

PROYECTO TERMINADO

Universidad	UNISARC
Programa Académico	BIOLOGÍA
Nombre del Semillero	BIOTECNOLOGIA
Nombre del Grupo de Investigación (si aplica)	
Línea de Investigación (si aplica)	HONGOS LIGNINOLITICOS
Nombre del Tutor del Semillero	NATALIA HERNANDEZ OSSA
Email Tutor	Nattio.biologia@gmail.com
Título del Proyecto	USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN HONGOS BASIDIOMICETOS, EN FASE MONOSPORICA Y FASE REPRODUCTIVA
Autores del Proyecto	VANESSA RUIZ MARIN Y JUAN DAVID QUINTERO OSORIO
Ponente (1)	VANESSA RUIZ MARIN
Documento de Identidad	1093225445
Email	Vane-713@hotmail.com
Ponente (2)	JUAN DAVID QUINTERO OSORIO
Documento de Identidad	1093224920
Email	Juancho_pick@hotmail.com
Teléfonos de Contacto	3146477904 – 3217767761
Nivel de formación de los estudiantes ponentes (Semestre)	IX Semestre de Biología
MODALIDAD (seleccionar una- Marque con una x)	PONENCIA
	<ul style="list-style-type: none"> • Investigación en Curso • Investigación TerminadaX
Área de la investigación (seleccionar una- Marque con una x)	PÓSTER
	<ul style="list-style-type: none"> • Propuesta de Investigación
	<ul style="list-style-type: none"> • Ciencias NaturalesX
	<ul style="list-style-type: none"> • Ingenierías y Tecnologías
	<ul style="list-style-type: none"> • Ciencias Médicas y de la Salud.
	<ul style="list-style-type: none"> • Ciencias Agrícolas
	<ul style="list-style-type: none"> • Ciencias Sociales
<ul style="list-style-type: none"> • Humanidades 	
<ul style="list-style-type: none"> • Artes, arquitectura y diseño 	

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN HONGOS BASIDIOMICETOS, EN FASE MONOSPORICA Y FASE REPRODUCTIVA

Juan David Quintero. Vanessa Ruiz Marín¹

RESUMEN

Introducción: Los basidiomicetos constituyen un grupo de hongos que reúne aproximadamente treinta mil especies, consideradas superiores por su complejidad morfológica y la presencia de basidios, este tipo de hongos son importantes por su capacidad degradativa de compuestos orgánicos aromáticos, heterogéneos y complejos que pueden ser contaminantes del medioambiente, debido a su amplia diversidad es complejo identificar con exactitud una especie, por lo que se opta a trabajar con herramientas moleculares para obtener resultados más precisos, basados en el genoma de las especies. **Objetivo:** Realizar un análisis molecular en dos especies de hongos con diferentes fases de desarrollo (monosporica y reproductiva). **Objetivos específicos:** Elegir las regiones ITS adecuadas para la identificación de la especie, comparar métodos mecánicos para la lisis de la pared celular del hongo en fase reproductiva, adquirir destreza en extracción, cuantificación y calidad del ADN fúngico. **Metodología:** Para el desarrollo del trabajo se tomó una muestra de hongo en fase reproductiva del campus universitario y la muestra del hongo en fase monosporica fue donado por la universidad de Manizales, una vez se tenía desinfectado el material se procedió a realizar la extracción de ADN, Electroforesis y PCR; **Los resultados** obtenidos indican que en el proceso de extracción ambas muestras dieron una buena cantidad y calidad promedio de ADN aproximadamente de 90 ng/μl y los productos de PCR indican que las muestras tienen un peso molecular entre 350 a 400 pb. **Conclusiones:** Al seguir los protocolos paso a paso se obtiene una extracción eficiente del material genético para sus posteriores análisis, los primers ITS4 e ITS5 amplificaron correctamente para las fases estudiadas del de los hongos.

Palabras Clave: Basidiomicetos, Fase monosporica, Fase reproductiva, Extracción de ADN, Electroforesis, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucarísticos, portadores de esporas, aclorofilicos, que por lo general se reproducen sexual y asexualmente y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina o celulosa, o ambas sustancias, junto con otras moléculas orgánicas complejas (Tovar & Valenzuela, 2006). Son organismos heterótrofos por lo que utilizan compuestos orgánicos como fuente primaria de energía, a través de la secreción de enzimas degradan moléculas grandes y poco solubles en agua (carbohidratos, proteínas o lípidos) convirtiéndolos en moléculas más pequeñas y más solubles, las cuales son absorbidas por las membranas plasmáticas de las células fúngicas y asimiladas como nutrientes. La mayoría de los hongos filamentosos son organismos saprófitos que utilizan una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, aunque un considerable número de especies son parásitos de animales, plantas, o incluso de otros hongos (Webster & Weber, 2009).

Estos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. La mayoría de los hongos utilizan azúcares como

¹ Estudiantes de Biología de IX Semestre
Vane-713@hotmail.com – Juancho_pick@hotmail.com
Corporación Universitaria de Santa Rosa de Cabal UNISARC

la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Estos se reproducen por esporas, que son diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular, estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas, existen cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos (Triana & Veloza, 2005).

Los basidiomicetos constituyen un grupo de hongos que reúne más de treinta mil especies consideradas superiores por su complejidad morfológica y la presencia de basidios, característica principal que define su identificación y clasificación taxonómica, estos tienen una esencial importancia en la naturaleza debido a que algunos de ellos, son capaces de descomponer o degradar la lignina (Agrios, 2005).

