A.C (hongo *Aspergillus flavus en tumbas*)**
- Tamaño esporas es **< 0,2 a 3.5 micras.**
- El **alvéolo pulmonar** es un saco de aproximadamente **0,2 a 0,5 mm de diámetro**
- Patógeno *oportunista.*

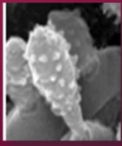


conidia < que diámetro alveolo

micra<mm



1 Milímetros = 1000 Micrómetros



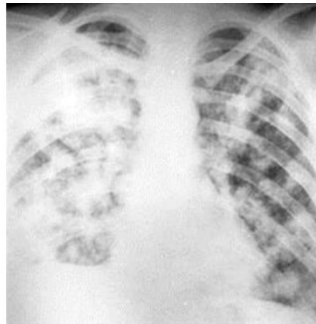
<p>Longitud</p> <p>1</p> <p>Micrómetro</p> <p>Fórmula divide el valor de longitud entre 1000</p>	=	<p>0.001</p> <p>Milimetro</p>
<p>Longitud</p> <p>0.2</p> <p>Milimetro</p> <p>Fórmula Multiplicar el valor de longitud por 1000</p>	=	<p>200</p> <p>Micrómetro</p>



Micosis

1. Hongo patógeno oportunista.
Aspergilosis invasivas o diseminadas
2. **Aspergilosis pulmonar de tipo bronco pulmonar alérgica**
3. **Aspergiloma**
4. **Aspergilosis pulmonar invasiva**

SALUD Vrs ENFERMEDAD

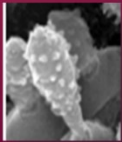


Investigación actual 2025:



1. Prevalence of target metabolites clusters in the circular DNA sequence of A. uessalvadorensis of the genus Aspergillus spp positive for aflatoxins carcinogenic, 2025

2. Prevalence of targer secundaries metabolites cluster in sequence of A. uessalvadorensis of genus Aspergillus for natural pigments black.

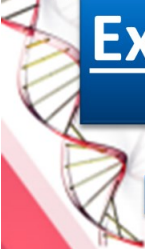


Extracción del colorante (inicio)

3 formas :

- 1. Artesanal semilla. Publicado 2008
- 2. Laboratorio semilla y hongo. Publicado 2008,2024
- 3. hongo . Publicado 2025....inicio Patente CNR

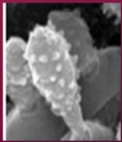




Extracción del colorante (inicio)

3 formas :

- 1. Artesanal semilla. Publicado 2008
- 2. Laboratorio semilla y hongo. Publicado 2008,2024
- 3. hongo . Publicado 2025....inicio Patente CNR





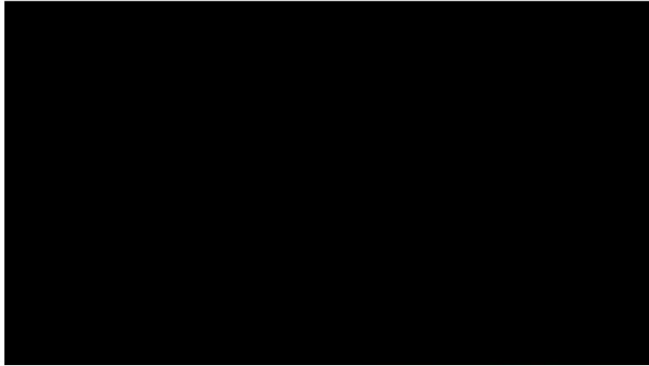
Prevención en la salud para resolver el problema identificado

La investigación consiste en un nuevo aporte científico de conocimiento en el impacto ambiental en salud de nuestro país, en identificar no solamente el hongo y su localización, sino también en contribuir con la educación sanitaria y ambiental. Incluso en cuanto a capacitar al personal de salud sobre el descubrimiento y conocimiento de aspectos microbiológicos en la prevención de la enfermedad, optando la posibilidad de pensar en otros diagnósticos.

Se ha encontrado que, al utilizar un **método sencillo de protección, como el uso de mascarilla y guantes, se reduce considerablemente la diseminación y contaminación de los susceptibles a contraer el hongo, así como otras medidas de eliminar o destruir el hongo durante el preparado.** También es importante **proteger el producto luego del quemado en otras áreas estériles.** También a nivel de suelo se ha reportado la presencia de Aspergillus, por lo que es un antígeno o alérgeno susceptible al ser humano.

En conclusión, se encontró una nueva especie de hongo del género Aspergillus en las semillas de nacascal y en el suelo salvadoreño en la zona norte del país, el cual será denominado en el futuro con el nombre científico: Aspergillus ues salvadorensis, del género Aspergillus; ues, porque se descubrió en la Universidad de El Salvador, y salvadorensis, porque está en territorio de El Salvador; o es el caso nombre científico binomial: *Aspergillus v ues salvadorensis*. Se hizo búsqueda en base de datos de Atlanta CDC y sociedades de micología, donde no se reporta la especie encontrada en partícula.

Se agradece a CENSALUD por su colaboración en la toma de microfotografías electrónicas de barrido y a la doctora Vianney Abrego.



click

VIDEO . TEÑIDO VASIJAS



Es termotolerante, pudiendo vivir entre los 12°C y los 57°C.

Horno a 600 °C

Semilla + nance hierven a 100 °C



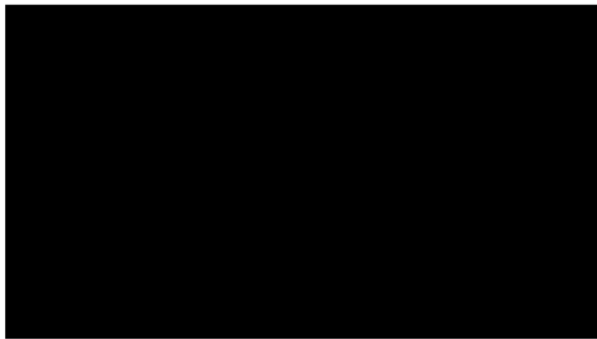
Prevención en la salud para resolver el problema identificado

La investigación consiste en un nuevo aporte científico de conocimiento en el impacto ambiental en salud de nuestro país, en identificar no solamente el hongo y su localización, sino también en contribuir con la educación sanitaria y ambiental. Incluso en cuanto a capacitar al personal de salud sobre el descubrimiento y conocimiento de aspectos microbiológicos en la prevención de la enfermedad, optando la posibilidad de pensar en otros diagnósticos.

Se ha encontrado que, al utilizar un **método sencillo de protección, como el uso de mascarilla y guantes, se reduce considerablemente la diseminación y contaminación de los susceptibles a contraer el hongo, así como otras medidas de eliminar o destruir el hongo durante el preparado.** También es importante **proteger el producto luego del quemado en otras áreas estériles.** También a nivel de suelo se ha reportado la presencia de Aspergillus, por lo que es un antígeno o alérgeno susceptible al ser humano.

En conclusión, se encontró una nueva especie de hongo del género Aspergillus en las semillas de nacascal y en el suelo salvadoreño en la zona norte del país, el cual será denominado en el futuro con el nombre científico: Aspergillus ues salvadorensis, del género Aspergillus; ues, porque se descubrió en la Universidad de El Salvador, y salvadorensis, porque está en territorio de El Salvador; o es el caso nombre científico binomial: *Aspergillus v ues salvadorensis*. Se hizo búsqueda en base de datos de Atlanta CDC y sociedades de micología, donde no se reporta la especie encontrada en partícula.

Se agradece a CENSALUD por su colaboración en la toma de microfotografías electrónicas de barrido y a la doctora Vianney Abrego.



click

VIDEO . TEÑIDO VASIJAS



Es termotolerante, pudiendo vivir entre los 12°C y los 57°C.

Horno a 600 °C

Semilla + nance hierven a 100 °C



PROCEDIMIENTO EXTRACCION DEL COLORANTE



Extracto acuoso de colorante negro natural, a partir de las semillas de nacazol (Caesalpinia coriaria) en condiciones de laboratorio. 2008

ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

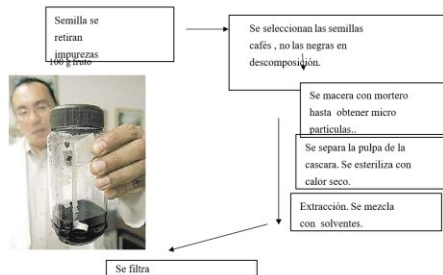
Docente Depto de Microbiología Facultad de Medicina Universidad de El Salvador

Pigmento : aspergilina



Semilla y hongo

Figura 1 Diagrama de bloques del proceso extracción colorante a escala de laboratorio.



CONDICIONES DEL PROCESO

Una condición ideal del proceso es la adecuada mezcla entre los solventes y oxidante, ya que esto proporciona una mejor calidad del producto. No se necesitan condiciones de temperatura ideal ya que a temperaturas ambiente y extremos de calor no influye en la obtención del colorante, sin embargo a mayores temperaturas el resultado no es muy favorable ya que puede precipitar el hierro.

Temperatura: Es necesario tener cuidado con las temperaturas extremas ya que en condiciones de laboratorio se puede variar de tonalidad de negro, en condiciones artesanales no importa ya que el barro puede soportar extremos de temperatura mayores de 300 grados Celsius.

Solventes: Se utilizaron varios solventes entre ellos el agua de grifo, destilada, teniendo mejores resultados el agua de grifo. Otros solventes como el alcohol se presentaron diversas tonalidades.

Tamaño de partícula: No es necesario el tamaño, pero si entre más macerado este el producto los resultados son mejores. Debe separarse de la cascara.



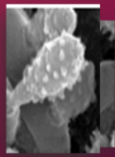


Hongo

The extraction of the black dye



The extraction of the black dye, usually melanin, produced by the *Aspergillus* fungus under laboratory conditions is a methodical procedure that begins with the cultivation of the microorganism. Since this pigment is inherently insoluble in many solvents, specific steps are required for its handling and treatment. The process begins with the *Aspergillus* Culture, where the fungus is sown in a Sabouraud Agar medium, which provides essential nutrients such as sources of carbon (glucose) and nitrogen (peptones or salts). The crop is grown under controlled conditions, at a room temperature or slightly higher (approximately 25–30°C) and with high humidity. This environment stimulates the production of large amounts of melanin, especially if the fungus is subjected to environmental stressors such as pH changes or UV radiation. Once the fungus has grown and synthesized the melanin in the medium, the Biomass is collected and prepared. The *Aspergillus* biomass, which contains the pigment, is separated from the liquid culture medium by methods such as centrifugation or filtration. This fungal biomass should be washed with distilled water to remove any residue from the culture medium that could interfere with extraction. Optionally, the biomass can be dried at a low temperature (40-50°C) in an oven to facilitate the extraction stage. The extraction of melanin is the crucial step due to the insolubility of the pigment. The most common method is based on the solubility of melanin in alkaline solutions. The biomass is mixed with a 1-2% sodium hydroxide (NaOH) solution and gently heated (to about 60-80°C) for several hours. This allows the melanin to dissolve in the alkali. The resulting solution is filtered to separate the insoluble biomass, and the filtrate, which contains the dissolved pigment, is neutralized with an acid such as hydrochloric acid (HCl) until a pH close to 7 is reached. This acidification causes the precipitation of melanin, which is later recovered by filtration and dried. Alternatively, other extraction methods may be employed. If the extraction alkaline is insufficient, organic solvents such as ethanol or methanol can be used; In this case, the biomass is mixed with the solvent, stirred with a slight heating, and the pigment is filtered out, allowing the solvent to evaporate to obtain the dried melanin. Concentrated hydrochloric acid is also sometimes used along with heating to dissolve and extract melanin, which is then precipitated and separated. After extraction, the melanin can undergo a Pigment Purification. Depending on the level of purity required for its end use, techniques such as additional precipitation, dialysis to remove impurities and other fungal metabolites, or column chromatography may be applied. Finally, the extracted and purified pigment goes through Drying and Storage. A dry melanin powder is obtained using a freeze-dryer. To store the melanin powder, it should be stored in dark and dry conditions to prevent its breakdown. In the predominantly, the extraction of the pigment through the use of ethanol or methanol can be employed. The process concludes with the optimization of extraction according to application needs.



IKR Journal of Agriculture and Biosciences
(IKRJAB)
ISSN: 3107-5509 (Online)
Frequency: Bimonthly
Publishers: IKR Publishers
Country of Origin: India
Journal Starting Year: 2025

[View Journal](#)

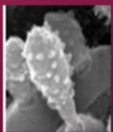
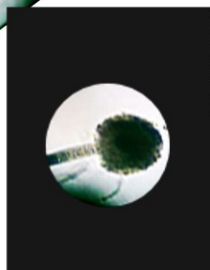
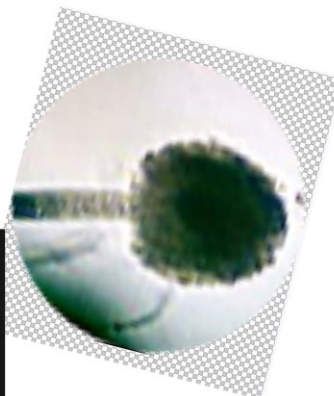


Resultados de la investigación

• I parte • CARACTERIZACION FENOTIPICA .

Laboratorios:

1. LAB DEPTO MICROBIOLOGIA FM UES 2006-2025
2. CENSALUD 2008



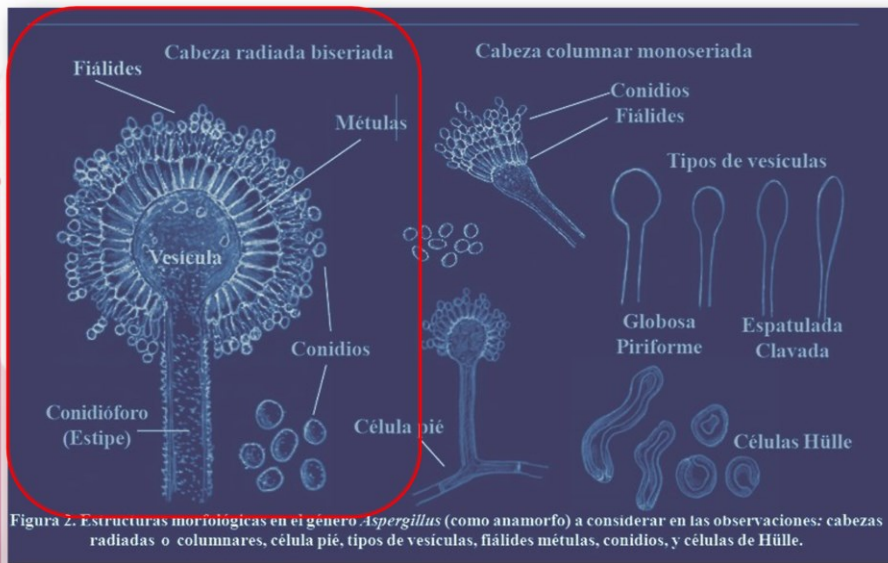
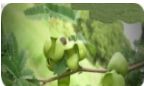


Figura 2. Estructuras morfológicas en el género *Aspergillus* (como anamorfo) a considerar en las observaciones: cabezas radiadas o columnares, célula pié, tipos de vesículas, fialides métulas, conidios, y células de Hülle.

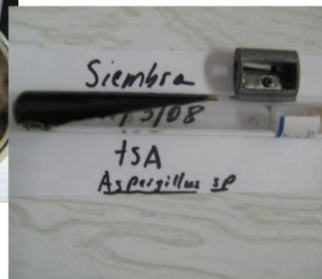


Cultivo



Aspergillus uessalvadorensis/salvadorensis

- **Características Macroscópicas:** colonia en Agar saboraud es de color blanco luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es pigmentado de color negro, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvorienta de color negro.



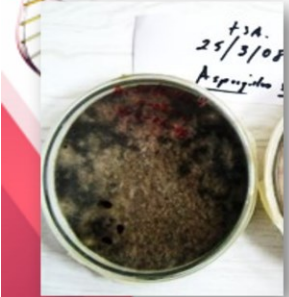
Composición básica del Agar Sabouraud:

- Peptona: Fuente de nutrientes para el crecimiento de los hongos.
- Glucosa: Fuente de carbono que favorece el crecimiento de hongos y levaduras.
- Agar: Agente solidificante.

Composición de Agar Sabouraud+ (con antibióticos):

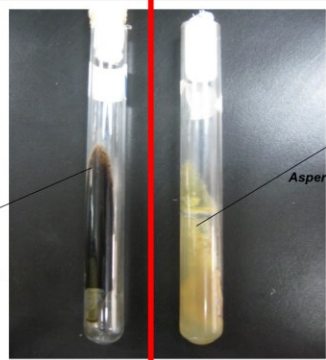
- Peptona: 10 g/L
- Glucosa: 40 g/L
- Agar: 15 g/L
- Antibióticos (varía según la formulación, pero los más comunes son):
 - Cloranfenicol (para inhibir bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas).
 - Ciprofloxacina (a veces se usa para inhibir bacterias).
 - Gentamicina o Bacitracina (pueden añadirse para suprimir la flora bacteriana no deseada).

