



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Ciencias**

Genómica computacional

Sergio Hernández López, Maira Nayeli Luis Vargas y Rafael López  
Martínez



**Proyecto: Identificación y clasificación de hongos en una  
muestra ambiental mediante herramientas genómicas**  
Ruiz Almanza Nancy Selene, Torres Sánchez Miguel Angel

---

**Resumen:**

**Introducción:**

El reino fungi comprende una amplia diversidad de organismos, mismos cuyas funciones ecológicas son cruciales para el correcto funcionamiento de los ecosistemas que habitan. Su diversidad no se limita al aspecto morfológico, sino que además se han observado y descrito ciclos de vida igualmente diversos, por lo tanto, es difícil diferenciarlos, clasificarlos y delimitarlos; sin embargo, algunas de las características que pueden usarse para su descripción son las siguientes:

- eucariontes
- con pared celular quitinosa principalmente o de celulosa
- filamentosos y con crecimiento apical
- heterótrofos por absorción
- con reproducción sexual o asexual por medio de esporas (Herrera y Ulloa, 1990 en Aguirre-Acosta, *et. al.*, 2014).

Ulloa y Hanlin (2012) proponen que la palabra "hongo" puede utilizarse para hacer referencia a organismos que pertenecen no sólo al reino fungi, sino que además se puede hacer uso de la palabra para nombrar a organismos de otros grupos que pueden presentar las mismas características que las que presentan los hongos del reino fungi.

Los grupos que incluyen organismos con características de hongos son:

- Reino Fungi: incluye los phyla Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota y Microsporidia
- Reino Chromista: incluye a los phyla Oomycota, Hyphochytriomycota y Labyrinthulomycota
- Reino Protozoa: comprende a los phyla Cercozoa, Percolozoa, Amoebozoa y Choanozoa

Es importante destacar la dificultad para generar taxonomías y filogenias estables y concisas, dada su vasta diversidad en morfología y las diferentes interacciones a nivel celular y ecológico hacen que resulte difícil diferenciar entre especies. Por lo tanto, su clasificación taxonómica, filogenética, así como sus relaciones evolutivas se encuentran en constante cambio incluso haciendo uso de herramientas moleculares actuales.

México cuenta con una gran diversidad de hongos en diferentes ecosistemas, por lo que se han realizado diferentes trabajos con el objetivo de caracterizar esta diversidad. Sin embargo, pese a los esfuerzos, los catálogos de hongos validados aún no reflejan con exactitud el número real de especies que han sido citadas en nuestro país, ya que muchas de estas especies no están incluidas en la base de datos de plataformas referentes en cuanto a temas de biodiversidad como la de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), particularmente en cuanto a especies de los phylum Zygomycota y Oomycota.

Los estudios sobre caracterización de la biodiversidad de un lugar pueden utilizar herramientas genómicas, como es el caso de la metagenómica, donde se utilizan técnicas moleculares para procesar muestras ambientales (como suelo, aire, agua. etc.) para obtener una gran cantidad de material

genético, el cual es secuenciado y comparado con la información que ofrecen las bases de datos. En estos estudios los marcadores moleculares son muy útiles, pues sirven para diferenciar y clasificar a los organismos presentes en la muestra ambiental.

Debido a la dificultad de aislar a los hongos por la diversidad de relaciones que establecen con otros organismos, se han realizado estudios moleculares para intentar identificar y caracterizar las especies de hongos con base en regiones muy conservadas de su genoma, como lo son los Internal Transcribed Spacers (ITS), que son regiones que se encuentran repetidamente entre los genes de RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del DNA nuclear, dicha región se transcribe junto con los genes 18S, 5.8S y 28S, pero se elimina durante el procesamiento postraduccional del RNA ribosomal (Ciaccio, 2011 en González, 2014; Rosenblad, 2016). La variabilidad en longitud de los ITS entre especies ha sido estudiada para establecer marcadores específicos para las especies de hongos. La región de los ITS se puede secuenciar y aporta los datos suficientes para ser usado en la identificación taxonómica, ya que incluso sirven para ubicar hongos desconocidos dentro de un grupo de especies. El uso de los ITS ha sido aplicado exitosamente en muestras de suelo, del cual se extrae el DNA total de la muestra y se amplifica el DNA micelial para secuenciarlo, después se buscan las homologías de estas secuencias con los ITS (Rodríguez-Tovar, 2004).

