



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

**Análisis filogenético multi-genes de ADNnr, ADNmt, RPB2 de cultivos de
Tulasnella spp.**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Zambrano de la Cruz, Victoria Estibaliz.

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, BQ.

Loja- Ecuador

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

BQF.

Darío Javier Cruz Sarmiento

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mí consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "**Análisis filogenético multi-genes de ADNnr, ADNmt, RPB2 de cultivos de *Tulasnella* spp** " realizado por el profesional en formación: Zambrano de la Cruz Victoria Estibaliz; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre del 2014

f.

Bqf. Darío Javier Cruz Sarmiento.

DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

CI:.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Zambrano de la Cruz Victoria Estibaliz declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Análisis filogenético multi-genes de ADNnr, ADNmt, RPB2 de cultivos de *Tulasnella* spp. de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Darío Javier Cruz Sarmiento director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: Zambrano de la Cruz Victoria Estibaliz

CI:1311559866

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho cariño en primer lugar a Dios por derramar bendiciones y la sabiduría necesaria para culminar esta etapa universitaria.

A mi mamá, por llenarme de valores, enseñarme a nunca rendirme a pesar de las circunstancias adversas, y especialmente por enseñarme a creer en mis sueños.

A mi tía, mi otra mamá que me ha ofrecido su apoyo incondicional en todo momento y ha sido una luz en mi vida.

A Carlos, por ser parte de mi vida acompañarme en los buenos y malos momentos con su comprensión y apoyo.

Por ser los pilares en mi vida y mi motivo para salir adelante, esta tesis se las dedico a uds que siempre confiaron en mí incluso cuando yo ya no creía que podía dar más.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera especial a la Titulación de Bioquímica y Farmacia, y a todos los maestros que fueron parte de mi formación profesional al brindarme todos sus conocimientos teóricos y prácticos.

Al Centro de Biología Celular y Molecular dentro del cual al Departamento de Ciencias Naturales por acogerme, poder ser parte de sus actividades y sobre todo poner a disposición el material necesario para el desarrollo de este trabajo.

Un sincero agradecimiento hacia mi tutor Bq. Darío Cruz quien con paciencia ha sabido brindarme sus conocimientos y guiarme en todo momento durante la realización de esta tesis.

Y finalmente a mis amigas/os, y familiares que de una u otra forma han contribuido con la culminación de esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Tulasnellaceae- Cantharellales.....	1
1.1.2. Importancia de <i>Tulasnella</i> como micobionte	2
1.1.3. <i>Tulasnella</i> y su sistemática dentro de Cantharellales.....	3
1.2. Marcadores moleculares	5
1.2.1. ADN nuclear ribosomal en el estudio de <i>Tulasnella</i> spp.....	5
1.2.2. ADN mitocondrial en el estudio de <i>Tulasnella</i> spp.	6
1.2.3. RPB2 en el estudio de <i>Tulasnella</i> spp.....	8
1.3. Técnicas y análisis moleculares	9
1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	9
1.3.2. Cloning molecular.	9
1.3.3. Secuenciación tradicional por el método Sanger y Maxam–Gilbert.....	10
1.3.4. Secuenciación de nueva generación (NGS).....	11

1.3.5. Análisis filogenético molecular usando el método de Maximun likelihood.	12
METODOLOGÍA.....	13
2.1. Recolección de muestras.....	14
2.2. Primers o cebadores empleados en el estudio.....	14
2.3. PCR y electroforesis.	15
2.4. Cloning molecular.	16
2.5. Edición y análisis filogenético de las secuencias obtenidas.	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	19
3.1. Muestreo y secuenciación.....	20
3.2. Porcentajes de similitud intra e inter-especies.	20
3.3. Analisis de Filogenias	23
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Correspondencia entre estados Anamorfo y Teleomorfo de algunos miembros del grupo Forma-Rhizoctonia.....	2
Tabla 2. Información sobre algunas tecnologías de secuenciación masiva en el mercado o por de salir.....	11
Tabla 3. Lista de Primers para ADN nuclear ribosomal	14
Tabla 4. Lista de primers para ADN mitocondrial.....	15
Tabla 5. Lista de primers para RPB2	15
Tabla 6. Componentes del mix usando Taq Phusion® Master Mix (Finnzymes).....	15
Tabla 7. Componentes del mix usando Taq Phusion® Master Mix (Finnzymes).....	16
Tabla 8. Número de secuencias obtenidas desde cultivos de <i>Tulasnella</i> spp.....	20
Tabla 9. Porcentajes de variación intra y inter-especies calculados con la opción “Complete delection” (MEGA v5).....	21
Tabla 10. Porcentajes de variación intra e inter-especies calculados con la opción “partial delection” (MEGA v5).....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología típica de un basidio, esterigmas y esporas lisas en <i>Tulasnellaceae</i>	1
Figura 2. Relaciones filogenética del género <i>Tulasnella</i> en relación a grupos afines usando información de los genes nSSU, nLSU, mtSSU, y RPB2.	4
Figura 3. Diagrama de las regiones que conforman el ADNnr y su ubicación para las repeticiones en tándem.....	6
Figura 4. Diagrama de la subunidad larga de ADNmt y ubicación de primers más conocidos....	7
Figura 5. Diagrama general de las subregiones de RPB2 y ubicación de los cebadores más frecuentemente utilizados.	8
Figura 6. Esquema general del proceso de PCR en la ampliación de ADN.....	9
Figura 7. Esquema general del proceso de clonación molecular.....	10
Figura 8. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región LSU parcial de ADNnr. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 74%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio. El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de <i>Tulasnella</i> más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.....	25
Figura 9. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región RPB2 de Polimerasa. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 56%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio..El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de <i>Tulasnella</i> más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.....	27
Figura 10. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región SL parcial de ADNmt. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 87%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio..El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de <i>Tulasnella</i> más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.....	29

RESUMEN

Los miembros del género *Tulasnella*, orden Cantharellales (Filum Basidiomycota) son considerados importantes sapotrófos y micobiontes formadores de micorrizas de orquídeas. Estos hongos por su elevada variabilidad morfológica y molecular han sido estudiados en busca de umbrales adecuados que permitan la correcta definición de especies. Para dar un aporte molecular a esta problemática de variabilidad se realizó un análisis de varios genes ADNnr, ADNmt y RPB2 a nivel intra e inter-especies desde cultivos de *Tulasnella*. Se analizaron 191 secuencias, en las cuales observamos los porcentajes de variación intra e inter-especies, permitiendo proponer los umbrales de 0,8% para ADNnr-LSU parcial, 3% para RPB2. En ADNmt-SL parcial con 0% de variabilidad no permitió determinar dicho umbral.

Estos umbrales fueron contrastados para los clados formados en las diferentes filogenias de los tres genes dejando una congruencia en las especies "*Tulasnella asymmetrica*", *T. asymmetrica*, *T. cf. pinicola*, *T. eichleriana* y *T. violea* ya predefinidas con la región ITS-5.8S en una investigación previa.

Nuestros análisis sugieren al marcador RPB2 como buen candidato para la definición de especies molecularmente en *Tulasnella* previo un nuevo re análisis.

Palabras claves: *Tulasnella*, ADNnr, ADNmt, RPB2, "Barcode gap".

ABSTRACT

The members of genus *Tulasnella* spp. order Cantharellales (Phylum Basidiomycota) are considered important mycobionts forming orchid mycorrhizae. These fungi due to the high morphological and molecular variability are studied searching to appropriate thresholds necessary to correct species definition. In order to contribute to solve the problem of variability, an analysis was realized with three genes DNAnr, DNAmr and RPB2 from culture of *Tulasnella* spp. at intra-species and inter-specific levels.

Sequences 191 (on total) were analyzed in this study, observing the higher intra-specific variation and the minimal inter-specific variation. We propose some thresholds for each gene: 0.8% for DNAnr-LSU partial, 3% for RPB2. For DNAmr-SL partial with 0% of the intra-specific variation was not possible determine a threshold.