Aspergillus uessalvadorensis



Aspergillus uessalvadorensis

Aspergillus uessalvadorensis



Aspergillus uessalvadorensis

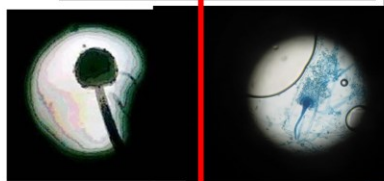
Aspergillus niger

Five-day-old, black colony of *Aspergillus niger* on Sabouraud's dextrose agar. The colony showing typical "salt and pepper appearance", which results from darkly pigmented conidia borne in large numbers on conidiophores



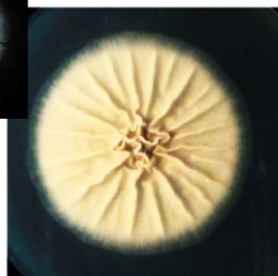
Aspergillus niger

The reverse of the colony appears yellowish to pale

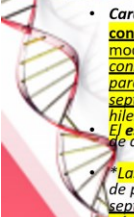


Aspergillus uessalvadorensis

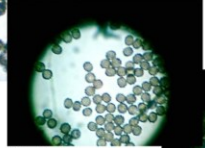
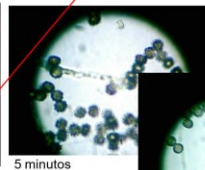
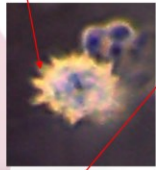
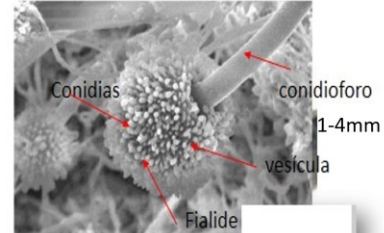
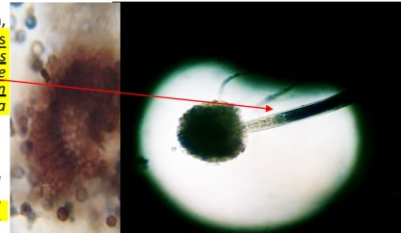
Aspergillus niger



(Color, forma, conidiofo... (septos, liso o rugoso)



- **Características Microscópicas:** La cabeza de la conidia es negra, **conidioforo** liso/rugoso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro, **cabecitas conidiales**, lisas de una pared redonda, dispuesta en forma radial, estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro, lisa sin septos, hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza, **tiene una hilera de fialides**.
- El esporangio es una estructura **globosa peridial simple**, del esterigma es de color negro.
- **Las conidias maduras de color café** son esféricas con proyecciones en forma de picos triangulares en toda la periferia, en forma de **mazo ó de raqueta sin septos** abundantes y las centrales son escasas formando **espículas en número mayor de 10**, la conidia tiene un aspecto esférico estrellado con **espículas**, que de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias, toda la estructura forma una **coraza sólida**.
- **Las conidias/esporas inmaduras asexuales** son irregulares de pared delgada incolora de tamaño grande, que luego se llenan formando **masas internas de color café**.
- El **conidioforo** es **largo rugoso con esporas abundantes**. **Crece a temperatura ambiente 20-25-37°C**

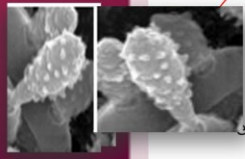


Crecimiento

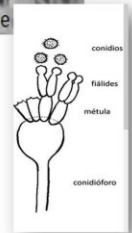
5 minutos

15 minutos

30 minutos

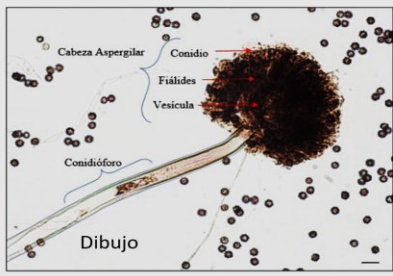


100 x /40 x
1-3 micras
espículas >10





Comparación A. niger



100 x

Ilustración 2. Aspergillus Niger. Información tomada de (Québec, 2019)

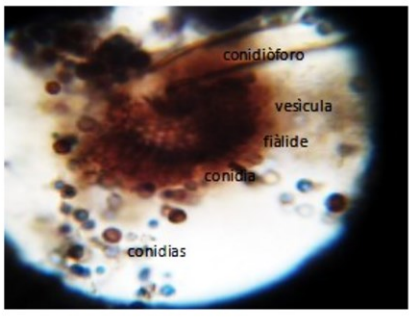
A. niger



Biseriadas con métula y fialides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula dando la forma radiada típica.



Figura 3. Cabezuelas de Aspergillus niger.



Fotografía . Aspergillus uessalvadorensis

Foto con tinción: lactofenol azul algodón

A. niger : se tiñe

A. uess : no se tiñe

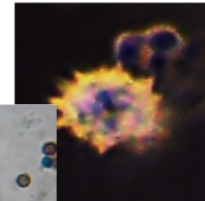
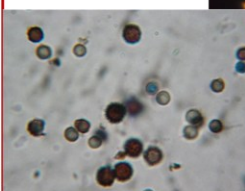
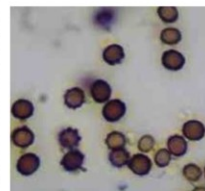
Uniseriadas sin métula y con fialides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula no dando la forma radiada típica



Aspergillus niger

Aspergillus uessalvadorensis

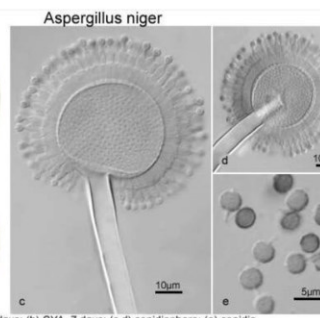
Microfotografías electrónicas de barrido. 2008.CENSALUD



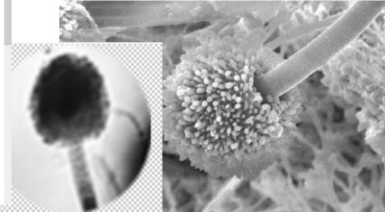
Aspergillus niger

100 X

Aspergillus var uessalvadorensis



conidios
fialides
métula
conidióforo





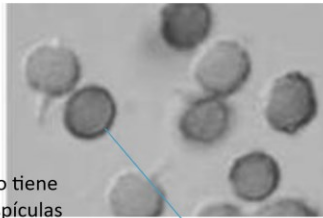
Aspergillus niger

esclerotes



a

Aspergillus niger en cultivo



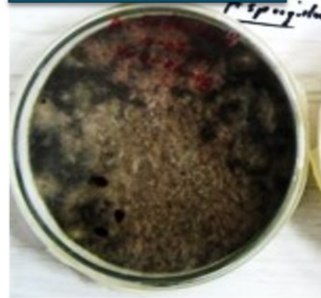
No tiene espículas

100 x

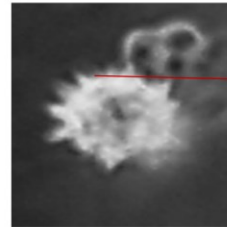
Pared gruesa



Aspergillus uessalvadorensis



Aspergillus uessalvadorensis en cultivo

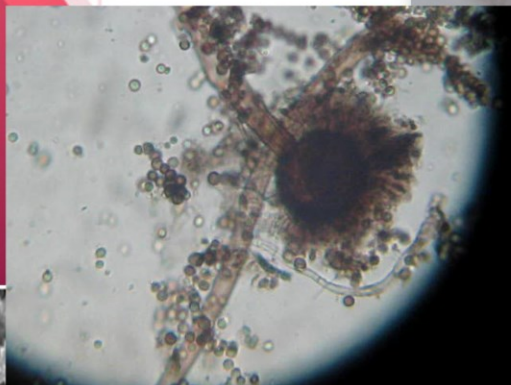


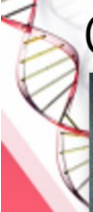
Espículas

100 x

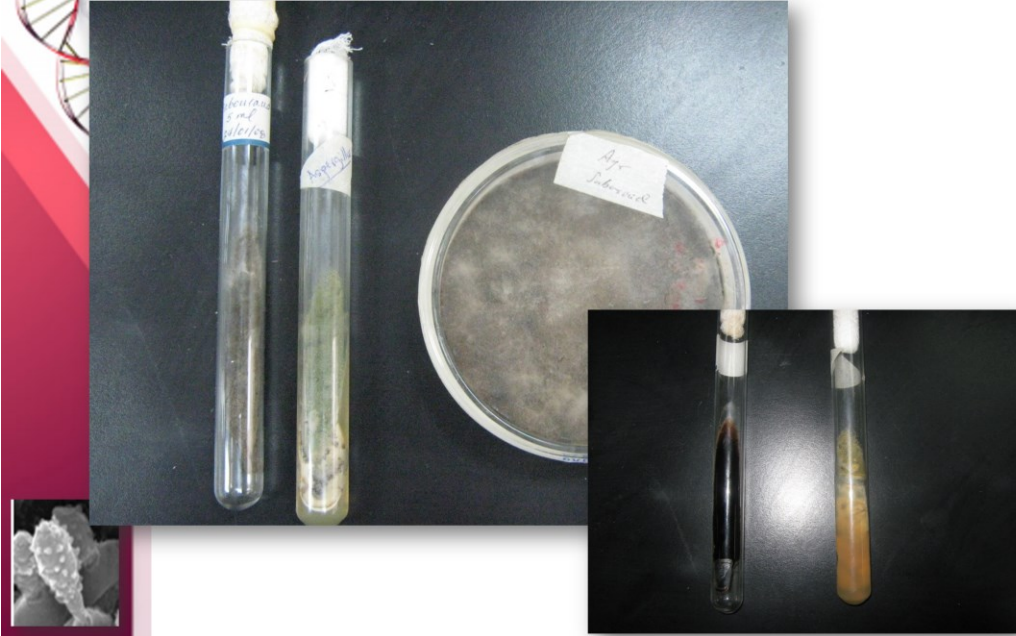


Aspergillus uessalvadorensis



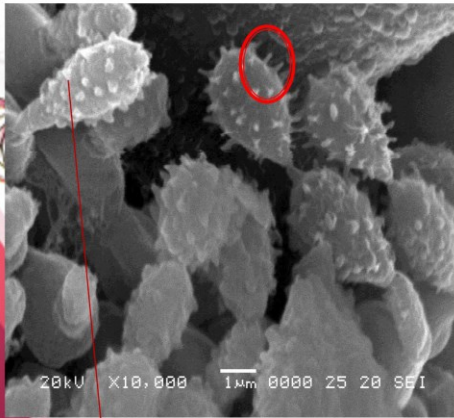


Cultivo Agar saboraud





Aspergillus uessalvadorensis



Conidias Aspergillus /1 -3 micras
Microscopia electrónica de barrido

Sobreviven a altas temperaturas hasta o mas **57 °C** . Las **espículas** brindan humedad.

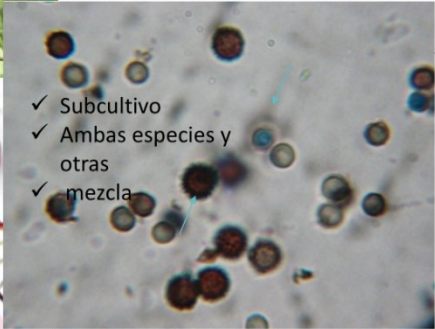
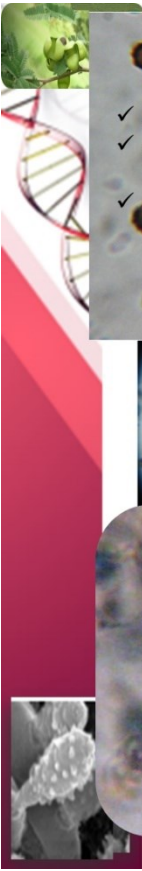


Planta natural cactus



Hojas cactus familia Cactaceae / 10-15 cm
Planta fotografía

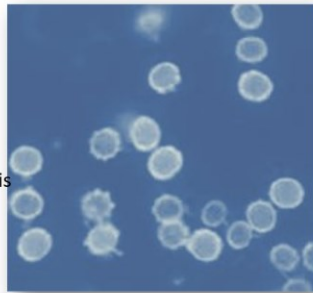
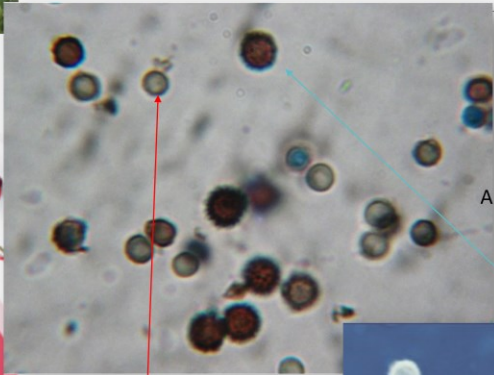
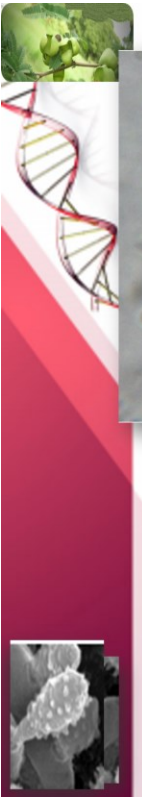
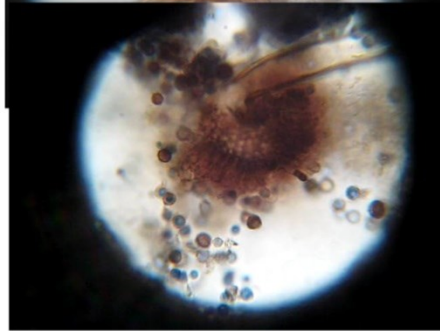
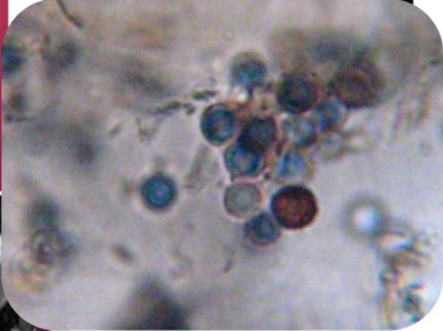
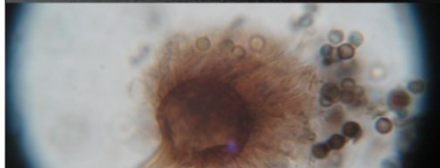
En su lucha contra las altas temperaturas de hasta 60 °C. Las espinas también brindan humedad y acumular agua.