Para este proyecto decidimos simular un estudio de metagenoma, realizando un programa bioinformático que permita reconocer secuencias de hongos para ser analizados por medio de marcadores moleculares con la intención de analizar diferentes secuencias simultáneamente y poder generar listas que permitan la identificación de hongos de acuerdo al phylum al que pertenecen; para ello se realizó una profunda investigación sobre las secuencias de organismos descritos en los bosques de nuestro país para simular una muestra de suelo en la cual encontramos diversos organismos, de los cuales nos interesa saber cuáles son hongos.

Ya que los marcadores mayormente utilizados en estos estudios son los genes ribosomales, en este proyecto se utilizaron siete biomarcadores comúnmente utilizados en código de barras y en estudios de identificación de especies.

### **Pregunta de investigación:**

Ya que los estudios de metagenómica son un novedoso método para caracterizar la biodiversidad de un lugar, ¿podrá éste, en conjunto con el uso de herramientas bioinformáticas, ayudar a resolver el problema que existe en cuanto a la caracterización, descripción y clasificación de los hongos en México?

### **Hipótesis:**

Los marcadores moleculares son una herramienta útil para crear filogenias, por lo que proponemos que usando marcadores específicos de hongos, como los ITS, podremos distinguir las secuencias de hongos de entre un conjunto de secuencias de otros organismos.

### **Objetivos:**

- Realizar una simulación de una muestra ambiental de un bosque de México para realizar un estudio de metagenómica.
- Crear un programa bioinformático que permita identificar únicamente secuencias hongos de entre un grupo de secuencias de diversos organismos.

### **Metodología:**

Se realizó una investigación en diferentes fuentes bibliográficas sobre las familias de organismos pertenecientes a la flora y fauna descritas en bosques mexicanos, se consultaron los catálogos de

especies registradas de la CONABIO ([www.gob.mx/conabio](http://www.gob.mx/conabio)) para elaborar una lista de especies de plantas y animales que habitan en estos ecosistemas.

Además se consideró la microbiota de dichos ecosistemas, para lo cual se obtuvieron algunas especies descritas en este tipo de suelos mediante la consulta de artículos científicos sobre trabajos relacionados.

Para elaborar la lista de especies de hongos se consultó el catálogo de especies EncicloVida de la CONABIO (<https://enciclovida.mx/>), se incluyeron hongos que mantienen diferentes relaciones con otros organismos, por ejemplo, hongos fitopatógenos, hongos saprófitos, líquenes y micorrizas.

Para elegir la lista definitiva de especies a trabajar, se realizó la búsqueda de cada especie en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). La búsqueda se realizó por la categoría de genoma y se descargaron las secuencias genómicas en formato FASTA (.fna, .txt y .faa).. Finalmente, la lista de especies con la cuales se realizó la simulación se acotó a 46 especies, descritas en la tabla 1.

Nombre del organismo	¿Qué es?	
<i>Odocoileus hemionus</i>	fauna	
<i>Puma concolor</i>	fauna	
<i>Lynx rufus</i>	fauna	
<i>Ursus americanus</i>	fauna	
<i>Papilio polyxenes</i>	fauna	
<i>Piaya cayana</i>	fauna	
<i>Cathartes aura</i>	fauna	
<i>Sylvilagus cunicularius</i>	fauna	
<i>Panthera onca</i>	fauna	
<i>Mycolicibacterium phlei</i>	microbiota	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	microbiota	
<i>Eucalyptus grandis</i>	flora	
<i>Pinus taeda</i>	flora	
<i>Frankia alni</i>	flora	
<i>Paenibacillus larvae</i>	microbiota	
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	microbiota	
<i>Dermatocarpon miniatum</i>	liquen	
<i>Agaricus bisporus</i>	Basidiomycota	
<i>Baeospora myosura</i>	Basidiomycota	Sordariomycetes
<i>Tolypocladium capitatum</i>	Ascomycota	
<i>Endocarpon pusillum</i>	liquen	
<i>Azospirillum brasilense</i>	microbiota	
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	microbiota	
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	flora	
<i>Pleurozium schreberi</i>	flora	
<i>Carya illinoensis</i>	flora	
<i>Crypturellus cinnamomeus</i>	fauna	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	microbiota	