Existe además un grupo de especies que son comestibles, de ellos los más cultivados comercialmente son el champiñón (Andrade *et al.*, 2012). Otros se han investigado con aplicaciones en la medicina humana y son altamente promisorios como fuente de metabolitos bioactivos. Se han encontrado compuestos con actividad antiviral, antitumoral, hematológica, antioxidante, antiinflamatoria y antidiabetes (Aqueveque *et al.*, 2006); incluso pueden presentar actividad anticancerosa a través de la potenciación inmunológica, eficaz en la profilaxis y tratamiento del sida (Ick-Dong *et al.*, 2005). Paralelo a estos descubrimientos se han reportado valiosos estudios referentes a la capacidad de los basidiomicetos de degradar eficientemente la lignina, polímero aromático, heterogéneo y complejo que protege las plantas de ataques de fitopatógenos. También pueden transformar a sustancias más simples que son menos contaminantes del medioambiente (Ortiz, 2009).

Este grupo de hongos, por su capacidad de degradación de compuestos orgánicos aromáticos, heterogéneos y complejos contaminantes del medioambiente pueden utilizarse para disminuir el uso de tratamientos químicos que pudieran generar un impacto mayor al ambiente, por lo que se sugiere su uso potencial como biorremediadores. De acuerdo con la capacidad de actividad biológica y a su amplia gama de aplicaciones, los basidiomicetos son especies promisorias como controladores biológicos, con interés para la agricultura; pueden influir en el control de enfermedades vegetales, capacidad actualmente poco explorada, y se convierten en una herramienta potencial biotecnológica. La bioactividad de los basidiomicetos no ha sido suficientemente investigada y pueden constituir una fuente para los bioensayos, sugiriendo nuevas líneas de desarrollo de nuevos metabolitos con amplia gama de aplicaciones (Rojas, 2013). Por lo tanto para buscar las posibles aplicaciones y beneficios que puede traer este tipo de organismos se emplean medios de cultivo *in vitro* como alternativa investigativa, uno de los medios selectivos para este tipo de hongo es el Sabouraud utilizado por Raymond Sabouraud en 1892.

La biología molecular se ha desarrollado grandemente a partir de la década de los 50's, donde inicia un gran desarrollo de técnicas de aislamiento, manipulación y análisis, que van desde la detección de proteínas, hasta la recombinación y transformación genética (Echeverría, 2006). La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos

cadena de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción.

Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na⁺ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos *et al.*, 2014).

Como segundo paso en el análisis molecular se debe realizar la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, esta consiste en la migración de las moléculas a través de un gel, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular, se visualizan mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones (Fierro, 2014). Por último realizamos la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual pretende aumentar el número de copias de fragmentos de ADN de una muestra de manera *in vitro*, según las condiciones establecidas y el propósito de su uso (Echeverría, 2006).

La taxonomía e identificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la caracterización fenotípica de los mismos. La sistemática atribuía valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto macroscópica como microscópica, es decir, presencia o ausencia de septos en las hifas, formación de esporas y mecanismos de liberación de las mismas, o aspectos de la biología y ecología de estos organismos, así como resultados obtenidos a través de pruebas bioquímicas o el estudio de su ultraestructura. Datos que, en conjunto, han permitido establecer las diferentes categorías taxonómicas hasta nivel de especie y, en algunos casos, hasta niveles inferiores (Webster & Weber, 2009). Actualmente, la aplicación de técnicas de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado mucho los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica (Perdomo, 2011).

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad se destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack & Binnicker, 2009).

Los ITS generalmente corresponden a secuencias altamente conservadas entre las especies fúngicas filogenéticamente próximas, en tanto que los IGS presentan una variabilidad muy elevada, incluso a nivel intraespecífico. Otra característica que determina la amplia utilización de estos genes, es el hecho de encontrarse en un número elevado de copias (hasta 200 copias), facilitando su amplificación mediante la PCR (Perdomo, 2011). Para el diagnóstico micológico, las secuencias conservadas se utilizan generalmente para confirmar la existencia de una infección fúngica, en tanto que las variables se emplean en la identificación a nivel de especie del agente etiológico implicado (Wengenack & Binnicker, 2009). Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis molecular en dos especies de hongos con diferentes fases de desarrollo (monosporica y reproductiva).

MATERIALES Y METODOS

Descripción del área de estudio: El trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular de UNISARC, localizado en el municipio de Santa Rosa de Cabal (Risaralda, Colombia), a los 4° 52' 07" N y 75° 37' 22" W. El campus universitario hace parte de la cuenca media del río Campoalegre, sobre la vertiente occidental de los Andes centrales colombianos a una altitud de 1635 m.s.n.m Fig.1, es una zona con las condiciones óptimas de un bosque húmedo pre-montano según la clasificación de (Holdridge, 1987). La precipitación promedio anual es de 3668 mm con un régimen bimodal que tiene sus picos en los meses de abril, octubre y noviembre, la temperatura medias es de 18, 9° C y una humedad relativa de 84% (FNC-Cenicafé, 2012).

