



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Extracción de ADN genómico y amplificación de la
región ITS por PCR en el ascomicete marino**

Lulworthia grandispora

Nancy Saltos Rosero

Tesis de Grado presentada como requisito para la
obtención del Título de Bióloga

Guayaquil – Ecuador

2012

© **Derechos de autor**

Nancy Saltos Rosero

2012

Director de Tesis

Blgo. Rafael Becerra

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Extracción de ADN genómico y amplificación de la
región ITS por PCR en el ascomicete marino
*Lulworthia grandispora***

Nancy Saltos Rosero

**Dipl. Mirella Cadena Infante
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**Msc. Mónica Armas Soto
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Dpl. Ruth Choez de Quezada
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Abg. Jorge Solórzano Cabezas
SECRETARIO DE LA FACULTAD**

Guayaquil, Octubre 2012

DEDICATORIA

A mis padres, por creer siempre en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Blgo. Rafael Becerra, director de esta tesis, apoyo y guía permanente en el correcto desarrollo de la investigación.

Al Dr. Efrén Santos, director del área de biología molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), y al Dr. Washington Cárdenas del Laboratorio de Biomedicina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por haber brindado las facilidades para el desarrollo experimental de este trabajo.

Al Dr. Xavier Álvarez por iniciarme en el camino de la investigación científica en ascomicetes marinos y por transmitirme sus conocimientos.

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

Al personal de Laboratorio de Biotecnología por haber contribuido a mi desarrollo como investigadora y profesional.

A la Dirección de Investigaciones y Proyectos Académicos (DIPA) por haber sido la principal fuente de financiamiento en este trabajo.

RESUMEN

La obtención de ADN de alta calidad y concentración es importante en la biología molecular de hongos, siendo la estandarización de protocolos de extracción ADN una herramienta indispensable para aumentar la simplicidad y eficacia de dichos procesos. En el presente estudio se estandarizó un protocolo de extracción de ADN genómico y se estableció las condiciones para la amplificación de la región ITS del ADNr utilizando el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*, sentando así las bases para futuros estudios moleculares en ascomicetes marinos del Ecuador.

Se evaluaron y estandarizaron tres protocolos de extracción basados en extracción por CTAB (Protocolo A), SDS + phenol:cloroformo:isoamilalcohol (Protocolo B), y CTAB + PVP (Protocolo C). La concentración y pureza del ADN fue establecida a una absorbancia de 260/280 y 260/230. Para la amplificación de la región ITS se emplearon los primers específicos para hongos ITS1 – ITS4 e ITS1F – ITS4A, cada uno con un programa de PCR preestablecido, la amplificación fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez estandarizados, estos protocolos fueron aplicados en los ascomicetes marinos *Dactylospora haliotrepha*, *Aigialus grandis* y *NX0008*. Con los resultados obtenidos de las cuatro cepas de ascomicetes marinos se estableció como mejor protocolo de extracción el *Protocolo B*, que reportó una concentración y pureza promedio de 318.8 ng/μL y $A_{260/280}=1.7$; $A_{260/230}=1.2$.

La región ITS fue amplificada con el par de primers ITS1F – ITS4A, la amplificación se confirmó en gel de agarosa al 1% a 120 V y 400 mA durante 25 min, observándose bandas a una altura de 600 – 650 pb.

ABSTRACT

The obtaining of high quality and concentration DNA is important in the molecular biology of fungi, being the standardization of DNA extraction protocols an indispensable tool to increase the simplicity and effectiveness of these processes. In the present study we standardized a protocol for genomic DNA extraction and established the conditions for the amplification of the ITS region from rDNA, using the ascomycete *Lulworthia grandispora*, setting precedents for future molecular studies in marine ascomycetes from Ecuador.

Three extraction protocols were evaluated and standardized based on extraction by CTAB (Protocol A), + SDS phenol: chloroform: isoamylalcohol (Protocol B), and CTAB + PVP (Protocol C). The DNA concentration and purity was established at an absorbance of 260/280 and 260/230. DNA was amplified with fungal ITS primers ITS1 - ITS4 and ITS1F - ITS4A, each with a preset PCR program, amplification was assessed by electrophoresis on agarose gel at 1%.

Once standardized, these protocols were applied in the marine ascomycetes *Dactylospora haliotrepha*, *Aigialus grandis*, and NX0008. With the results of the four strains of marine ascomycetes was established as best extraction protocol: *Protocol B*, which reported a concentration and purity with an average of x 318.8 ng / μ L = 1.7 and $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ = 1.2.

The ITS region was amplified with the primer pair ITS1F - ITS4A, amplification was confirmed on agarose gel 1% at 120 V and 400 mA for 25 min, bands were observed at a height of 600 to 650 bp.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE GENERAL.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Generalidades de los hongos marinos.....	5
2.2 Caracterización de <i>Lulworthia grandispora</i>	8
2.2.1 Clasificación Taxonómica.....	8
2.2.2 Morfología.....	9
2.2.3 Hábitat y Distribución Geográfica.....	9
2.3 Aplicación de la biología molecular en la taxonomía de los hongos.....	10
2.3.1 Análisis de la región ITS del ADNr.....	12
2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13
2.3.3 Componentes de la reacción.....	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Cultivo y mantenimiento de ascomicetes marinos.....	18

	PÁGINA
5.1.1 Preparación de medios de cultivo.....	19
5.1.2 Inoculación de micelio en medio sólido y líquido.....	20
5.1.2.1 Inoculación en medio sólido.....	20
5.1.2.2 Inoculación en medio líquido.....	21
5.2 Protocolos de extracción y purificación de ADN.....	21
5.2.1 Protocolo A.....	21
5.2.2 Protocolo B.....	23
5.2.3 Protocolo C.....	24
5.3 Cuantificación de pureza del ADN extraído.....	26
5.3.1 Dilución del ADN extraído.....	27
5.4 Amplificación de la región ITS por PCR.....	27
5.4.1. Programas de PCR.....	29
5.5 Electroforesis.....	30
5.5.1 Comprobación del producto amplificado.....	30
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Extracción de ADN.....	32
6.2 Concentración y calidad del ADN.....	34
6.3. Amplificación y electroforesis.....	35
7. DISCUSIÓN.....	37
7.1 Extracción, concentración y pureza del ADN.....	37
7.2 Amplificación por PCR y electroforesis.....	41
8. CONCLUSIONES.....	44
9. RECOMENDACIONES.....	45

	PÁGINA
10. BIBLIOGRAFÍA.....	46
11. GLOSARIO.....	55
ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Fórmula del medio de cultivo PDB (1000 mL).....	19
Tabla 2. Fórmula del medio de cultivo PDA (1000 mL).....	19
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región ITS del ADNr de <i>Lulworthiagrandispora</i>	28
Tabla 4. Composición y concentración de reactivos de la mezcla para PCR, con un volumen final de 20 µL por reacción.....	29
Tabla 5. Composición de la solución stock de TAE 20X (pH 8.2).....	31
Tabla 6. Concentración y calidad del ADN de <i>Lulworthia grandispora</i> con los protocolos A, B y C.....	34
Tabla 7. Concentración y pureza del ADN extraído de <i>Aigialus grandis</i> , <i>Dactylospora haliotrepha</i> y <i>NX0008</i> con los protocolos A, B, y C.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

- Figura 1.** Morfología de los ascocarpos. **A)** Ascas desnudas. **B)** Cleistotecio mostrando la disposición de las ascas. **C)** Peritecio indicando las ascas y la paráfisis. **D)** Apotecio indicando las ascas y la Paráfisis.....59
- Figura 2.** Morfología de *Lulworthia grandispora*. **A)** Cuerpos fructíferos de una colonia de *Lulworthia grandispora*. **B)** Cuerpo fructífero mostrando el cuello y el ostiolo. Magnificación 4X. **C)** Ascosporas filiformes. Magnificación 10X. **D)** Ascospora mostrando la cámara cónica apical. Magnificación 100X. (Álvarez *et al.*, 2011).....60
- Figura 3.** Porción del ADNr mostrando la ubicación de la región ITS y 5.8S.....60
- Figura 4.** Preparación del extracto de papa para la preparación del Medio PDB. **A)** Obtención del peso de la papa. **B)** Ebullición de la papa en agua de mar. **C)** Filtrado del caldo. **D)** Ajuste del volumen a 1000 mL.....61
- Figura 5.** Colonias de *L. grandispora* a los 4 días de incubación.....61
- Figura 6.** **A)** Inoculación de un disco fúngico de *Lulworthia grandispora* en medio líquido PBD. **B)** Cultivos en la zaranda rotatoria a 120 rpm.....62
- Figura 7.** Medición de la concentración y pureza del ADN. **A)** Equipos y materiales empleados durante la medición. **B)** Muestra de ADN (2 µL) cargada en la placa. **C)** Placa cargada lista para

la medición.....	62
Figura 8. Amplificación por PCR. A) Estación de trabajo para PCR. B) Termociclador con las muestras listas para ser amplificadas.....	63
Figura 9. Programa de PCR para el par de primers ITS1F – ITS4A.....	63
Figura 10. Gel de agarosa 1%. A) Adición de la agarosa al TAE 1X. B) Gel más SYBR Safe. C) Proceso de solidificación del gel con los peines. D) Mezcla del producto de PCR con loading dye 6X. E) Carga del gel en la cámara de electroforesis. F) Programa de electroforesis en proceso.....	64
Figura 11. A) Equipo de fotodocumentación de geles. B) Gel insertado en el equipo para su análisis.....	65
Figura 12. Protocolo A estandarizado. A) Micelio lavado con agua destilada B) Vortex del micelio con el buffer de extracción. C) Incubación de las muestras. D) Sobre nadante (SN) que contiene el ADN. E) Pellet color blanco luego de la precipitación con acetato de amonio y etanol. F) Secado del pellet de ADN.....	65
Figura 13. Protocolo B estandarizado. A) Ruptura celular con esferas de metal. B) Agitación a 30 Hz. C) Muestras con una mezcla de fenol-cloroformo-isoamilalcohol. D) Formación de dos fases, el ADN se encuentra en la fase superior. E) Pellet de ADN luego de los lavados con etanol.....	66
Figura 14. Protocolo C estandarizado. A) Micelio sumergido en	

nitrógeno líquido. **B)** Agitación a 30 Hz. **C)** Incubación a 65°C.
D) Fases producidas por la extracción con fenol-cloroformo-
 isoamilalcohol. **E)** Lavado con etanol. **F)** Pellet de ADN.....67

Figura 15. Amplificación de la región ITS del ADNr de *Lulworthia grandispora* con los cebadores ITS1F-ITS4A e ITS1-ITS4 a una altura de 600 pb aproximadamente. Las letras A, B y C corresponden a los protocolos de extracción estandarizados.....68

Figura 16. Amplificación de la región ITS del ADNr de *Aigialus grandis*, *NX0008* y *Dactylospora haliotrepha* con los cebadores ITS1 – ITS4, bandas entre 600 – 650 pb aproximadamente. Las letras A, B y C corresponden a los protocolos de extracción estandarizados.....68

Figura 17. Amplificación de la región ITS del ADNr de *Aigialus grandis*, *NX0008* y *Dactylospora haliotrepha* con los cebadores ITS1F – ITS4A, bandas entre 600 – 650 pb aproximadamente. La flecha roja indica la presencia de una banda tenue con el protocolo C.....69

Protocolo A.....70

Protocolo B.....71

Protocolo C.....73

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los tres mayores hábitats de la biosfera, el marino cubre el 70% de la superficie de la Tierra, y provee un gran espacio habitable para los organismos, particularmente los microorganismos. Los microorganismos marinos han provisto las condiciones en la tierra para hacerla habitable para el resto de especies (Surajit *et al.*, 2006). Cientos de diferentes especies de bacterias, hongos y virus existentes en los ecosistemas marinos forman parte de la compleja red alimenticia microbiana. Estos microorganismos juegan roles altamente diversos en términos de ecología y bioquímica, en la mayoría de los ecosistemas (Thakur *et al.*, 2008).

El ecosistema de manglar provee un ambiente ecológico único para las comunidades microbianas. Bacterias y hongos (ascomicetes) ocupan varios nichos y son fundamentales para el funcionamiento de estos hábitats (Maria & Sridhar, 2003).

Los ascomicetes marinos poseen una función ecológica fundamental, especialmente en las zonas costeras y de manglar. Estos intervienen en la descomposición de todos los sustratos orgánicos, entre los que se encuentran los compuestos lignocelulósicos (Nambiar & Raveendran, 2009). Estos compuestos no pueden ser utilizados por otros organismos, y su acumulación puede causar un desequilibrio en diversos ecosistemas marinos (Gadd *et al.*, 2007). Por lo tanto, estos microorganismos contribuyen al reciclaje de los nutrientes, la

mineralización de las fuentes de carbono y al movimiento de materia y energía en el ambiente marino (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Liberra & Lindeguist, 1995). Las hojas caídas, flores, frutos, ramas pequeñas, corteza del tronco, todos proporcionan un sustrato idóneo para el crecimiento de los ascomicetes. De hecho, los ascomicetes son más efectivos como descomponedores, que las bacterias, ya que tienen la capacidad de penetrar los tejidos orgánicos (Medhi & Saifullah, 2000).

Los métodos tradicionales para estimar la biodiversidad han presentado fuertes limitaciones cuando se trata de microorganismos hiperdiversos, como son los micromicetos (hongos microscópicos). Mientras que existe abundante información sobre la fisiología y taxonomía de macromicetos (hongos macroscópicos) terrestres, la información disponible para micromicetos marinos es escasa (Valderrama *et al.*, 2006).

La aplicación de técnicas moleculares en biología marina ha empezado a ser considerada importante, y es utilizada como una herramienta potencial para la resolución de problemas asociados con el cambio climático global, biodiversidad, calidad del medio ambiente y el uso de los recursos marinos vivos (Molecular Biology in Marine Science, 1994).

Existen dos diferentes tendencias, estrictamente relacionadas, a través de las cuales la genómica puede transformar nuestro conocimiento y entendimiento de la biología marina:

1. La secuenciación del genoma completo (clave en los organismos).
2. El análisis parcial de la secuencia del genoma completo de una muestra medioambiental (Cary & Chisholm, 2001).