These thresholds to the three genes were compared and contrasted with the clades formed in the different phylogenies showing a congruence in the results for the following species "*Tulasnella asymmetrica*" *T. asymmetrica*, *T. cf. pinicola*, *T. eichleriana* and *T. violea* which were predefined in a previous investigation applying the region ITS-5.8S.

Our analyses suggest that the marker RPB2 could be a good candidate to find a threshold to define species molecularly in *Tulasnella* previous a new reanalysis.

Keywords: *Tulasnella*, DNAnr, DNAmr, RPB2, "Barcode gap".

INTRODUCCIÓN

La clasificación taxonómica de los seres vivos está conformada por cinco reinos, Animalia-Animales, Plantae-Plantas, Fungi-Hongos, Protista-Protozoos y el actualmente obsoleto reino Monera-Arqueas y Bacterias, estos fueron propuestos por el ecólogo vegetal, algólogo y botánico Whittaker (1969). Se considera al reino de los hongos como mucho más diverso que el reino de las plantas y animales, incluyendo siete Filos (Basidiomycota; Blastocladiomycota; Ascomycota; Glomeromycota; Chytridiomycota; Neocallimastigomycota y Microsporidia).

El Filum Basidiomycota contiene dentro de su grupo hongos que cumplen roles ecológicos de vital importancia para mantener el equilibrio de los ecosistemas, como por ejemplo, especies de hongos dentro del género *Tulasnella*–Cantharellales (Moncalvo et al., 2006). Este género es importante por incluir especies de carácter, saprótrofo como descomponedores de madera, así como importantes micobiontes de orquídeas formando micorrizas de orquídeas y asociaciones con hepáticas (Cruz et al., 2011; Kottke et al., 2003; 2010; Suárez et al., 2006).

Sin embargo estudios previos del género *Tulasnella* ponen en evidencia las dificultades para la delimitación de especies, principalmente debido a su elevada tasa de variabilidad morfológica y molecular (Cruz et al., 2014; Cruz et al., 2011; Moncalvo et al., 2006). Varios estudios en la actualidad buscan entender dicha variabilidad genética aplicando análisis moleculares y correlacionando con datos morfológicos (Cruz et al., 2014; Pereira et al., 2014). Algunos estudios proponen la región ITS-5.8S de ADN nuclear ribosomal (ADNnr) como el marcador universal para hongos (Schoch et al., 2012).

Sin embargo aún se deja abierta la discusión en el uso de esta región para la definición de especies en varios grupos de hongos incluido el género *Tulasnella*. Cruz et al. (2011 y 2014) identificó variaciones genéticas entre individuos de una misma mofo-especie inferiores al 4% desde fructificaciones de *Tulasnella* spp. para el gen de ADNnr ITS-5.8S. Dada la importancia de este grupo como saprótrofo y micobionte de diferentes organismos, este estudio pretende analizar la variación genética y la determinación del llamado “Barcode gap” evaluando la variabilidad intra-especie e inter-especies desde cultivos puros de *Tulasnella* spp.

Tres genes, secuencia parcial de ADN nuclear ribosomal subunidad larga (ADNnr-LSU parcial), secuencia parcial de ADN mitocondrial subunidad larga (ADNmt-SL parcial) y parte de la

segunda subunidad grande de la ARN polimerasa (RPB2) se aplicaran para ser contrastados con los resultados obtenidos para el gen ADNnr ITS-5.8S por Cruz et al. (2014).

MARCO TEÓRICO

1.1. Tulasnellaceae- Cantharellales

Morfológicamente los miembros de la familia Tulasnellaceae se caracterizan por un único y distintivo tipo de **basidio** u holobasidio (Figura1). **Esterigmas** globosas o hinchadas (Alexopoulos et al., 1996; Weiss & Begerowd, 2004; Wells & Bandoni, 2001). **Hifas** claras, bi o multinucleadas, con o sin conexiones por fíbulas. Las **septas** poseen doliporos y parentomas imperforados con márgenes recurvados. Las **basidioesporas** son de múltiples formas, redondas, fusiformes, espiraloides y alantoides, por lo general son lisas y su germinación puede ser formando ballistosporas o esporas secundarias por repetición, por lo que se los clasificó tradicionalmente dentro de los “Heterobasidiomycetes” (Cruz et al., 2011; Roberts, 1999; Suárez et al., 2006; Warcup & Talbot, 1966, 1967, 1971, 1980; Wells & Bandoni, 2001).

Tres géneros actualmente son reconocidos: *Tulasnella* syn. *Gloeotulasnella* (Tulasnelloid basidia y miembros con cistidias); *Pseudotulasnella* (Tulasnelloid basidia parcialmente septada), y *Stilbotulasnella* (Tulasnelloid basidia con formación anelidic blastoconidias) (Weiss & Begerowd, 2004).



Figura 1. Morfología típica de un basidio, esterigmas y esporas lisas en Tulasnellaceae. Fuente: Alexopoulos et al., 1996.

Cerca de 54 especies de Tulasnellaceae son mencionadas por Kirk et al. (2008). Las especies de *Tulasnella* más conocidas son muy distribuidas y registradas principalmente en muchos países del hemisferio norte, así como en Australia. Sin embargo *Tulasnella* ha sido poco estudiada en América del Sur (Cruz et al., 2011, 2014; Greslebin & Rajchenberg, 2001).

Las especies de *Tulasnella* pueden encontrarse en forma natural o artificial en sus estados holomórficos (sexual o asexual), o fructificando en su forma teleomórfica (sexual) como descomponedores. Así mismo es muy común que los aislamientos en cultivos solamente generen estados anamórficos (asexual) (Pereira et al., 2014).

Debido a la dificultad de generar los estados teleomórficos desde cultivos el género *Tulasnella* fue clasificado dentro del grupo artificial denominado Forma-*Rhizoctonia* (Roberts, 1999). Esta clasificación es muy discutida y confusa ya que incluye varios géneros con estado teleomórfico diferente (Tabla 1). *Tulasnella* spp. en su forma asexual principalmente se caracterizan por generar hifas monilioides, totalmente septadas, y compartimentos elipsoides (Pereira et al., 2014; Roberts, 1999) estas hifas pueden ser heterocarióticas (dos o más núcleos genéticamente diferentes) o homocarióticas (núcleos genéticamente idénticos) (Roberts, 1999).

Varios miembros de este grupo Forma-*Rhizoctonia* incluyen los estados anamórficos y telomórficos de varios géneros, como se detallan en la Tabla 1. (Roberts, 1999; Sharma et al., 2003).

Tabla 1. Correspondencia entre estados Anamorfo y Teleomorfo de algunos miembros del grupo Forma-*Rhizoctonia*.

Anamorfo (Grupo Forma- Rhizoctonia)	Telomorfo
<i>Epulorhiza</i>	<i>Tulasnella</i> o <i>Sebacina</i>
<i>Ceratorhiza</i>	<i>Ceratobasidium</i>
<i>Monoliopsis</i>	<i>Thanatephorus</i> o <i>Waitea</i>

Fuente: Sharma et al., 2003.

1.1.2. Importancia de *Tulasnella* como micobionte

El género *Tulasnella* y al igual que otros basidiomycetes han sido reportados formando endomicorrizas principalmente en orquídeas, ectomicorrizas y asociaciones con hepáticas (Smith & Read, 2008). Siendo conocidos principalmente por ser indispensables en la germinación y establecimiento de semillas de orquídeas, sean estas epífitas o terrestres (Kottke

et al., 2013; Suárez et al., 2006). Estas interacciones simbióticas brindan un intercambio mutualista donde el hongo comparte nutrientes y minerales a cambio de azúcares (Sharma et al., 2003; Suárez et al., 2006) demostrándose así la importancia de estos organismos en diversos ecosistemas (Suárez et al., 2008).

1.1.3. *Tulasnella* y su sistemática dentro de Cantharellales.