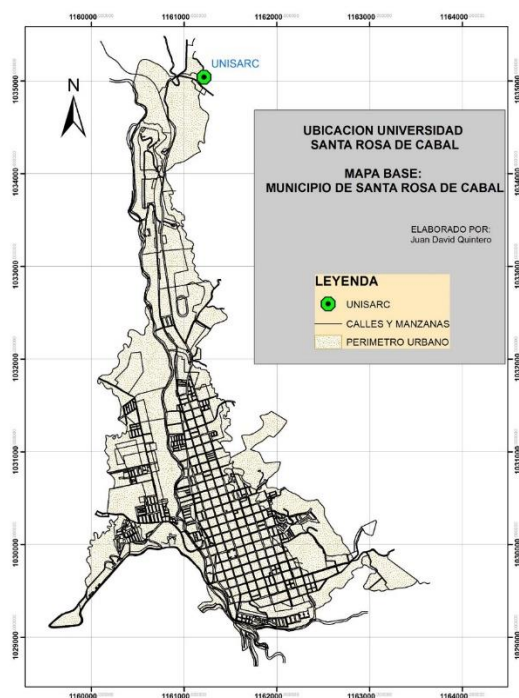


Fig.1 Ubicación de UNISARC en el municipio de Santa Rosa de Cabal, en el cual se puede observar la división de la capa urbana en color gris y las líneas que determinan las calles y manzanas del municipio.

Colecta de muestras de campo: El hongo en fase reproductiva (Imagen. 1a), fue colectado del tronco de un árbol en descomposición, el cual fue retirado desde su base y depositado en un recipiente plástico para luego ser llevado hasta el laboratorio de Biología Molecular de Unisarc, por otro lado, el hongo en fase monosporica (Imagen.1b), fue donado por la Universidad de Manizales, el cual fue sembrado en medio SDA y con referencia de cepa Riol 26/08/16.

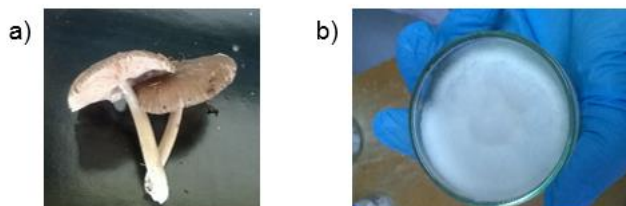


Imagen. 1 Hongos de los cuales se tomaron las muestras; la imagen (a) corresponde al hongo en fase reproductiva, mientras que la imagen (b) corresponde al hongo en fase monosporica.

Tratamiento de las muestras: Una vez se tenía el individuo de fase reproductiva, este fue sometido a un proceso de limpieza realizando varios lavados con diferentes agentes desinfectantes y germicidas con el fin de remover todo residuo o traza contaminantes que puedan interferir con la extracción de ADN, para este paso se utilizó agua destilada, hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70% v/v. Mientras que el hongo en fase monosporica no necesito de tratamiento preliminar, por lo tanto se realizó directamente la toma de la muestra con un asa microbiológica estéril para posteriormente extraer ADN.

Extracción de ADN, calidad y cantidad de muestra: Una vez colectada la muestra en fase reproductiva previamente desinfectada y lavada, se procede a extraer una muestra de aproximadamente 100 mg y se deposita en un tubo eppendorf de 1,5 ml, luego se adiciona 450 μ l de buffer de extracción el cual contiene: SDS (funciona como detergente), TRIS 7.5 (el cual permite mantener el pH de la solución estable), EDTA (molécula quelante que sirve desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas), NaCl (recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación); se macero el material repetitivamente en un mortero de porcelana hasta obtener la muestra homogénea, (este paso es clave en el proceso de extracción ya que se debe romper completamente la pared celular de la muestra), se adicionó 450 μ l de cloroformo (su función es separar las dos fases de la muestra, dejando el ADN expuesto) y se mezcló todo el contenido del tubo por inversión, después se centrifuga las muestras a 14 mil rpm durante 5 minutos y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml que contiene 250 μ l de isopropanol (es el encargado remover la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucleico), luego se debe mezclar por inversión varias veces y refrigerar a -20°C (durante 20 min), al retirar las muestras del refrigerador se centrifuga por segunda vez a las mismas revoluciones durante 5 min., Se removió el sobrenadante ya que el ADN se encuentra en la base del tubo eppendorf y se adiciona 1ml de etanol frío al 70% (ayuda a precipitar el ADN), luego centrifugar por 5 minutos.

Se descartó el sobrenadante de etanol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente sobre un papel absorbente dejando boca abajo el tubo eppendorf, una vez evaporado el etanol se resuspendió el pellet en 50 μ l de buffer TE (se utiliza para eludir y conservar el ADN) y se

almacenó a -20°C ; el mismo protocolo se realizó con la muestra del hongo en fase monosporica, el único paso que se omitió fue la desinfección del material, ya que esta muestra se tomó directamente del medio de cultivo; para determinar el contenido total de ácidos nucleicos, la estimación de su concentración y el grado de entereza se realizó una electroforesis en gel de agarosa, donde utilizamos el fago λ como marcador de peso molecular.