La secuenciación total del genoma de muchos organismos, es un área de investigación de rápido avance. En el mayor avance científico, los investigadores han decodificado el primer set completo de instrucciones genéticas de un microorganismo, que confirma la existencia de la tercera gran rama de la vida en la Tierra.

La taxonomía, hace relativamente poco tiempo, se basaba casi exclusivamente en los caracteres morfológicos para delimitar las especies o los diferentes niveles taxonómicos. Sin embargo, dichos caracteres presentan una serie de problemas asociados como es la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados, la laboriosidad de sus métodos de estudio y, en algunos casos, incluso la insuficiente resolución para la delimitación de los taxones (Guarro *et al.*, 1999).

Los métodos moleculares también han sido aplicados en la identificación y aislamiento de hongos, o para investigar hongos en muestras del medio ambiente (Anderson & Cairney, 2004). La identificación molecular de hongos se basa generalmente en el análisis del gen 18S del ADN ribosomal (ADNr) y en la región espaciadora del transcrito interno (ITS). Sin embargo, comparado con

los estudios realizados con bacterias marinas, existen muy pocos reportes que evalúen la aplicación de técnicas moleculares en el entendimiento de la biodiversidad de hongos ascomicetes marinos (Holley & Whitehead, 2006).

La región ITS contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes para ADNr de la subunidad grande (Gardes & Bruns, 1993).

Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2) (Iwen *et al.*, 2002).

El presente trabajo pretende estandarizar la extracción del ADN genómico y posterior amplificación de la región ITS del ascomiceto marino *Lulworthia grandispora*, especie que se encuentra descrita e identificada morfológica y taxonómicamente en el primer reporte de este tipo de organismos para Ecuador (Álvarez *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE LOS HONGOS MARINOS

La definición sobre hongos marinos ha sido objeto de polémica por diversos investigadores (Jones & Jennings, 1964; Jones, 1976; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Kohlmeyer y Kohlmeyer en 1979, propusieron la definición más completa y con vigencia actual: “Los hongos marinos obligados son aquellos que crecen y esporulan exclusivamente en hábitats marinos o estuarinos, los hongos marinos facultativos son aquellos de agua dulce y ambientes terrestres, capaces de crecer y posiblemente también esporular en el ambiente marino” (Hyde *et al.*, 1998).

El phylum Ascomycota es el grupo más grande del reino Fungi con aproximadamente 32 000 especies descritas en 3 400 géneros (Kirk *et al.*, 2001). Las cuatro características morfológicas relevantes para distinguir este grupo son (Spatafora *et al.*, 1998) (Figura 1):

1. Ascocarpo.- Aparato esporífero con ascas y ascosporas de los ascomicetes.
2. Centro.- Conjunto de estructuras fértiles y estériles del interior del ascocarpo.
3. Asca.- Célula especializada en la que se forman las ascosporas internamente.

4. Ascospora.- Espora sexual haploide que se forma en el interior del asca, usualmente como resultado de miosis (Ulloa & Hanlin, 2006).

La mayoría de las especies poseen ascocarpos con forma de frasco o peritecio. Se caracterizan por tener un ostiolo, que es un canal con un poro terminal que puede estar ubicado en una papila o en el cuello del ostiolo. Únicamente después de atravesar el canal ostiolar, es que las ascosporas se liberan al ambiente (Spatafora *et al.*, 1998).

La cavidad central o centrum es el sitio de producción de las ascas y ascosporas, y está inicialmente compuesto por una pared fina de células poligonales pseudoparenquimatosas. Este pseudoparénquima desarrolla cadenas de células estériles (catenophyses), las cuales se convierten en el asca o pueden desaparecer completamente en el peritecio maduro (Spatafora *et al.*, 1998).

El asca de la mayoría de los ascomicetes marinos es típicamente producida en un fascículo (haz de hifas) localizado en la región basal de la cavidad central (Spatafora *et al.*, 1998). De acuerdo a su estructura las ascas pueden ser: protunicada, unitunicada, bitunicada, fisitunicada, extenditunicada, astropaleana, anelada, hipodermatócea, pseudoperculada, operculada, lecanoraleana y verrucaroide (Ulloa & Hanlin, 2006).

En la mayor parte de las especies de ascomicetes marinos la pared del asca se desintegra anteriormente, o durante la maduración de las ascosporas. A este

proceso se denomina ascas evanescentes (Spatafora *et al.*, 1998). Las ascosporas son empujadas dentro del canal ostiolar del peritecio por la producción adicional de ascas y ascosporas, y en las especies de ascomicetes marinos intermareales pueden ser exudadas en una gota en la punta del cuello, y así ser dispersadas por el agua (Jones, 1995).

La pared de las ascosporas puede tener de dos a tres capas; la capa interna es denominada mesosporium, la capa media es el episporium, y la capa externa, ausente en algunos géneros, es el exosporium. A menudo las ascosporas con apéndices o cubiertas conspicuas son características de los ascomicetes marinos (Jones, 1995).

Los apéndices y cubiertas de las ascosporas derivan principalmente del episporium y/o del exosporium, y son específicos de cada género. Los apéndices de las ascosporas son adaptaciones al medio marino, estos le permiten incrementar el área superficial para su dispersión en el agua (apéndices flequillos) y adherirse al sustrato apropiado (estrías y rugosidades). La mayoría de los géneros tienen ascosporas elipsoidales o fusiformes con uno o muchos septos. Sin embargo hay géneros (*e.g.*, *Lindra* y *Lulworthia*) que poseen ascosporas largas y filiformes, con o sin septos dependiendo de la especie (Spatafora *et al.*, 1998).

2.2 CARACTERIZACIÓN DE *Lulworthia grandispora*

2.2.1 Clasificación Taxonómica

Phyllum: Ascomycota

Subphyllum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Lulworthiales

Familia: Lulworthiaceae

Género: *Lulworthia*

Especie: *grandispora*

El género *Lulworthia* que inicialmente fue considerado monotípico, actualmente se ha convertido en uno de los géneros con mayor número de especies (11 especies aceptadas) y con un número de otras taxa, cuyas diferencias morfológicas no son lo suficientemente pronunciadas para permitir una distinción (Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1991). Hasta ahora *Lulworthia* ha sido tratado como un género monofilético, sin embargo los estudios basados en el análisis del ADNr han demostrado que es parafilético (Kohlmeyer *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2002; Inderbitzin *et al.*, 2004).

2.2.2 Morfología

Ascocarpo de 155 - 290 μm de altura y 165 – 325 μm de diámetro, solitario o en grupo, subgloboso a piriforme, inmerso o superficial, ostiolado, papilado, color café claro a negro. Cuello de 50 – 1300 x 25 – 40 μm , cilíndrico, recto o curvo, café oscuro a negro, a veces se presentan dos cuellos en un ascocarpo. Paráfisis ausente. Asca con ocho esporas, elongada-fusiforme, unitunicada, pared fina, de rápida delicuescencia. Ascosporas de 400 – 570 μm x 4 – 6 μm (incluyendo la cámara cónica apical), filamentosas, curvadas, hialinas, disminuye en cada extremo y se alarga, cámara cónica apical, 4 – 8 μm de longitud, con mucosidad en el interior que es expulsada a través de un poro apical (Figura 2) (Meyers, 1957).

2.2.3 Hábitat y Distribución Geográfica

L. grandispora es una especie cosmopolita cuyo hábitat es esencialmente el manglar, se ha hallado en diversos tejidos de mangle como madera, hojas, frutos y semillas.

Los reportes de este ascomicete marino provienen de las siguientes locaciones: República de Seychelles (Aldabra), India (Islas Andamán, Nicobar), Australia, Bahamas, Belice, Estados Unidos de Norteamérica (Bermuda), Brasil, Egipto, Oceanía (Fiji), República de Ghana, Guatemala, China (Hong Kong, Taiwán), Indonesia, Japón, Kuwait, Liberia, Malasia, República de las

Maldivas, México, Perú, República de Filipinas, República de Trinidad y Tobago, República de Singapur, República de Sudáfrica , Reino de Tailandia (Meyers, 1957) y República del Ecuador (Álvarez *et al.*, 2011).

2.3 APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA TAXONOMÍA DE LOS HONGOS

La biología ha sufrido grandes cambios como resultado de los recientes avances en la biología molecular, ciencia que estudia la estructura química y los fenómenos biológicos a nivel molecular (Lindley & Tabery, 2005).

Los métodos moleculares que se basan en el análisis del ADN, se encuentran ampliamente disponibles para el análisis de comunidades microbianas. Aunque son utilizados con mayor frecuencia para el análisis de comunidades bacterianas, los métodos moleculares son igualmente eficaces para investigaciones relacionadas con la ecología fúngica (Bridge & Spooner, 2001).

Dicha revolución ha proporcionado técnicas para la identificación de un gran número de hongos. Este análisis incluye, la identificación de cepas y el linaje clonal dentro de una misma especie, además de la discriminación y clasificación de poblaciones, especies, géneros, familias, órdenes, clases e inclusive reinos y dominios (Xu, 2006).

Tradicionalmente la micología ha sido considerada como una subdisciplina de la botánica, pero el análisis filogenético del ADNr y de los genes codificadores de proteínas, sugieren que los hongos se encuentran más relacionados con los animales que con las plantas (Wainright *et al.*, 1993; Baldauf & Palmer, 1993; Berbee & Taylor, 2001; Lang *et al.*, 2002).

Mediante el análisis molecular se ha demostrado que eucariotas heterótrofos ubicados dentro de los hongos, como los mohos plasmodiales, celulares y mohos de agua (Myxomycota, Dictyosteliomycota, y Oomycota, respectivamente) se encuentran ahora fuera de dicho grupo. Al mismo tiempo algunos eucariotas unicelulares previamente clasificados como protistas han sido ubicados en el reino Fungi, incluyendo a *Pneumocystis carinii*, un peligroso patógeno para los humanos, y Microsporidia, un amitochondriado intracelular parásito de animales (Edman, *et al.*, 1988; Keeling, 2003).

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado hasta la fecha para resolver problemas taxonómicos, muchas ya están en desuso y otras, como el análisis filogenético con múltiples genes, se encuentran en pleno auge. Dentro de las técnicas moleculares clásicamente utilizadas para resolver la identidad de cepas morfológicamente similares podemos destacar la determinación del contenido guanina/citosina en el ADN nuclear (Kurtzman, 1994), o el grado de hibridación ADN-ADN (Vilgalys, 1988).

2.3.1 Análisis de la región ITS del ADNr

El ADNr se encuentran en forma de unidades repetidas dispuestas en tandem de hasta 200 copias por núcleo (Butler & Metzberg, 1989), se encuentra localizado en el cromosoma en la región de organización nucleolar (NORs, por sus siglas en inglés).

Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). También encontramos asociado a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS-1 y ETS-2) (Iwen *et al.*, 2002). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (Bruns *et al.*, 1991).

La secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (White *et al.*, 1990) (Figura 3).

White *et al.*, (1990) diseñaron y describieron iniciadores específicos (ITS1 e ITS4) para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nucleico de hongos, así mismo se han utilizado los primer ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4A (Larena *et al.*, 1999) para la identificación de especies dentro del phylum Ascomycota.

Entre las características convenientes para el análisis de las secuencias ITS en hongos, tenemos:

- La región ITS completa puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales.
- La naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr, hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aún cuando se utilicen muestras de ADN pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (ADN obtenido de material viejo y especímenes de herbarios).
- Finalmente, diversos estudios demuestran su utilidad en análisis filogenéticos (Álvarez & Wendel, 2003), (Gardes & Bruns, 1993).

2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular que fue desarrollada por Kary Mullis en 1985.

La idea básica de la técnica es sintetizar un gran número de copias de un fragmento específico de ADN utilizando una polimerasa que trabaja a altas temperaturas, como es el caso de la *taq* polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Eguiarte *et al.*, 2007).

La PCR se lleva a cabo en tres pasos:

1. *Desnaturalización* o separación de la cadena doble de ADN en dos cadenas simples.
2. *Anillamiento* de los iniciadores o primers en las cadenas originales para la síntesis de una nueva cadena.
3. *Extensión* de la nueva cadena a partir los iniciadores. La reacción es mediada por la ADN polimerasa y da como resultado la síntesis de la porción de ADN deseada (Delidow *et al.*, 1993).

Estas tres etapas de la reacción constituyen un ciclo, un protocolo de amplificación por lo general tiene de 30 – 50 ciclos. Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven como ADN blanco, y en unos pocos ciclos más, el producto predominante será el fragmento de ADN que corresponde a la distancia entre los iniciadores. Así la repetición de ciclos origina un número exponencial de secuencias amplificadas (Torres & Baca, 1995).

2.3.3 Componentes de la reacción

1. ADN Polimerasa: Es una enzima cuya temperatura óptima oscila alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estable a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C. La *taq* polimerasa es una proteína que consta de una sola

cadena polipeptídica con actividad de exonucleasa 5'→3' (Rodríguez & Barrera, 2004).

2. ADN Molde: ADN a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, la porción del ADN que queremos amplificar. Este ADN se conoce como ADN molde.

3. Primers: Son moléculas de entre 10 y 30 bases de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son las que van a delimitar el fragmento a amplificar.

4. Desoxirribonucleótidos: Las enzimas ADN polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde.

Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

3. HIPÓTESIS

La extracción de ADN genómico de calidad de *Lulworthia grandispora*, y la posterior amplificación por PCR de la región espaciadora del transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal (ADNr), permitirá estandarizar un protocolo que servirá de base para el estudio de otras especies de ascomicetes marinos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar técnicas de extracción de ADN genómico del ascomicete marino *Lulworthia grandispora* y la amplificación de la región espaciadora del transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal (ADNr) mediante PCR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar tres protocolos de extracción de ADN genómico para el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*.
2. Establecer la concentración y pureza del ADN extraído mediante espectrofotometría utilizando los rangos $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$.
3. Establecer el protocolo de PCR para la amplificación de la región ITS del ADNr de *Lulworthia grandispora*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa monospórica de *L. grandispora* (cepa aislada del manglar de Palmar - Provincia de Santa Elena) fue suministrada por el Banco de Cepas Fúngicas del Laboratorio de Biotecnología & Genética de la Facultad de Ciencias Naturales - Universidad de Guayaquil. Así mismo fueron suministradas las cepas de los ascomicetes marinos *Aigialus grandis*, *Dactylospora haliotrepha* y *NX0008*; cepas que fueron empleadas para comprobar la estandarización del protocolo de extracción y amplificación de la región ITS.