- ✓ Subcultivo
- ✓ Ambas especies y otras
- ✓ mezcla

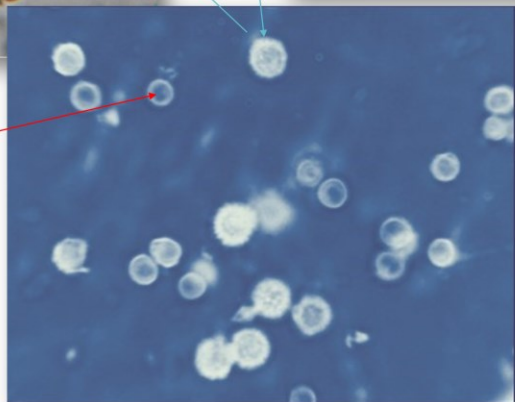


click

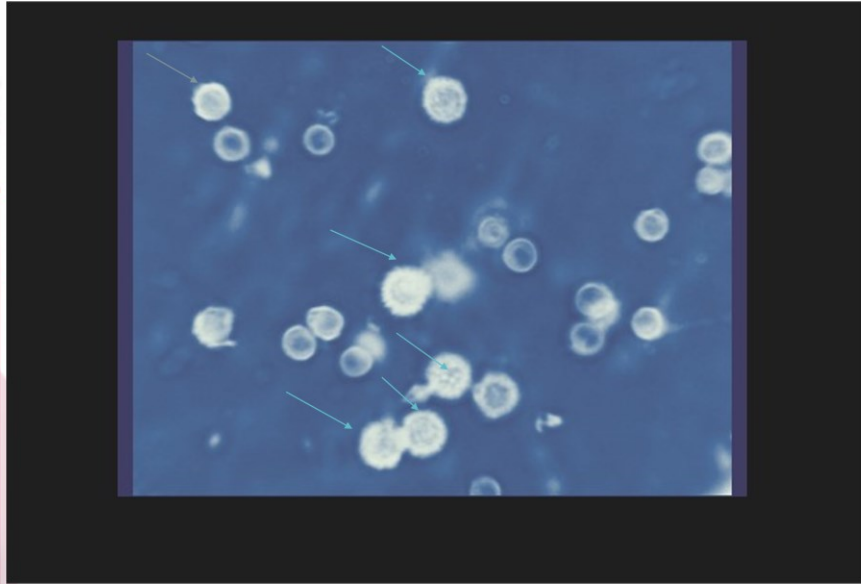


A. salvadorensis

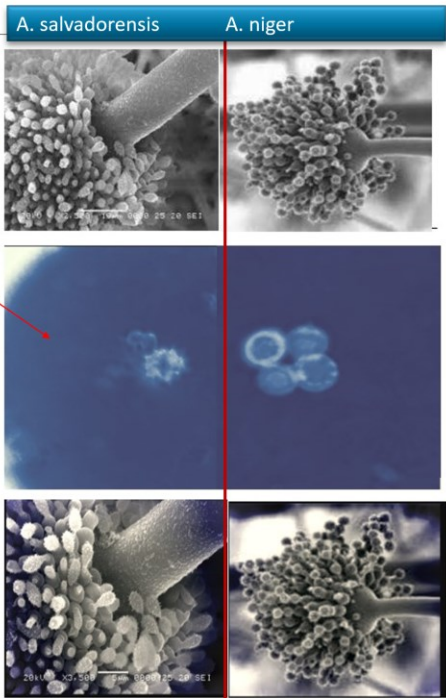
A. niger



Efecto Rayos X



Conidias por Microfotografías electrónicas y a 100x





CULTIVO	HONGO 100 X	CONIDIA 100x	ESPECIE
 <p data-bbox="354 863 537 877">Aspergillus niger on PDA culture and slide.</p>		 <p data-bbox="914 842 976 869">100 X</p>	<p data-bbox="1114 695 1308 730"><i>Aspergillus niger</i></p>
   <p data-bbox="914 1058 976 1085">100 X</p> <p data-bbox="938 1108 1252 1163">NO SE TIÑEN CON LACTOFENOL AZUL ALGODON</p>	 	 <p data-bbox="914 1058 976 1085">100 X</p> <p data-bbox="938 1108 1252 1163">NO SE TIÑEN CON LACTOFENOL AZUL ALGODON</p>	<p data-bbox="1101 968 1365 1003"><i>Aspergillus salvadorensis</i></p>



```

Name:
137238396

(Click on the sequence to view details)

Accession: FeatureMap | Argo Applet

Sequence:
>A. niger Asig_scaffold_1(contig_1.1) [MB] 1-3978925 +
TTTGAATGATTAATGATGATCTTTTCGACTTGAGCGAGCGATGATACCGGATTAAT
CAACTCCCGGCGACAGCTTACCGGACTCATGAAACCGGCGATGATGATGATGATG
CTAGGGACCTGACAGTGCACACCGGACCTTTCAGTAGGTGATGATGATGATGATG
TTGCTCCAAATGATCAGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GTCTGGAGAAACGAGCGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CCACATATAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TTGCTCCAAATGATCAGAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GTCTGGAGAAACGAGCGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CCACATATAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG

```



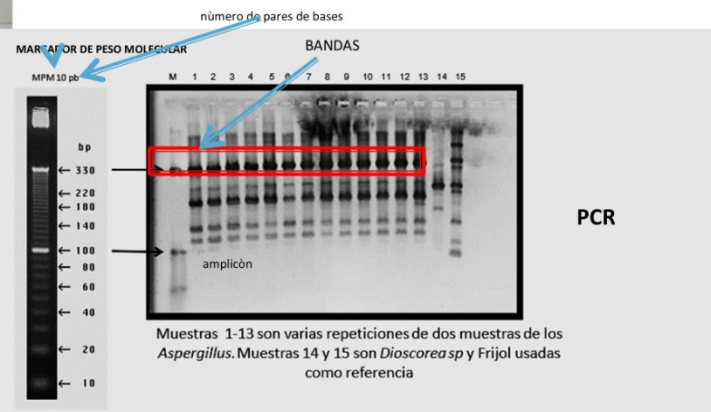
MEXICO: primeros reportes
 Varias especies
 -niger
 -carbonarius
 - desconocida? (subcultivo)

PCR en tiempo real x detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos.

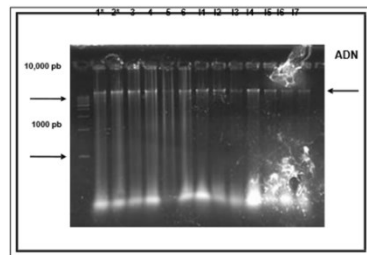
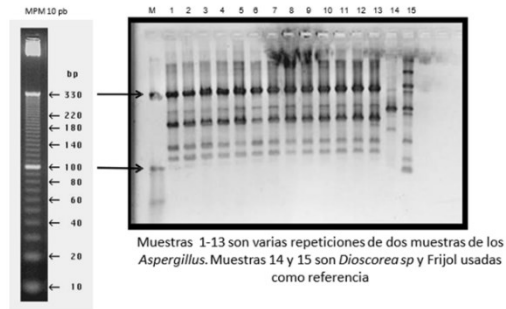
**PENDIENTE:
 POR ELABORACION PRIMERS
 específico para la variante Y
 BIOMARCADOR específico ?
 EJ**

Secuencia
5'ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG 3'
5'CCGATCCCTAGTCGGCATAG 3'
LC Red 640-5'TGGCGAACCAGGACTTTTACTTTG 3'

RESULTADO + Presencia DNA +



Gel de agarosa. Los **productos de la PCR o amplicones** están representados 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**.
 Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb.



Fotografía 5. PCR de hongo del genero *Aspergillus* .Muestra de El Salvador.



Reporte México.

REPORTE MEXICO. 2010

“Se utilizaron semillas de Nacascal (*Caesalpinia coriaria*) para aislar el hongo reportado como endógeno en las mismas. Se probaron dos tratamientos de desinfección para las semillas. Se sembró en tres medios de cultivos selectivos para hongos MEA (Medios Agar-Malta), CYA (Medio Levadura-Agar) y Medio Saboraund, dos de ellos específicos para *Aspergillus*. Posteriormente se realizó la siembra monospórica para la caracterización de cepas. Se proliferó el micelio para ser utilizado en la extracción de ADN, para lo cual se utilizaron tres métodos de extracción de ADN (Vogel, 1956; Sagai-Marroof, 1984 y Denning et al 1990). Posteriormente se aplicará la técnica PCR para el marcador molecular ITS (Internal Transcript Sequence).”

Aislamiento de ADN

El método más eficiente para extraer ADN del micelio del hongo fue el reportado por Sagai-Marroof, (984) con el que se obtuvo ADN de alto peso molecular (Figura 2).

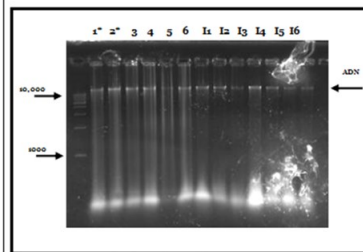
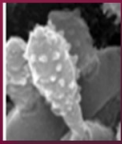


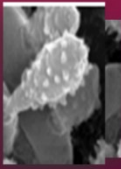
Fig.2. ADN genómico obtenido en trece muestras de *Aspergillus sp.*





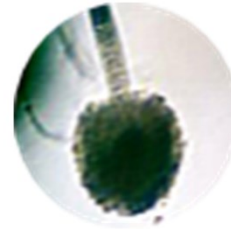
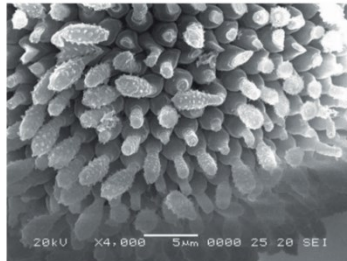
Reporte CENSALUD
2008

1a microfotografía elect



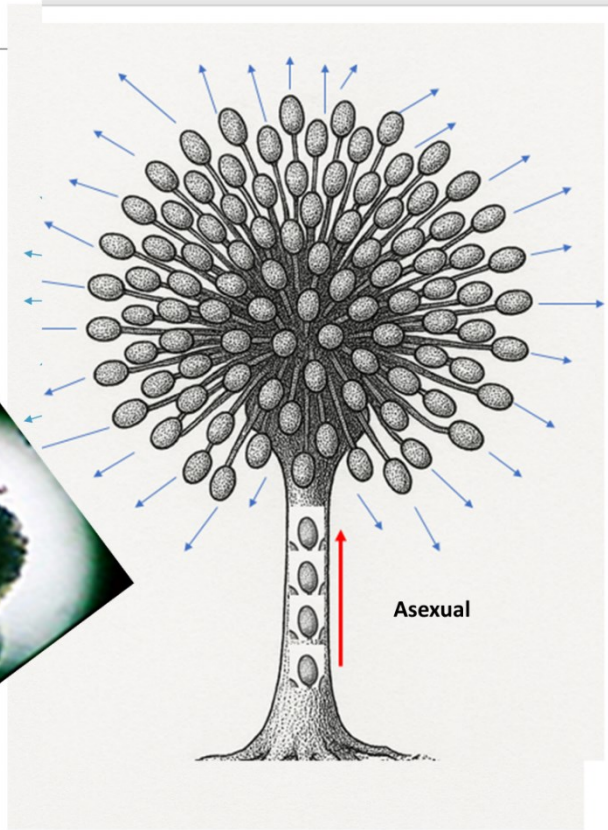
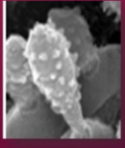
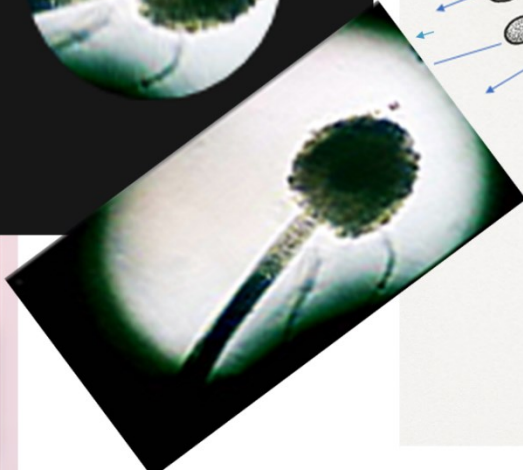
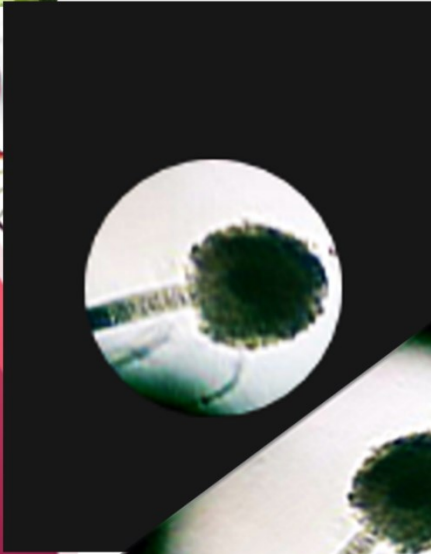
la siguiente: «el problema es viral». Esto revela que desconocen que los fenómenos alérgicos y respiratorios tienen otras causales.

Figura 1-4. Imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 X). Cortesía de la doctora Vianey de Abrego (Tomada en CENSALUD, febrero de 2008)



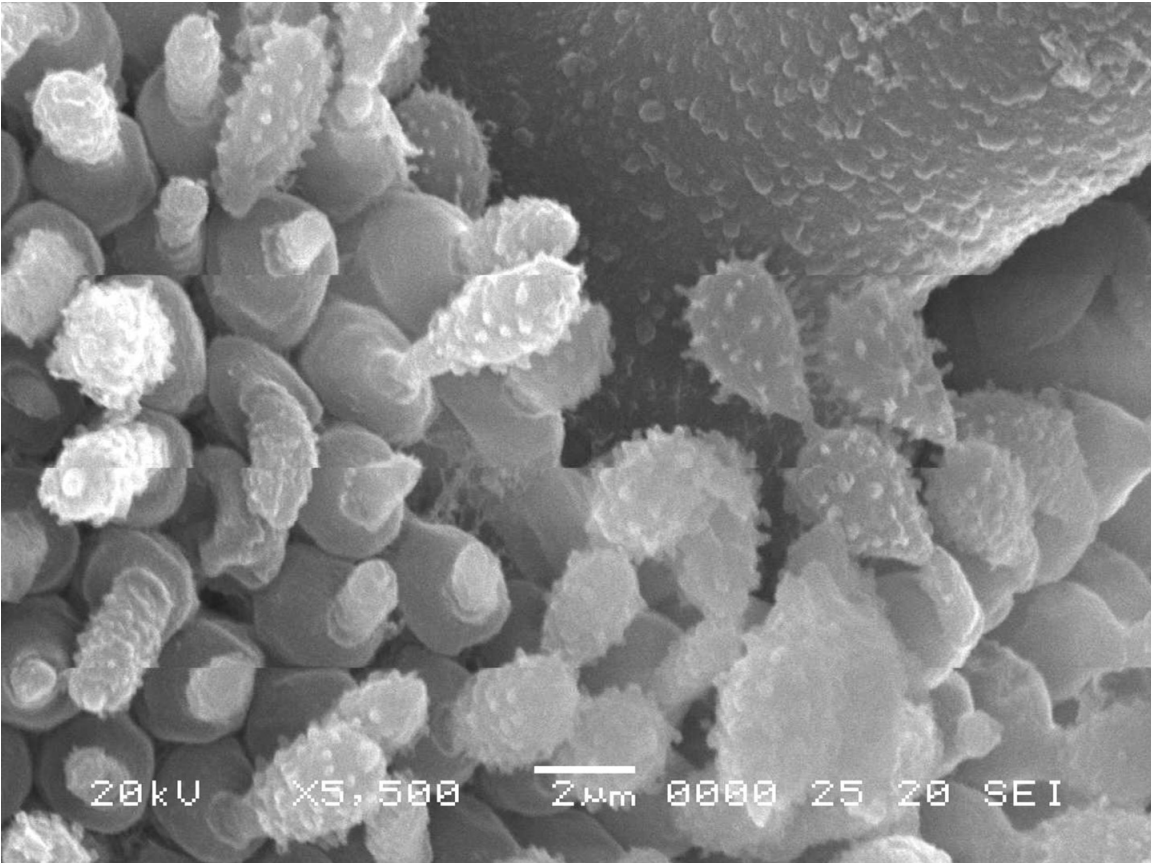
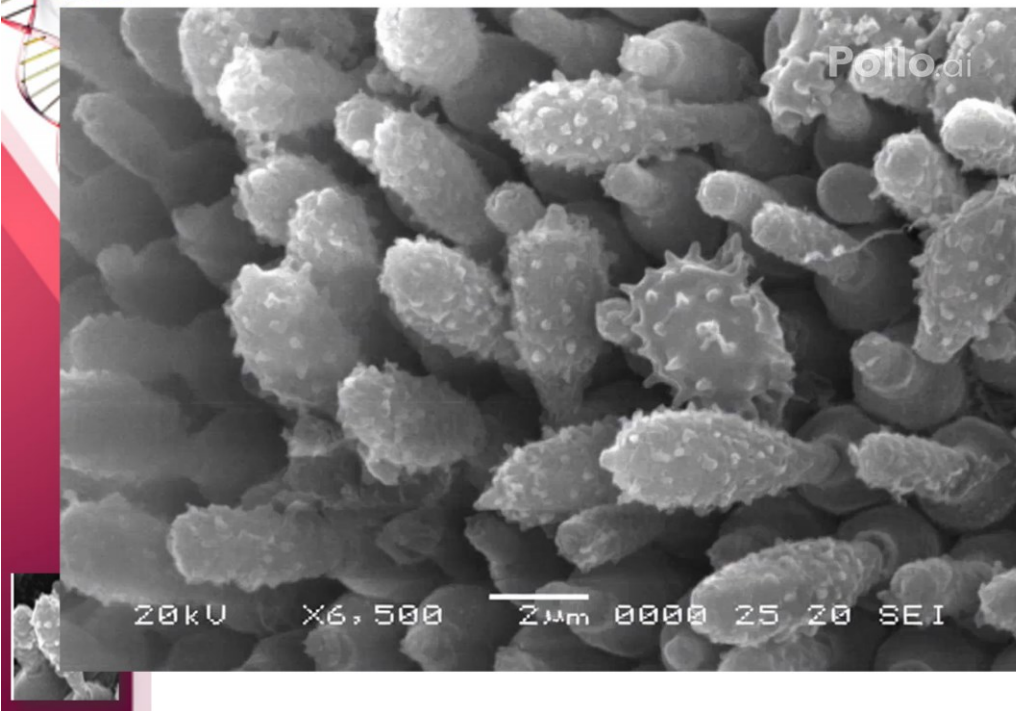
En la Figura 1-4 se observa la imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse, según reporte de CENSALUD, que es un «hongo filamentososo, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de filoides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadena». El conidioforo no tiene septos y es liso/rugoso, la vesícula es redonda de donde emergen múltiples de una a dos esporas en forma de mazo o cactus con espículas dispersas, en el cultivo dan un pigmento al reverso del tubo, las otras especies no. Fenotípicamente corresponde a otra especie del género *Aspergillus*.