Electroforesis: Se preparó un gel de agarosa al 0.8% para visualizar cantidad y calidad de ADN, para lo cual se pesó 0.48 g de agarosa, diluida en 60 ml de TAE 1X (buffer de corrida, el cual tendrá el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN), luego para homogenizar la solución se calentó en un microondas durante dos minutos hasta obtener un producto totalmente líquido, se deja pasar 10 minutos para que la solución se enfríe y luego se procede a servir el gel en la cámara de electroforesis evitando fugas del preparado, este se deja polimerizar aproximadamente por media hora y ya se procede a servir las muestras mezclando 2 μL de gel red con 4 μL de ADN total, antes de depositar las muestras en los carriles se adicionó el marcador de peso molecular Fago λ en los primeros 3 carriles ; una vez se dejaron todas las muestras en los carriles correspondientes se conecta correctamente los cables (+) y (-) en las posiciones correspondientes y por último se programa para que funcione a 75 voltios (V) durante 5 min, esta corrida en tan poco tiempo se hace para verificar si las muestras si están corriendo adecuadamente, una vez se corrobora este procedimiento se reprograma la cámara de electroforesis para 45V durante 30 minutos y por último se revela el gel en la cámara de luz UV.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): La idea básica en este proceso es amplificar los fragmentos de interés, en este caso las regiones 16S y 18S, la técnica permite sintetizar muchas veces un pedazo de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, para la PCR realizada se utilizó la *taq* polimerasa, de esta manera se busca asimilar lo que sucede naturalmente en la célula, por lo cual se deben añadir los ingredientes necesarios para hacerlo, teniendo en cuenta un orden específico: 1) Buffer 1x 1 μL el cual mantiene las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente a cierto pH, 2) MgCl_2 1 μL como un cofactor catalítico de la reacción, 3) oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores o cebadores, en este caso los primers utilizados fueron ITS4 0,5 μL e ITS5 0,5 μL necesarios para que se inicie la transcripción, 4) dinucleótidos (dNTPs) 1 μL para complementar los fragmentos amplificados, 5) *taq* polimerasa 0,5 μL , 6) muestra de ADN 0,5 μL y por último se agregaron 6,5 μL de agua mili-Q para llevar a un volumen total de 12,5 μL .

El siguiente paso fue colocar los tubos en el termociclador, que básicamente sirve para calentarlos o enfriarlos a temperaturas muy precisas que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), el primer ciclo fue 95°C donde se desnaturaliza la doble cadena del ADN, quedando en forma de cadenas sencillas; luego se ajusta la temperatura a 55°C , donde empieza la fase de alineamiento donde la *taq* polimerasa se une a los pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'. Después la temperatura sube a 72°C (paso que se conoce como extensión), ya que a 72°C es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico y este número de copias va aumentando exponencialmente de esta manera: en el ciclo 1 se producen $2^1=2$ nuevos

fragmentos, en el ciclo 2 serán 2^2 , esto es, 4 fragmentos recién sintetizados, y así, con 30 ciclos de PCR se producirán 2^{30} nuevos fragmentos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Extracción de ADN y Electroforesis de hongos basidiomicetos: Para determinar el contenido de ácidos nucleicos, la estimación de su concentración y el grado de entereza de las dos muestras de hongos que utilizamos (en fase reproductiva y monosporica), se usó la metodología de electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y realizamos la visualización por medio de rayos UV de los cual no obtuvimos ningún resultado positivo (Fig.2), pues no se visualiza la presencia de ADN en las muestras esto puede ser causado por alguna de las siguientes razones

Equipos sin verificación de calibración: Se recomienda que los equipos utilizados en biología molecular cuenten con un certificado de calidad avalado por sus propios fabricantes, a fin de asegurar el óptimo funcionamiento de las pruebas moleculares. Además estos equipos deben pasar por un proceso de mantenimiento preventivo continuo por lo menos una vez al año. Este proceso deberá ser realizado por personal técnico altamente capacitado para garantizar su buen funcionamiento y calibración (Yábar, 2003).



Fig. 2 Primera práctica de extracción, dónde se utiliza como marcador de peso molecular el Fago lambda, Carril 1 fago λ de 30 ng/ μ l, Carril 2 fago λ de 60 ng/ μ l, Carril 3 fago λ de 90 ng/ μ l, Carril 8 corresponde a la muestra del hongo en fase monosporica y el carril 9 a la fase reproductiva; en ambos carriles la extracción de ADN no fue optima ya que no se observa ningún bandeo, por lo tanto no se puede determinar el peso molecular de las muestras; en la parte inferior del gel se encuentra el control positivo.

Equipos sin verificación de calibración: Se recomienda que los equipos utilizados en biología molecular cuenten con un certificado de calidad avalado por sus propios fabricantes, a fin de asegurar el óptimo funcionamiento de las pruebas moleculares. Además estos equipos deben pasar por un proceso de mantenimiento preventivo continuo por lo menos una vez al año. Este proceso deberá ser realizado por personal técnico altamente capacitado para garantizar su buen funcionamiento y calibración (Yábar, 2003).

Agua MQ: En biología molecular la calidad del agua (grado de pureza) es imprescindible para obtener óptimos resultados en cada experimento. En ese sentido, se recomienda preparar tanto los buffers como también para los geles de agarosa con agua bidestilada. Si el investigador cuenta con un equipo de destilación asegúrese que el agua presente una resistividad eléctrica

dentro de un rango de 10 a 18 Meghoms (rango por el cual existe una mínima concentración de iones y cationes de agua, lo cual indica un alto grado de pureza) (Yábar, 2003).

El equipo de destilación del laboratorio de trabajo ha tenido problemas de calibración, lo que puede llevar a pensar que la calidad del agua MQ no tiene un rango óptimo de Meghoms y esto provocar la deficiente preparación de los reactivos necesarios.

Reactivos con bajo grado de pureza: Los reactivos que se empleen deberán ser de grado biología molecular a fin de asegurar resultados satisfactorios después de cada experimento. Para el caso de algunos reactivos que exigen mantenerse en refrigeración, deberán ser evaluados por el propio investigador que los adquirió antes de realizar cualquier experimento.

Posibles vectores de contaminación: Desde el momento de la toma de muestra (hongo), la falta de un protocolo de desinfección y las buenas prácticas de esterilidad de los instrumentos y entorno de trabajo llevo a la posible contaminación e interferencia del protocolo de extracción.