5.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ASCOMICETES MARINOS

La obtención del micelio de los ascomicetes ya mencionados se realizó mediante la inoculación de micelio (cepa monospórica) en medio líquido y sólido de Papa Dextrosa Caldo (PDB) preparado con agua de mar, suplementado con sulfato de estreptomycinina y penicilina (Tabla 1).

Con el fin de obtener cultivos con micelio fresco para la extracción de ADN se realizó el mantenimiento de las cepas en medio sólido Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con sulfato de estreptomycinina y penicilina (Tabla 2) e incubado a 30 °C.

Tabla 1. Fórmula del medio de cultivo PDB (1000 mL).

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

Tabla 2. Fórmula del medio de cultivo PDA (1000 mL).

Reactivo	Cantidad
PDA	39 g
Agua de mar	500 mL
Agua destilada	500 mL
Sulfato de estreptomicina	250 mg
Penicilina	250 mg

5.1.1 Preparación de medios de cultivo

PDB: En un vaso de precipitado con 500 mL de agua de mar filtrada con un filtro de celulosa (0.45 μ m), se colocaron 200 g de papa pelada y cortada en cubos, se llevó a ebullición durante 30 min. El extracto fue filtrado con gasa,

colocado en una probeta para medir su volumen, y llevado hasta un volumen final de 1000 mL con agua de mar filtrada (Figura 4., luego se añadió la dextrosa y se homogenizó. El pH fue medido y ajustado a 8.2 con KOH 1M.

PDA: En un matraz se agregaron 39 g de medio de cultivo PDA (CRITERION™) más 1 000 mL de agua de mar filtrada; el pH fue medido y ajustado a 8.2 con KOH 1M. Una vez ajustado el pH se llevó a ebullición durante 1 minuto.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 15 minutos. Posteriormente, dentro de la cabina de flujo laminar se agregaron 500 mg de sulfato de estreptomycin y 500 mg de penicilina.

El medio sólido fue dispensado en cajas de Petri (20 mL por caja) y el medio líquido en fiolas de 1 000 mL (500 mL por fiola).

5.1.2 Inoculación de micelio en medio sólido y líquido

5.1.2.1 Inoculación en medio sólido

A partir de una placa de Petri con medio de cultivo se extrajo un disco de PDA mediante un sorbete estéril, de la misma manera con el otro extremo se obtuvo un disco fúngico que fue colocado en el orificio de la placa de PDA. Las placas

fueron llevadas a incubación a 30 °C hasta el desarrollo de la colonia (Figura 5).

5.1.2.2 Inoculación en medio líquido

A partir de cultivos frescos de las cepas ya mencionadas se extrajo un disco fúngico de con un sorbete estéril utilizando la técnica descrita en el procedimiento anterior. El disco fúngico fue colocado en el matraz con el medio de cultivo líquido. El cultivo fue colocado en la zaranda rotatoria a 120 rpm, durante 10 días a temperatura ambiente (Figura 6).

5.2 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

5.2.1 Protocolo A

1. Se colectó el micelio aéreo directamente de la placa y fue colocado en un tubo de 1.5 mL.
2. En el tubo con micelio se agregaron 400 µL de buffer de extracción (1% hexadecyltrimethylamonium bromide (CTAB), 1M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA), mas vortex durante 1 minuto.

3. El tubo fue colocado en el microondas por 30 segundos (10 s-10 s-10s) a máximo poder, seguido por incubación en baño maría a 70 °C durante 15 min (Lee & Taylor, 1990).
4. En vez de tapar el tubo, este se envolvió con papel adherente para evitar la ebullición en el microondas.
5. Un volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1 v/v) fue añadido, se invirtió el tubo repetidamente.
6. Luego, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, y la fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 mL.
7. Se añadió medio volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto al tubo, seguido por incubación en hielo por 10 min.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C.
9. El pellet de ADN fue lavado con 100 µL de etanol al 70%, seguido por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min.
10. Finalmente se colocó el pellet de ADN en una corriente de aire y se resuspendió en buffer Tris-EDTA (pH 8.5) (Pang *et al.*, 2008).

5.2.2 Protocolo B

1. Se colectaron 200 – 500 mg de micelio directamente de la placa o del medio líquido en tubos de 1.5 mL.
2. El micelio fue suspendido en 500 µL de una solución conformada por: 0.1 M NaCl, 0.5 M Tris – HCl, (pH 8.0), y SDS 5 %.
3. Se añadieron 0.2 g de esferas de vidrio para romper la pared celular y se aplicó vortex durante 10 min a máxima velocidad. Seguido por centrifugación durante 10 min a 8 700 rpm.
4. El sobrenadante fue decantado en un nuevo tubo y se repitió el procedimiento de extracción.
5. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (24:24:1) más breve vortex y se centrifugó durante 5 min en una microcentrífuga.
6. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se realizó nuevamente la extracción con un volumen igual de cloroformo:isoamil alcohol (24:1).
7. Los tubos fueron agitados vigorosamente y centrifugados durante 5 min a 8 000 rpm.

8. La fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se añadieron 2.5 volúmenes de isopropanol para la precipitación del ADN.
9. Los tubos fueron refrigerados durante una hora y centrifugados a 4 °C por 10 min a 11 000 rpm.
10. Se lavó el pellet dos veces con etanol frío al 70 %, y se secó en una corriente de aire.
11. Se resuspendió el pellet en agua estéril deionizada.
12. Las muestras fueron tratadas con ARNasa (Plaza *et al.*, 2004).

5.2.3 Protocolo C

1. Se colectó 1 g de micelio (peso húmedo) y fue triturado con nitrógeno líquido.
2. Se agregaron 0.5 mL de buffer de extracción (Tris HCl 100 Mm, Na₄EDTA 20 mM, CTAB 2 % w/v, NaCl 1.4 M, PVP 1 % w/v) precalentado a 65°C más 100 µL de β-mercaptoetanol 1%.
3. La mezcla fue agitada vigorosamente e incubada a 65°C por 30 min.

4. Luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 mL.
5. Se agregó un volumen igual de fenol (pH 8.0):CHCl₃:isoamil alcohol (24:24:1 v/v), y se mezcló vigorosamente.
6. Los tubos fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 mL.
7. Un volumen igual de CHCl₃:isoamil alcohol (24:1) fue añadido, se mezcló y centrifugó por 10 min a 10 000 rpm.
8. El sobrenadante fue transferido en un tubo nuevo y se agregaron 200 µL de ARNasa (1 Mg mL⁻¹ stock). Seguido por incubación a 37 °C durante 30 min.
9. Se agregó un volumen igual de fenol (pH 8,0):CHCl₃:isoamil alcohol (25:24:1), y se mezcló vigorosamente. La centrifugación se realizó a 10 000 rpm durante 15 min.
10. Se retiró el sobrenadante en un tubo nuevo.

11. Se agregó un volumen igual de CHCl_3 :isoamil alcohol (24:1), y se mezcló vigorosamente. La centrifugación se realizó a 10 000 rpm durante 15 min.
12. El sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo, y se añadieron 2.5 volúmenes de isopropanol frío.
13. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C.
14. El pellet fue lavado con etanol al 70% previamente refrigerado.
15. Disolver en un volumen mínimo de agua destilada estéril.
16. Se almacenó a -20°C (van Burik *et al.*, 1998).

5.3 CUANTIFICACIÓN DE PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO

La concentración y pureza del ADN fue obtenida mediante espectrofotometría, a una absorbancia de 260 nm en el Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader.

Para medir la concentración y pureza del ADN, inicialmente se estableció el blanco colocando 2 μL del agua utilizada para la resuspensión del pellet de

ADN en cada una de las celdas del plato. Una vez establecido el blanco se secó las celdas y se colocaron 2 µL de la muestra de ADN a analizar (Figura 7).

La pureza se estableció empleando los rangos 260/280 nm y 260/230 nm. Los valores de ~1.8 fueron considerados como ADN “puro” para el rango 260/280 nm, y 1.5 – 2.0 para el rango 260/230 nm. Cualquier valor considerablemente por debajo de lo establecido fue indicio de contaminación por proteínas y carbohidratos y fenoles respectivamente.

5.3.1 Dilución del ADN extraído

Luego de obtener la concentración del ADN extraído con cada protocolo se tomó alícuotas de 100 µL de las muestras de ADN fueron diluidas en agua ultra pura hasta una concentración final de 40 ng/µL, para lo que se empleó la fórmula: $C_1V_1=C_2V_2$.

5.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS POR PCR

La amplificación de la región ITS completa (ITS1, ITS2) fue evaluada con los siguientes iniciadores o primers: ITS1-ITS4, ITS1-F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4-A (Larena et al., 1999) (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región ITS del ADNr de *Lulworthia grandispora*.

Cebador	Locus	Secuencia (5' → 3')
ITS₁	ITS ADNr	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS₄	ITS ADNr	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS₁-F	ITS ADNr	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS₄-A	ITS ADNr	CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf (Figura 8), en un volumen final de 20 µL compuesta por: 40 ng de ADN genómico, 0.5 µM de cada primer, 1X de PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de mezcla de dNTP, 0.5 unidades de Platinum DNA taq polimerasa, y agua ultra pura (Tabla 4).

Para comprobar la selectividad de los primers y establecer el tamaño aproximado de la región blanco se realizó el alineamiento con secuencias de *Lulworthia sp.* obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa de análisis genético MEGA 5.05.

Tabla 4. Composición y concentración de reactivos de la mezcla para PCR, con un volumen final de 20 μL por reacción.

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
PCR Buffer minus	2.0 μL	1 X
Mg		
dNTP`s mixture	0.4 μL	0.2 mM cada uno
MgCl ₂	0.6 μL	1.5 μM
Primer Mix	0.4 μL	0.5 μM cada uno
Platinum Taq	0.08 μL	0.5 unidades
H ₂ O	15.52 μL	-
ADN	1.0 μL	40.0 ng/ μL

5.4.1. Programas de PCR

Para cada par de primers se estableció un programa de PCR específico. Así tenemos: para el par ITS1F - ITS4A la desnaturalización inicial se realizó a 95 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 52 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C (Figura 9).

Para el par ITS1 - ITS4 la desnaturalización se realizó a 95 °C durante 2 min seguida por 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 45 s a 53 °C, 1 min 30 s a 72 °C y una extensión final durante 5 min a 72 °C.

5.5 ELECTROFORESIS

5.5.1 Comprobación del producto amplificado

La amplificación de la región ITS fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe.

El gel fue preparado de acuerdo al siguiente protocolo:

Se pesaron 300 mg de agarosa en la balanza analítica y fueron mezclados con 30 mL de buffer TAE 1X (Tabla 5), la mezcla se colocó en el microondas por periodos de 10 – 20 s hasta que la agarosa se disolviese por completo, y se agregaron 3 μ L de SYBR Safe. El gel fue vertido en la bandeja en donde se colocó el peine para la formación de los pocillos y se dejó solidificar durante 20 min en ausencia de luz, una vez solidificado el gel se retiró el peine formador de pocillos y fue colocada en la cubeta para electroforesis con buffer TAE 1X.

En cada pocillo del gel se colocó una mezcla de 7 μ L de producto de PCR, más 1.5 μ L de loading dye 6X. Se utilizó 4 μ L de marcador de 1 Kb en el primer pocillo para determinar el tamaño de los amplicones (Figura 10).

Tabla 5. Composición de la solución stock de TAE 20X (pH 8.2).

Reactivo	Concentración
Tris	0.04 M
Acetato	0.04 M
EDTA	1.0 Mm

Se evaluaron dos programas para electroforesis: 120 V y 400 mA durante 25 minutos y 200 V y 400 mA durante 30 minutos.

La visualización y fotodocumentación de las bandas en el gel se realizó con el sistema documentador de geles Gel Doc™ XR (Figura 11).

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACCIÓN DE ADN

En el presente trabajo se estandarizó tres protocolos de extracción de ADN utilizando el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*; los protocolos se basaron en métodos de extracción por CTAB (Protocolo A), SDS + phenol:cloroformo:isoamilalcohol (Protocolo B), y CTAB + PVP (Protocolo C) con el fin de establecer un protocolo de extracción general aplicable a otros ascomicetes marinos.

Como parte de la estandarización del protocolo A, el micelio no fue colectado directamente de la placa (paso 1), sino del cultivo líquido. Las colonias más pequeñas fueron extraídas del matraz con una pinza estéril, y colocadas en un tubo falcón estéril de 50 mL para ser lavadas con agua destilada estéril. Luego con una gasa se retiró la mayor cantidad posible de líquido de las colonias y se colocó en tubos de 1.5 mL para determinar su peso (200-300 mg). En lugar de colocar el tubo en el microondas e incubar durante 15 min (pasos 5, 6 y 7), se estableció un periodo de incubación en baño maría durante 20 min a 70°C (Figura 12). El pellet fue resuspendido en agua ultra pura en lugar del buffer Tris-EDTA (pH 8.5).

La modificación del protocolo B consistió en el lavado de 200 – 500 mg de micelio del medio líquido con agua destilada estéril (Paso 1). En lugar de

utilizar esferas de vidrio y el Vortex a máxima velocidad se emplearon esferas de acero estériles y el Mixer Mill a 30 Hz durante 2 min (Paso 3), además se redujo el tiempo de incubación a -20°C de 1 h a 10 min (Paso 9) (Figura 13).

Como parte de la estandarización del protocolo C el micelio fue lavado con agua destilada estéril y secado a 30°C durante 48 horas. En cada tubo se colocaron de 65 – 155 mg de micelio seco (Paso 1). La ruptura de la pared celular se realizó con esferas de acero estériles agitadas a 30 Hz durante 2 min (Paso 2) (Figura 14).

Se obtuvo pellets de ADN *L. grandispora* mediante los tres protocolos estandarizados, la apariencia del pellet en el protocolo A fue de color blanco translúcido, la del protocolo B de color blanco grisáceo y la del protocolo C presentó una coloración blanca con café claro en el centro. En la página 70 de los anexos se puede observar los protocolos estandarizados.

La aplicabilidad de los protocolos de extracción estandarizados fue comprobada con la obtención de pellets de ADN de los ascomicetes *Aigialus grandis*, *Dactylospora haliotrepha* y la cepa NX0008.