Nombre del organismo	¿Qué es?	
<i>Physcia stellaris</i>	liquen	
<i>Cladonia borealis</i>	liquen	
<i>Laccaria bicolor</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes
<i>Zancudomyces culisetae</i>	Zygomycota	Harpellomycetes
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	Zygomycota	Mucorales
<i>Rhizopus microsporus</i>	Zygomycota	(fitopatògeno)
<i>Amanita muscaria</i>	Basidiomycota	Agaricales
<i>Calocera viscosa</i>	Basidiomycota	Dacrymycetes
<i>Dichomitus squalens</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes
<i>Chaetomium globosum</i>	Ascomycota	Sordariomycetes
<i>Candida parapsilosis</i>	Ascomycota	Saccharomycetaceae
<i>Daldinia childiae</i>	Ascomycota	Sordariomycetes
<i>Alternaria brassicicola</i>	Ascomycota	Dothideomycetes
<i>Blumeria graminis</i>	Ascomycota	Leotiomycetes
<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Mucoromycota	Mucorales
<i>Scutellospora calospora</i>	Glomeromycota	Glomeromycetes
<i>Glomus cerebriforme</i>	Glomeromycota	Glomeromycetes

Tabla 1. Lista de especies descritas en bosques mexicanos

Una vez obtenidas las secuencias de las especies problema, se realizó la búsqueda en diferentes plataformas de revistas científicas para recopilar información sobre los biomarcadores documentados para hongos. La búsqueda se realizó tomando palabras clave como "fungi biomarkers"; los artículos resultantes se filtraron por fecha de publicación, descartando aquellos con año de publicación anterior a 2018. De acuerdo a la literatura consultada, se eligieron un total de 7 marcadores moleculares, de los cuales también se obtuvo la secuencia en formato FASTA. La lista de marcadores utilizados para el presente proyecto se muestran en la tabla 2.

<i>Marcador</i>	<i>Nombre</i>	<i>Descripción</i>
<i>ITS</i>	Espaciador Transcrito Interno	Fragmento de DNA espaciador, se ubica entre la subunidad mayor y menor del rRNA. De fácil detección. Alta tasa evolutiva. Alta variación. Usado en código de barras para la identificación de especies, así como en análisis filogenéticos.
<i>5.8S</i>	Subunidad 5.8S	Fragmento de rRNA no codificante, pertenece a la subunidad mayor.
<i>18S</i>	Subunidad menor (SSU) del rRNA 18S	Menor tasa evolutiva y variación de su secuencia que los ITS. Usada para identificar organismos a niveles taxonómicos como familia y género.
<i>28S</i>	Subunidad mayor (LSU) del rRNA 28S	Es el segundo más utilizado después de los ITS. Secuencias mayormente conservadas en comparación a los ITS. Útiles para identificaciones a nivel de familia y género.
<i>RPB</i>	RNA Polimerasa I y II	Complejo protéico que transcribe el DNA. Se divide en subunidad mayor (II) y menor (I). Son utilizados para identificar a nivel de especies. Su uso es de menor frecuencia y comúnmente se utilizan combinados con ITS.
<i>TEF</i>	Factor de Elongación 1-alfa (TEF1-alfa)	Proteínas involucradas en la traducción. Pueden identificar organismos a nivel de especie y sin utilizadas en combinación con ITS.
<i>TUB</i>	Gen codificante de tubulina	Es la tercer secuencia mayor utilizada para estudios de identificación de hongos, después de los ITS y las subunidades del rRNA. Son utilizados en combinación con los ITS e identifican secuencias de organismos a nivel de especie.

Tabla 2. Lista de biomarcadores característicos en la diferenciación de hongos (Badotti et. al. 2018)

Finalmente, se tomó como principal referencia los marcadores y la metodología de búsqueda propuesta por Badotti *et. al.* (2018), misma que fue modificada resultando en las consultas booleanas que se muestran en la Tabla 3 para la recopilación de secuencias de marcadores en NCBI. Por otra

parte, se consultó el Barcode of Life Data System (BOLD: [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) para complementar las secuencias de marcadores.

Marcador	Sintaxis de consulta booleana
<i>ITS</i>	(internal[Title] AND transcribed[Title] AND spacer[Title]) OR ITS1[title] OR ITS2[title] AND Fungi [Title]
<i>5.8S</i>	5-8S[Title] OR (small[Title] AND subunit[Title] AND Nombre del phylum[Title])
<i>18S</i>	18S[Title] OR (small[Title] AND subunit[Title]) AND Nombre del phylum[Title]
<i>28S</i>	28S[Title] OR (large[Title] AND subunit[Title]) AND Nombre del phylum[Title]
<i>RPB</i>	RPB[Title] OR RPB1[Title] OR RPB2[Title] AND Fungi [Title]
<i>TEF</i>	TEF1[Title] OR (TEF[Title] AND 1[Title]) OR EF-1alpha[Title] OR EF-1a[Title] AND Fungi [Title]
<i>TUB</i>	TUB2/BenA[Title] OR TUB2[Title] OR BenA[Title] OR Beta-tubulin[Title] AND Fungi [Title]