Los Cantharellales son un orden de hongos en la clase Agaricomycetes con diferentes configuraciones morfológicas como por ejemplo, rebozuelos (Cantharellaceae), en forma de dientes (Hydnaceae), clavarioides (Aphelariaceae y Clavulinaceae) y corticioides (Botryobasidiaceae). El orden históricamente fue propuesto en 1926 por el micólogo alemán Ernst Albert Gäumann para incluir tres familias: Cantharellaceae (incluyendo el Hydnaceae), Clavulinaceae y Exobasidiaceae (Hawksworth, 1995).

Actualmente los análisis moleculares utilizando secuencias de ADN, ha permitido redefinir el orden Cantharellales, incluyendo nuevas familias, como por ejemplo hongos corticioides “heterobasidiomycetes” (Ceratobasidiaceae y Tulasnellaceae) y otros clavaroides como (Clavulinaceae), así este orden contiene 7 familias, 38 géneros y 544 especies (Kirk et al., 2008).

Dentro de la familia Tulasnellaceae se encuentra el género *Tulasnella* uno de los hongos micobiontes más comunes de orquídeas (Kottke et al., 2010; Suárez et al., 2006). Según los resultados de análisis multigénico (Figura 2) realizados por Moncalvo et al. (2006), *Tulasnella* muestran una ambigüedad de localización dentro de Cantharellales. Esto sugiere que *Tulasnella* debería ser segregado de Cantharellales y por ende generar un grupo hermano denominado “Tulasnellales” (Matheny et al., 2007).

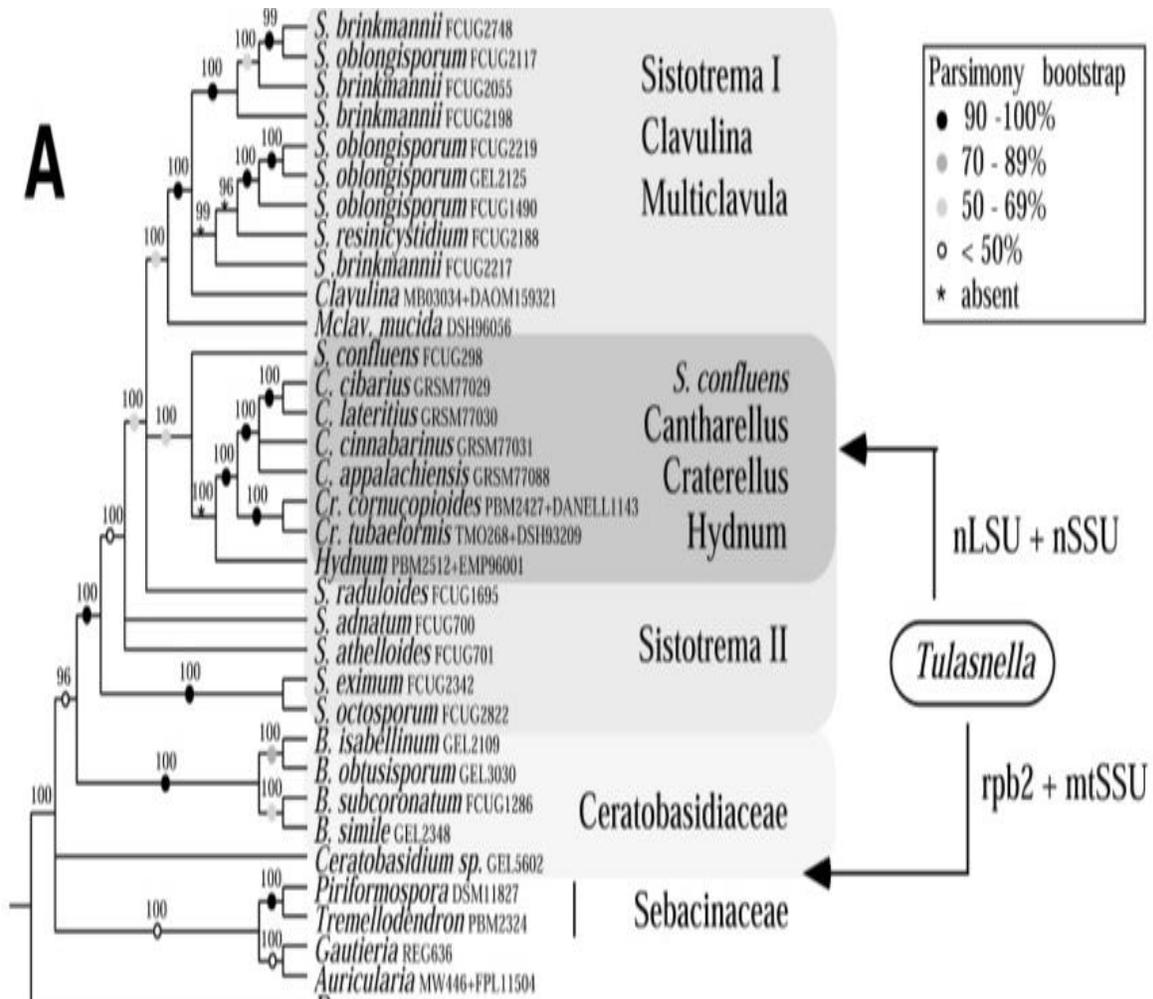


Figura 2. Relaciones filogenética del género *Tulasnella* en relación a grupos afines usando información de los genes nSSU, nLSU, mtSSU, y RPB2.

Fuente: Moncalvo et al., 2006.

1.2. Marcadores moleculares

Existen diversos marcadores moleculares aplicados en estudios biológicos, ecológicos y principalmente de diversidad, que permiten analizar genes específicos de interés. El gen de ADN nuclear ribosomal ITS-5.8S es el marcador genético más frecuentemente secuenciado en hongos y es utilizado en general para análisis filogenéticos (en el caso de 5.8S) e identificación a nivel de especie (Begerow et al., 2010). Este gen es considerado como el marcador universal para estudios de diversidad en hongos (Schoch et al., 2012).

No obstante, el uso de un solo marcador o la aplicación de umbrales genéticos como por ejemplo el 3% de diferencia genética en la región ITS-5.8S aplicada para hongos (Nilsson et al., 2008) puede presentar limitaciones. Muchos grupos de hongos pueden presentar diferentes niveles de variabilidad intra-especies, inter-especies e inclusive intra-individuo, lo cual puede generar una sobre estimación o subestimación de la diversidad de especies dentro de un ecosistema (Rodríguez et al., 2003).

1.2.1. ADN nuclear ribosomal en el estudio de *Tulasnella* spp.

El grupo de genes en el ADN nuclear ribosomal (ADNnr) se considera que son altamente conservados entre los organismos eucarióticos y normalmente se emplean como marcadores moleculares (Pfenning & Abreu, 2000). El ADNnr consiste en repeticiones en tándem de secuencias compuestas por la región NTS (Espaciador No Transcripcional), la región ETS (Espaciador Externo Transcripcional), la subunidad 18S o SSU, (Subunidad Pequeña), la región ITS1 (Espaciador Interno Transcripcional), la subunidad 5.8S, la región ITS2 y la subunidad 28S o LSU (Subunidad Grande) (Sonnenberg et al., 2007).

El ADNnr posee una tasa de evolución lo suficientemente significativa como para llevar a cabo comparaciones a nivel de taxa. Tiene regiones muy conservadas como la subunidad 18S o SSU en eucariotas (Figura 3) que provee información muy general y a la vez posee regiones que varían dentro de un mismo género como ITS-5.8S, por lo que también provee información muy específica (Bruns et al., 1991).

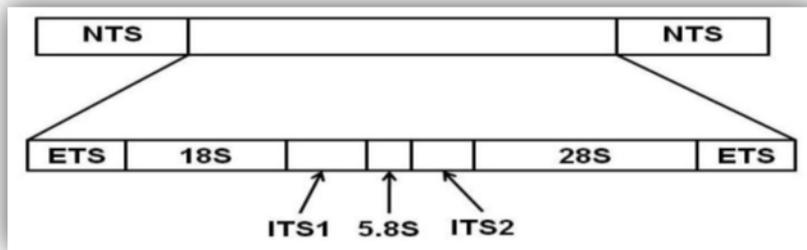


Figura 3. Diagrama de las regiones que conforman el ADNnr y su ubicación para las repeticiones en tándem.