6.2 CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL ADN

Con los protocolos de extracción A, B y C estandarizados se obtuvo altas concentraciones de ADN de *L. grandispora* entre 283 – 894.5 ng/ μ L. Con el rango A_{260}/A_{280} se obtuvo valores desde 1.6 – 2.0 indicando ADN libre de proteínas, y de 1.3 – 1.6 para A_{260}/A_{230} , es decir, ADN contaminado con fenoles, sales u otros compuestos aromáticos.

La más alta concentración fue obtenida con el protocolo B (894.5 ng/ μ L), el ADN más puro con el protocolo C para $A_{260}/A_{280}= 1.9$ y el protocolo A para el rango $A_{260}/A_{230}= 1.6$. En la Tabla 6 se muestra los valores de concentración y calidad del ADN obtenido con cada uno de los protocolos de extracción estandarizados, y en la Tabla 7 los valores obtenidos con las cepas *A. grandis*, *D. haliotrepha* y *NX0008*.

Tabla 6. Concentración y calidad del ADN de *Lulworthia grandispora* con los protocolos A, B y C.

<i>Lulworthia grandispora</i>	ng/ μ L	260/280	260/230
Protocolo A	283	2	1.6
Protocolo B	894.5	1.6	1.5
Protocolo C	451.6	1.9	1.3

Tabla 7. Concentración y pureza del ADN extraído de *Aigialus grandis*, *Dactylospora haliotrepha* y *NX0008* con los protocolos A, B y C.

Ascomicete	Protocolo A			Protocolo B			Protocolo C		
	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
<i>Aigialus grandis</i>	451.6	1.9	1.9	112.5	2.2	1.1	53.9	1.4	1.5
<i>Dactylospora haliotrepha</i>	17.2	1.2	0.3	208.7	1.9	1.4	117.6	1.7	0.6
<i>NX0008</i>	72.2	1.6	0.8	59.6	1.1	0.8	536.8	1.7	0.8

6.3. AMPLIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS

No fue necesaria la modificación del programa de PCR establecido en la metodología para el par de cebadores IT1 – ITS4, en el programa para ITS1F – ITS4A se ajustó el periodo de extensión final de 10 min a 2 min. La amplificación de la región ITS fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe a 120 V y 400 mA durante 25 minutos.

El tamaño esperado del amplicón no pudo ser establecido de manera confiable puesto que en la base de datos del NCBI únicamente se encontraron secuencias parciales de la región ITS del ADNr de *L. grandispora* que oscilaban entre los 522 – 546 pb. Al realizar el alineamiento de los primers con dichas secuencias se obtuvo como estimado una media de 384 pb.

El ADN obtenido de *L. grandispora* con los tres protocolos estandarizados permitió la amplificación de la región ITS completa utilizando los cebadores ITS1-F (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') e ITS4-A (5'CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG 3'), mientras que con los iniciadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') solo se obtuvo amplificación con el ADN de los protocolos B y C. El tamaño de la región ITS del ADNr de *L. grandispora* fue de 600 pares de bases para los tres protocolos de extracción (Figura 15).

Mediante los cebadores ITS1 – ITS4 se comprobó la amplificación de la región ITS utilizando el ADN de *A. grandis* y *NX0008* obtenido con los protocolos A, B y C observándose bandas de 600 a 650 pb, y la de *D. haliotrepha* con los protocolos A y B con una banda tenue a una altura de 600 pb (Figura 9).

Con los cebadores ITS1F – ITS4A se observó el mismo resultado para *A. grandis* y *NX0008* mientras que para *D. haliotrepha* se observó una banda tenue en el protocolo C (Figura 10).

7. DISCUSIÓN

7.1 EXTRACCIÓN, CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN

La obtención de ADN de alta calidad y concentración es importante en la biología molecular de Hongos, siendo la estandarización de protocolos de extracción ADN una herramienta indispensable para aumentar la simplicidad y eficacia de dichos procesos.

En el presente estudio se observó que la concentración y pureza del ADN de *L. grandispora* con los tres protocolos estandarizados fue alta a pesar de haber presentado valores bajos de $A_{260/230}$ con el protocolo C. Sin embargo cuando los protocolos fueron aplicados en *A. grandis*, *D. haliotrepha* y *NX0008* la concentración y pureza variaron notablemente.

Jin *et al.*, 2004 y Moslem *et al.*, 2010 señalan que al realizar estudios con diversos tipos de hongos se debe emplear una amplia gama de estrategias para la extracción del ADN, las cuales van a diferir de acuerdo a la especie y el subsecuente uso que se le dé al ADN.

Los métodos de extracción se realizan en tres grandes pasos: disrupción celular, extracción y purificación del ADN, pero previo a estos pasos es necesario seleccionar las condiciones de cultivo y el método de procesamiento del micelio, puesto que no todas las cepas de hongos se desarrollan igual.

El crecimiento de hongos se da rutinariamente en medio sólido, pero el agar complica la extracción de ADN (Seifert, 1994), es por esto que la preparación de los hongos para la extracción del ADN típicamente involucra el crecimiento de cultivos en medio líquido ya sea en Erlenmeyers, botellas o inclusive en tubos de microcentrífuga (Cenis, 1992).

Tomando estos datos en consideración y, añadiendo el lento crecimiento y ausencia de esporulación de las cepas en medio sólido, se estableció como primer paso previo la inoculación en medio líquido para los tres protocolos. El siguiente paso fue el lavado del micelio colectado para eliminar cualquier sustancia que pudiera interferir con la extracción, como sales del medio de cultivo o compuestos producidos por el hongo marino.

La ruptura de la pared celular, la extracción y purificación del ADN se realizaron por distintos métodos, con el protocolo A estandarizado se utilizó el CTAB e incubación a 70°C como agentes disruptores, cloroformo-isoamil alcohol para la desproteinización, acetato de amonio para la precipitación del pellet y etanol frío para la purificación del ADN, este método permitió obtener altas concentraciones de ADN puro en *L. grandispora* y *A. grandis*, y altas concentraciones de ADN libre de proteínas pero contaminado con fenoles u otros compuestos orgánicos en *NX0008*, y en *D. haliotrepha* se obtuvo baja concentración y pureza.

En este protocolo el uso del cloroformo-isoamil alcohol fue la clave para la desnaturalización de las proteínas y la remoción de lípidos (Madriz & Peraza, 2005), mientras que la remoción de fenoles y otros compuestos orgánicos no fue del todo posible como ya se ha reportado en otros estudios que emplean el método de extracción por CTAB (Demeke *et al.*, 2009).

En el protocolo B la utilización del buffer de extracción con SDS más esferas de metal, y agitación a alta frecuencia fueron suficientes para romper la pared celular, desnaturalizar proteínas y obtener las más altas concentraciones de ADN de las cuatro cepas evaluadas, en comparación con los otros dos protocolos.

La extracción se basó en una mezcla de fenol-cloroformo-isoamil alcohol para la desproteinización, seguido por cloroformo-isoamil alcohol para la remoción de residuos de fenol. Luego se empleó isopropanol frío (-20°C) el cual deshidrata el ADN haciendo que precipite (Mygind *et al.*, 2003), seguido por un corto periodo de incubación a -20°C, puesto que en ensayos anteriores se observó que la apariencia o la concentración de ADN no dependía del periodo de incubación, reduciendo así el tiempo de duración del protocolo en 50 min.

Los dos lavados con etanol no fueron suficientes para eliminar restos de sales o fenoles en el pellet. Si bien este protocolo permitió obtener altas concentraciones de ADN en todas la cepas, solo *L. grandispora* presentó valores óptimos en todos los parámetros evaluados, mientras que las otras tres

cepas resultaron contaminadas con fenoles u otros compuestos aromáticos. *D. haliotrepha* y *A. grandis* resultaron libres de proteínas siendo *NX0008* el único que presentara este tipo de contaminación.

Durante el desarrollo del protocolo C fue imposible triturar el micelio húmedo como sugería el protocolo por lo que se empleó micelio seco. La mayoría de protocolos de extracción de ADN de hongos filamentosos recomiendan utilizar micelio seco debido a que facilita el rompimiento de las células (Van Burik *et al.*, 1998; Dávila *et al.*, 2001; Möller *et al.*, 1992).

Sin embargo el proceso de secado aumenta la posibilidad de contaminación de la muestra y la degradación del ADN (Van Burik *et al.*, 1998; Rogstad, 1992), aspecto que no se vio reflejado en la concentración o amplificación de ninguna de las muestras.

El buffer de extracción del protocolo C en base a CTAB y PVP está diseñado para provocar lisis celular con el CTAB y para remover polifenoles mediante la formación de puentes de hidrógeno con estas moléculas, separándolas del ADN por centrifugación (Kim *et al.*, 1997).

Una de las desventajas de este protocolo es su laboriosidad ya que incluye dos pasos con fenol-cloroformo-isoamil alcohol y dos con cloroformo-isoamil alcohol, cada uno de ellos con periodos de centrifugación que suman en total 50 min, además de ser compuestos altamente tóxicos y costosos. A pesar de que se consiguió altas concentraciones de ADN en todas la cepas, únicamente

A. grandis resultó libre de contaminación por fenoles y compuestos aromáticos pero con una ligera contaminación por proteínas.

El hecho de que las concentraciones variaran notablemente entre algunas cepas con el mismo protocolo indica que la estructura de la pared celular influye en la extracción de ADN genómico, esto es consistente con lo reportado con otros investigadores, Moslem *et al.*, 2010 afirma que la pared celular de algunas especies de hongos como los cladosporoides (ascomicete) impide la extracción debido a sus paredes.

7.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR Y ELECTROFORÉISIS

Los primers ITS1-ITS4 diseñados por White *et al.*, 1990 son considerados como universales para la amplificación de la región ITS del ADNr de hongos, siendo empleado por la mayoría de los micólogos (Gardes & Bruns, 1993).

Al ser considerados universales existen protocolos de PCR ya estandarizados, en el presente estudio se demostró la eficacia de este par de primers con el protocolo establecido ya que se observó bandas en todas las cepas, aunque no en todos los protocolos. La ausencia de bandas de amplificación en *L. grandispora* (protocolo A) y *D. haliotrepha* (Protocolo C), indican la presencia de productos inhibidores de PCR en el ADN extraído con esos dos protocolos en estas dos cepas en particular.

El tamaño del amplicón esperado (384 pb) no coincidió con el tamaño de las bandas obtenidas por electroforesis luego de la PCR (600 – 650 pb), sino que más bien se acercó al tamaño de las secuencias parciales del ITS del ADNr encontradas en la base de datos (522 – 545 pb).

Fujita *et al.*, 2001 analizaron la región ITS de 45 cepas de hongos con los primers ITS1 – ITS4 y encontraron fragmentos de 350 – 880 pb, demostrando la alta variabilidad de la región ITS a nivel de género y especie. Esto se observó claramente con los primers ITS1-ITS4 e ITS1F-ITS4A en la cepa *D. haliotrepha* que se encontró por debajo de los 650 pb, a diferencia de los 600 pb observados en las otras tres cepas.

Con el par de primers ITS1F-ITS4A se obtuvo los mejores resultados en cuanto a definición de bandas y verificación de la calidad del ADN, debido a que este par ha sido desarrollado específicamente para la identificación de miembros del Phylum Ascomycota (Larena *et al.*, 1999).

La alta especificidad de estos primers permitió identificar bandas más intensas en el gel que las observadas con ITS1-ITS4, tal es el caso de *D. haliotrepha* (protocolo C) en la que se observó una banda tenue que al encontrarse a la misma altura de A y B (Figura X) se descarta como falso positivo. En cuanto a la calidad la cepa *NX0008* (protocolo C) mostró señales de degradación del ADN al encontrarse a una altura diferente que A y B, y presentar un barrido.

La amplificación de las cepas que presentaron baja pureza sugiere que al menos para este tipo de estudio el protocolo de extracción B y los primers ITS1F – ITS4A proporcionan la cantidad, pureza y especificidad suficientes.

8. CONCLUSIONES

1. De los tres protocolos de extracción estandarizados el protocolo B fue el mejor para *L. grandispora*, puesto que permitió obtener una concentración alta de ADN genómico (894.5 ng/μL) de buena calidad con valores de $A_{260/280} = 1.6$ y $A_{260/230} = 1.5$, estos valores se encuentran dentro de lo establecido para la determinación de un ADN de buena calidad.
2. Las concentraciones de reactivos y condiciones establecidas en el protocolo de PCR para el par de primers ITS1F – ITS4A permitieron la amplificación de la región ITS del ADNr de *L. grandispora* observándose bandas de aproximadamente 600 pb.
3. Fue posible comprobar de manera eficiente la estandarización de protocolos de extracción de ADN, el establecimiento de las condiciones y el programa de PCR para el par de primers ITS1F – ITS4A al aplicar dichas técnicas en las cepas *D. haliotrepha*, *A. grandis* y *NX0008*, quedando así sentadas las bases para futuros estudios moleculares en ascomicetes marinos.

9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con los estudios moleculares para el análisis taxonómico de los ascomicetes marinos del Ecuador, y el desarrollo de diferentes tipos de marcadores moleculares para la realización de investigaciones más específicas en este grupo de microorganismos.

10. BIBLIOGRAFÍA

AL-SAMARRAY, T. and SCHIMID, J., 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 53-56.

ÁLVAREZ, I. and WENDEL, J., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 417 – 434.

ÁLVAREZ, X., SALTOS, N. y CÁRDENAS, W., 2011. Primer reporte de Ascomicetos marinos en Ecuador. Revista Digital del VI Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2011 – ISSN 1390-4663.

ANDERSON, I., and CAIRNEY, J., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environment Microbiology*, 6, 769 – 79.

BALDAUF, S. and PALMER, J., 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives-congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90, 1558 – 1562.

BERBEE, M., and TAYLOR, J., 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin, and P. A. Lemke [eds.], *The Mycota*, vol. 7B, Systematics and evolution, 229–245 pp. Springer-Verlag, New York, USA.

BRIDGE, P., and SPOONER, B., 2001. Soil fungi diversity and detection. *Plant Soil*, 232, 147 – 154.

BRUNS, T., WHITE, T. and TAYLOR, J., 1991. Fungal Molecular Systematics, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 22, 525 – 564.