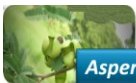
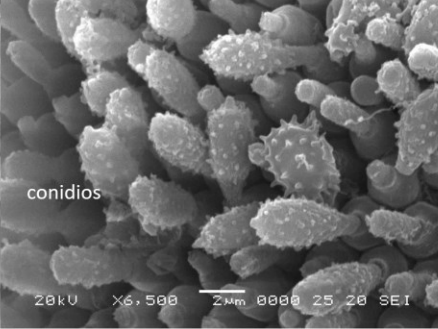
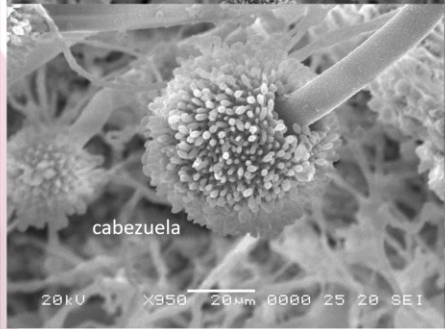
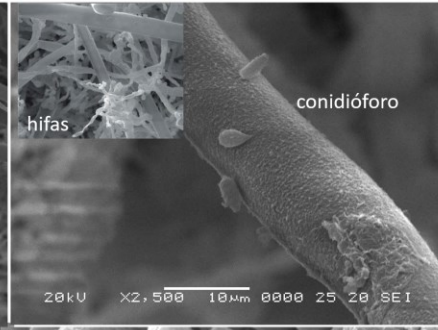
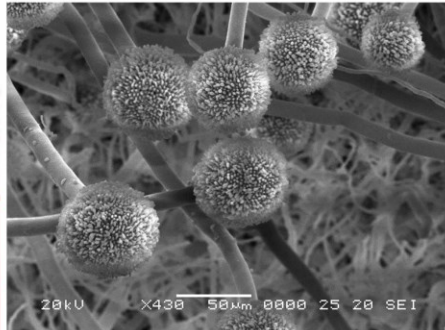
A partir de estudios genotípicos se identificó su pertenencia al género *Aspergillus*, ya que presenta la siguiente secuenciación de ADN.





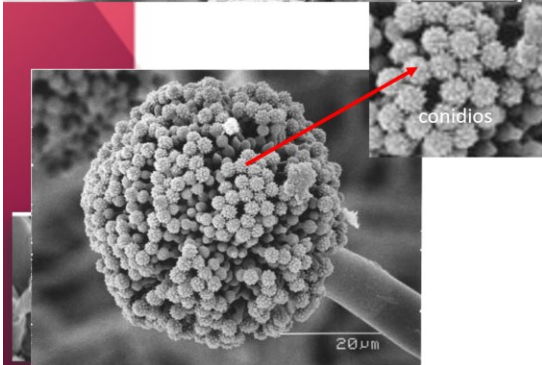
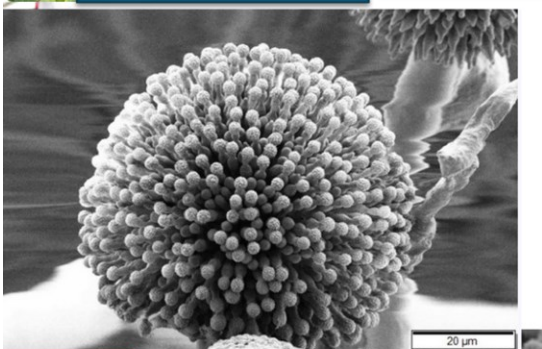
Aspergillus uessalvadorensis



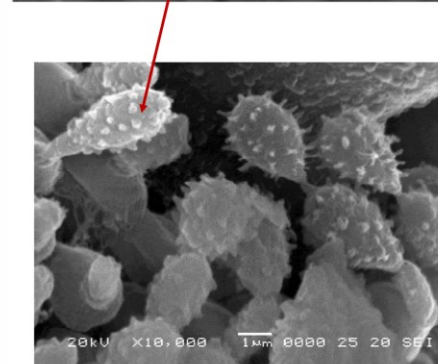
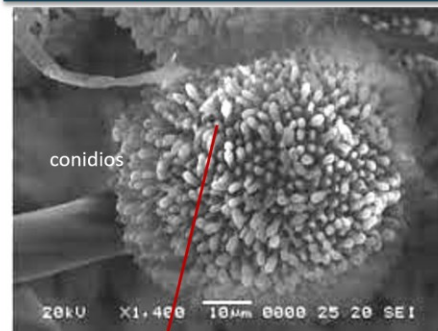


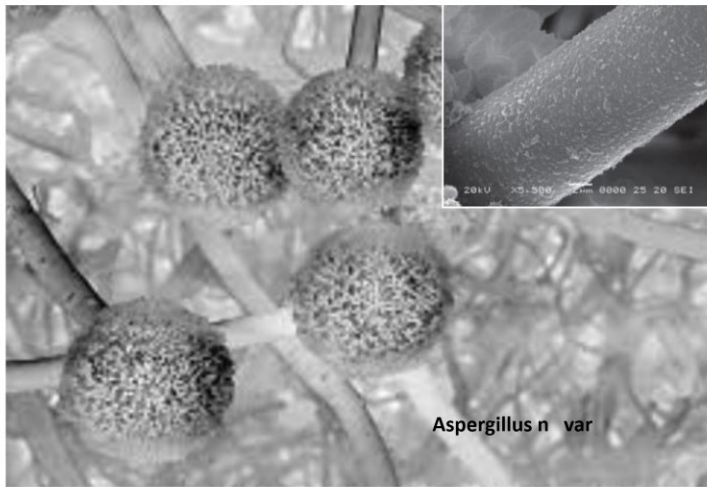
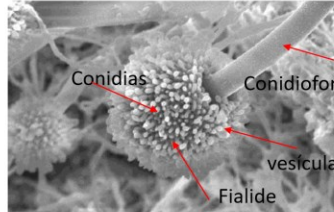
Aspergillus niger

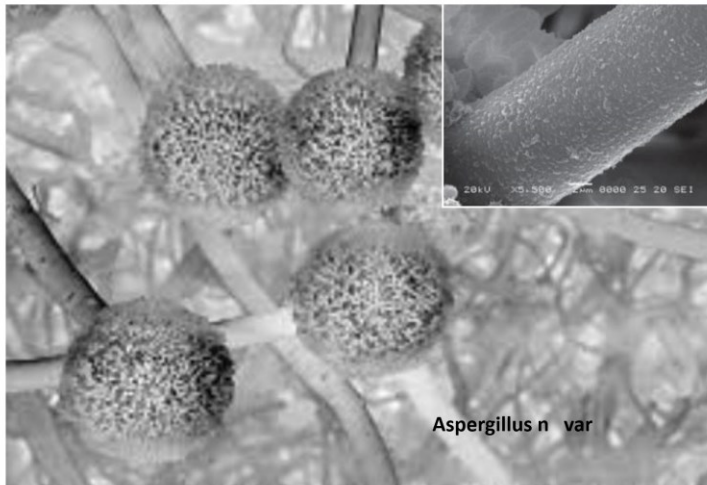
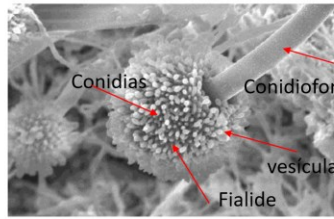
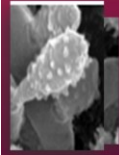
conidios



Aspergillus niger var salvadorensis





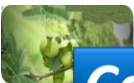


Aspergillus n var



En Resumen

Característica	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus uessalvadorensis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • placa reverso • Vesícula color • Conidioforo • septos • Forma 		



Caesalpinia coriaria: nacascal

Floración y frutos

- **Floración:** Ocorre durante la temporada seca, generalmente entre **los meses de agosto y septiembre**, aunque esto puede variar según el lugar y las condiciones climáticas específicas.
- **Producción de frutos y semillas:** La fruta del nacascal, que contiene las semillas, suele madurar después de la floración. En general, la producción de frutos se observa en los meses siguientes a la floración, a menudo coincidiendo con el inicio de la temporada de lluvias o en los meses intermedios.





Países con nacascol :
Caesalpinia coriaria

1. México
2. Guatemala
3. Honduras
4. El Salvador
5. Nicaragua
6. Costa Rica
7. Panamá
8. Colombia (Caribe tropicales)
9. Venezuela
10. Brasil (amazónica)
11. Ecuador

Diferencias :

1. **No producen colorante,**
2. **Variedad FLOR DIFERENTE**
3. **NO HAY EXPLOTACION.**
4. **VASIJAS PARA EXPORTACION.**



Publicación.
2008

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud

Antonio VásquezHidalgo

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus sp*, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus sp* en El Salvador.

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2168>

Introducción

En nuestro medioambiente la salud es un valor agregado al capital humano. No solo es necesario identificar los riesgos ambientales, sino también contribuir a resolver la problemática encontrada. Es tarea de todos colaborar en la minimización del daño al medioambiente.

En esta ocasión se investiga sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio: el árbol nacascal o nacascolo. Esta semilla tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del género *Aspergillus sp*, para que, junto con las propiedades del barro, se puedan teñir de color negro las vasijas lo que les otorga una particular belleza, quizás incluso un aspecto colonial. Asimismo, se puede curtir la piel del ganado vacuno.

Sin embargo, se ha encontrado que en los cinco lotes de semillas se alberga un hongo que infiere daño a la salud luego de exposiciones prolongadas y si la persona tiene las defensas inmunológicas bajas, tal como se demuestra en muchos estudios del género *Aspergillus*, y ya sea por negligencia o desconocimiento, se ignora el «peligro» que encierra la aspiración de las esporas.

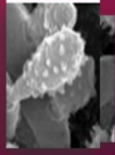
507

Revista La Universidad - N° 3 y 4, julio - diciembre de 2022



N° 3 y 4, julio - diciembre 2022

La Universidad segunda época, N° 3 y 4, julio - diciembre 2022





En muchas ocasiones las afecciones pulmonares se diagnostican como Bronquitis Aguda o Asma Bronquial, cuando en realidad no se debe descartar una Micosis Pulmonar, y el tratamiento debería conformarse por antimicóticos y no antibióticos. Así también se reportan fenómenos alérgicos

La investigación estuvo compuesta por tres fases:

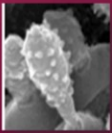
- a) **Primera fase** Recolección de las semillas de nacascol.
- b) **Segunda fase** Extracción y preparación del tanino de la semilla y el hongo.
- c) **Tercera fase:** Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inoculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar la muestra por microscopia simple y microscopia electrónica de barrido.



El descubrimiento

El árbol conocido como nacascol tiene como nombre científico *Caesalpinia coriaria*. Pertenece a la familia *Caesalpiniciaceae*, del género *Caesalpinia*. Es una planta leguminosa con 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, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro.

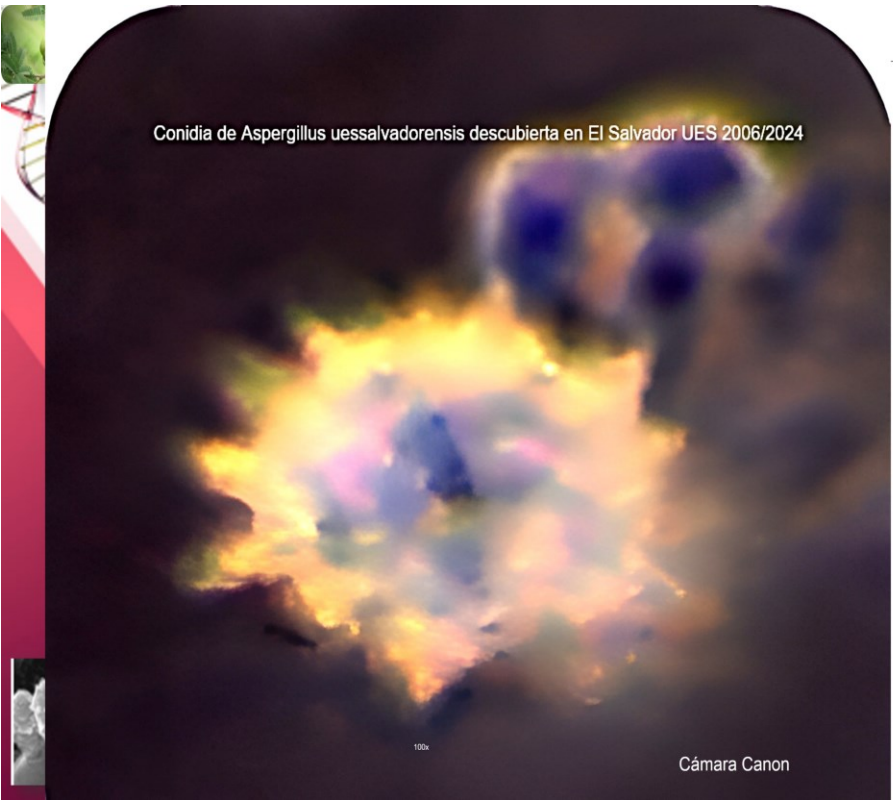
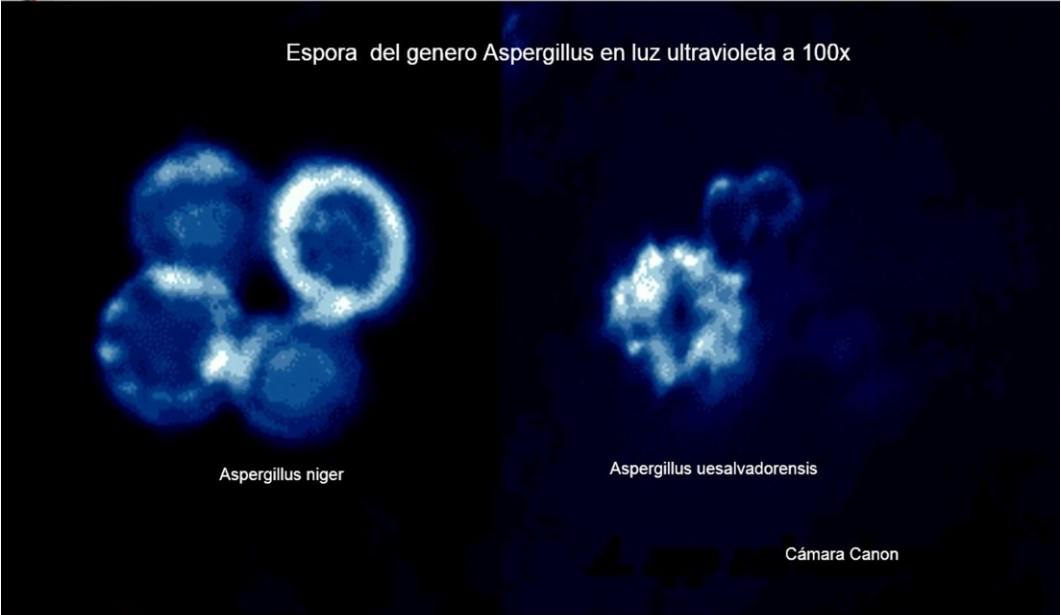
En estas semillas crece un hongo parecido al *Aspergillus niger*, considerado como patógeno oportunista para el ser humano; sin embargo, su morfología es diferente, sus esporas varían con el anterior. En este caso están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, unas pigmentadas y otras claras, de diámetro pequeño, y de color negro a café según pigmentación, no son planas ni rugosas como la de especie *niger*. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo, antes de las 24 horas al agregar al medio agar sabouroud más sustancias oxidantes. Según el análisis fitoquímico preliminar del árbol *Caesalpinia*



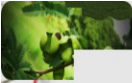
Cultivo de especie descubierta del género *Aspergillus* en El Salvador. UES 2006/2024



Cámara Canon



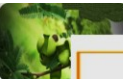
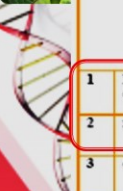




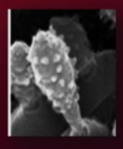
RESUMEN MACRO Y MICROSCOPICO DE HONGOS DEL GENERO ASPERGILLUS.2009 (micras)

NOMENCLATURA ESPECIES DE ASPERGILLUS	COLOR CONIDIA	COLOR REVERSO	DIAMETRO COLONIA (mm)	CONIDIO PORO	LONGITUD CONIDIA Micras	ANCHO CONIDIA micras	FORMA CONIDIA	ORNAMENTACION CONIDIA	CONIDIA EN SITU
1 Nueva especie	Aspecto plano algodonoso, color negro a gris	negro	9-10	Rugoso 300, hifas sin septos	3-5	1.96-2	Mazo, botella o cactus.	prominente	radial
2 niger	Aspecto lanoso, granular color verde, negra o color blanco amarillo	Amarillo-incoloro	25-30	400-3000 liso largo 1,5 a 3 mm hifas con septos	4-5	3-5	Elipsoide, esferico Pared gruesa	rugoso	radial
3 clavatus	Aspecto fieltro ,verde azulado	Blanco a marrón.	21-24.5	Largo liso, hifas con septos	3-4.5	2.5-3.5	Elipsoide	suave	En columna
4 giganteus	Blanco a crema, olivo, verde	café	35-42	hifas con septos	3.5-4.5	2.4-3	elipsoide	suave	En columna
5 nidulans	Aspecto aterciopelado, Blanco a crema, amarillo, verde	Purpura oscura.	25-30	Muy corto, liso. hifas con septos	3-3.5	3-4	Redonda u oval	rugosa	radial
6 flavus	Aspecto polvoriento aterciopelado, color verde amarillo	Marrón rojizo o incoloro	42-49	800 variable, rugoso. hifas con septos	3.5-4.5	3.5-4.5	Globosa, esferico	Rugoso o granuloso	radiada
7 terreus	Aspecto aterciopelado, Blanco a crema, amarillo, verde	Blanco marrón	24.5-35	250 corto liso. hifas con septos	1.8-2.4	1.5-2.5	globosa	suave	En columnas o radial
8 versicolor	Aspecto aterciopelado Blanco a crema, amarillo, café, negro	Amarillo, café	10-15	600 largo liso. hifas con septos	21-28	3-3.5	Redonda u oval	rugoso	radial
9 fumigatus	Aspecto veloso, polvoso plano	Amarillo, café	40-60	300 corto, liso. hifas con septos	2.5-3	2-3.5	redonda	rugoso	radial
10 orizae	Blanco a crema, algodonoso amarillo, negro, gris a beige	Blanco crema amarillo.	60	35-42 rugoso hifas con septos	7-10	4-8	Ovoide, subglobosa	suave	Variable, radial