Cantidad de muestra: Posiblemente la cantidad de hongo obtenida no fue suficiente según los protocolos reportados por otros autores, que en promedio requieren alrededor de 50-500 mg de muestra (Lurentin & Martinez, 2012), el protocolo de extracción usado requerida aproximadamente 100 mg de muestra pero este peso no fue comprobado, lo que lleva a pensar que la cantidad no fue suficiente como respuesta a la cantidad y calidad de ADN esperada según el protocolo usado.

Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumentan las impurezas del extracto, de manera que es aconsejable realizar experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada de muestra (Alejos *et al.*, 2014).

Pipeteo: La falta de destreza para pipetear ocasiono que las concentraciones estuvieran diferentes a las indicadas en el protocolo, los resultados se vieron alterados notablemente, algunos autores indican que el mal pipeteo aumentan el riesgo de contaminación, disminuyendo la purificación de la muestra. (Baena *et al.*, 2013).

Rompimiento de la pared celular: En este pasó de maceración y trituración de la muestra es de vital importancia para destruir la pared celular del hongo y así romper la membrana de quitina que lo protege de la lisis celular. (Rogers & Bendich, 1988). La homogenización, mecánica o química, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético (Alejos *et al.*, 2014).

En el caso del protocolo usado, se realizó un macerado mecánico en tubos eppendorf de 1,5ml adicionando 450 μ L de buffer de extracción, lo cual pudo causar que la pared celular del hongo no se rompiera de forma exitosa para realizar la extracción de ADN.

Tiempo de centrifugación y degradación del pellet: La suspensión del pellet debe ser obtenida mediante la centrifugación a 14 mil rpm durante 10 min y la precipitación del pellet fue lavada dos veces con etanol al 80% y resuspendio en buffer TE según (Lurentin & Martinez, 2012).

El protocolo que usamos solo indicaba centrifugar a 14 mil rpm durante 5 min y después de esto lavar el pellet una única vez con etanol al 70%, lo que pudo causar que no se diera la debida separación entre los reactivos antes adicionados y el pellet.

Ausencia de cámara de flujo laminar: En trabajos de biología molecular, se recomienda trabajar en una campana de flujo laminar con el fin de evitar posibles contaminaciones de la muestra con ácidos nucleicos extraños. (Falcon & Valeta).

En el momento de retirar el etanol que lavo el pellet, se realizó de manera mecánica volteando cuidadosamente los tubos eppendorf 1,5 ml sobre un papel absorbente en ausencia de acamara de flujo laminar, lo que puede ser una las causa de contaminación del ADN.

Ausencia de proteinasa K: Los métodos de extracción de ADN que utilizan proteinasa k son más eficientes para obtener un ADN de alto peso molecular, logrando concentraciones (entre 16-76 mg/l) pureza (entre 1,66 – 1,92), lo que produce una integridad optima de secuenciación. (Monrroy *et al.*, 2014). Nuestro protocolo no utilizo la proteinasa K lo que puede responder el problema del baja pureza y peso molecular.

El Gel Red vs Bromuro de Etidio: El gel red es un marcador de peso molecular es muy estable en el proceso de tinción de los ácidos nucleicos y permite visualizar ADN total y diferentes fragmentos de ADN previamente amplificado por PCR (Uribe *et al.*, 2013). Sin embargo este compuesto se degrada fácilmente al estar expuesto a la luz, provocando una disminución en su efecto de tinción, por lo tanto quizás este fue uno de los factores de la poca visibilidad de nuestras bandas en revelado del gel de agarosa.

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida, el inconveniente con el bromuro de etidio es su toxicidad a elevadas concentraciones debido a su capacidad mutagénica. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularlo en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes (Alejos *et al.*, 2014).

Preparación de los geles de agarosa: La continua licuación de la agarosa incrementa su concentración por deshidratación alterando el perfil de las bandas al final del resultado. Por lo tanto, se recomienda preparar soluciones de agarosa en volúmenes no mayores de 200 mL y verificar constantemente la turbidez de la agarosa antes de la preparación del gel. De otro lado también se recomienda, verificar la presencia de residuos extraños en la solución ya que pueden interferir con el análisis del resultado final y con la electroforesis misma. Por lo tanto, será necesario preparar una nueva solución a fin de superar este inconveniente (Yabar, 2003).

La Muestra no cae eficientemente y se difunde en el buffer de electroforesis en el momento que es depositada en el pocillo: Posiblemente en el momento de poner la muestra en los pozos de gel de agarosa, no se sumergió la punta de la pipeta hasta donde se debía, por lo tanto el total de la muestra homogenizada con el marcador de peso molecular, pierde una cantidad de su concentración lo que puede llevar a una baja visualización de la banda de ADN. Según (Yabar, 2003) una posible solución es volver a preparar el buffer de carga si es necesario

y servir las muestras de forma correcta en cada uno de los pozos sin perder la más mínima cantidad de la muestra.

Fuga de buffer: Se pierde volumen del buffer de la cámara de electroforesis durante la corrida, (Yabar, 2003) recomiendan que para evitar cualquier tipo de fuga del buffer localizar el lugar de escape y untar con una capa mediana de vaselina.

Las bandas de ADN no se ven nítidamente en el gel: Esto puede ser causado porque el gel de agarosa es muy grueso y el gel red está muy diluido (Yabar, 2003). Preparar geles más delgados de tal manera que se pueda visualizar el color del recipiente que lo contiene a través de ellos y proteger las muestras combinas con el Gel Red de la luz directa para evitar la degradación de esta sustancia.

Degradación del ADN: Manchas indefinidas o difusas de ADN a lo largo de todo el gel por causa de contaminación.