Fuente: Binder & Hibbett, 2003.

En estudios recientes de miembros de género *Tulasnella* y otros hongos Cantharelloides se han reportado una tasa excepcionalmente alta de variabilidad molecular en diferentes genes de ADNnr y en especial para la región ITS-5.8S (Moncalvo et al., 2006). Dicha variabilidad genera dificultades en alineamientos de secuencias (Suárez et al., 2006; Shefferson et al., 2007; Taylor & McCormick 2008; Nontachaiyapoom et al., 2010) y puede afectar en la delimitación y aplicación de umbrales universales para definir especies.

No obstante en un estudio realizado por Cruz et al. (2011, 2014) a partir de basidiomas y cultivos de *Tulasnella* spp. de Ecuador y Alemania, se encontraron diferencias proporcionales de variabilidad intra-especie menores al 4% y variaciones inter-especies superiores al 9% para esta región ITS-5.8S. Esto deja la posibilidad de definir un umbral en el rango del 3% y 5% para delimitación de especies en *Tulasnella* como lo ya discutido y aplicado por otros autores (Girlanda et al., 2011; Jacquemyn et al., 2010; Martos et al., 2012).

1.2.2. ADN mitocondrial en el estudio de *Tulasnella* spp.

El ADN mitocondrial (ADNmt) tiene un tamaño de 15 a 17kb aproximadamente, variando su tamaño entre diferentes especies (Brown et al., 1979). Es una molécula circular, helicoidal, con doble hebra, y súper condensada (Schwartz & Vissing, 2002) con diferencias en animales, hongos y plantas. El ADNmt en animales es codificante en toda su extensión para algún producto (Figura 4) mientras que el ADNmt de hongos y plantas contienen varios espaciadores (intrones) que no codifican para ningún producto (Pakendorf, 2005).

Las moléculas de ADN de los cloroplastos y mitocondrias son especialmente importantes para trazar historias geográficas y de estructura poblacional estrechamente relacionada porque son de herencia uniparental y no se recombinan (Dirienzo & Wilson, 1991).

Los genomas de ADNmt en hongos han sido menos estudiadas que en los animales y plantas, sin embargo, tienen un gran potencial para indagar en la evolución de los genomas de las organelas. La característica más evidente es que, si bien el contenido de genes se conserva en gran parte, el orden de los genes es muy variable, tanto “entre” como “dentro” de los principales filos de hongos (Aguileta et al., 2014).

Una diferencia entre los dos más grandes Filos de hongos, Ascomycota y Basidiomycota, es que en la mayoría de los ascomicetos sus genes son normalmente codificados en la misma cadena de ADNmt, mientras que en basidiomicetos pueden ser codificados en ambas hebras de ADNmt (Aguileta et al., 2014). Otra característica notable es que, aunque los hongos son un linaje más estrechamente aliado con los animales, el ADNmt en estos organismos muestran señales de recombinación, una característica que es más similar al ADNmt de plantas. (Lang et al., 2007).

El ADNmt se ha utilizado para estudiar la evolución de hongos y señal filogenética (Cedergren & Lang, 1985).



Figura 4. Diagrama de la subunidad larga de ADNmt y ubicación de primers más conocidos.

Fuente: Binder & Hibbett, 2003.

1.2.3. RPB2 en el estudio de *Tulasnella* spp.

Otro marcador importante en el estudio de hongos es el ARN polimerasa (RPB) una enzima que cataliza la transcripción del ADN en los eucariotas. Esta enzima cuenta con 10 a 12 subunidades caracterizadas por su función desempeñada en el proceso de transcripción (Brandon, 2006). La segunda subunidad más grande es la RPB2 que mantiene contacto con el sitio activo de la enzima entre la plantilla de ADN y el ARN mensajero recién sintetizado y es por esto su importancia al momento de la transcripción (Malkus et al., 2006)

La región RPB2 entre dominios 6 y 7 (Figura 5) al ser más variable, se ha demostrado como la más adecuada para la determinación de especies a nivel molecular. Esta región incluso es más variable que el espaciador interno transcripcional (ITS) de rápida evolución, en los hongos como *Cortinarius* (Frøslev et al., 2005). RPB2 se lo ha utilizado también en estudios filogénicos de Ascomycetos y Basidiomycetos (Matheny et al., 2007), aplicable incluso para definir la relación evolutiva que existe entre Cantharellales y *Tulasnella* (Moncalvo et al., 2006).

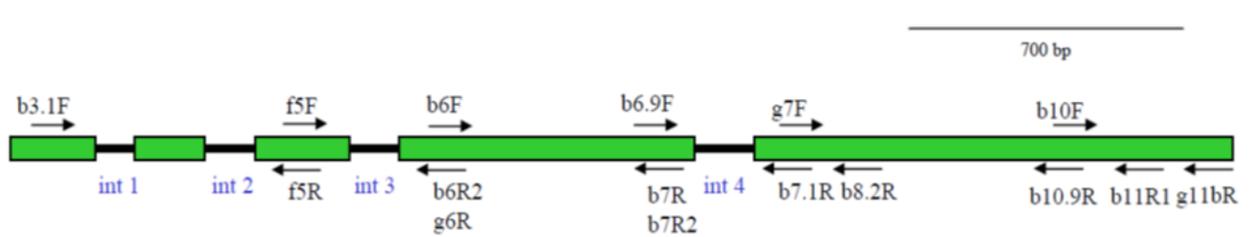


Figura 5. Diagrama general de las subregiones de RPB2 y ubicación de los cebadores más frecuentemente utilizados.

Fuente: Brandon, 2006.

1.3. Técnicas y análisis moleculares

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La identificación por PCR es un método para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN, utilizando una enzima polimerasa estable al calor. Ciclos de calentamiento y enfriamiento son necesarios para seccionar y separar, sucesivamente las hebras de ADN (Figura 6). Este método utiliza los fragmentos obtenidos como plantillas para la formación de un nuevo ADN copia (Carranza, 2006). La PCR es una de las técnicas más comúnmente usada para estudios de caracterización de organismos como por ejemplo los hongos (Bruns et al., 2004).

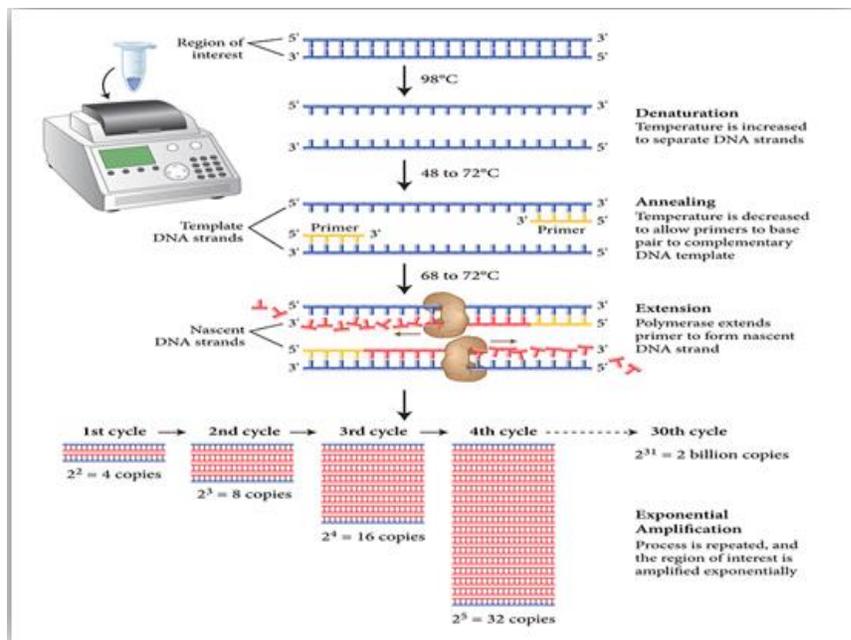


Figura 6. Esquema general del proceso de PCR en la amplificación de ADN.