- BUTLER, D., and METZENBERG, R., 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics*, 122, 783 – 791.
- CAMPBELL, J., SHEARER, C., MITCHELL, J., and EATON, R., 2002. *Corollospora* revisited: a molecular approach. *Fungal Diversity*, 15 – 33.
- CARY, S., and CHISHOLM, S., 2001. Ecological genomics: the application of genomic sciences to understanding the structure and function of marine ecosystems. Report, NSF workshop on Marine Microbial Genomics. University press. 1 – 20.
- CENIS, J., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380.
- DÁVILA, M., ZAMBRANO, K and CASTILLO, M., 2001. Uso de la técnica RAPD para la identificación de fragmentos de ADN posiblemente relacionados con virulencia en hongos entomopatógenos. *Bioagro*, 13(3): 93 – 98.
- DELIDOW, B., LYNCH, J., PELUSO, J. and WHITE, A., 1993. Polymerase chain reaction: Basic protocols. *Methods in molecular biology*, 15, 1 – 30.
- DEMEKE, T., RATNAYAKA I., and PHAN, A., 2009. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *AOAC International*, 92(4): 1136 – 1144.
- EDMAN, J., KOVACS, j., MASUR, H., SANTI, D., ELWOOD, H. and SOGIN, M., 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334: 519–522 pp.

- GONZÁLEZ, G. y AGUIRRE, D., 2007. Inter Simple Sequence Repeats. 567 – 571, en EGUIARTE, E., SOUZA V. y AGUIRRE, X. (comp). *Ecología Molecular*. INE, SEMARNAT y CONABIO. 594.
- FUJITA, S., SENDA, Y., NAKAGUCHI, S. and HASHIMOTO, T., 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Clinical Microbiology*, 39(10).
- GADD, G., WATKINSON, S. and Dyer, P., 2007. *Fungi in the Environment*. 1ra. ed. New York, Cambridge University Press. 408.
- GARDES, M. and BRUNS, T., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113 – 118.
- GUARRO, J., GENÉ, J. and STCHIGEL, A., 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology*, 12: 454 – 500.
- HOLLEY, P. and WHITEHEAD, M., 2006. The genetics and molecular biology of marine fungi. *Mycologist*, 20: 144 – 151.
- HYDE, K., JONES, E., LEAÑO, E., POINTING, S., POONYTH, A. and VRIJMOED, L., 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 7: 1147–1161.
- INDERBITZIN, P., LIM, S., VOLKMANN-KOHLMEYER, B. and KOHLMEYER, J., 2004. The phylogenetic position of *Spathulospora* based on DNA sequences from dried herbarium material. *Mycological Research*, 108: 737 – 748.

- IWEN, P., HINRICHS, S. and RUPP, M., 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40: 87 – 109.
- JIN, J., LEE, Y., WICKES, B., 2004. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Cinical Microbiology*. 42(9): 4293 – 4296.
- JONES, E. and JENNINGS, D., 1964. The effect of salinity on the growth of marine fungi in comparison with non-marine species. *Transactions of the British Mycological Society*. 47, 619-25.
- JONES, E., 1995. Ultrastructure and taxonomy of the aquatic ascomycetous Order Halosphaeriales. *Canadian Journal of Botany*, 73 (suppl. 1): S790-S801.
- JONES, E., 1976. Lignicolous and alguicolous fungi. In: Recent advances in aquatic mycology (ed. E.B.G. Jones), Paul Elek (Scientific Books) Ltd., London, UK, 1 – 49.
- KEELING, P., J., 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 298 – 309.
- KIRK, P., CANNON, P., DAVID, J. and STALPERS, J. (Eds.), 2001. Dictionary of the Fungi (9th ed.) Wallingford, UK: CABI Publishing.
- KOHLMEYER, J., and KOHLMEYER, E., 1979. Marine mycology: the higher fungi, New York: Academic Press.
- KOHLMEYER, J. and VOLKMANN-KOHLMEYER, B., 1991. Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina*, 34: 1 – 61.

KOHLMEYER, J., SPATAFORA, J., and VOLKMANN-KOHLMEYER, B., 2000. Lulworthiales, a new order of marine Ascomycota. *Mycologia*, 92: 453 – 458.

KURTZMAN, C., 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13): 1727-1740.

LANG, B., O'KELLY, C., NERAD, T., GRAY, M. and BURGER, G., 2002. The closest unicellular relative of animals. *Current Biology*, 12, 1773 – 1778.

LARENA, I., SALAZAR, O., GONZALES, V., JULIAN, M. and RUBIO, V., 1999. Design of primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75: 187 – 194.

LEE, S. and TAYLOR, J., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M., D. H. Gelfand, J. J. SNINSKY & T. J. WHITE (eds.), *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., USA. 282 – 287.

LIBERRA, K. and LINDEQUIST, U., 1995. Marine fungi: a prolific resource of biologically active natural products?. *Pharmazie*, 50, 553-555.

LINDLEY, D., and TABERY, J., 2005. Molecular biology. In: Zalta Edward N, editor. The Stanford Encyclopedia of Philosophy; available online at Molecular Biology (<http://plato.stanford.edu/entries/molecular-biology/>).

MADRIZ, K., PERAZA, J., 2005. Manual de Laboratorio Biología Molecular. Escuela de Biología. Instituto tecnológico de Costa Rica, 49.

MARIA, G. and SRIDHAR, K., 2003. Diversity of filamentous fungi on woody litter of five mangrove plants species from the southwest coast of India. *Fungal Diversity*, 14: 109-126 pp.

- MEDHI, F., and SAIFULLAH, S., 2000. Species Diversity and Seasonal Occurrence of Fungi on Seedlings of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3(2): 265-268.
- MEYERS, S., 1957. Taxonomy of marine Pyrenomycetes. *Mycologia*, 49(4): 475 – 528.
- Molecular biology in marine science, 1994. Scientific questions, technological approaches and practical implications. Committee on Molecular Marine Biology, Ocean Studies Board, National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press; (<http://www.nap.edu/catalog>).
- MÖLLER, E., BAHNWEIG, G., SANDERMANN, H. and GEIGER, H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic acids research*. 20(22): 6115 – 6116.
- MOSLEM, M., BAHKALI, A., ABD-ELSALAM, K. and WIT, P., 2010. An efficient method for DNA extraction from Cladosporioid fungi. *Genetics and Molecular Research*, 9: 2283 – 2291.
- MOSLEM, M., BAHKALI, A., ABD-ELSALAM, K., WIT, P., 2010. An efficient method for DNA extraction from Cladosporioid fungi. *Genetics and Molecular Research*. 9(4): 2283 – 2291.
- MYGIND, T., OSTERGAARD, L., BIRKELUND, S., LINDHOLT, J. and CHRISTIANSEN, G., 2003. Evaluation of five DNA extraction methods for purification of DNA from atherosclerotic tissue and estimation of prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in tissue from a Danish population undergoing vascular repair. *BMC Microbiology*, 3:19.

NAMBIAR, R. and RAVEENDRAN, K., 2009. Manglicolous Marine Fungi of Kerala (South India). *Botany Research International*, 2(3): 206 – 210.

PANG, K., JONES, E. y VRIJMOED, L., 2008. Autecology of *Antenospora* (Fungi: Ascomycota: Sordariomycetidae: Halosphaeriales) and ITS phylogeny. *The raffles bulletin of zoology*, 19: 1 – 10.

PLAZA, G., UPCHURCH R, BRIGMON, R., WHITMAN, W. and ULFIG, K., 2004. Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish journal of environmental studies*, 13(3): 315 – 318.

RODRÍGUEZ, I. y BARRERA, S., 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *CIENCIA UANL*, 7 (3): 323-335.

ROGSTAD, S., 1992. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analysis. *Taxon*. 41(4): 701 – 708.

SEIFERT, K., 1994. A novel method of growing fungi for DNA extraction. *Fungal Genetic Newsletters*, 41: 79 – 80.

SPATAFORA, J., KOHLMAYER, B. and KOHLMAYER, J., 1998. Independent terrestrial origins of the Halosphaeriales (Marine Ascomycota), Department of Botany and Plant Pathology – Oregon State University – Institute of Marine Sciences – University of North Carolina.

SURAJIT, D., LYLA, P., and AJMAL KHAN, S., 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10): 1325 – 1335.

- THAKUR, N., JAIN, R., NATALIO, F., HAMER, B., THAKUR, A. and MÜLLER, W., 2008. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. *Biotechnology Advances*, 26(3) 233 – 245.
- TORRES, A. y BACA, B., 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 3(23): 16 – 124.
- ULLOA, M. y HANLIN, R. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Minnesota, APS PRESS, 2006. 672 p.
- VALDERRAMA, B., LOZA, M., MARTÍNEZ, F., GASTEAZORO, F., RODRÍGUEZ, R., DANTÁN, E., MENDOZA, A. y FOLCH, J., 2006. Biodiversidad de hongos acuáticos en México: Un enfoque metagenómico. Instituto de Biotecnología – UNAM – México.
- Van BURIK, J., SCHRECKHISE, R., WHITE, T., BOWDEN, R. and MYERSON, D., 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*, 36(5): 299 – 303.
- VILGALYS, R., 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology*, 78: 698 – 702.
- WAINRIGHT, P., HINKLE, G., SOGIN, M. and STICKEL, S., 1993. Monophyletic origins of the Metazoa: “an evolutionary link with fungi.” *Science*, 260: 340 – 342.
- WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. En:

PCR protocols: a guide to the methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds.), Academic Press. New York. USA.

XU, J. Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analyses
Department of Biology. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(2): 75 – 89.

11. GLOSARIO

18S = Gen que codifica el ARNr de 1 900 nucleótidos que forma parte de la SSU del ribosoma eucariota.

28S = Gen que codifica el ARNr de 4 700 nucleótidos que forma parte de la LSU del ribosoma eucariota.

5.8S = Gen que codifica el ARNr de 160 nucleótidos que forma parte de la LSU del ribosoma eucariota.

ADN= Ácido desoxirribonucleico.

ADNr = Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

Ascomicete= Grupo de hongos que se caracteriza por formar ascas (Ascomycetes). Este término se emplea aquí como nombre genérico y no como de clase taxonómica, por lo que se escribe con *i*, y no con *y*.

ARNasa = Abreviatura de ribonucleasa, es una enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

ARNr = Ácido Ribonucleico ribosomal.

dNTP's= Desoxirribonucleótidos.

EDTA= Di-sodio etilenediaminetetra-acetato· 2H₂O.

g= Gramos.

h= Horas.

Hz = Unidad de frecuencia electromagnética.

IGS = Espaciador intergénico.

ITS = Espaciador del Transcrito Interno.

LSU = Subunidad grande del ribosoma eucariota (60S)

mA = Miliamperio, unidad de intensidad eléctrica.

nm = Nanómetro, unidad de longitud.

Monofilético = Un grupo es monofilético si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común.

Parafilético = Un grupo es parafilético cuando incluye al antepasado común de sus miembros, pero no a todos los descendientes de este.

pb = Pares de bases.

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PDA = Agar Papa Dextrosa.

Pellet = Botón de ADN.

PVP = Polivinilpirrolidona.

SDS = Dodecilsulfato sódico.

SSU = Sub unidad pequeña.

TAE = Tris-acetato-EDTA.

Tris-HCl = Tris(hidroximetil)amilometano.

V = Voltio.

ANEXOS

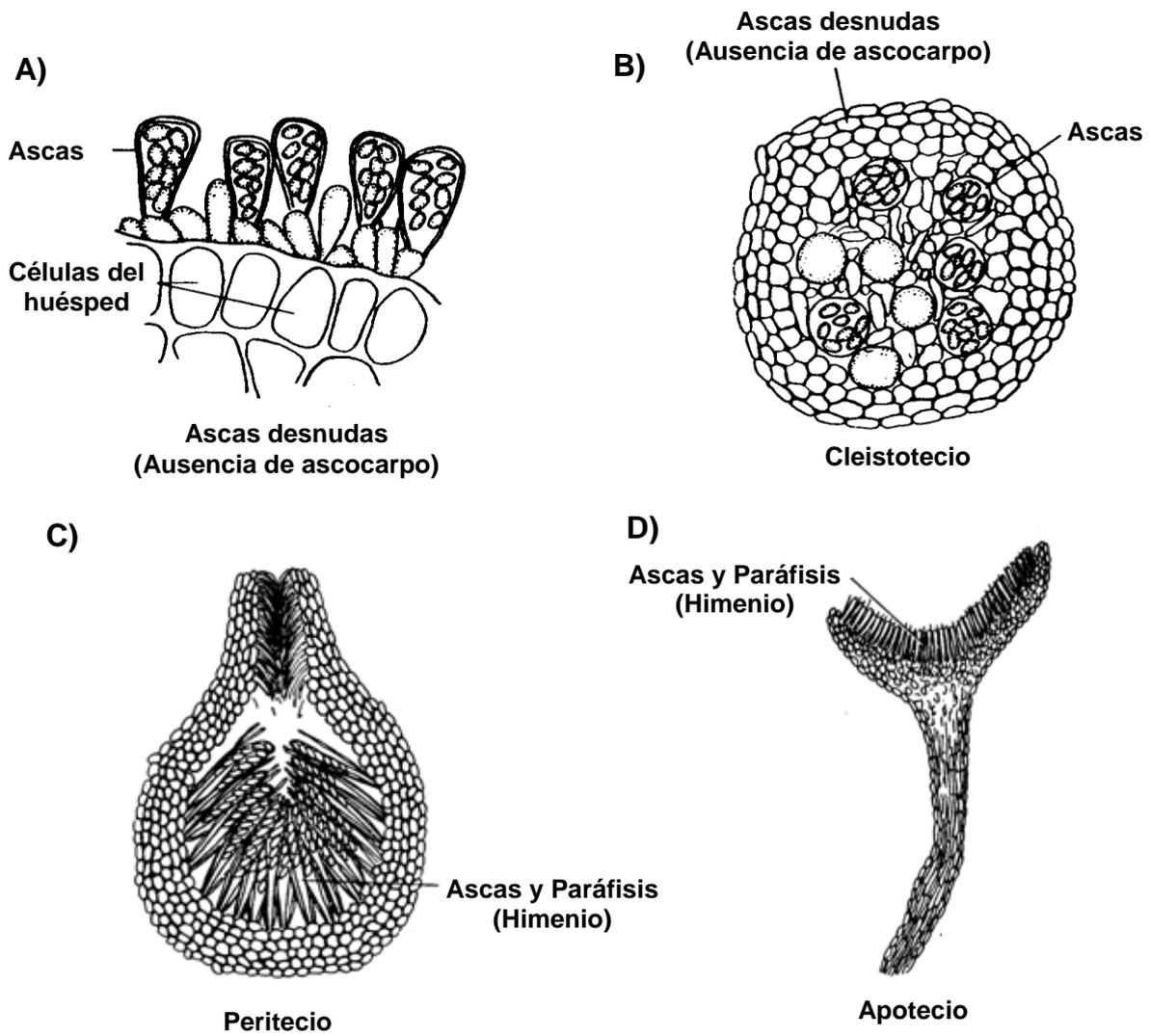


Figura 1. Morfología de los ascocarpos. **A)** Ascas desnudas. **B)** Cleistotecio mostrando la disposición de las ascas. **C)** Peritecio indicando las ascas y la paráfisis. **D)** Apotecio indicando las ascas y la paráfisis.