Ruido: Los resultados de este trabajo indican que la presencia de ARN y/o impurezas que coprecipitan con el ADN inhiben la visualización en el gel de agarosa. La falta de adición de ARNasa provocó la contaminación con ARN lo que hizo que al visualizar la banda se notara de poco peso molecular. La importancia de la adición de ARNasa es; la función catalítica que estas tienen en la reacción eliminando toda traza de ARN que puede interferir en la obtención del ADN (purificación del ADN). (Usuga & Rugeles, 2006).

Este ruido logra ser eliminados mediante la acción enzimática de la ARNasa y la adición de acetato de amonio. (Radstrom *et al.*, 2004) Señalan que los inhibidores actúan inactivando la polimerasa del ADN, o degradando el ácido nucleico de la muestra. La ARNasa elimina el ARN que precipita junto al ADN en el proceso de extracción, mientras que el acetato de amonio, al incrementa el gradiente salino, contribuye con la remoción de las proteínas que coprecipitan junto a los ácidos nucleicos (Aidar & Peres, 2007; Doosty *et al.*, 2012) así como de algunos polisacáridos en forma similar a como lo hace el acetato de potasio (Ribeiro & Lovato, 2007). Esta remoción se logra mediante la precipitación de estos compuestos partiendo de la suspensión que contiene ADN en la fase líquida.

Para tener resultados exitosos se repitió la extracción de ADN y electroforesis siguiendo cuidadosamente todos los pasos de los protocolos, para la muestra 1 (hongo en fase monosporica) se tuvo especial cuidado en tomar la muestra del cultivo sin trazas de agar que podían interferir en los resultados esperados, para la muestra 2 (hongo en fase reproductiva) se realizó una metódica desinfección y una maceración mecánica utilizando un mortero de porcelana para ayudar así una óptima lisis celular, lo que nos llevó tener una buena cantidad de muestra para proceder a la extracción de ADN, además se hizo réplicas de cada muestra para realizar comparaciones entre las mismas y observar los posibles errores. Para cumplir con nuestro objetivo tomamos en cuenta todas las recomendaciones nombradas anteriormente y dimos solución de los problemas presentados en la primera práctica, teniendo como resultado en la electroforesis (Fig.3) la observación de una banda con excelente calidad y cantidad de ADN total.

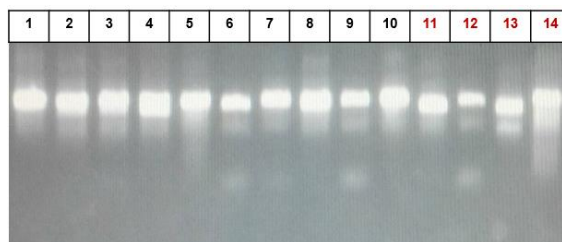


Fig. 3 Segunda práctica de extracción, en los primeros 3 carriles se encuentra el marcador de peso molecular (Fago λ), en esta ocasión se realizaron 2 muestras por tipo de hongo, por lo tanto el carril 11 y 12 corresponden al hongo en fase monosporica, mientras que los carriles 13 y 14 al hongo en fase reproductiva.

ANÁLISIS DE PRODUCTO DE PCR

Para optimizar la PCR se recomienda trabajar con un control negativo: un tubo extra al que se le agreguen todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto ADN, si en esta muestra hay amplificación significa que en algún reactivo hay restos de ADN o de producto de PCR que está contaminando el experimento. Si esto sucede, consideramos que lo más fácil es deshacerse de todas las alícuotas sospechosas y tomar alícuotas nuevas; Además nos permite visualizar posibles casos de contaminación, una vez que se ha ajustado el protocolo de PCR es siempre recomendable incluir un control positivo, este es un tubo que contiene ADN de una muestra que haya amplificado adecuadamente y cuyo patrón de bandas es conocido. De esta manera, puede esperarse que si la reacción se llevó a cabo correctamente, esta muestra siempre salga. En caso contrario, si nuestra PCR no generó bandas en ninguna de las muestras, ni siquiera en el control positivo, puede suponerse que el error radica en que se nos olvidó agregar algún ingrediente o bien que los ciclos de temperatura no se llevaron a cabo adecuadamente, ya sea por problemas de la máquina o bien por error al elegir el programa de amplificación (Espinosa, 2007).

Para evaluar si se logró una amplificación exitosa, utilizamos la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa la cual fue positiva para los carriles 11 y 12 que corresponden a la muestra del hongo en fase monosporica y los carriles 13 y 14 muestra del hongo en fase reproductiva (Fig. 4). Si el producto no hubiera amplificado o éste hubiera tenido un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador.

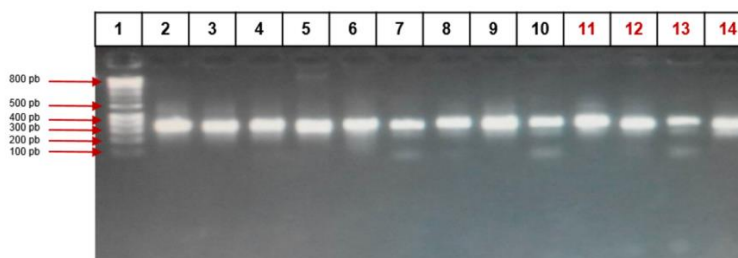


Fig. 4 Electroforesis de producto PCR, en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 1kb, en los carriles 11 a 14 tienen un peso molecular aproximadamente entre 300 a 400 pb. Los carriles 11 y 12 son los resultados de PCR del hongo en fase monosporica, mientras que los carriles 13 y 14 son los resultados de PCR del hongo en fase reproductiva.