Fuente: New England Biolabs (2014).

1.3.2. Cloning molecular.

La clonación puede definirse como el proceso por el cual se consiguen copias idénticas ya sea de una molécula, célula o de un organismo (Ramirez, 2010). En el caso más específico la clonación molecular se basa en el uso de moléculas de ADN recombinante que son introducidas en un organismo huésped donde se replica idénticamente. La clonación molecular incluye principalmente dos componentes: a) el fragmento de ADN de interés para ser replicado y b) un esqueleto vector o plásmido que contiene todos los componentes para la replicación en el

huésped (Saverio, 2000). Además el proceso de clonación molecular consta de los siguientes pasos detallados (Figura 7). El clonaje molecular es una técnica que se puede utilizar en estudios de diversidad de organismos, así mismo en estudios de identificación de variabilidad genética dentro de un organismo. Por ejemplo ha sido utilizado en estudios de hongos como el género *Tulasnella*, analizando la variabilidad intra e inter-especie (Cruz et al., 2011).

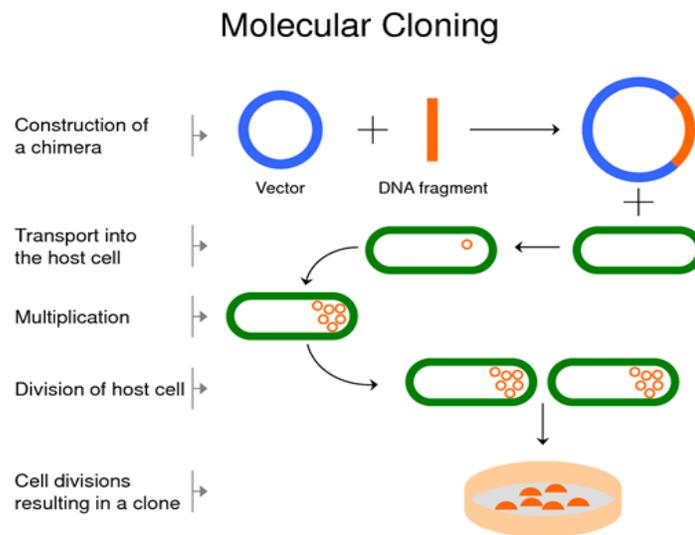


Figura 7. Esquema general del proceso de clonación molecular.

Fuente: New England Biolabs (2014).

1.3.3. Secuenciación tradicional por el método Sanger y Maxam–Gilbert.

Las técnicas de secuenciación empleadas actualmente de forma rutinaria están basadas en metodologías publicadas en la década de los 70, conocidos como el método de Sanger y el de Maxam–Gilbert, siendo el primero el más popular. Ambos se basan en la generación de una población de moléculas marcadas radiactivamente, que representan todos los tamaños y combinaciones de nucleótidos posibles (Campion & Canul, 2004).

El procedimiento Sanger emplea una ADN polimerasa que copia la cadena molde a ADN de cadena sencilla (ssADN) en presencia de una mezcla de reacción que contiene los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y una pequeña cantidad de un didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP), que es un análogo del primero. Se llevan a cabo cuatro reacciones en paralelo, cada

una de las cuales contiene un ddNTP ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, respectivamente (Dorado, 2007).

La ADN polimerasa es capaz de incorporar el análogo en la cadena que se sintetiza, pero como éste carece de extremo 3'-OH, dicha enzima es incapaz de unirse al siguiente nucleótido y por consiguiente se "termina" la reacción. Es por ello que esta técnica recibe también el nombre de terminación de dideoxidos y los ddNTPs suelen denominarse "terminadores" (Dorado, 2007).

1.3.4. Secuenciación de nueva generación (NGS).

La Secuenciación de nueva generación aparece cerca de 30 años después del método de Sanger, involucrando varias técnicas (Tabla 2). La principal característica de estas nuevas metodologías es la posibilidad de secuenciado masivo, sin el uso de dideoxynucleotidos terminadores. Esto significa que el número de secuencias obtenidas durante una corrida supera muchas veces el máximo de 96 secuencias por corrida (Greif, 2012). Esto se logra, en uno de los métodos disponibles, mediante la ruptura de todo el genoma "shotgun" generando trozos pequeños "short reads", que son luego son ligados a las pequeñas piezas de ADN (Zhanga et al., 2011).

Tabla 2. Información sobre algunas tecnologías de secuenciación masiva en el mercado o por de salir.

Plataforma	Tecnología	Longitud de lectura	Año
Solid (Applied Biosystem)	Ligación	50 bases	2007
Genetic Analysis System (helicos)	True Single Molecular Sequencing	25 a 55 bases	2008
SMRT (Pacif Biosciences)	Single Molecule Real time	>1000 bases	ND
Ion Torrent	Micro pHímetros	> 200 bases	2011
Oxford Nanopore	Label free, electrical	ND	ND

Fuente: Greif, 2012

Estos nuevos métodos de secuenciación masiva no ofrecen lecturas tan largas como el método clásico de Sanger, aunque en pocos años se ha mejorado sustancialmente el largo de las secuencias obtenidas y en algunos casos alcanzan longitudes comparables a Sanger (Tabla 2) (Greif, 2012).

Estos resultados de secuencias cortas muchas veces no pueden ser interpretados o montados con precisión en cualquier ADN de referencia, esto es debido a que algunos "short reads" son demasiado cortos y puede coincidir con muchas regiones diferentes del genoma (Zhang et al., 2011).

1.3.5. Análisis filogenético molecular usando el método de Maximum likelihood.

La taxonomía tradicional inicialmente usaba datos morfológicos obtenidos mediante la medición y cuantificación de las propiedades fenotípicas de los organismos representativos (Mount, 2004). Mientras que actualmente se utiliza el análisis comparativo de datos a partir de secuencias para la reconstrucción y generar hipótesis sobre la historia evolutiva de las especies (Tamura et al., 2011) .

En análisis de filogenia el método de Maximum likelihood (ML) emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, aquel que tenga la más alta probabilidad (verosimilitud) de reflejar el proceso evolutivo más cercano a lo real. El ML es un método exhaustivo que busca todas las posibles topologías y considera cada posición de los nucleótidos y no solo los sitios informativos dentro de un alineamiento (Andreatta & Ribeiro, 2002).

Es considerado un método rápido para generar clados (agrupación de los datos) con un alto grado de confiabilidad (Valcárcel, 2010).

METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras.

El ADN de cultivos puros de *Tulasnella* spp. fueron proporcionados desde el trabajo de Cruz et al. (2011) y extraídos con el kit DNeasy Plant Mini Kit extracción (Qiagen), según las indicaciones del fabricante (Girlanda et al., 2011). Se utilizaron siete cultivos puros de *Tulasnella* spp. los cuales tienen diferentes orígenes detallados a continuación:

- Aislados desde fructificaciones colectadas por (D. Cruz) Alemania: DC292 (*T. violea*), DC309 (*T. cf. pinicola*) y préstamo desde la Universidad de Tübingen-Alemania: FO 2438^a (*Tulasnella* sp.), y FO 35532.
- Aislados desde raíces de orquídeas de Australia y disponibles a través de la Universidad de Tübingen-Alemania: 4306 (*Tulasnella asymmetrica* MAFF 305808), 4304 (*Tulasnella asymmetrica* Warcup & Talbot MAFF 305806), y 4303 (*T. sp.*).