		FORMA FIALIDE	VESICULA APICAL	LARGO VESICULA mm	ANCH O VESICULA mm	FORMA VESICULA	LONGITUD STIPE	ANCHO STIPE	ORNAMEN TACION STIPE	RAMA PATRON
1	Nueva especie	Una serie	presente	52-66	50-48	globosa	100-300	2-2	irregular	no
2	niger	biseriada	Presente	30-75	75-80	Piriforme	1500-3000	15-20	rugoso	No
3	clavatus	uniseriado	Presente	200-250	40-60	Clavado	1500-3000	20-30	suave	no
4	giganteus	biseriada	Presente	100-600	30-180		10000-20000		liso	no
5	nidulans	biseriada	presente	8-10	8-10	globosa	70-150	2.5-5	liso	no
6	flavus	Una o dos series	presente		20-45	globosa	400-800	25-45	liso	no
7	terreus	biseriada	presente		12-20		100-250	4.5-6	liso	no
8	versicolor	biseriada	presente		12-16	Globosa, subglobosa	500-700	5-10	liso	no
9	fumigatus	uniseriado	Presente		18-30	rugosa	300-500	5-8	rugosa	no
10	orizae	Uniseriada o biseriada	presente		50-75	globosa	4000-5000	6-12	suave	no




II parte

- **SECUENCIACION DNA**

A01056:583:HNTKDSXC:1:1101:4218:1000:N:0:1 NACGGACGTTAAGCATGATCAAAATAATGCATGCAGGAGACTCTGTGAAAGTGATTGTAT 60
 XM_025680759.1:833-924 ----- 0



Alto Rendimiento / Industrial

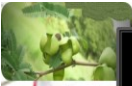
Illumina NextSeq, NovaSeq



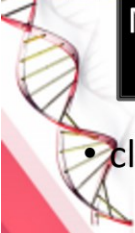
Centros de genómica, hospitales de alto volumen, proyectos de genoma completo a gran escala.



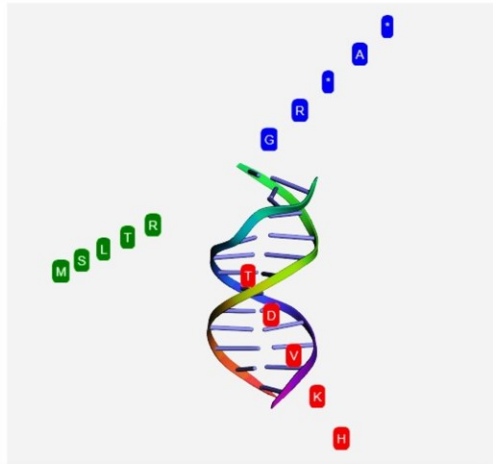
\$250,000 – Más de \$1,000,000 USD



Modelo secuencia DNA *Aspergillus salvadorensis*



• click



```

>gn|SRA|SRR34997200.1.1 A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:4218:1000:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG Biological (Biological)
NACGGACGTT AAGCATGATC AAATAATGCA TGCAGGAGAC TCTGTGAAAG TGCATTGTAT
ATGTAGTTTCG AAATATTTC GGGTTACCTC TATCTCTAA CTAGCTGCTT GACAGATCAC
CGGAAACAC TACCATACA CTTTGTGCTT T

```



Secuencia DNA

DNA-Seq (SRR34997200)

Metadata Analysis Reads Data access FASTA/FASTQ download

Filter

Search by sub-sequence, spot ID, etc. Find

What can the filter be applied to?

Reads: 66,962,595 reads

Page 1 / 6,696,259

quality scores advanced options

1 SRR34997200.1
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

2 SRR34997200.2
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

3 SRR34997200.3
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

4 SRR34997200.4
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

5 SRR34997200.5
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

6 SRR34997200.6
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

7 SRR34997200.7
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

8 SRR34997200.8
name: A01056:583:HNTKTD5XC:1:110

Reads (separated)

```

>gn|SRA|SRR34997200.1.1 A01056:583:HNTKTD5XC:1:1101:4218:1000:N:0:TCTCTACT+GAACCGCG Biological (Biological)
NACGGACGTT AAGCATGATC AAATAATGCA TGCAGGAGAC TCTGTGAAAG TGCATTGTAT
ATGTAGTTTCG AAATATTTC GGGTTACCTC TATCTCTAA CTAGCTGCTT GACAGATCAC
CGGAAACAC TACCATACA CTTTGTGCTT T

```



II parte

• CARACTERIZACION GENOTIPICA.

II parte

1. **PCR Y PARTE SECUENCIACION** EN CENSALUD/INSTITUTO BIOLOGIA MOLECULAR DE MEXICO.

2. **MACROGEN INC. KOREA DEL SUR. 2024.** (DATOS CRUDOS/RAW DATA)

1.Registrado la especie nueva *Aspergillus uessalvadorensis* con los números: Registrado [GenBank/NCBI \(BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219 y en MycoBank \(MB#860453, MB#860456\)\)](#). Universidad de El Salvador a nivel mundial. [Fungal Name](#). FN: 573057

2. **BLAST LINK** [BLAST secuencia](#) [DNA](#) *Aspergillus uessalvadorensis*

3. **Alineación** : [A. uessalvadorensis y A. neoniger](#) programa CLUSTAL [Clustal Omega](#) < EMBL-EBI



Alignment with colours

Hide

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
sequessalvadoriensis  CGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTATGCGGATGCGACGCATC 60
neoniger              -----GTTTC 5
                        * : **

sequessalvadoriensis  GGCTGGACTGGGTGGCTGATATGTCGGCCTGGTA-----TGGGATGGGCAGG 108
neoniger              AGACGG-----AGTAGCGTCTGTAAAGATAAATAGGTGCTTGGGGTCAGA 53
                        . * . **          * : : * ** ** * : *          * . ** ** .

sequessalvadoriensis  TACAGAGTAACTATTCGAGGTACCGACGCATCGGCTGGACTGGGTGGCTGATA---- 163
neoniger              TTCCTA----CGTCCATCCAGAACCGCCT-TTTGGCGTACTGGATGATTTTGTCTCGAT 107
                        * : * : * : . * . * : * * * : * ** * * * * * . * : .

sequessalvadoriensis  -----TGTCCGCTGGT----ATGCGGATGGGCAGGTACAGAGCGAGTAACTATTCGGT 213
neoniger              TTCTGAGTTCCTCCCTGTTGATATAGCGAATGTTATG-----C----ATCTCAT---- 151
                        ** * * * * : : * * * . * * : : *          * * : * : *