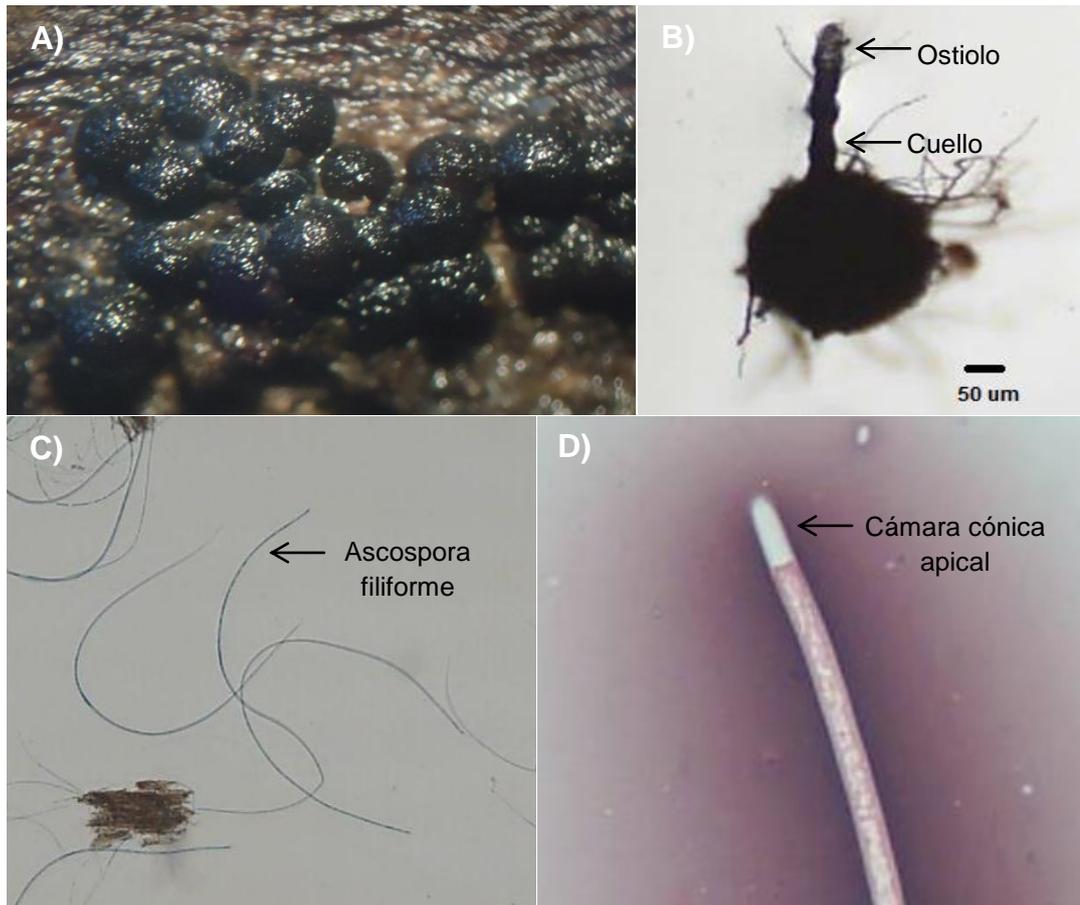


Figura 2. Morfología de *Lulworthia grandispora*. **A)** Cuerpos fructíferos de una colonia de *Lulworthia grandispora*. **B)** Cuerpo fructífero mostrando el cuello y el ostiolo. Magnificación 4X. **C)** Ascosporas filiformes. Magnificación 10X. **D)** Ascospora mostrando la cámara cónica apical. Magnificación 100X. (Álvarez *et al.*, 2011).



Figura 3. Porción del ADNr mostrando la ubicación de la región ITS y 5.8S.

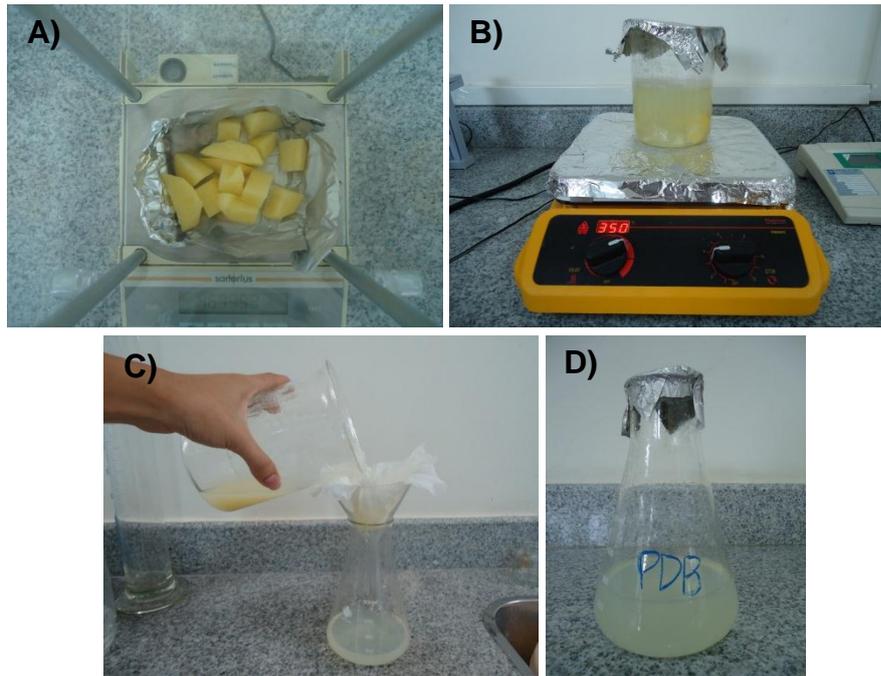


Figura 4. Preparación del extracto de papa para la preparación del medio PDB. **A)** Obtención del peso de la papa. **B)** Ebullición de la papa en agua de mar. **C)** Filtrado del caldo. **D)** Ajuste del volumen a 1000 mL.

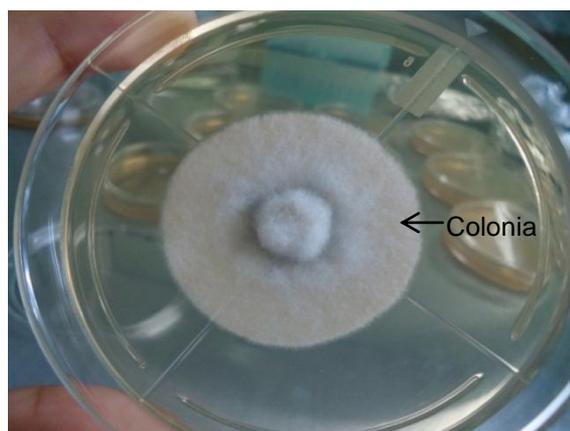


Figura 5. Colonias de *L. grandispora* a los 4 días de incubación.

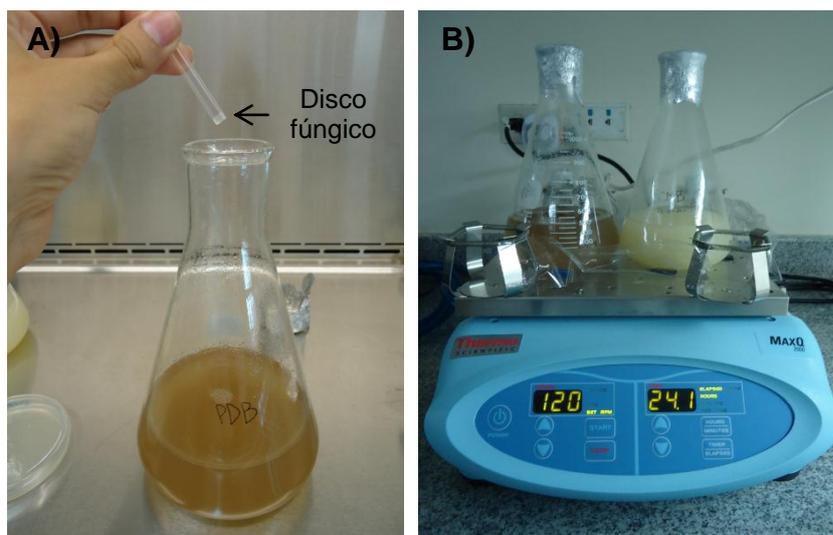


Figura 6. A) Inoculación de un disco fúngico de *L. grandispora* en medio líquido PDB. B) Cultivos en la zaranda rotatoria a 120 rpm.

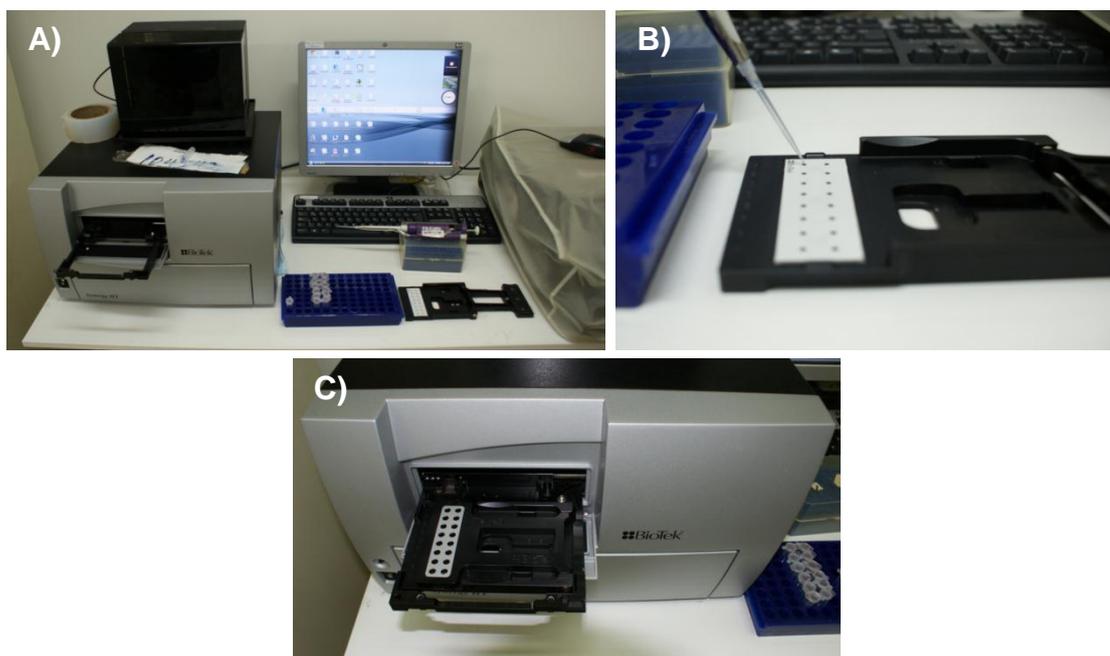


Figura 7. Medición de la concentración y pureza del ADN. A) Equipos y materiales empleados durante la medición. B) Muestra de ADN (2 μ L) cargada en la placa. C) Placa cargada lista para la medición.

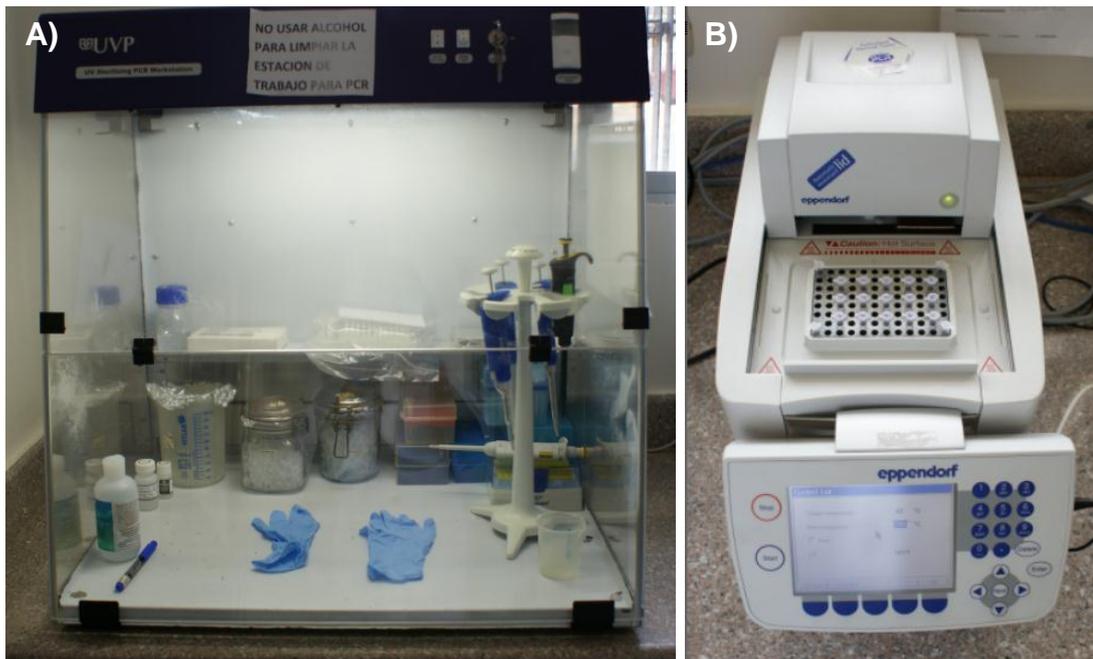


Figura 8. Amplificación por PCR. **A)** Estación de trabajo para PCR. **B)** Termociclador con las muestras listas para ser amplificadas.