2.2. Primers o cebadores empleados en el estudio.

Se seleccionaron varios pares de primers tanto universales para eucariotas como específicos para *Tulasnella* enlistados a continuación:

Tabla 3. Lista de Primers para ADN nuclear ribosomal

NOMBRE:	SECUENCIA:	FUENTE:
5.8S Tul-F	5'-TCATTC GATGAAGACCGTTGC-3';	Suarez 2006
NL4-R	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3';	White et al. 1990
ITS1-F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';	White et al. 1990
TW14-R	5'-GCTATCCTGAGGGAAACTTC-3';	Cullings 1994
ITS4 Tul-R	5'-CCG CCAGATTCACACATTGA-3';	Taylor 1997

Tabla 4. Lista de primers para ADN mitocondrial

NOMBRE:	SECUENCIA:	FUENTE:
MLIN3-F	5'-CGACACAGGTTCTAGGTAG-3'	Bruns et al., 1998
CML 7.5-R	3'-CCGC CCCAGTCAAACCTGCC-5'	Bruns et al., 1998

Tabla 5. Lista de primers para RPB2

NOMBRE:	SECUENCIA:	FUENTE:
RPB2-5F	5'-GAYGAYM GWGATCAYTTYGG-3';	Liu et al., 1999
RPB2-7.1R	5'-CCCATRGCYTGTTMCC CATDGC-3';	Matheny 2005

2.3. PCR y electroforesis.

Las condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) constaron de 30 ciclos empezando con una desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos; seguido de cada ciclo que consiste de un paso de desnaturalización a 98°C por 10 segundos; anillamiento desde 40°C hasta 62°C dependiendo de la combinación de primers por 20 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; finalizando la PCR con una extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Taq Phusion® (Finnzymes) ya sea en Master Mix o aplicando el buffer 5X HF Reaction Buffer (Finnzymes) (Carranza, 2006). El volumen final de reacción de la PCR fue optimizado a 20ul, detallado en las siguientes tablas.

Tabla 6. Componentes del mix usando Taq Phusion® Master Mix (Finnzymes)

COMPONENTES	X1
Taq Phusion® Master Mix (Finnzymes)	10 µl
Agua desionizada (ddH₂O)	6,4 µl
Primers-F (25pm/ µl)	0,4 µl
Primers-R (25pm/ µl)	0,4 µl

BSA 10%	0,8 µl
Producto de cultivo de <i>Tulasnella</i>	2 µl
TOTAL	20 µl

Elaboración: Zambrano, V (2014).

Tabla 7. Componentes del mix usando Taq Phusion® Master Mix (Finnzymes)

COMPONENTES	X1
Agua desionizada (ddH₂O)	11 µl
5X HF Phusion® HF Reaction Buffer (Finnzymes)	4 µl
Primers-F (25pm/ µl)	0,8 µl
Primers-R (25pm/ µl)	0,8 µl
DNTP Mix (Invitrogen) (10mM)	0,4 µl
Taq Phusion ® (Invitrogen)	0,2 µl
BSA 10%	0,8 µl
Producto de cultivo de <i>Tulasnella</i>	2 µl
TOTAL	20 µl

Elaboración: Zambrano, V (2014).

Los resultados de la PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de UltraPure™ Agarosa (Invitrogen) al 1% (agar en solución 1X de Gel Red (Biotium), como lo dice el procedimiento del fabricante). Se tomó 2.5 µl de producto de PCR más 1.5 µl de azul de bromofenol y se corrió frente a 1.5 µl de marcador de peso molecular 1Kb (TrackIt™ 100bp DNA Ladder de Invitrogen) en buffer de corrida TBE 1X (Trisborato, EDTA). Las condiciones de corrida de electroforesis son: 128 V, 300 mA durante 20 minutos. El gel se revelara en el equipo KODAC EDAS 290.

2.4. Cloning molecular.

Los mejores productos con las bandas más claras observados en la foto de la PCR se seleccionaran para la realización del cloning con Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) (Kottke et al., 2010) según las normas de manufactura y la siguiente modificación del mix para optimización de reactivos:

- Solución Salina (Invitrogen): 0,33 μ l
- Vector PCR ® Blunt II TOPO® (Invitrogen): 0,33 μ l
- Producto de PCR :1,33 μ l

Para el proceso de check-cloning (PCR con 5x Green GoTaq® Reaction Buffer de Promega y primers M13F y M13R) se seleccionaron 15 colonias. De las 15 colonias chequeadas se toman 10 positivas con el ADN inserto y se incuban toda la noche en medio líquido Difco™ LB Broth MILLER más kanamicina. La purificación del vector y recuperación del ADN inserto se lo efectúa con el Kit S.N.A.P (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Todos los productos se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Seoul Korea).

2.5. Edición y análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

Para las secuencias obtenidas de los diferentes genes, se revisa los cromatogramas, elaboración de consensos y comparación en BLAST (Altschul et al., 1997) con el programa Codon Code Aligner V.4.2.4. Los alineamientos de las diferentes secuencias se efectuaron con el programa MAFFT V. 6.6.2 (Kato et al., 2002) siguiendo la recomendación de Cruz et al. (2011, 2014). Los alineamientos fueron también revisados visualmente en busca de incongruencias especialmente en las colas.

Se efectuó un árbol preliminar Neighbor-Joining (NJ) en el programa (MEGA v5) para todos los alineamientos de los diferentes genes con el fin de definir los grupos correspondientes a especies determinadas desde los cultivos puros, según los análisis de la región ITS-5.8S por Cruz et al. (2014). Esto nos permitió efectuar y evaluar las diferencias proporcionales entre las secuencias en base a las matrices de distancia (Pairwise Differences) por el método “partial deletion” y “complete deletion” (Tamura et al., 2011) en búsqueda de las máximas variaciones intra-especies para proponer umbrales (Schloss et al., 2011). Además se buscó el denominado “Barcode gap” el cual es estimado entre la máxima variación intra-especies (MVIE) y la mínima variación inter-especies (LVIE) y corroborar nuestros umbrales (Meier et al., 2008).

De los diferentes grupos o clados formados en la filogenia preliminar se seleccionó una secuencia referente para la búsqueda de las secuencias más cercanas en las bases de datos del BLAST (Sonnenberg et al., 2007). Una vez obtenidas las secuencias más relacionadas a

nuestras secuencias desde las bases de datos se desarrolló una nueva filogenia con análisis Maximun likelihood empleado el software MEGA v5, bajo los siguientes parámetros.

- 1000 bootstrap (BS) replicates (Felsenstein, 1985).
- General time reversible model.
- Gama distributed within variant sites.

Los valores de los porcentajes de diferencias proporcionales obtenidos a partir de las secuencias correspondientes para cada especie según Cruz et al. (2014) también se emplearon para contrastar con la formación de los diferentes clados en la filogenia.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Muestreo y secuenciación.

Se obtuvieron un total de 236 secuencias que luego de ser revisadas y editadas finalmente nos quedamos con 191 secuencias correspondientes: 72 para ADNnr, 82 para ADNmt y 37 secuencias para RPB2 (Tabla 8). Asumimos que los errores en estas 45 secuencias pueden ser errores en la secuenciación (dobles picos o picos muy pequeños) errores de PCR, o errores durante el clonaje (por ejemplo, falta de inserción de ADN al vector) según ya se menciona por Lou et al. (2013). Sin embargo, los errores en secuenciación de nuestras muestras no superan el 20% del total secuenciado. No obstante este porcentaje afectó en el número de clones obtenidos para cada muestra, siendo estas un número menor a 12 clones en algunos casos, lo cual es lo recomendado por Bower et al. (2005).

Los errores pueden interferir en la interpretación de resultados (Meacham et al., 2011), sin embargo hemos tratado de reducir el número de errores, y eliminar secuencias de mala calidad, bajo búsqueda de quimeras mediante BLAST, o análisis detenido de los alineamientos para que nuestros resultados sean lo más confiables.

Tabla 8. Número de secuencias obtenidas desde cultivos de *Tulasnella* spp.

Cultivos	Clasificación	Número de secuencias ADNnr	Número de secuencias ADNmt	Número de secuencias RPB2
4308	"T. asymmetrica"	5	5	-
448		12	6	-
4307		7	6	-
4306		8	12	-
DC309	T. cf. pinicola	9	12	2
F035532		13	6	8
4304	T. asymmetrica-tipo	12	12	3
24462a	T. eichleriana	3	6	10
243800a	T. violea	-	6	7
DC292		3	11	7
Total de secuencias:		72	82	37

Elaboración: Zambrano, V (2014).