Tabla 3. Seis consultas booleanas utilizadas para buscar secuencias de biomarcadores moleculares de hongos seleccionados para este estudio en la base de datos de nucleótidos del NCBI

Una vez obtenidas las secuencias de organismos y marcadores para realizar la simulación, se realizó el programa bioinformático para el análisis e identificación de las secuencias. El programa trabaja actualmente solo con los marcadores *ITS* ya que son los marcadores más utilizados y recomendados para la identificación de secuencias. Dada una dirección de un archivo FASTA de la secuencia de un organismo el programa extrae los encabezados y secuencias del archivo y los guarda en un diccionario. Seguido de esto el programa construye otro diccionario para los marcadores con los que se trabajará. Después el programa busca en las secuencias del organismo subcadenas que coincidan con alguno de los marcadores que se están utilizando. De encontrar una subcadena que coincide el programa muestra en pantalla qué marcador encontró, en qué secuencia la encontró y el índice en la secuencia de nucleótidos en la que comienza. Por ahora el programa solo trabaja con 4 marcadores *ITS* del reino fungi. Los marcadores son los utilizados para identificar Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota y Ascomycota.

## Resultados:

## Discusion:

## Conclusiones:

## Referencias:

- Tesis: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/22898/An%C3%A1lisis%20metagen%C3%B3mico%20de%20hongos%20en%20suelos%20cultivados.pdf?sequence=3&isAllowed=y#:~:text=El%20estudio%20metagen%C3%B3mico%20muestra%20que,para%20as%C3%AD%20de%20esta%20manera>
- [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242020000401150](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242020000401150)
- [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532014000200009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000200009)

## Referencias para la lista de organismos:

- [https://www.gob.mx/semarnat/articulos/parque-nacional-el-chico#:~:text=La%20fauna%20es%20caracter%C3%ADstica%20de,\(Basileuterus%20belli\)%20entre%20otras.](https://www.gob.mx/semarnat/articulos/parque-nacional-el-chico#:~:text=La%20fauna%20es%20caracter%C3%ADstica%20de,(Basileuterus%20belli)%20entre%20otras.) (Especies del parque nacional El Chico)
- <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/bosqueNublado>
- <http://www.conabio.gob.mx/otros/cgi-bin/herbario.cgi> (catálogo de angiospermas)
- <https://www.gbif.org/es/dataset/b7010c1b-8013-4a3c-a43b-4309a91f9629> (catálogo de musgos)
- [https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/styles/rcg-guide-page-thumbnail/public/rapid-color-guides-thumbnails/939\\_1.png?itok=mJioh-Hp](https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/styles/rcg-guide-page-thumbnail/public/rapid-color-guides-thumbnails/939_1.png?itok=mJioh-Hp) (aves del bosque-veracruz)
- [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682017000200109](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682017000200109) (especies de microbiota del suelo)
- <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol29num3/articulos/Las-bacterias-del-suelo.html> (especies de microbiota del suelo)
- <https://www.naturalista.mx/> (especies de microbiota del suelo)
- [https://enciclovida.mx/busquedas/resultados?nivel=%3D&cat=7000&busqueda=avanzada&id=4&por\\_pagina=50](https://enciclovida.mx/busquedas/resultados?nivel=%3D&cat=7000&busqueda=avanzada&id=4&por_pagina=50)
- <https://enciclovida.mx/especies/4-fungi>
- <https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/micorr.htm#:~:text=Estas%20micorrizas%20se%20dan%20en,%2C%20leguminosas%2C%20mirt%C3%A1ceas%20y%20ros%C3%A1ceas.> (micorrizas)
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1870345314706797#:~:text=Las%20divisiones%20taxon%C3%B3micas%20de%20los,cuerpos%20fruct%C3%ADferos%3A%20peritecios%20y%20apotecios.> (líquenes)
- <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-mexicana-biodiversidad-91-articulo-biodiversidad-hongos-mexico-S1870345314706785> (diversidad de hongos mex)

#### Referencias para la lista de biomarcadores:

- Rodríguez-Tovar, A., Xoconostle-Cáarez, B., & Valdés, M., (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(3), 267-278.
- Rosenbland, M., Martín, M., Tedersoo, L., Ryberg, M., Larsson E, Wurzbacher C, Abarenkov K, Nilsson RH. (2016) Detection of signal recognition particle (SRP) RNAs in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer I (ITS1) of three lineages of ectomycorrhizae fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota). *Myckeys* doi: 10.3897/