En el protocolo no se usó BSA (Bovine Serum Albumin o Albúmina Sérica Bovina), por lo tanto no se sabe cómo hubiera ayudado en nuestro producto, ya que según Espinosa en el 2007 este reactivo incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones y otros inhibidores de la taq polimerasa como la melanina.

IMPACTOS

Actualmente, la aplicación de técnicas de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado mucho los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica (Perdomo, 2011). Pues la taxonomía e identificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la caracterización fenotípica de los mismos ya que la sistemática atribuía valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto macroscópica como microscópica o aspectos de la biología y ecología de estos organismos, así como resultados obtenidos a través de pruebas bioquímicas o el estudio de su ultraestructura, las cuales a largo plazo son costosas hablando de tiempo y veracidad de los resultados por el contrario las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad se destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack & Binnicker, 2009).

El proyecto tiene un aporte a nivel ambiental y económico, ya que implementando las técnicas moleculares se tiene mayor exactitud de la especie de hongo que se estudia, así fortaleciendo la sistemática fúngica, garantizando así la identificación y potencialidad de estos, pues en la actualidad, los hongos son de gran importancia a nivel industrial y otros se han investigado con aplicaciones en la medicina humana y son altamente promisorios como fuente de metabolitos bioactivos. Se han encontrado compuestos con actividad antiviral, antitumoral, hematológica, antioxidante, antiinflamatoria y antidiabetes (Aqueveque *et al.*, 2006); incluso pueden presentar actividad anticancerosa a través de la potenciación inmunológica, eficaz en la profilaxis y tratamiento del sida (Ick-Dong *et al.*, 2005). Paralelo a estos descubrimientos se han reportado valiosos estudios referentes a la capacidad de los basidiomicetos de degradar eficientemente la lignina, polímero aromático, heterogéneo y complejo que protege las plantas de ataques de fitopatógenos. También pueden transformar a sustancias más simples que son menos contaminantes del medioambiente (Ortiz, 2009).

CONCLUSIONES

Los basidiomicetos son importantes en la naturaleza debido a que algunos de ellos son capaces de degradar compuestos orgánicos aromáticos, ligninolíticos, heterogéneos y complejos que pueden ser contaminantes para medio ambiente, por lo tanto es de suma importancia tener una clasificación clara y exacta de las especies con estas particularidades, ya que es un grupo bastante diverso, las herramientas moleculares son eficientes en el momento de clasificar y analizar este tipo de hongos.

Para la extracción de ADN en hongos basidiomicetos es esencial el seguir paso a paso las indicaciones del protocolo y procurar en gran medida de evitar los posibles vectores de contaminación, al igual que tener los equipos volumétricos bien calibrados y reactivos en buen estado, de esta manera se tendrá una buena extracción de material genético de la especie a analizar.

En este caso la atracción de ADN realizada en el hongo en fase monosporica y fase reproductiva, arrojó un resultado positivo para ambas muestra, sin embargo se obtiene mayor cantidad del material genético cuando este es extraído directamente de la fase reproductiva, además en este caso se evita la posible contaminación o inhibición que puede ocasionar las trazas del medio de cultivo del que se extrae la muestra de la fase monosporica.

En ocasiones puede resultar engorroso el rompimiento de la pared celular del hongo, por lo que se recomienda hacerlo con los equipos adecuados o manualmente garantizando el macerado (lisis celular) total de la muestra ya que de este paso depende el resto de análisis moleculares que se deseen hacer.

En el momento de realizar la electroforesis se debe tener un registro donde se indica el número y tipo de muestra que se deposita en cada carril para evitar posibles confusiones, es elemental trabajar de manera rápida pero eficaz ya que el marcador de peso molecular (Fago λ) se degrada fácilmente al estar expuesto ante la luz, como segundo punto pero no menos importante, es clave el momento de depositar las muestras en el carril ya que esta debe caer completamente en el pozo sin dejar derramar muestra en el buffer, al igual que tener cuidado de romper el gel con la punta de la pipeta.

La reacción de PCR es muy sensible a cambios de iones, temperaturas y contaminantes que pueden estar en el ADN o en el agua, por esto es fundamental llevar el correcto paso a paso del protocolo, además de supervisar el correcto funcionamiento del termociclador.

Elegir los ITS adecuados desde el inicio de la investigación llevará a una óptima amplificación de PCR y rápida identificación de la especie, ya que estos tienen secuencias altamente conservadas entre las especies fúngicas, de esta manera se pueden realizar estudios filogenéticos a partir de las herramientas moleculares.

La ventaja de trabajar con técnicas moleculares es que se obtiene eficazmente la muestra de ADN, el protocolo que utilizamos ha sido probado en diferentes especies de hongo, facilitando así el costo y el tiempo para el diseño de una nueva metodología.