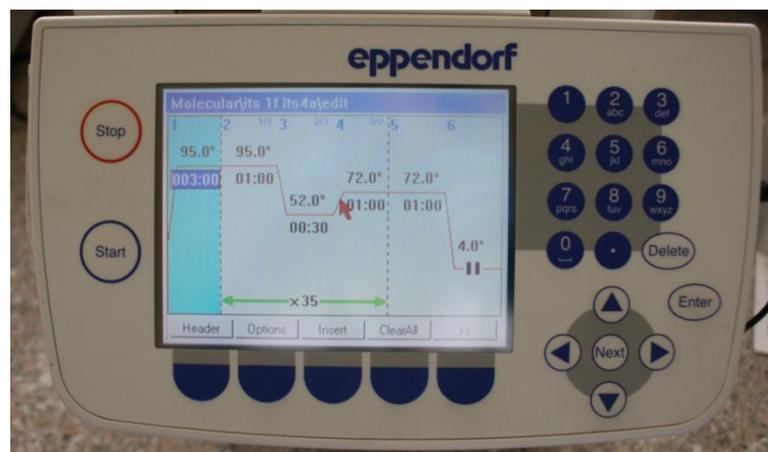


Figura 9. Programa de PCR para el par de primers ITS1F – ITS4A.

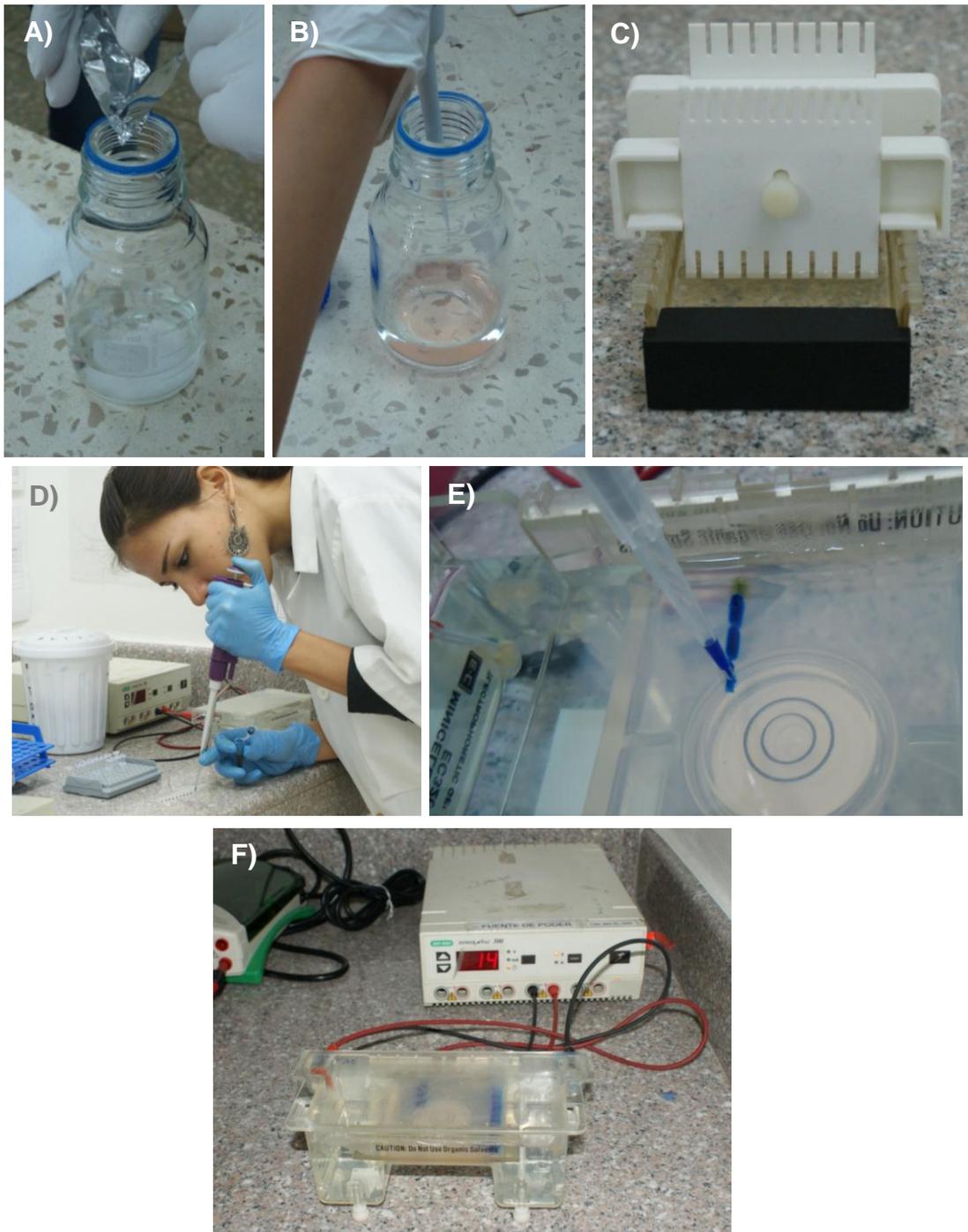


Figura 10. Gel de agarosa 1%. **A)** Adición de la agarosa al TAE 1X. **B)** Gel más SYBR Safe. **C)** Proceso de solidificación del gel con los peines. **D)** Mezcla del producto de PCR con loading dye 6X. **E)** Carga del gel en la cámara de electroforesis. **F)** Programa de electroforesis en proceso.

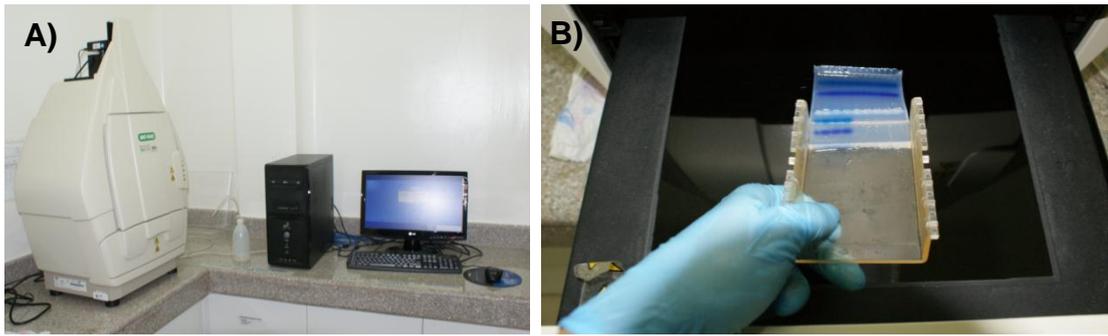


Figura 11. A) Equipo de fotodocumentación de geles. B) Gel insertado en el equipo para su análisis.

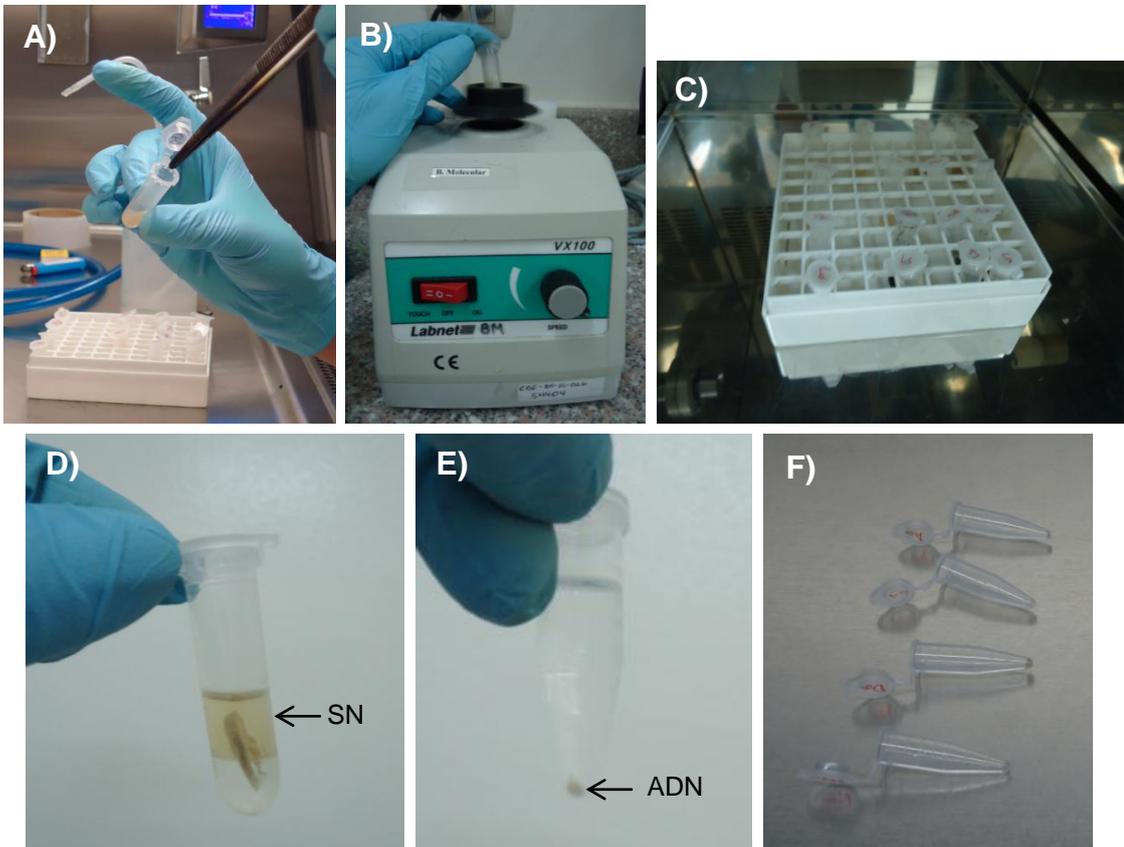


Figura 12. Protocolo A estandarizado. A) Micelio lavado con agua destilada. B) Vortex del micelio con el buffer de extracción. C) Incubación de las muestras. D) Sobre nadante (SN) que contiene el ADN. E) Pellet color blanco luego de la precipitación con acetato de amonio y etanol. F) Secado del pellet de ADN.

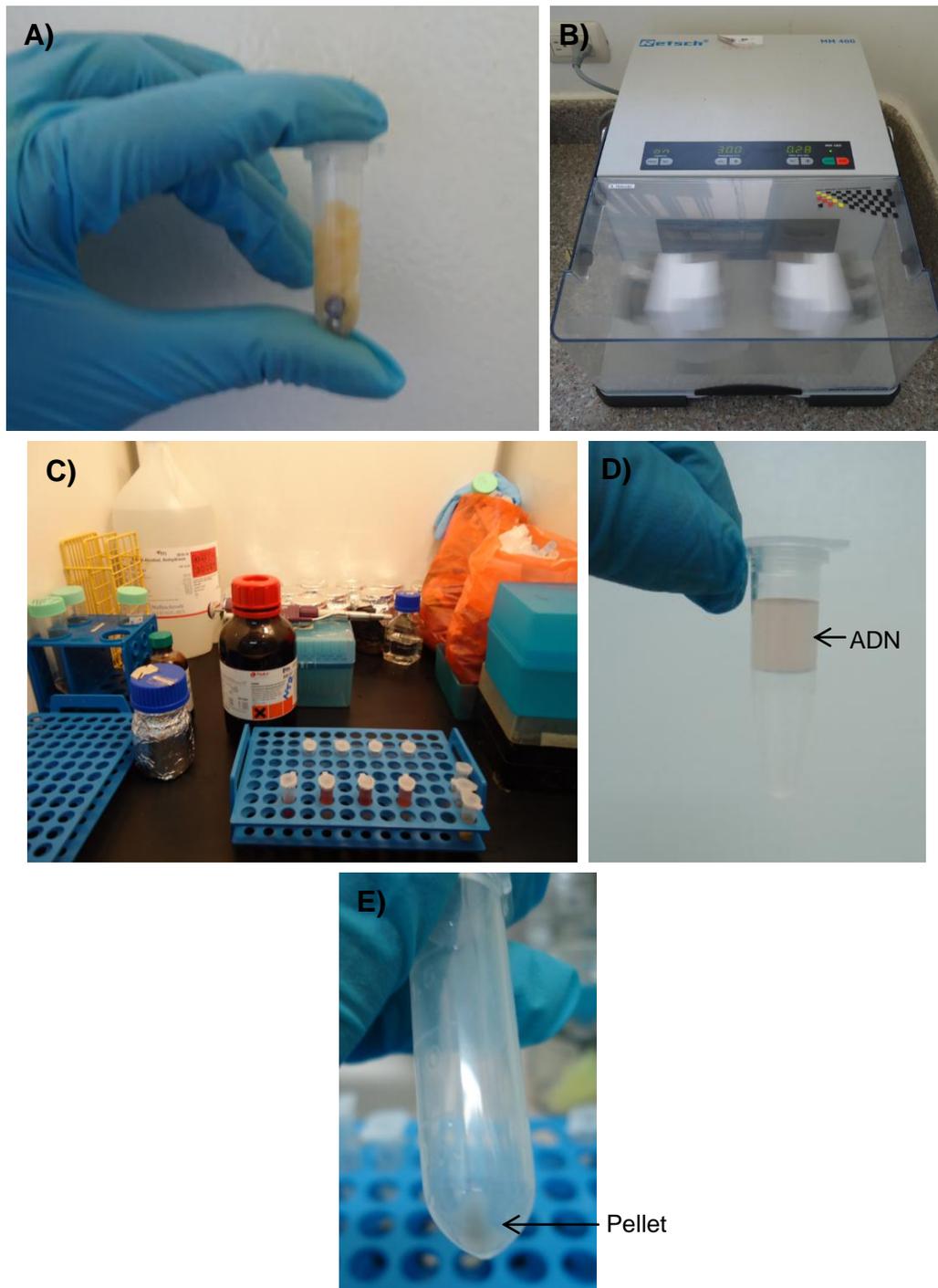


Figura 13. Protocolo B estandarizado. **A)** Ruptura celular con esferas de metal. **B)** Agitación a 30 Hz. **C)** Muestras con una mezcla de fenol-cloroformo-isoamilalcohol. **D)** Formación de dos fases, el ADN se encuentra en la fase superior. **E)** Pellet de ADN luego de los lavados con etanol.