3.2. Porcentajes de similitud intra e inter-especies.

Del cálculo de porcentajes mediante las matrices de distancias (Pairwise differences) estimadas para secuencias de nucleótidos (Saitou & Nei 1987; Jones et al 1992; Tamura & Nei

1993; Tamura et al., 2004.), con la opción “**complete deletion**” obtuvimos los porcentajes de máxima variación intra-específica (MVIE) hasta 0,62% y la mínima variación inter-especies (LVIE) de 6,82% para ADNnr-LSU parcial. En el ADNmt-SL parcial en cambio obtuvimos un 0% de MVIE y 1,23% de LVIE. Para RPB2 la MVIE fue de 1.31% y la LVIE fue de 21,91%(Tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de variación intra y entre-especies calculados con la opción “**Complete deletion**” (MEGA v5).

Grupos basados en ITS-5.8S (Cruz et al, 2014)	Cultivos	Clasificación	Variación intra-especies ADNnr-LSU parcial	Variación inter-especies	Variación intra-especies ADNmt-SL parcial	Variación inter-especies	Variación intra-especies RPB2	Variación inter-especies
III	4308	“ <i>T. asymmetrica</i> ”	0,31-0,62%	6,82%-53,37%	0%	1,23%-15,45%	-	21,91%-42,03%
	448							
	4307							
	4306							
	DC309	<i>T. pinicola</i>	0%		0%		0,99%	
	F035532							
4304	<i>T. asymmetrica</i>	0-0,31%	0%	1,31%				
IV	24462a	<i>T. eichleriana</i>	0%	0%	0%			
	243800a	<i>T. violea</i>	0%	0%	0,32%-2,68%			
	DC292							
Media de variación intra-especies: \bar{x} de ADNnr-LSU parcial 0,08% ; \bar{x} de ADNmt-SL parcial 0 %; \bar{x} de RPB2 0,67%								

Elaboración: Zambrano, V (2014).

Del cálculo de porcentajes mediante las matrices de distancias (Pairwise Differences) con la opción “**partial deletion**” se obtuvo 0,57% de MVIE y 6,16% de LVIE para ADNnr-LSU parcial; 0,75% de MVIE y 2,31 de LVIE para ADNmt-SL parcial, y 1,59% de MVIE y 22,13% de LVIE para RPB2 (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de variación intra e inter-especies calculados con la opción “partial deletion” (MEGA v5).

Grupos basados en ITS-5.8S (Cruz et al, 2014)	Cultivos	Clasificación	Variación intra-especies ADNnr-LSU parcial	Variación inter-especies	Variación intra-especies ADNmt-SL parcial	Variación inter-especies	Variación intra-especies RPB2	Variación inter-especies
III	4308	“ <i>T. asymmetrica</i> ”	0,25%-0,57%	6.16%-55.28%	0,19%-0,75%	2,31-25,31	-	22,13%-44%
	448							
	4307							
	4306							
	DC309	<i>T. cf. pinicola</i>	0,25%-0,26%		0%		0,16-1,47%	
	F035532							
4304	<i>T. asymmetrica</i>	0,26%-0,27%	0%	1,29%				
IV	24462 ^a	<i>T. eichleriana</i>	0%	0%	0%			
	243800a	<i>T. violea</i>	0%	0%	0,16-1,59%			
	DC292							
Media de variación intra-especies: \bar{X} de ADNnr-LSU parcial 0,07% ; \bar{X} de ADNmt-SL parcial 0,02 %; \bar{X} de RPB2 0,54%								

Elaboración: Zambrano, V (2014).

La diferencia de porcentajes de variación desde los dos análisis (complete y partial deletion) para evaluar la variación intra e inter-especies es mínima (Tabla 9 y 10). La opción “complete deletion” elimina todos aquellos sitios que tienen faltantes o lagunas de alineación antes que comience el análisis de datos y la opción “partial deletion” elimina los gaps durante el análisis de los datos según surja la necesidad. Esta opción “partial deletion” es relevante si el número de nucleótidos implicados en un faltante es pequeño y si los faltantes se distribuyen más o menos al azar (Tamura et al., 2011). Por tal razón, debido a que durante la alineación las secuencias presentaron ciertas deleciones o inserciones al azar que pueden servir para la identificación de especies estrechamente relacionadas (Hao et al., 2012) consideramos que la opción “partial deletion” es la más adecuada para el análisis de nuestros datos. Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente nosotros proponemos los siguientes umbrales: ADNnr-LSU parcial 0,8%, ADNmt-SL parcial 0% y para RPB2 3% para nuestros datos. Así mismo estos umbrales serán contrastados con el cálculo del denominado “Barcode gap” (Meyer & Paulay, 2005). Dichos umbrales serán discutidos detalladamente más adelante.

3.3. Analisis de Filogenias

Los analisis para los tres genes ADNnr-LSU parcial, ADNmt-SL parcial, y RPB2 nos permite distinguir dos grupos; los cuales los vamos a denominar III y IV ya que corresponden a los ya expuestos para la region ITS-5.8S por Cruz et al. (2014).

El grupo III está conformado por secuencias correspondientes a las especies "*Tulasnella asymmetrica*", *Tulasnella* cf. *pinicola* y *Tulasnella asymmetrica* (Figura 8) .

El clado "*T. asymmetrica*" soportado con un 97% y 56% para los genes ADNnr-LSU y ADNmt se lo considera un clado distante con diferencias mayores al 16% en ADNnr y 3% en ADNmt del clado *T. asymmetrica*. Dicho clado es considerado como el correcto para *T. asymmetrica* ya que contiene la secuencia obtenida desde el cultivo puro 085 (MAFF 305806) aislado desde raices de orquidias terrestres (Australia) y considerado como el material tipo por Warcup & Talbot (1967). De igual forma corroborado por Cruz et al. (2014) usando información de ITS-5.8S.