Para finalizar, la implementación de herramientas moleculares en la biología es de importancia porque esta busca el entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye las relaciones de la síntesis proteica, metabolismos y procesos evolutivos, los cuales son claves en el momento de caracterización genética de una especie.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. (2005).** Plant Pathology. *5.a ed., Elsevier Academic Press, EE. UU*, 922 .
- AIDAR, M., & PERES, S. (2007).** A single and cost-effective protocol for DNA isolation from bucal epithelial cells. *Brazilian Dentist Journal* 18, 148-152.
- ALEJOS, L., ARAGÓN, M., & CORNEJO, A. (2014).** Capitulo 1 : Extracción y purificación de ADN . En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-20). Mexico: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-Semarnat).
- ANDRADE, R., MATA, G., & SÁNCHEZ, J. (2012).** Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. . En *La producción Iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional* (págs. 9-16). México: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural.
- AQUEVEQUE, P., BECERRA, J., PALFNER, G., SILVA, M., ALARCÓN, J., ANKE, J., Y OTROS. (2006).** Antimicrobial Activity of Metabolites from Mycelial Cultures of Chilean Basidiomycetes . *Journal of the Chilean Chemical Society* , 1057-1060.
- BAENA, J., RAMOS, A., GOMEZ, C., & GOMEZ, D. (2013).** Comparacion de metodos de extraccion de ADN en tejidos parafinados y utilizando para amplificacion por PCR. *Rev.Colomb.Biotecnol. Vol XV N° 1*, 172-179.
- DOOSTY, B., DRIKVAND, R., SALAHUARZI, E., & AMIR, H. (2012).** Comparative analysis and optimization of different DNA extractions protocols in *Satureja khuzistanica*. *International Journal of Biology* 4:4.
- ECHEVERRÍA, F. (2006).** *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin* . Instituto Tecnológico de Costa Rica - Escuela de Biología.
- ESPINOSA, L. (2007).** Capítulo 17: Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 531-554). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- FALCON, L., & VALETA, A. (S.F.).** Extracción de ácidos nucleicos. *Quinta parte: Las herramientas moleculares*, 1-20.
- FIERRO, F. (2014).** Capitulo 2 : Electroforesis de ADN . En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (págs. 27-51). Mexico: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-Semarnat).
- FNC-CENICAFÉ. (2012).** Anuario meteorológico cafetero 2011. *Cenicafé. Chinchina*.
- GUINEA, J., PELÁEZ, T., ALCALÁ, L., & BOUZA, E. (2005).** Evaluation of Czapeck agar and Sabouraud dextrose agar for the culture of airborne *Aspergillus* conidia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 4-333.
- HOLDRIDGE, L. R. (1987).** Ecología basada en zonas de vida. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*, 64-70.

- ICK-DONG, Y., SOO-MUK, C., BYEUNG-WOOK, P., JAE-KUK, Y., NAM-DOO, H., HWAN-MOOK, K., Y OTROS. (2005).** Nuevo polisacárido inmunoestimulante procedente de la cepa de la especie *Phellinus*, y su uso. *Patente 2241219, Corea.*
- LURENTIN, H., & MARTINEZ, A. (2012).** Optimización de protocolo para extracción de ADN del hongo fitopatogénico *Macrophomina phaseolina* (TASSI) GOID. *Boletín del centro de investigaciones biológicas vol.46.Nº.3 .*, 297-309.
- MONRROY, E., FERNANDEZ, C., DIAZ, R., MARTINEZ, G., LLLNAIT, M., & PERURENA, M. (2014).** Evaluación de cuatro métodos de extracción de ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*, 49-56.
- ORTIZ, M. (2009).** *Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina.* Orinoquia , Colombia.
- PERDOMO, H. (2011).** *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS: SCEDOSPORIUM, ACREMONIUM, PHIALEMONIUM, LECYTHOPHORA Y PAECILOMYCES .* España: Reus, Universidad Rovira i Virgili.
- RADSTROM, P., KNUTSSON, R., WOLFFS, P., LOVENKLEV, M., & LOFSTROM, C. (2004).** Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* 26, 133-146.
- RIBEIRO, R., & LOVATO, M. (2007).** Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genetic Molecular Research* 6, 173-187.
- ROGERS, S., & BENDICH, A. (1988).** Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, Belgium.*, 1-10.
- ROJAS, L. (2013).** Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad* , 49-55.
- TOVAR, J., & VALENZUELA, R. (2006).** *Los hongos del Parque Nacional Desierto de los Leones.* México : Gobierno del Distrito Federal/Secretaría del Medio Ambiente.
- TRIANA, W., & VELOZA, B. (2005).** *Utilización del hongo phanerochaete chrysosporium para la remoción de cianuro en reactores de carga secuencial para la industria de recubrimientos electrolíticos.* Bogota: Universidad la Salle.
- URIBE, T., HERRERA, J., OROZCO, N., & BETANCUR, J. (2013).** Uso alternativo del colorante GelRed en la tinción de ácidos nucleicos. *Archivos de Medicina Volumen 13 No 2*, 160-166.
- ÛSUGA, X., & RUGELES, M. (2006).** Ribonucleasas: Su potencial terapéutico en infecciones virales. *Inmunovirología - Biogenesis*, 1-14.
- WEBSTER, J., & WEBER, R. (2009).** Introduction to fungi. *3rd ed. Cambridge University press.*
- WENGENACK, N., & BINNICKER, M. (2009).** *Fungal molecular diagnostics.* Clin. Chest. Med. 30: 391– 408.
- YABAR, C. (2003).** Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. *Instituto Nacional de Salud. Lima-Peru*, 1-69.

3 de Abril de 2017

Santa Rosa de Cabal

CARTA AVAL

La presente es con el objetivo de informar que yo Carolina Osorio Solano, docente de UNISARC, avalo que el trabajo que tiene como título USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN HONGOS BASIDIOMICETOS, EN FASE MONOSPORICA Y FASE REPRODUCTIVA realizado por los estudiantes de IX Semestre del programa de Biología, Vanessa Ruiz Marín y Juan David Quintero Osorio se encuentra terminado y revisado.

Agradezco su atención.

Carolina Osorio Solano

Carolina Osorio Solano

30.239.277.