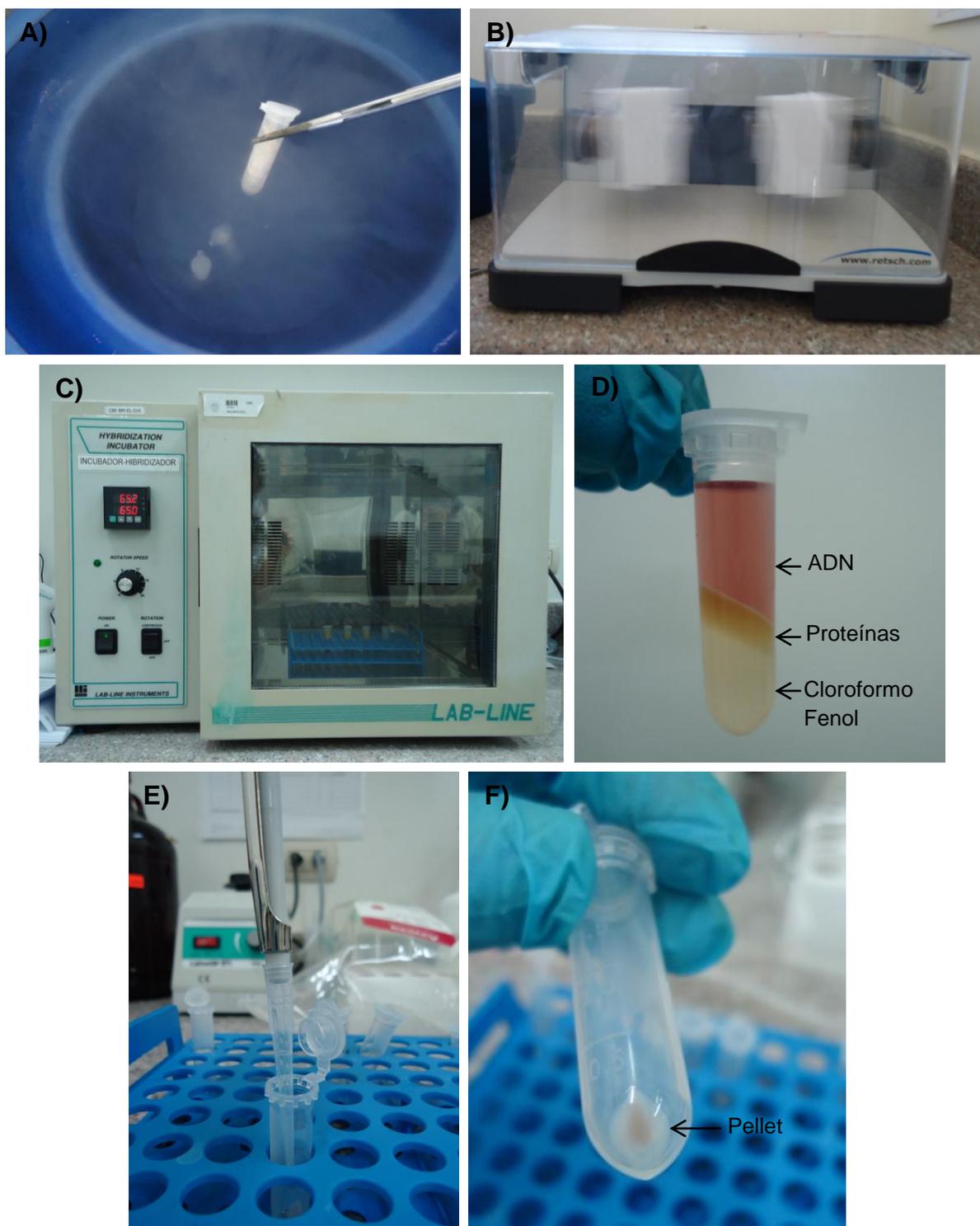


Figura 14. Protocolo C estandarizado. **A)** Micelio sumergido en nitrógeno líquido. **B)** Agitación a 30 Hz. **C)** Incubación a 65°C. **D)** Fases producidas por la extracción con fenol-cloroformo-isoamilalcohol. **E)** Lavado con etanol. **F)** Pellet de ADN.

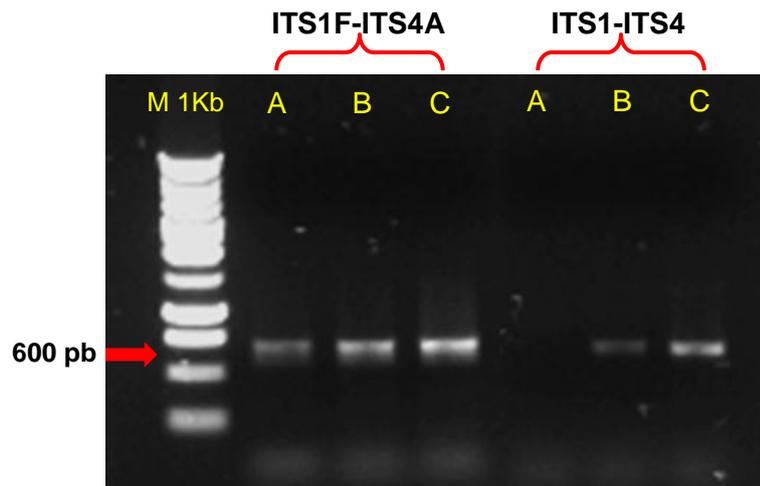


Figura 15. Amplificación de la región ITS del ADNr de *L. grandispora* con los cebadores ITS1F-ITS4A e ITS1-ITS4 a una altura de 600 pb aproximadamente. Las letras A, B y C corresponden a los protocolos de extracción estandarizados.

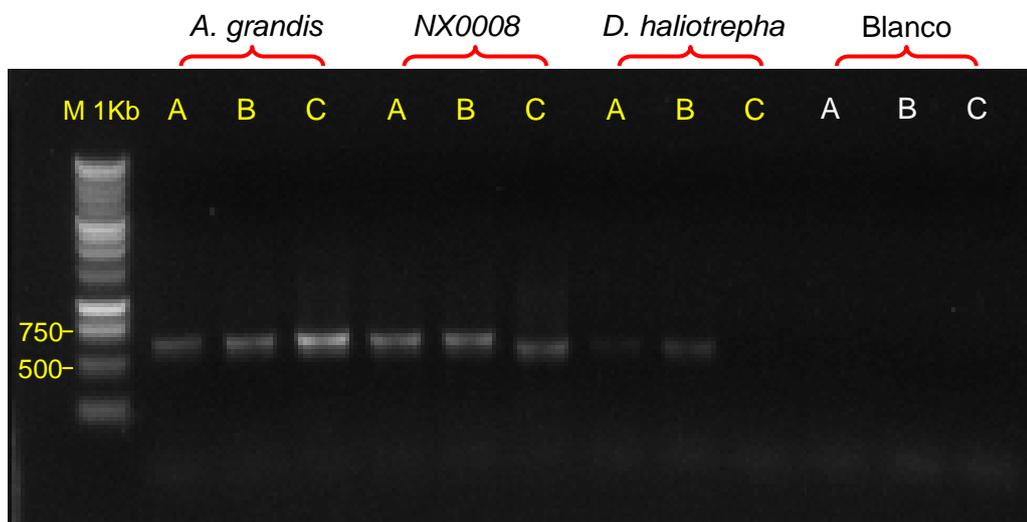


Figura 16. Amplificación de la región ITS del ADNr de *A. grandis*, *NX0008* y *D. haliotrepha* con los cebadores ITS1-ITS4, bandas entre 600 – 650 pb aproximadamente. Las letras A, B y C corresponden a los protocolos de extracción estandarizados.

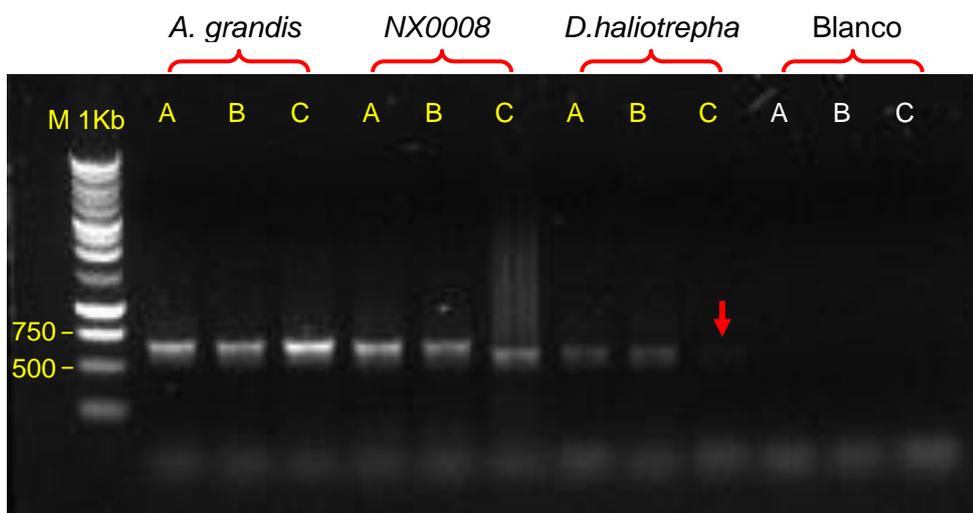


Figura 17. Amplificación de la región ITS del ADNr de *A. grandis*, *NX0008* y *D. haliotrepha* con los cebadores ITS1F-ITS4A, bandas entre 600 – 650 pb aproximadamente. La flecha roja indica la presencia de una banda leve con el protocolo C.

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN ESTANDARIZADOS

Protocolo A

11. Se colectó las colonias del medio de cultivo líquido y fueron colocadas en un tubo Falcón. El micelio fue lavado con agua destilada estéril, el exceso de agua se retiró exprimiendo el micelio con una gasa estéril.
12. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 200 – 300mg de micelio, se agregaron 400 µL de buffer de extracción (1% hexadecyltrimethylamonium bromide (CTAB), 1M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA), mas vortex durante 1 minuto.
13. Las muestras fueron colocadas en incubación durante 20 min a 70°C.
14. Se añadió un volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1 v/v), se invirtió el tubo repetidamente.
15. Luego, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, la fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 mL.
16. Se añadió medio volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto al tubo, seguido por incubación en hielo y a -20°C por 10 min.
17. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C.
18. El pellet de ADN fue lavado con 100 µL de etanol al 70%, seguido por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min.
19. Finalmente se colocó a secar el pellet de ADN en una corriente de aire durante 15 min.
20. El pellet fue resuspendido en agua ultra pura y almacenado a -20°C.

Protocolo B

13. Se colectó las colonias del medio de cultivo líquido y fueron colocadas en un tubo Falcón. El micelio fue lavado con agua destilada estéril, el exceso de agua se retiró exprimiendo el micelio con una gasa estéril.
14. El micelio (200 – 300mg) fue suspendido en 500 µL de una solución conformada por: 0.1 M NaCl, 0.5 M Tris – HCl, (pH 8.0), y SDS 5 %. En cada tubo se añadieron dos esferas de metal estériles.
15. Los tubos se agitaron a una frecuencia de 30 Hz durante 2 min. Seguido por centrifugación durante 10 min a 8 700 rpm.
16. El sobrenadante fue decantado en un nuevo tubo y se repitió el procedimiento de extracción sin las esferas de metal.
17. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (24:24:1) más breve vortex y se centrifugó durante 5 min en una microcentrífuga.
18. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se realizó nuevamente la extracción con un volumen igual de cloroformo:isoamil alcohol (24:1).
19. Los tubos fueron agitados vigorosamente y centrifugados durante 5 min a 8 000 rpm.
20. La fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se añadieron 2.5 volúmenes de isopropanol para la precipitación del ADN.
21. Los tubos fueron refrigerados durante 10 min a -20°C y centrifugados a 4 °C por 10 min a 11 000 rpm.

22. Se lavó el pellet dos veces con etanol frío al 70 %, y se secó en una corriente de aire.

23. Se resuspendió el pellet en agua ultra pura y se almacenó a -20°C.

Protocolo C

17. Se colectó las colonias del medio de cultivo líquido y fueron colocadas en un tubo Falcón. El micelio fue lavado con agua destilada estéril, el exceso de agua se retiró exprimiendo el micelio con una gasa estéril.
18. El micelio fue apropiadamente envuelto en papel filtro estéril y colocado en la estufa para su secado a 30°C durante 48 h.
19. En tubos de 1.5 mL se colocaron 65 –155 mg de micelio seco más 500 µL de buffer de extracción (Tris HCl 100 Mm, Na₄EDTA 20 mM, CTAB 2 % w/v, NaCl 1.4 M, PVP 1 % w/v) precalentado a 65°C, y 100 µL de β-mercaptoetanol 1%.
20. La mezcla fue agitada vigorosamente e incubada a 65°C por 30 min.
21. Luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 mL.
22. Se agregó un volumen igual de fenol (pH 8.0):CHCl₃:isoamil alcohol (24:24:1 v/v), y se mezcló vigorosamente.
23. Los tubos fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 mL.
24. Un volumen igual de CHCl₃:isoamil alcohol (24:1) fue añadido, se mezcló y centrifugó por 10 min a 10 000 rpm.
25. El sobrenadante fue transferido en un tubo nuevo y se agregaron 200 µL de ARNasa (1 Mg mL⁻¹ stock). Seguido por incubación a 37 °C durante 30 min.

- 26.** Se agregó un volumen igual de fenol (pH 8,0):CHCl₃:isoamil alcohol (25:24:1), y se mezcló vigorosamente. La centrifugación se realizó a 10 000 rpm durante 15 min.
- 27.** Se retiró el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 28.** Se agregó un volumen igual de CHCl₃:isoamil alcohol (24:1), y se mezcló vigorosamente. La centrifugación se realizó a 10 000 rpm durante 15 min.
- 29.** El sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo, y se añadieron 2.5 volúmenes de isopropanol frío.
- 30.** Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 31.** El pellet fue lavado con etanol al 70% previamente refrigerado y secado en una corriente de aire durante 15 min.
- 32.** El pellet fue resuspendido en agua ultra pura y almacenado a -20°C hasta su uso.