sequessalvadoriensis  GCGGATCGCCGAGTATCGTGGCGATGAATCTGTGG 250
neoniger              ----- 151
```



Caracterización fenotípica y genotípica de *Aspergillus uessalvadorensis* encontrada en las semillas de *Caesalpinia coriaria* (nacascal).

Especie descubierta del genero *Aspergillus* en El Salvador. UES
2006/2024 Cámara canon

UTILIDADES:

1. Se aislaron enzimas, proteínas y metabolitos secundarios en Korea del Sur. 2025
2. Se puede hacer vacunas
3. Colorante para alimentos
4. Anticancerígenos propiedades (no es cancerígeno)
5. Servir como nutrientes ricos en fosfatos
6. etc

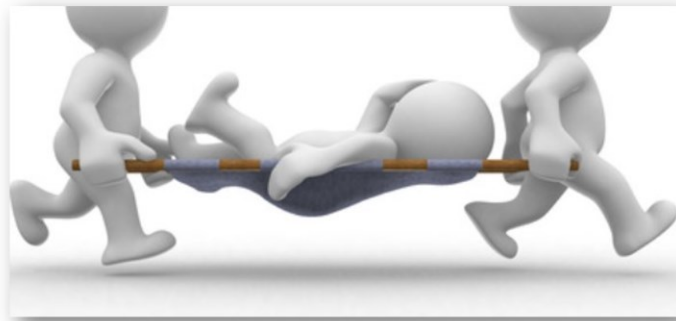
NOMENCLATURA TAXONOMICA MUNDIAL

***Aspergillus salvadorensis*, A. Vásquez 2016**

Concluding that the taxonomy of the description will be: **Domain:** Eukaryota, **Kingdom:** Fungi, **Division:** Ascomycota, **Class:** Eurotiomycetes, **Order:** Eurotiales, **Family:** Trichocomaceae, **Genus:** *Aspergillus*, **Species:** *Aspergillus uessalvadorensis*. What will be called in the future binomial scientific name: *Aspergillus uessalvadorensis*.

Vásquez Hidalgo, A. (2024). *Aspergillus salvadorensis*. Registrado en [Mycobank](#) (MB#860453, MB#860456) y [GenBank/NCBI](#) (BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219). Fungal Name





- Gracias



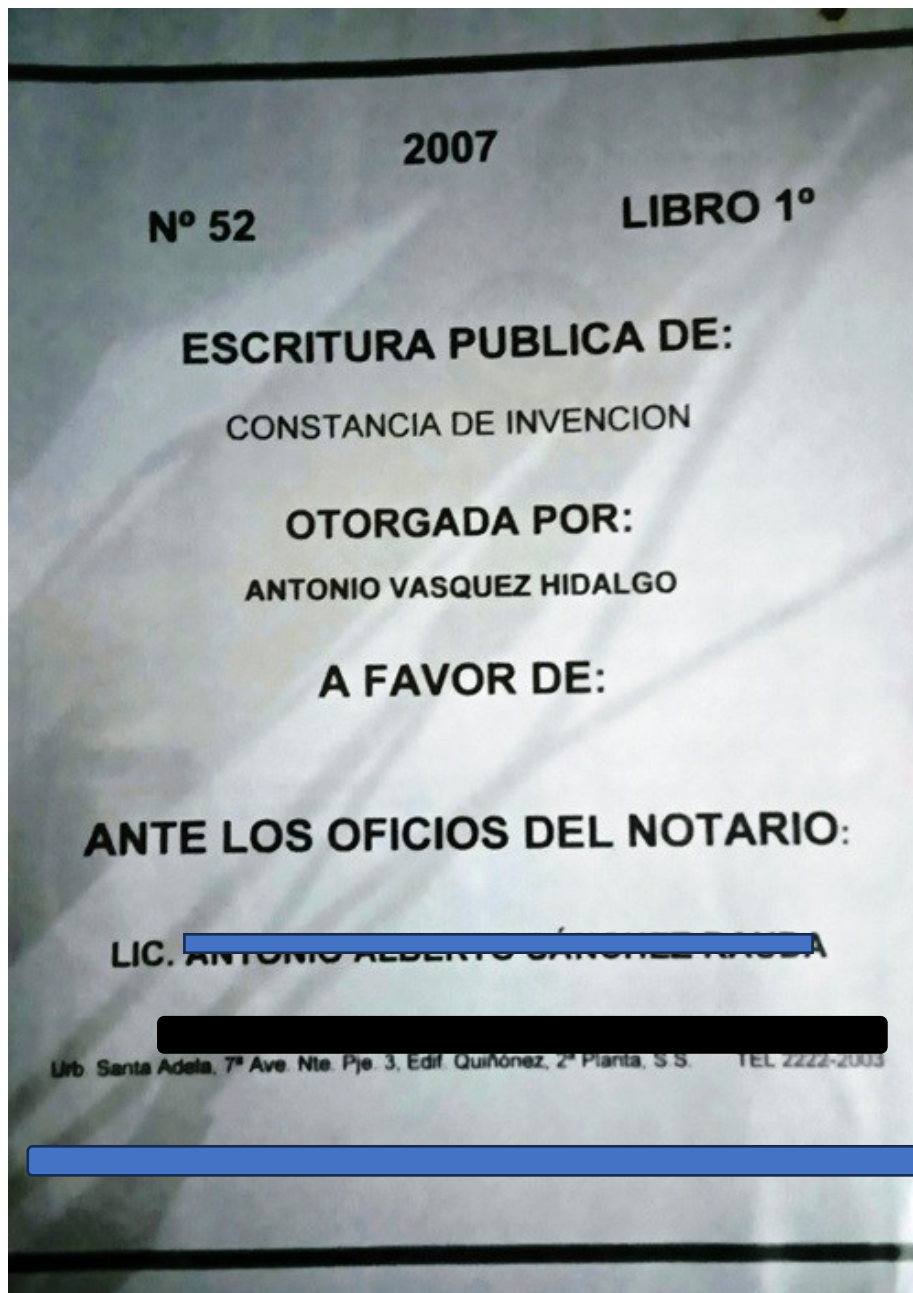
Capítulo VII

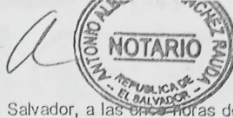
FE PUBLICACIONES DE ARTICULO ASPERGILLUS PREVIO 2010.

ACTO DE FE QUE FUE PUBLICADO ANTES DEL 2011 Y 2014

PARA EFECTOS LEGALES INTERNACIONALES

ACTA NOTARIAL DE REGISTRAR NOMBRE *Aspergillus salvadoriensis*. Año 2007





1 NUMERO CINCUENTA Y DOS.- En la ciudad de San Salvador, a las ~~once~~ horas del día ocho de julio del dos mil
2 siete.- ante mi, ANTONIO SANCHEZ RAUDA, Notario de este domicilio, comparece el señor ANTONIO VASQUEZ
3 HIDALGO, ~~ciudadano salvadoreño de edad~~, Médico de este domicilio, a quien conozco y lo identifico con su Documento
4 Único de Identidad Numero cero dos uno nueve cinco cero siete ocho-uno, y ME DICE: que comparece ante el
5 suscrito notario a informar para que quede constancia del descubrimiento sobre una especie de hongo nuevo del
6 genero Aspergillus del año dos mil siete, que se llamará en el futuro Aspergillus salvadoriensis A. Vásquez de la que
7 junto con la semilla de Nacascal (Caeselpinia coriaria) se extrae un colorante negro, además informa que presento la
8 invención con base al descubrimiento del hongo al Centro Nacional de Registros al servicio de Inscripción de Patentes
9 de invención y modelos de utilidad el día tres de julio del año dos mil siete, con numero de expediente dos cero cero
10 siete cero cero dos siete siete cero, con el título PROCESO ACELERADO DE SINTESIS DE LABORATORIO DEL
11 HONGO ASPERGILLUS SPPP EN LAS SEMILLAS DE CAESELPIA CORIARIA (NACASCOL), PARA LA
12 OBTENCION DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE LA BIOCATALISIS DE UNA NUEVE ESPECIE DE ESPORA
13 QUE SE DENOMINARA ASPERGILLUS SALVADORIENSIS A. VASQUEZ ENCONTRADA EN EL SALVADOR. Me
14 informa que ha inventado una nueva forma de cultivo del hongo para extraer colorante y preparar el colorante con
15 nacascal. Modo operativo de preparación del colorante: En condiciones de laboratorio con las medidas de
16 bioseguridad adecuadas, se procede a extraer de las semillas la cantidad que se necesita , para en este caso se
17 utilizan diez gramos de la semilla previo a limpieza, se maceran y se colocan en un beaker de quinientos mililitros agua
18 de chorro o agua destilada doscientos cincuenta ml, se le agrega la semilla , luego se agita con espátula, luego se
19 agrega dos mil microgramos de sulfato ferroso se agrega a la solución y se agita por tres minutos, para que produzca
20 mayor solubilidad y catálisis en el cual se produce un cambio de color de claro a negro. Se considera opcional hervir y
21 llevarlo a temperaturas de cien grados centigrados, lo que hace aumentar el proceso químico. Se incuba a
22 temperatura ambiente. Para el preparado del caldo en medio de cultivo, primero se prepara el medio con un preparado
23 de Agar Saboraud compuesto por peptona treinta gramos, glucosa veinte gramos, agua destilada quinientos mililitros,
24 al medio se agrega dos mil microgramos de sulfato ferroso, se calienta y luego vierte a los tubos y placas de petri para


IMPROMA, S.A. DE C.V.

La Universidad	
Órgano científico-sociocultural de la Universidad de El Salvador	
Nueva Época	Número 3-4, septiembre-diciembre, 2008
<i>Carta del director</i>	2
Caracterización biológica del hongo <i>Aspergillus sp</i> y su impacto en la salud	5
Antonio Vázquez Hidalgo	5
Acontecimientos del 15 de septiembre de 1821	25
Víctor René Marroquín	25
Los problemas y desafíos de la universidad pública en El Salvador	39
Roberto Cañas	39
Análisis y actualidad del fascismo	47
Ricardo Ribera	47
El símbolo en la poética de Roque Dalton	77
Carlos Roberto Paz Manzano	77
Estudiante universitario y lucha de clases	97
Juan Ruano	97
La revista más antigua de El Salvador Fundada el 5 de mayo de 1875 Director fundador: Doctor Esteban Castro	




Director: **Dr. David Hernández**

PREMIO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE . 2008 . INVESTIGACION SOBRE HONGO ASPERGILLUS








Personas
que dejan
huella
con su entrega para preservar
nuestro medio ambiente



DR. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

Acompáñenos a reconocerlos.
El día 28 de agosto a las 7:00 p.m. en los Salones Suramérica,
El Salvador y Centroamérica del Hotel Radisson.





El color negro que tienen los artesanatos de barro de Guasmas, Morazán, se debe a una mezcla que es preparada con la semilla del árbol de nacascalco, color café. En esta especie de semilla es donde se genera el hongo Aspergillus una salvadoreña.

Puede ser clave para evitar infecciones

Hallan una nueva especie de hongo en el nacascal

» Antonio Vázquez es un investigador de la UES y ganó el premio ambiental

Ilustración: J. J. J.

Las semillas del árbol de nacascal, utilizadas por generaciones para dar el color negro a las vasijas de barro y otros artículos de cuero vacuno, entraña una nueva especie de hongo del género Aspergillus SP. hasta hace poco desconocido. El doctor Antonio Vázquez, su descubridor, lo bautizó como Aspergillus UES salvadoreño. Esta especie se suma a las otras conocidas como Niger, Nidulans, Pumigatus, Uitra y Glaucous.

El nacascal (Caesalpinia coriaria) es nativo del país. Abunda en la zona norte, en el suelo y en plantaciones, y es usado en la industria artesanal.

"Por accidente lo descubrí. Yo estaba investigando el nacascal en busca de producir un colorante en condiciones de laboratorio y obtuve el color negro en esta condición. Cuando se hizo el raspado de la semilla se aisló un hongo aspergillus y para mi sorpresa, fue una nueva especie", comentó Vázquez. Por ese trabajo, el doctor obtuvo el 28 de agosto el Premio Nacional de Medio Ambiente en la categoría de



PERFIL
NOMBRE: Antonio Vázquez.
PROFESIÓN: Médico con especialidad en Salud Pública, con postgrados en Microbiología e Investigación. Es catedrático en la Universidad de El Salvador (UES). Correo electrónico: doctorvazquez@yahoo.com

proyecto de investigación ambiental.

La diferencia entre el Aspergillus salvadoreño y las otras especies radica en que cuando se aísla da un pigmento negro. Además, a través del microscopio electrónico de barrido que tiene Censalud de la Universidad de El Salvador, se observaron diferencias en la forma.

Esta variante de aspergillus no tiene septos (especie de tabiques) en el conidoforo o hila (pallo que sostiene la cabeza del hongo). Otro distintivo es que las esporas son en forma de mano ó cac-

tus con espigas, detalló Vázquez.

Para producir el colorante de forma artesanal suelen cortar la semilla, triturarla y luego le agregan barro para formar una mezcla con la que colorean las vasijas o cuero. Los artículos impregnados son quemados en hornos hasta que toman el color negro.

Aunque el hongo muere a alta temperatura, el catedrático explicó que si los artesanos ponen los productos terminados en las áreas donde estuvieron las semillas sin tratar el hongo se vuelve a regenerar de forma rápida.

"Lo ideal es tener un área estéril porque al humano (el hongo) le puede ocasionar una aspergilosis pulmonar o aspergilloma pulmonar, que es un tipo de cáncer por la acumulación de las esporas que circulan en el aire", dijo el especialista.

Vázquez y otros colegas que visitaron algunos talleres artesanales de la zona norte, como los de Guasmas, Morazán, sugirieron que las personas que elaboran estos productos usen guantes y mascarillas. Como parte del estudio revisó placas de tiorax tomadas a personas que estuvieron en contacto con este hongo y es evidente su presencia en los pulmones.

"Hay casos sospechosos por infecciones micóticas en los que el médico debe pensar la posibilidad de que haya problemas de hongos y bacterias, porque en esos casos el tratamiento ideal es un antimicótico y no un antibiótico", puntualizó.

EN CORTO

RESOLUCIÓN ALTERNATIVA DE CONTINUA POR APUESTA POR EL NACIONAL DE MEDIACIÓN

El Procurador General de la Ley, Gregorio Sánchez Trejo, pidió a la Asamblea Legislativa que declare el 7 de septiembre como Día Nacional de Mediación. La iniciativa sería por la resolución alternativa de conflictos, oficina de mediación de esa entidad a través del diálogo y entendimiento. En un año se han resuelto más de 14 mil casos entre vecinos, familiares o amigos, permitiendo descongestionar los juzgados civil e incluso los penales. La mediación tiene que ver con problemas de vecinos.



CONTROL VEHICULAR MULTAS POR APARCAR EN LOS EJES PREFERENCIALES

La división de control vehicular de la Policía de Tránsito impuso los controles para sancionar a los conductores que se pararon en los ejes preferenciales. Hoy se instalarán en la carretera Troncal del Norte, donde los conductores acostumbran a estacionar los vehículos que reparan en esa vía principal. Los ejes preferenciales son los que los propietarios de talleres para limpiar la zona.



DEPÓSITO DEPENDE DE HACIENDA TRANSPORTISTAS ES SUBSIDIO EL FIN DE

La mayoría de empresarios del colectivo espera que, a partir de julio, el Ministerio de Hacienda haga del nuevo subsidio que correge de julio más los últimos cuatro meses. La erogación mensual se estima en \$2.3 millones para más de miles de transportistas autorizados.

PREMIO INTERNACIONAL. INVESTIGACION NACASCOL Y ASPERGILLUS. LIMA PERU. 2008

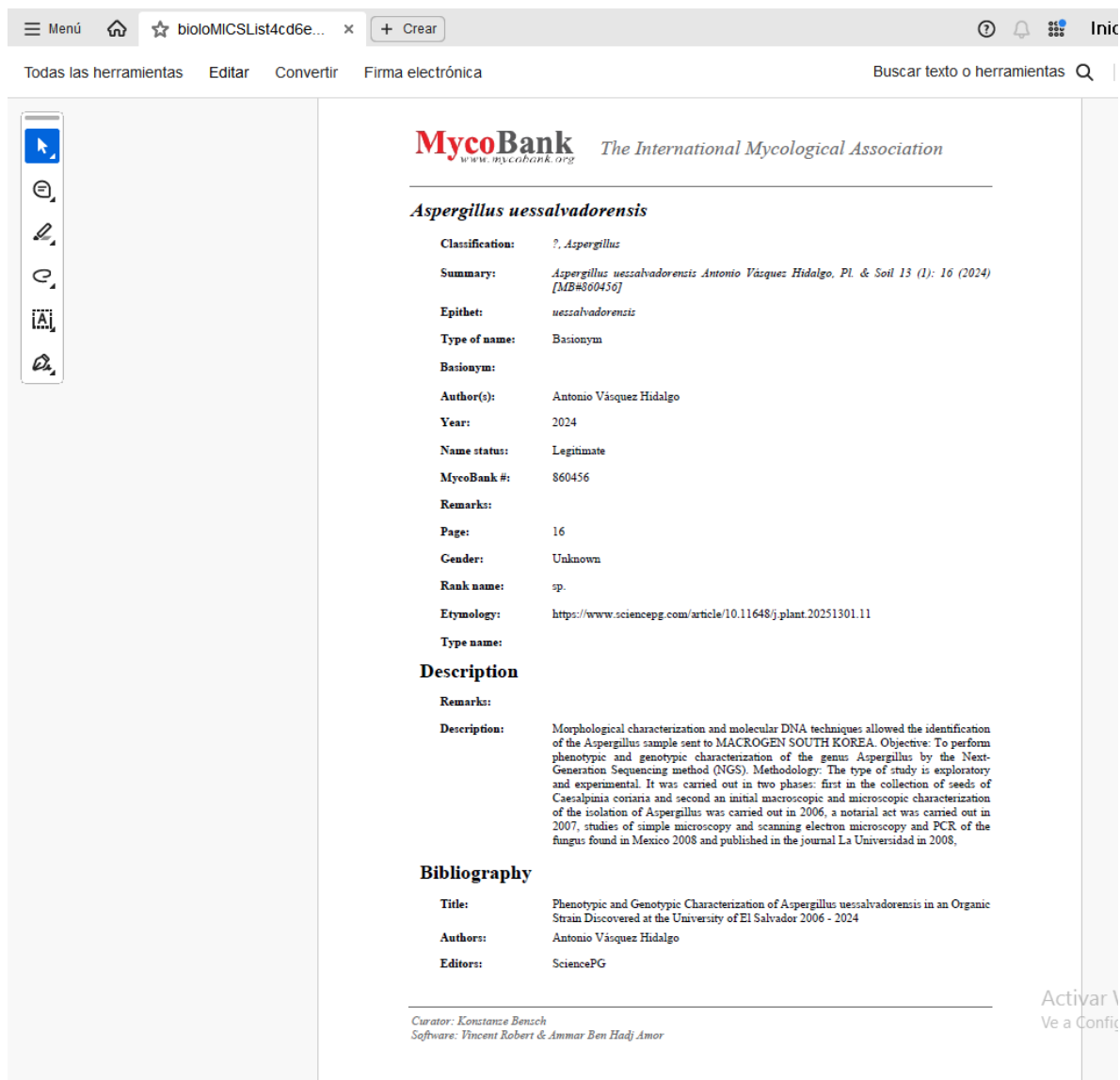




PREMIO INTERNACIONAL . LIMA PERU. 2008.

Capítulo VIII. VALIDACION Y DEPOSITOS

Registrado la especie nueva *Aspergillus uessalvadorensis* con los números: Registrado en MycoBank (MB#860453, MB#860456) y GenBank/NCBI (BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219). Universidad de El Salvador a nivel mundial. *Fungal Name FN 573057: Aspergillus salvadorensis Antonio Vásquez Hidalgo (2025-10-17)*



The screenshot shows the MycoBank website interface. At the top, there is a navigation bar with a menu icon, a home icon, a star icon, and a browser tab titled 'bioloMICSLIST4cd6e...'. Below the navigation bar, there are options for 'Todas las herramientas', 'Editar', 'Convertir', and 'Firma electrónica', along with a search bar labeled 'Buscar texto o herramientas'. The main content area features the MycoBank logo and the text 'The International Mycological Association'. The entry for *Aspergillus uessalvadorensis* is displayed, including its classification, summary, epithet, type of name, basionym, author(s), year, name status, MycoBank #, remarks, page, gender, rank name, etymology, and type name. A description section follows, detailing the morphological and molecular DNA techniques used for identification. A bibliography section is also present, listing the title, authors, and editors of the publication. The page is partially obscured by a vertical toolbar on the left and a 'Activar' button on the right.

MycoBank www.mycobank.org The International Mycological Association

Aspergillus uessalvadorensis

Classification: ? *Aspergillus*

Summary: *Aspergillus uessalvadorensis* Antonio Vásquez Hidalgo, Pl. & Soil 13 (1): 16 (2024) [MB#860456]

Epithet: *uessalvadorensis*

Type of name: Basionym

Basionym:

Author(s): Antonio Vásquez Hidalgo

Year: 2024

Name status: Legitimate

MycoBank #: 860456

Remarks:

Page: 16

Gender: Unknown

Rank name: sp.

Etymology: <https://www.sciencepg.com/article/10.11648/j.plant.20251301.11>

Type name:

Description

Remarks:

Description: Morphological characterization and molecular DNA techniques allowed the identification of the *Aspergillus* sample sent to MACROGEN SOUTH KOREA. Objective: To perform phenotypic and genotypic characterization of the genus *Aspergillus* by the Next-Generation Sequencing method (NGS). Methodology: The type of study is exploratory and experimental. It was carried out in two phases: first in the collection of seeds of *Caesalpinia coriaria* and second an initial macroscopic and microscopic characterization of the isolation of *Aspergillus* was carried out in 2006, a notarial act was carried out in 2007, studies of simple microscopy and scanning electron microscopy and PCR of the fungus found in Mexico 2008 and published in the journal *La Universidad* in 2008,

Bibliography

Title: Phenotypic and Genotypic Characterization of *Aspergillus uessalvadorensis* in an Organic Strain Discovered at the University of El Salvador 2006 - 2024

Authors: Antonio Vásquez Hidalgo

Editors: SciencePG

Curator: Konstanze Bensch
Software: Vincent Robert & Ammar Ben Hadj Amor

i Notice

Because of a lapse in government funding, the information on this website may not be up to date, transactions submitted via the website may not be processed, and the agency may not be able to respond to inquiries until appropriations are enacted. The NIH Clinical Center (the research hospital of NIH) is open. For more details about its operating status, please visit cc.nih.gov. Updates regarding government operating status and resumption of normal operations can be found at opm.gov.

BioProject [Create alert](#) [Advanced](#) [Help](#)

Project Types
Primary submission (2)

Project Data
SRA (2)

Scope
Multi-species (2)

Attributes: Data Types/Material
Genome (2)

Attributes: Capture
Whole (2)

Attributes: Method Type
Sequencing (2)

Organism Groups
Fungi (2)

[Clear all](#)

[Show additional filters](#)

Display Settings: Summary, Sorted by Default order

Search results

Items: 2

- [Genoma sequencing *Aspergillus uessalvadorensis*](#)
- 1. [Project data type: Raw sequence reads](#)
Scope: Multispecies
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Accession: PRJNA1306032 ID: 1306032
- [Phenotypic and Genotypic Characterization of *Aspergillus uessalvadorensis*](#)
- 2. [Project data type: Raw sequence reads](#)
Scope: Multispecies
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
Accession: PRJNA1303219 ID: 1303219

Send to: [Filters: Manage Filters](#)

Find related data

Database:

Search details

("Aspergillus"[Organism] OR ASPERGILLUS[All Fields]) AND uessalvadorensis[All Fields]

[See more...](#)

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

Q ASPERGILLUS uessalvadorensis (2)

Ve a Configuración para activar [Feedback](#)

[See more...](#)



An official website of the United States government

[Here's how you know](#)

Log in

SRA

Full

SRX30071042: DNA-seq

1 DNBSEQ (DNBSEQ-G50) run: 1 spots, 312 bases, 56,478b downloads

Design: ILLUMINA- Next-Generation Sequencing method

Submitted by: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Study: Phenotypic and Genotypic Characterization of Aspergillus

[PRJNA1303219](#) • [SRP608180](#) • [All experiments](#) • [All runs](#)

[show Abstract](#)

Sample: Aspergillus uessalvadorensis

[SAMN50502260](#) • [SRS26138520](#) • [All experiments](#) • [All runs](#)

Organism: [Aspergillus sp. AV-2025a](#)

Library:

Name: TruSeq Nano (350_META)

Instrument: DNBSEQ-G50

Strategy: AMPLICON

Source: GENOMIC

Selection: PCR

Layout: SINGLE

Runs: 1 run, 1 spots, 312 bases, [56,478b](#)

Run	# of Spots	# of Bases	Size	Published
SRR34948844	1	312	56,478b	2025-08-11

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Win

Home > Name Search > All Fungal Names

All taxon names
 Current taxon names
 Author names

e.g. [Aspergillus sparsus](#) [Absidia corymbifera](#) [Aleurodiscus gabonicus](#)

All
 Epithet
 Intraspecific
 Species
 Genus
 Higher Rank
 Registration Identifier
 Year

Summary

Current Species Names: 1	Genus Names: 0	Order Names: 0	Phylum Names: 0
Typification: 1	Infrageneric Names: 0	Suborder Names: 0	Subphylum Names: 0
Species Names: 1	Family Names: 0	Class Names: 0	Regnum Names: 0
Intraspecific Names: 0	Intrafamilial Names: 0	Subclass Names: 0	Subregnum Names: 0

Search Results


Identifier...	Taxon name	Rank	Year...	Name Status*	Current Name
573057	Aspergillus salvadorensis Antonio Vásquez Hidalgo	sp.	2025	Current Name	Aspergillus salvadorensis Antonio Vásquez Hidalgo 2025

Total: 1

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

Presence of Enzymes and Secondary Metabolites Clusters in DNA Sequence of *Aspergillus salvadorensis* in the Production of Natural Black Pigments

Dr. Antonio Vasquez Hidalgo, PhD*

Professor of Microbiology, School of Medicine, University of El Salvador  <https://orcid.org/0000-0001-5643-8317>

DOI:10.5281/zenodo.17399462

ARTICLE INFO

Article history:

Received : 07-10-2025

Accepted : 14-10-2025

Available online : 20-10-2025

Copyright©2025 The Author(s): This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY-NC) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial use provided the original author and source are credited.

Citation: Vásquez Hidalgo, A. (2025). Presence of Enzymes and Secondary Metabolites Clusters in DNA Sequence of *Aspergillus Salvadorensis* in the Production of Natural Black Pigments. *IKR Journal of Agriculture and Biosciences (IKRJAB)*, 1(3), 107-117.



ABSTRACT

Original research paper

Objective. To determine by the Next-Generation Sequencing Illumina method to identify the genes related to the pigmentation of the fungus in the DNA sequencing of enzymes and secondary metabolites. As well as in determining the phenotypic and genotypic characteristics in general of the species *A. salvadorensis*. **Methodology.** For the identification of cluster genes in enzymes, proteins, and secondary metabolites, MACROGEN For the identification of cluster genes in enzymes, proteins, and secondary metabolites, MACROGEN used the following systems: the EggNOG system summary: Orthology Frequency within COG (Clusters of Orthologous Groups) Categories in sequencing reading., MetaCyc is a comprehensive database that provides in-depth information on metabolic pathways, biochemical reactions, enzymes, and associated compounds. UniRef (UniProt Reference Clusters) organizes groups of protein sequences from the UniProt Knowledgebase including isoforms and selected UniParc entries into clustered sets to enhance sequence analysis and annotation efficiency. EggNOG: Relative Abundance in Hierarchical Categories of COG (Clusters of Orthologous Groups) using CPM, KEGG Orthology (KO) and KEGG summary: Orthology Frequency within Main and Sub-Categories. **DNA-seq. Conclusions.** 14 enzymes and secondary metabolites were found in the production of black pigments produced by the fungus by oxidative stress.

Keywords: *Aspergillus salvadorensis*, Macrogen, Metabolites, Enzymes.

*Corresponding author: Dr. Antonio Vasquez Hidalgo, PhD

Professor of Microbiology, School of Medicine, University of El Salvador

Activar Windows
Ve a Configuración para activar

Phenotypic and Genotypic Characterization of *Aspergillus uessalvadorensis* in an Organic Strain Discovered at the University of El Salvador 2006 - 2024

[Antonio Vásquez Hidalgo](#) Published in *Plant* (Volume 13, Issue 1)

Received: 21 January 2025 Accepted: 12 February 2025 Published: 18 March 2025

Views: 518 Downloads: 77

 Download PDF Share This Article

Abstract

Morphological characterization and molecular DNA techniques allowed the identification of the *Aspergillus* sample sent to MACROGEN SOUTH KOREA. **Objective:** To perform phenotypic and genotypic characterization of the genus *Aspergillus* by the Next-Generation Sequencing method (NGS). **Methodology:** The type of study is exploratory and experimental. It was carried out in two phases: first in the collection of seeds of *Caesalpinia coriaria* and second an initial macroscopic and microscopic characterization of the isolation of *Aspergillus* was carried out in 2006, a notarial act was carried out in 2007, studies of simple microscopy and scanning electron microscopy and PCR of the fungus found in Mexico 2008 and published in the journal La Universidad in 2008, then the extraction of gDNA, qPCR, cDNA was performed in 2024 at MACROGEN INC. by Metagenome Shotgun Sequencing Reports. **Results:** The gDNA genome was extracted obtaining a maximum concentration of 12.297 ng/ul, volume 30 ul, total amount 0.369 and DIN 6.4 maximum level 8732 sample intensity for 15000 bp, the quantum qDNA was obtained at 624 bp at a concentration of 103.24 nM and 41.87 ng/ul and cDNA. From the gDNA extraction of the TapeStation gDNA Screen, a maximum concentration of 12.297 ng/ul, volume 30 ul, total quantity 0.369 and DIN 6.4 maximum level 8732 sample intensity for 15000 bp in quality control was obtained. qPCR 624 bp were obtained at a concentration of 103.24 nM and 41.87 ng/ul with the TruSeq Nano DNA library (350_META). cDNA library 33

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud.



Archivos

[Caracterizacion_biologica_del_hongo_Aspergillus_sp_y_su_impacto_en_la_sa.pdf](#)
(416.27 KB)

Fecha

2008-09-01

Autores

Vásquez Hidalgo, Antonio

Editor

Editorial Universitaria

Resumen

Con el objeto de caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas de nacascal y su impacto en la salud se procedió en tres fases: la Primera fase en la recolección de las semillas de nacascal en diferentes zonas del país, principalmente de la zona norte de los departamentos de Chalatenango y Morazán; segunda fase extracción y preparación del tanino de la semilla y hongo; tercera fase pruebas de laboratorio que consistieron en sembrar el inculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar por microscopia la muestra y su relación con infecciones pulmonares y alérgicas en el ser humano. De las semillas de nacascal se encontró un hongo del genero *Aspergillus* sp, que incide en las infecciones respiratorias agudas de los habitantes que manipulan la semilla durante el teñido de pieles y vastijas, y por ende su impacto en la salud que lesiona los tejidos pulmonares. Se ha encontrado una relación entre el aspirado de las esporas del hongo y la consecuente enfermedad en el humano. Se encontró una nueva especie de hongo en El Salvador. El impacto ambiental producido por las esporas del hongo *Aspergillus* sp contribuye a la discapacidad laboral y gasto público en salud en tratar las infecciones respiratorias agudas.

Palabras clave

Nacascal, caracterización biológica, hongos, *aspergillus* sp

Activar Windows

Ve a Configuración para activar Windows.

URI



Inicio / Archivos / La Universidad, Segunda Época, Volumen 1, Nº 3, julio - septiembre 2020 / Artículo científico

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo
Universidad de El Salvador

Palabras clave: Hongo *Aspergillus* sp, Infecciones Respiratorias Agudas

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascol y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus* sp, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus* sp en El Salvador.

Descargas

25



ISSN - L 0041 - 8242

E - ISSN 3005 - 5857

ISSN 0041 - 8242

ISNI

Equipo Editorial

Director:

Lcdo. Luis Alonso Alvarez Hernández
Universidad de El Salvador
luis.alvarez@ues.edu.sv
<https://orcid.org/0009-0008-3363-9798>

Editor:

Lcda. Alba Isabel Landaverde
Granadino
Universidad de El Salvador
alba.landaverde@ues.edu.sv
<https://orcid.org/0009-0008-2618-4422> ar Windows.

Correctora de texto:

ResearchGate Search for publications, researchers, or questions or Discover by subject area Recruit researchers Join for free Login


Home > Eurotiales > Ascomycetes > Phytopathogenic Fungi > Aspergillus

Article PDF Available

Phenotypic and Genotypic Characterization of *Aspergillus uessalvadorensis* in an Organic Strain Discovered at the University of El Salvador 2006 - 2024

March 2025
DOI: [10.11648/j.plant.20251301.11](https://doi.org/10.11648/j.plant.20251301.11)
License: [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Authors:

 **Antonio Vásquez Hidalgo Phd**
University of El Salvador

[Download citation](#) [Copy link](#)

[Download full-text PDF](#)
[Read full-text](#)

References (52) Figures (7)

Activar Windows

Buscar en Facebook

Universidad de El Salvador

¡ORGULLO UES! Descubrimos el *Aspergillus uessalvadorensis*, un hongo único en el mundo que abre nuevas posibilidades para la ciencia y la biotecnología.

1.3 mil
62
275

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows

Publicación de Universidad de El Salvador

Universidad de El Salvador agregó fotos al álbum: **Reconocimiento a Dr. Antonio Vázquez Hidalgo**
4 de septiembre

¡ORGULLO UES! Hoy celebramos un hecho histórico: El Dr. Antonio Vázquez Hidalgo, uno de nuestros docentes ha descubierto una nueva especie de hongo y la ha nombrado *Aspergillus uessalvadorensis*. Por ello, nuestras autoridades han reconocido su trabajo perseverante y ejemplar.

Este descubrimiento, aceptado oficialmente por la Comisión Internacional de Nomenclatura Taxonómica de Hongos y registrado en MycoBank y GenBank/NCBI, nos posiciona como referente nacional y sobre todo MUNDIAL. El *Aspergillus uessalvadorensis*, encontrado en las semillas de Nacascal, es único en el planeta por su capacidad de producir un pigmento negro natural, abriendo nuevas posibilidades para la ciencia y la biotecnología.

Este logro refleja la pasión investigativa del Dr. Vázquez, y también la entrega de nuestra planta docente, administrativa y estudiantado, quienes con su esfuerzo cotidiano forjan la identidad científica de la UES, así lo manifestó nuestro rector, **M.Sc. Juan Rosa Quintanilla**, en una actividad donde estuvieron presentes los vicerrectores: **Dra. Evelyn Farfán** y **M.Sc. Roger Arias**, y el decano de la Facultad de Medicina, **Dr. Saúl Díaz**.

Con este reconocimiento internacional, consolidamos nuestro prestigio como la universidad de referencia en El Salvador y como un faro de la investigación científica en la región.

Escribe un comentario...

Wikimedia Commons está disponible en [español](#)

Category:Aspergillus uessalvadorensis

Category [Discussion](#)

[Read](#) [Edit](#) [View history](#) [Tools](#)

Appearance [hide](#)

Media in category "Aspergillus uessalvadorensis"

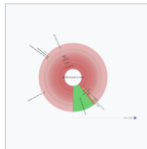
The following 3 files are in this category, out of 3 total.



[10000x.jpg](#)
1,280 × 960; 104 KB



[Panorame aspergillus.jpg](#)
962 × 537; 93 KB



[Pastel GenBank.png](#)
1,498 × 1,100; 377 KB

NO WIKIDATA ID FOUND!
[Search for Aspergillus uessalvadorensis on Wikidata](#)
[Create new Wikidata item](#)
[Upload media](#)

Category: [Aspergillus](#)

Non-topical/index: [Uses of Wikidata Infobox with no item](#)

Text

Small
 Standard
 Large

This page always uses small font size

Width

Standard
 Wide

Color (beta)

Automatic
 Light
 Dark



Artículos / Publicado el 23 de marzo de 2009

Caracterización biológica

Nueva especie de hongo Aspergillus

Encontrada en las semillas de *Caesalpinia coriaria* y su impacto en la salud del medio ambiente.



Lo más leído



Soy Médico: ¿cómo crear un patrimonio a largo plazo?
25/10/2025 - Dr. Guillermo Di Palma - Dra. María Laura García

Personas que quizás conozcas:

[Ver más](#)

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.



Aspergillus uessalvadorensis

TAG



Descubren en El Salvador un hongo con potencial biotecnológico

Autor TCS - 16 septiembre, 2025

El microbiólogo salvadoreño Antonio Vázquez identificó un hongo nuevo para la ciencia capaz de producir pigmentos naturales innovadores.

Últimas Noticias

Sale el primer adelanto de la película biográfica de Michael Jackson
6 noviembre, 2025



Así queda la tabla de posiciones en la fecha 20 del Apertura 2025
6 noviembre, 2025



Dembélé y Yamal encabezan lista de nominados en el The Best 2025
6 noviembre, 2025



Activar Windows

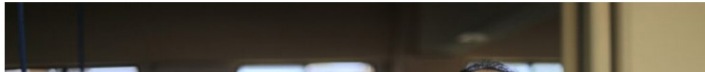


Inicio > DePaís

Microbiólogo de la UES descubre especie de hongo en las semillas de nacazcol

La nueva especie fue nombrada «*ASPERGILLUS uessalvadoriensis*» para destacar el nombre del país. El aporte social y práctico de su investigación está enfoca-do en la comercialización del tinte negro.

por Andrea Alas — 17 de noviembre de 2024 En DePaís Tiempo de lectura:4 mins read AA



EL SALVADOR > SOCIAL > SALVADOREÑÍSIMO

Experto salvadoreño descubre nueva especie de hongo, tras 20 años de investigación: así la nombró

ESCUCHAR NOTA

LECTURA 4:00 MIN



Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows

Científico salvadoreño descubrió nueva especie de hongo: ¿qué se sabe de ella y por qué es relevante?

publicación Diario La Pagina — jueves, 4 septiembre 2020 2:39 PM



El Dr. Antonio Vázquez Hidalgo, docente de la Universidad de El Salvador (UES), ha descubierto una nueva especie de hongo y la ha nombrado *Aspergillus uessalvadorensis*. Las mismas autoridades de esa casa de estudios superiores han reconocido su trabajo perseverante y ejemplar.

Este descubrimiento, aceptado oficialmente por la Comisión Internacional de Nomenclatura Taxonómica de Hongos y registrado en MycoBank y GenBank/NCBI, posiciona a la UES como referente nacional y sobre todo mundial.

El *Aspergillus uessalvadorensis*, encontrado en las semillas de Nacascal, es único en el planeta por su capacidad de producir un pigmento negro natural, abriendo nuevas posibilidades para la ciencia y la biotecnología.

Este logro refleja la pasión investigativa del Dr. Vázquez, y también la entrega de nuestra planta docente, administrativa y estudiantado, quienes con su esfuerzo cotidiano forjan la identidad científica de la UES, así lo manifestó nuestro rector, M.Sc. Juan Rosa Quintanilla, en una actividad donde estuvieron presentes los vicerrectores: Dra. Evelyn Farfán y M.Sc. Roger Arias, y el decano de la Facultad de Medicina, Dr. Saúl Díaz.

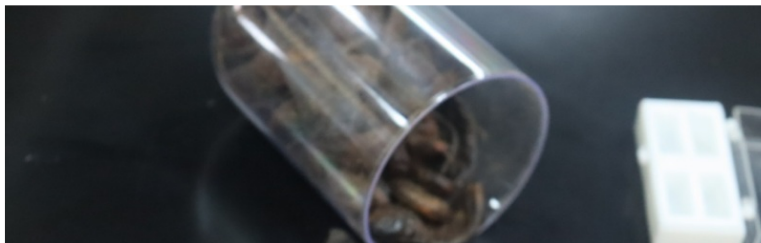
Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

NOTICIAS

El Salvador y la UES como referentes mundiales en descubrimiento de nueva especie de hongo

El Aspergillus uessalvadorensis, una especie de hongo que se descubrió en la Universidad de El Salvador (UES), ha sido registrado en bases de datos internacionales como la de MycoBank y el repositorio genético GenBank/NCBI.

Ago 31 | 19:20 Por Xiomara Alfaro



Además...

- Epaper
- Tasas y balances
- Obituarios digitales

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.



noticia sv • Seguir

noticia sv 8 sem
 Científico salvadoreño descubre hongo único y lo nombra «uessalvadorensis»

El Dr. Antonio Vásquez Hidalgo, docente de la Universidad de El Salvador (UES), descubrió una nueva especie de hongo, bautizada como *Aspergillus uessalvadorensis*.

El hallazgo fue validado por la Comisión Internacional de Nomenclatura Taxonómica de Hongos y registrado en MycoBank y GenBank/NCBI, posicionando a la UES como referente científico mundial.

4 de septiembre

Entra para indicar que te gusta o comentar.

Más publicaciones de noticia sv



Portal de Revistas del CSUCA

[Inicio](#) [Acerca de](#) [Contacto de Revistas](#) [Cómo unirse](#) [Idioma](#)

Todos los Campos
Q Buscar
Avanzado

Caracterización biológica del... / Vista Equipo

* Citar
Enviar este por Correo electrónico
Imprimir
Exportar Registro
Marcar

Ejemplares similares

- Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud por: Vásquez Hidalgo, Antonio Publicado: (2022)
- Response of sea fans to infection with *Aspergillus sp.* (Fungi) por: Smith, G. W., et al. Publicado: (1998)
- BIOPROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS FILOFÉRICOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTAGÓNICA CONTRA PYRICULARIA ORYZAE EN EL CULTIVO DE ARROZ. por: Herrera, Rito, et al. Publicado: (2023)
- Viabilidad de esporas de *Aspergillus*

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud

→ [other_versions_link](#)

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus sp*, que incide...

[Descripción completa](#)

Autor principal:	Vásquez Hidalgo, Antonio
Formato:	Online
Idioma:	spa
Publicado:	Universidad de El Salvador. Editorial Universitaria 2014
Acceso en línea:	https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/12

Descripción
[other_versions_title](#)
[Ejemplares similares](#)
Vista Equipo



Inicio / Archivos / Núm. 3-4: La Universidad, Nueva Época, Volumen 1, N° 3-4, septiembre - diciembre, 2008 / Artículo científico

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo
Universidad de El Salvador

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus* sp, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus* sp en El Salvador.

Descargas



PDF

Publicado
2014-08-28

ISSN - L 0041 - 8242

E - ISSN 3005 - 5857

ISSN 0041 - 8242

ISNI

Equipo Editorial

Director:

Lcdo. Luis Alonso Alvarez Hernández
Universidad de El Salvador
luis.alvarez@ues.edu.sv
https://
orcid.org/0009-0008-3363-9798

Editor:

Lcda. Alba Isabel Landaverde
Granadino
Universidad de El Salvador
alba.landaverde@ues.edu.sv
https://var Windows
orcid.org/0009-0008-2618-4422 ar Windows.



Inicio / Archivos / La Universidad, Segunda Época, Volumen 1, N° 3, julio - septiembre 2020 / Artículo científico

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo
Universidad de El Salvador

Palabras clave: Hongo *Aspergillus* sp, Infecciones Respiratorias Agudas

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus* sp, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus* sp en El Salvador.

Descargas



pdf

ISSN - L 0041 - 8242

E - ISSN 3005 - 5857

ISSN 0041 - 8242

ISNI

Equipo Editorial

Director:

Lcdo. Luis Alonso Alvarez Hernández
Universidad de El Salvador
luis.alvarez@ues.edu.sv
https://
orcid.org/0009-0008-3363-9798

Editor:

Lcda. Alba Isabel Landaverde
Granadino
Universidad de El Salvador
alba.landaverde@ues.edu.sv
https://var Windows
orcid.org/0009-0008-2618-4422 ar Windows.

DESCRIPCION TAXONOMICA

***Aspergillus salvadorensis* sp. nov.**

Autor: Dr. Antonio Vásquez Hidalgo, PhD

Institución: Universidad de El Salvador (UES)

Registro.

Registrado la especie nueva *Aspergillus uessalvadorensis* con los números: Registrado en MycoBank (MB#860453, MB#860456) y GenBank/NCBI (BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219). Universidad de El Salvador a nivel mundial. Fungal Name FN 573057: *Aspergillus salvadorensis* Antonio Vásquez Hidalgo (2025-10-17)

Resumen

Se describe una nueva especie del género *Aspergillus*, denominada *Aspergillus salvadorensis* sp. nov., aislada en El Salvador. La especie se distingue por caracteres morfológicos y moleculares que la separan claramente de sus congéneres cercanos. Las secuencias de referencia se encuentran registradas en GenBank bajo los BioProjects PRJNA1306032 y PRJNA1303219. Este hallazgo amplía el conocimiento sobre la diversidad fúngica de la región mesoamericana.

Palabras clave

Aspergillus uessalvadorensis, taxonomía, hongo nuevo, El Salvador, GenBank, biodiversidad fúngica.

Descripción taxonómica

Etimología

El epíteto específico *salvadorensis* hace referencia a El Salvador, país donde la especie fue aislada por primera vez.

Diagnóstico

Aspergillus salvadorensis se diferencia de especies cercanas por una combinación única de caracteres morfológicos y moleculares. Filogenéticamente, forma un linaje monofilético bien sustentado dentro del género *Aspergillus*, separado de especies afines en los análisis multilocus (ITS, benA, CaM, rpb2). Morfológicamente, presenta características distintivas en la coloración de las colonias, la morfología de los conidióforos y la ornamentación de los conidios. Su morfología, hábitat, composición suelo, origen ancestral desde la colonia nacascal usado en alfarería y cueros, hacen de esta especie única en El Salvador.

Descripción. 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 μm de largo con conidios moderados o esporas internas de 1 a 3 micras, de color marrón a negro. Es un hongo filamentoso 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 polvorienta. Es un hongo filamentoso. Características microscópicas: El conidióforo de *Aspergillus* tiene tres partes distintas: una vesícula globosa terminal con un fiálide uniseriado sin metal, un estípite 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 μm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. En su interior se observan cientos de esporas o conidios. La espora es esférica e irregular, aseptada, ameroporosa, coloreada y oscura del tipo feospora columnar. La vesícula es globosa con 52-66 μm de diámetro con una longitud de estípite de 100-300 μm , un ancho de estípite de 2-2 μm , ornamentación irregular y produce filalides a su alrededor. Los filalidos son monoseriados, las ramas primarias miden 30 μm de largo, cortas y 8 micras de largo, de las que brotan los conidios, que son globosos y rugosos de 4 a 5 μm de diámetro, de color marrón o marrón a negro. El diámetro de la colonia es de 9-10 μm , los conidios son columnares y tienen una longitud de 3-5 μm y un ancho de 1,96-2 μm . Cabezas de conidios lisos con una pared redonda e irregular, dispuestas en una columna; estípites 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, coloreadas, and negras del tipo feospora, grande, con un diámetro de 1 a 3 μm ; 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 env-jece. 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 níger como la especie descubierta, la vesícula de la especie níger 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 níger 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 níger 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 conidióforo que en su extremo terminal termina en una cabeza conidial globosa de la que emergen los filalidos 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 conidióforo 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 fialides 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

Material examinado (Holotipo)

Holotipo: Aislamiento procedente de semillas nacascol de la zona norte de Morazán El Salvador, recolectadas en febrero del año 2006, Depositado en la colección de cultivos de la Universidad de El Salvador (UES) como cepa tipo. Secuencias de referencia depositadas en GenBank bajo los BioProjects PRJNA1306032 y PRJNA1303219.

Hábitat y distribución

Aislado de materia vegetal en semillas y suelo. El Salvador. Hasta el momento, solo se ha reportado en esta región.

Notas taxonómicas

Aspergillus salvadorensis pertenece a la sección nigri del género *Aspergillus*, donde forma un clado monofilético distinto y bien soportado. Las diferencias consistentes en las secuencias ITS, β -tubulina, calmodulina y rpb2 respaldan su reconocimiento como especie independiente. La combinación de evidencia molecular, filogenética y morfológica justifica su designación como especie nueva. Además de que es productor de colorante negro proveniente del hongo.

Referencias

MACROGEN. INC. (2024). Estudio secuenciación DNA.

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., et al. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173.

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., et al. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales). *Studies in Mycology*, 95, 5–169.

Ficha taxonómica: *Aspergillus salvadorensis*

Nombre del taxón

Aspergillus salvadorensis AVH

Autoridad

Antonio Vásquez Hidalgo (AVH)

Publicación efectiva

Plant & Fungal Research 13 (1): 16 (2024)

MycoBank Nº

MB#860453 (nombre)

MB#860456 (descripción/ilustración)

Estatus del nombre

Legítimamente publicado y aceptado

Diagnosis

Fungus belonging to the genus *Aspergillus*, section [indicar sección], distinguished by [rasgos morfológicos claves: color de la colonia, tamaño de conidióforos, vesículas, conidios, ornamentación].

Ejemplo de diagnosis corta en inglés o latín: Differs from other species in section by producing conidia...

Material tipo

- Holotipo: [ej. cepa AVH001 depositada en la colección XXXX]
- Isotipo: [si existe]
- Cepas de referencia: [ej. depositadas en CBS, ATCC, etc.]

Origen y ecología

- Lugar de aislamiento: [ej. suelo, aire, planta, animal, hospital, coordenadas].
- País: El Salvador.
- Hábitat: [ej. hospital environment / soil sample / clinical isolate].

Secuencias depositadas

- ITS rDNA: GenBank: XXXXX
- β -tubulin (BenA): GenBank: XXXXX
- Calmodulin (CaM): GenBank: XXXXX

Etimología

El epíteto *salvadorensis* hace referencia a la Universidad de El Salvador (UES), institución donde se realizó el estudio y el aislamiento de la especie.

Ilustraciones

- Fotografía de colonias (frente/reverso en medios CYA, MEA, YES).
- Micrografías de conidióforos, vesículas y conidios.

Referencia principal

Vásquez Hidalgo, A. (2024). *Aspergillus uesalvadorensis*, a new species from El Salvador. *Plant & Fungal Research* 13 (1): 16.

Ficha taxonómica Fungal Names *Aspergillus salvadorensis*

El nombre *Aspergillus salvadorensis* parece ser el de una **nueva especie** o **subespecie** de hongo del género *Aspergillus*, descubierta y caracterizada en la **Universidad de El Salvador (UES)**.

Dada la naturaleza reciente de su descubrimiento y caracterización, la información puede estar más detallada en publicaciones científicas locales o repositorios institucionales de la UES que en bases de datos taxonómicas internacionales consolidadas bajo ese nombre exacto. Algunos documentos la mencionan también como *Aspergillus niger subspecies salvadorensis* o *Aspergillus uessalvadorensis*.

A continuación, se presenta la **ficha taxonómica (clasificación científica)** del género, seguida de los detalles específicos de la supuesta especie o subespecie, según las publicaciones encontradas:

Ficha Taxonómica del Género *Aspergillus*

Nivel Taxonómico	Clasificación
Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo (División)	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Género	<i>Aspergillus</i> Micheli, 1729
Especie/Subespecie	<i>Aspergillus salvadorensis</i> sp. nov. (o similar)

Características de *Aspergillus salvadorensis* / *Aspergillus niger* subespecies *salvadorensis*

Los hallazgos de investigación (principalmente de la UES) sugieren que se trata de una especie o subespecie con las siguientes características morfológicas y moleculares que la diferencian de otros *Aspergillus*, especialmente de *A. niger*:

- **Nombre Propuesto (Variante):** *Aspergillus salvadorensis* sp. nov. o *Aspergillus niger* subespecies *salvadorensis* o *Aspergillus uessalvadorensis*.
- **Aislamiento:** Originalmente aislada de semillas de **Nacascal** (*Caesalpinia coriaria*) en El Salvador.
- **Filo:** Ascomycota (Hongo filamentoso hialino, saprófito).
- **Morfología Macroscópica:**
 - Crecimiento en medio Saboraud produce una **coloración negra** con producción de pigmento.
 - Inicialmente el micelio es blanco, cambiando a **negro** después de semanas a temperatura ambiente con esporulación marrón progresiva.
- **Morfología Microscópica:**
 - **Conidióforo:** Largo, liso/rugoso. A diferencia de otras especies, en un estudio se menciona que no es liso y que no tiene septos (en contraste con *A. niger*).
 - **Cabeza Conidial:** Se describe como columnar, **no radiada** y uniseriada (con una sola hilera de fiálides).
 - **Esporas/Conidios:** Esféricas e irregulares, **aseptadas**, ameroporas, pigmentadas (marrón a negro), tipo feospora columnar. Tienen proyecciones en forma de picos triangulares/espículas cuando maduras.
 - **Vesícula:** Globosa.
- **Temperatura de Crecimiento:** Crece bien a temperatura ambiente (20-25 °C) y hasta 37 °C.

En resumen, *A. salvadorensis* es una entidad taxonómica propuesta recientemente dentro del género *Aspergillus*, destacando por sus características morfológicas específicas (como la cabeza conidial columnar y los conidios estrellados con espículas) y sus diferencias con especies cercanas como *A. niger*.

¿Le gustaría que busque más detalles sobre la publicación científica que describe a *Aspergillus salvadorensis*?

Fungal Name FN 573057:

Aspergillus salvadorensis Antonio Vásquez Hidalgo (2025-10-17) ficha taxonomica

Fungal Names .

Ficha Taxonómica de *Aspergillus salvadorensis*

El nombre *Aspergillus salvadorensis* (o *Aspergillus uessalvadorensis*) corresponde a una **nueva especie de hongo** descubierta y caracterizada por el Dr. **Antonio Vásquez Hidalgo** de la Universidad de El Salvador (UES). La ficha se basa en la descripción formal y el registro en bases de datos internacionales como MycoBank y GenBank, según la información más reciente de la publicación.

El código **FN 573057** y la fecha **2025-10-17** corresponden al **registro formal del nombre del hongo** en una base de datos taxonómica (*Fungal Name*), que consolida el hallazgo.

Nivel Taxonómico Clasificación

Dominio	Eukaryota (Eucariotas)
Reino	Fungi (Hongos)
Filo (División)	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Género	<i>Aspergillus</i> P. Micheli, 1729
Especie	<i>Aspergillus salvadorensis</i> sp. nov. (Antonio Vásquez Hidalgo, 2025-10-17)
Nombres Alternativos	<i>Aspergillus uessalvadorensis</i> , <i>Aspergillus niger</i> subsp. <i>salvadorensis</i> (Nombres anteriores o variantes de estudio)
Números de Acceso	MycoBank: MB#860453, MB#860456 / GenBank (BioProjects): PRJNA1306032, PRJNA1303219
Localidad Tipo	Semillas de Nacascal (<i>Caesalpinia coriaria</i>) en El Salvador.

Características Clave (Morfología y Biología)

La especie fue reconocida como diferente de sus congéneres, como *A. niger*, basándose en caracteres morfológicos y análisis de secuenciación de ADN.

- **Aislamiento y Hábitat:** Aislado de las **semillas de Nacascal** (*Caesalpinia coriaria*), un árbol nativo de El Salvador.
- **Capacidad Única:** Es el único hongo del género *Aspergillus* conocido que, al interactuar con el tanino de la semilla de Nacascal, produce un **pigmento negro natural** utilizado tradicionalmente para teñir barro, cuero y textiles.
- **Morfología Macroscópica:**
 - Crecimiento en agar Saboraud: Colonias de micelio blanco que se vuelven **negras** con el tiempo. Reverso de la placa **pigmentado de negro**.
- **Morfología Microscópica:**
 - **Conidióforo:** Largo, liso/rugoso.

- **Cabezas Conidiales:** Negras, uniseriadas (una hilera de fiálides).
- **Conidios (Esporas):** Esféricas a irregulares, aseptadas, de color **café a negro**, con un tamaño de 1 a 3 micras. Una característica distintiva son los conidios maduros de aspecto **esférico estrellado con espículas** (proyecciones en forma de picos triangulares) en toda la periferia.
- **Relevancia:** Además de su uso potencial en biotecnología (producción de colorantes).

Significado de los Números de Registro

Los números de acceso, como los de MycoBank y GenBank, cumplen funciones esenciales en la **taxonomía fúngica** y la **biología molecular**.

1. MycoBank (MB#)

- **MB#860453** y **MB#860456** son los **números de registro formal** en MycoBank.
- **Función:** MycoBank es una base de datos pública que registra los **nombres de hongos** y sus **descripciones originales**.
 - Registrar el nombre aquí asegura que es **válido** según las reglas de nomenclatura botánica (*Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas*).
 - Confirma la **fecha de publicación** y quién es el **autor** del nombre (en este caso, Antonio Vásquez Hidalgo).
- **Importancia:** Actúa como una "**partida de nacimiento**" oficial para el nombre *Aspergillus salvadorensis*, previniendo duplicidades y asegurando que la comunidad científica reconozca el nombre formal.

2. GenBank (PRJNA / Números de Secuencia)

- **PRJNA1306032** y **PRJNA1303219** son números de acceso a **BioProjects** (proyectos de datos biológicos) dentro del **NCBI** (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), que administra GenBank.
- **Función:** GenBank es una base de datos genética que almacena las **secuencias de ADN** de los organismos.
 - Para la descripción de un hongo nuevo, el investigador debe depositar las secuencias de genes clave (como el **ITS** y **β-tubulina**) que fueron usadas para **identificar y diferenciar** a *A. salvadorensis* de otras especies de *Aspergillus*.
- **Importancia:** Proporcionan la **evidencia molecular** de que *A. salvadorensis* es genéticamente distinto. Permite a cualquier otro investigador en el mundo descargar la secuencia y **verificar** o **comparar** sus propios aislamientos de hongos con esta nueva especie.

En resumen: **MycoBank** valida el **nombre formal** según la nomenclatura, y **GenBank** valida la **identidad molecular** a través de su código genético (ADN)

3. **Fungal Names.** El código FN 573057 y la fecha 2025-10-17 corresponden al **registro formal del nombre del hongo** en una base de datos taxonómica (*Fungal Name*), que consolida el hallazgo.

Según los artículos de ley del **Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (CIN)** para la **publicación válida** de ciertos tipos de nombres científicos a partir de una fecha específica como **válidamente publicado**: se cumplieron los siguientes requisitos: **Publicación Efectiva (Artículo 30)**: Se publicó en **IKR Journal of Agriculture and Biosciences ISSN: 3107-5509 (Online) DOI:10.5281/zenodo.17565141** revista científica open access. **Forma Correcta (Artículo 23.1)**: El nombre de la especie es un **binomio** (dos partes, como *Género especie*) se denomina *Aspergillus salvadorensis* y debe ser tratado como latín, siguiendo las reglas gramaticales y ortográficas para su escritura. **Descripción o Diagnóstico (Artículo 38 y 39)**: El nombre tiene una **descripción** de las características de la especie y una **diagnóstico**. Esta diagnóstico es una breve declaración que resalta las características clave que diferencian a la nueva especie de sus parientes más cercanos, la descripción o diagnóstico está en **inglés**, como son su morfología macro y microscópica ampliamente desarrollada, fotos de microfotografías electrónicas, caracterización genotípica realizada en MACROGEN INC Korea del Sur y depositada en GenBank con el número ID: PRJNA1306032, el hongo es productor de colorante, su hábitat y origen es colonial, crece a temperaturas de 37 +/- 2, resistente a temperaturas extremas, crece en zonas específicas, Registered species *Aspergillus salvadorensis* with the numbers: Registered in GenBank/NCBI (BioProjects PRJNA1306032, PRJNA1303219) and as *Aspergillus salvadorensis* A. Vásquez Hidalgo, sp. nov. **MycoBanknov**: 849321. **Etymology**: Named after *El Salvador*, the country where the species was isolated. **Diagnóstico**: Differs from *Aspergillus neoniger* by producing smaller, rough-walled conidia (3.5–4.0 µm in diameter vs. 4.5–5.5 µm), slower growth on Agar Sabouraud at 37 °C, and absence of sclerotia. **Designación de un Tipo (Artículo 40)**: El holotipo está depositada en el departamento de microbiología de la Facultad de Medicina con el número UES-001 sección micología. **El Caso Específico del Artículo 41.5 (Nombres Basados en Otros Nombres) completa, precisa y directa al basónimo** (el nombre original) o al sinónimo reemplazado. Se incluyó el autor del nombre original, la revista o libro donde fue publicado originalmente, y la página o lámina exacta.