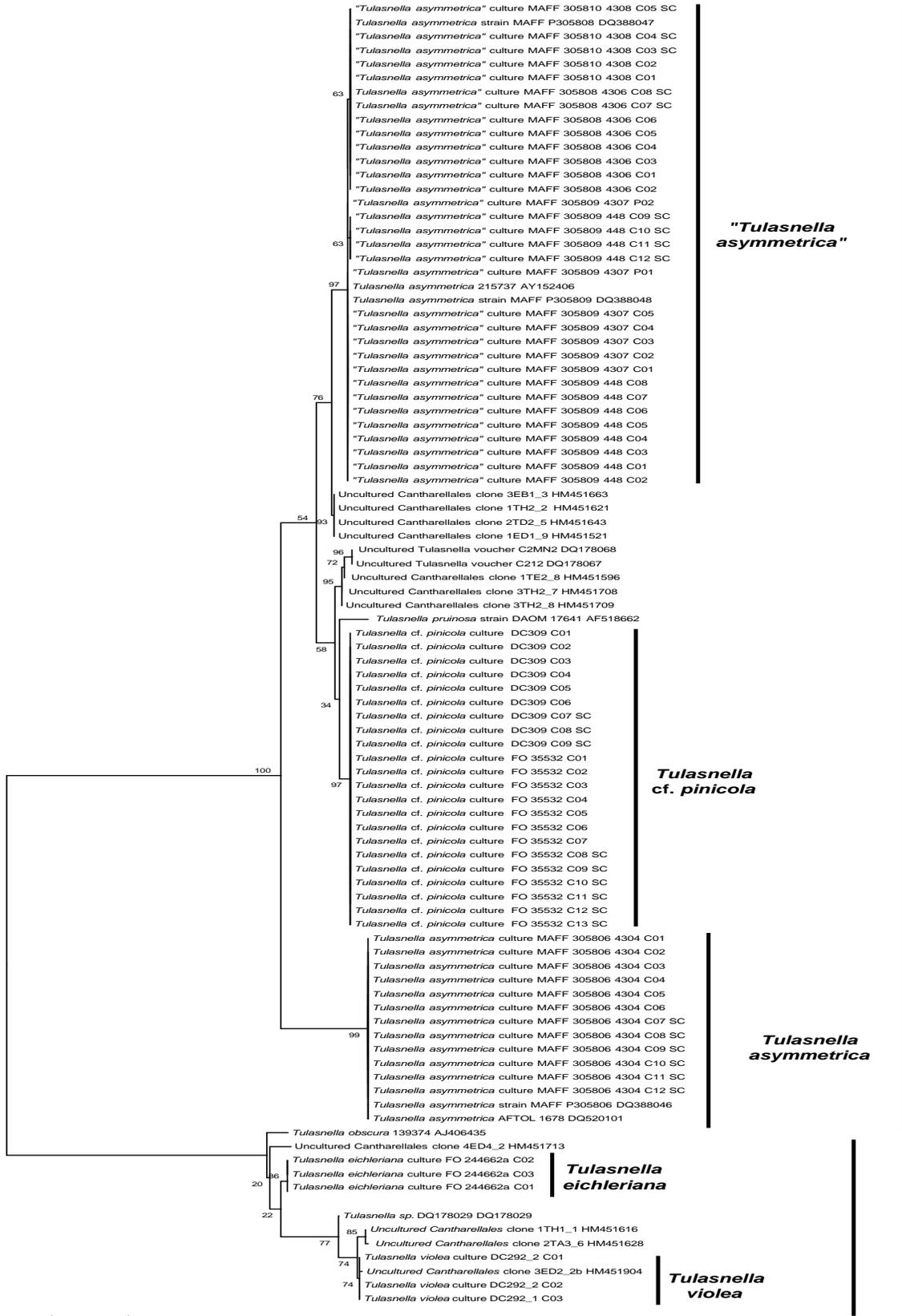


Figura 8. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región LSU parcial de ADNnr. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 74%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio. El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de *Tulasnella* más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.

Desafortunadamente no se pudieron obtener secuencias de RPB2 para "*T. asymmetrica*" (Figura 9) nosotros atribuimos principalmente a que el ADN pudo estar degradado y en poca concentración debido a que este fue extraído hace dos años y no se contó con cultivos para realizar una nueva extracción. Además suponemos que los primers universales utilizados no amplifican para esta especie de *Tulasnella* aunque esto sería una probabilidad muy baja puesto que si se amplificaron las otras especies de *Tulasnella*.

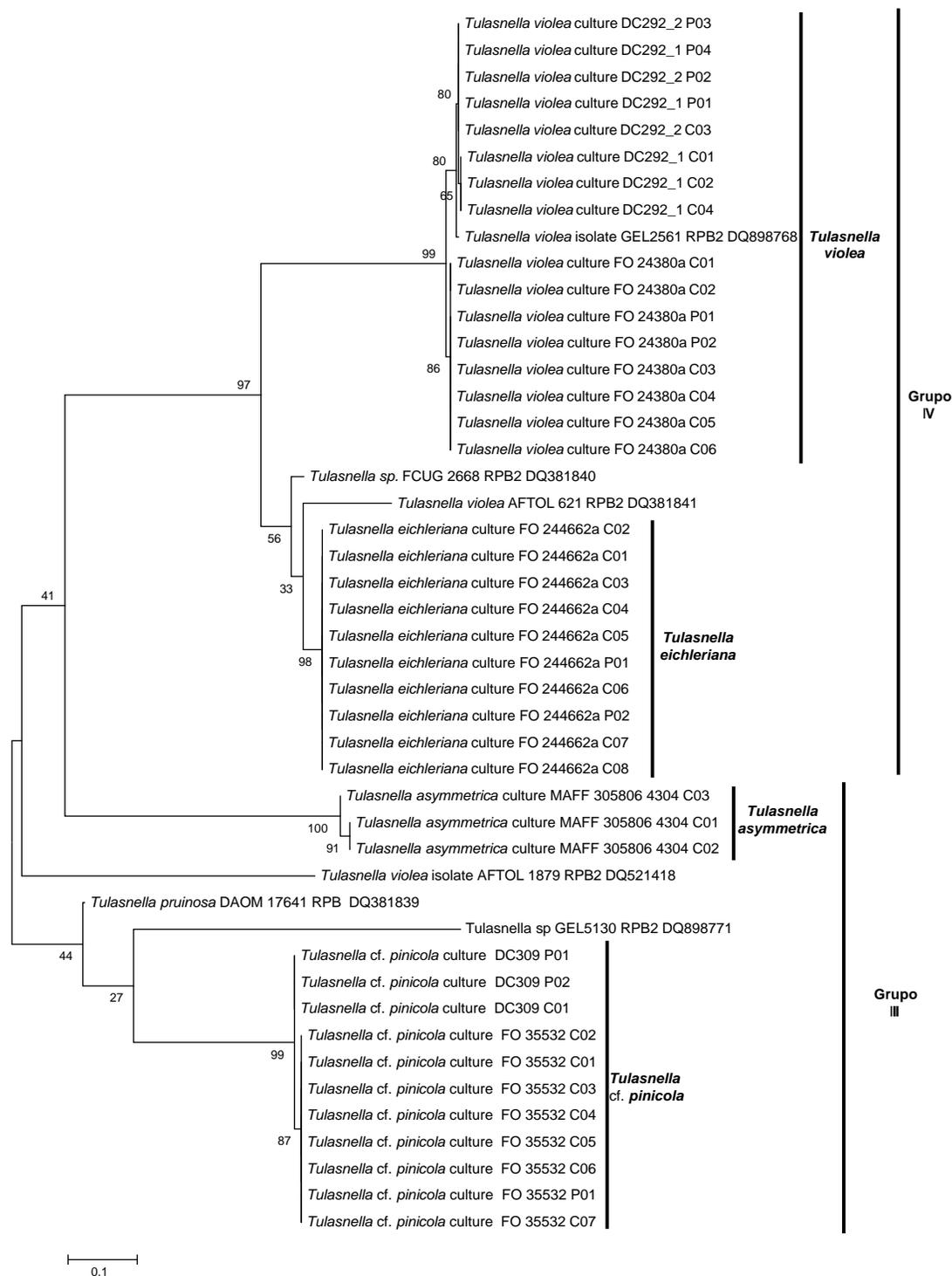


Figura 9. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región RPB2 de Polimerasa. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 56%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio..El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de *Tulasnella* más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.

El clado conformado por secuencias nombradas como *Tulasnella* cf. *pinicola* se encuentra soportado por 97/-/87% para cada gen (ADNnr, ADNmt, RPB2). En esta filogenia podemos observar que tanto en ADNnr y RPB2 el clado correspondiente para *Tulasnella* cf. *pinicola* son notablemente diferentes con 5/23% de secuencias para “*T. pruinosa* strain DAOM 1764”. Sin embargo, este clado para *Tulasnella* cf. *pinicola* en ADNmt (Figura 10) se agrupa con secuencias de *T. pruinosa* aisladas desde la misma cepa. No obstante al analizar las secuencias visualmente se observan diferencias que fueron corroboradas con las matrices de distancias (Pairwise Differences) con la opción “partial deletion” donde obtuvimos 0,63% y 1,26% de diferencias frente a nuestras secuencias.

Dentro del grupo IV encontramos dos clados formados por las especies de *T. eichleriana* con un soporte 86/ 77 y 98% para cada gen ADNnr, ADNmt, RPB2 y *T. violea* con los siguientes soportes 77/ 99/ 99.

En las filogenia de ADNmt en el clado conformado por las secuencias *T. eichleriana* existe la presencia de las secuencias “*T. violea* strain KC851” junto con “*T. eichleriana* strain KC852 AY373292” descargadas del GenBank usado la herramienta BLAST. Consideramos que la secuencia de “*T. violea* strain KC851” ha sido identificada de forma errónea puesto que presenta 100% de similitud tanto para nuestras secuencias como para la secuencia “*T. eichleriana* strain KC852 AY373292” aislada por McCormick (2004). Esto ya fue discutido por Sharon et al. (2008) y reanalizado por Cruz et al. (2014), en concordancia con nuestros resultados.

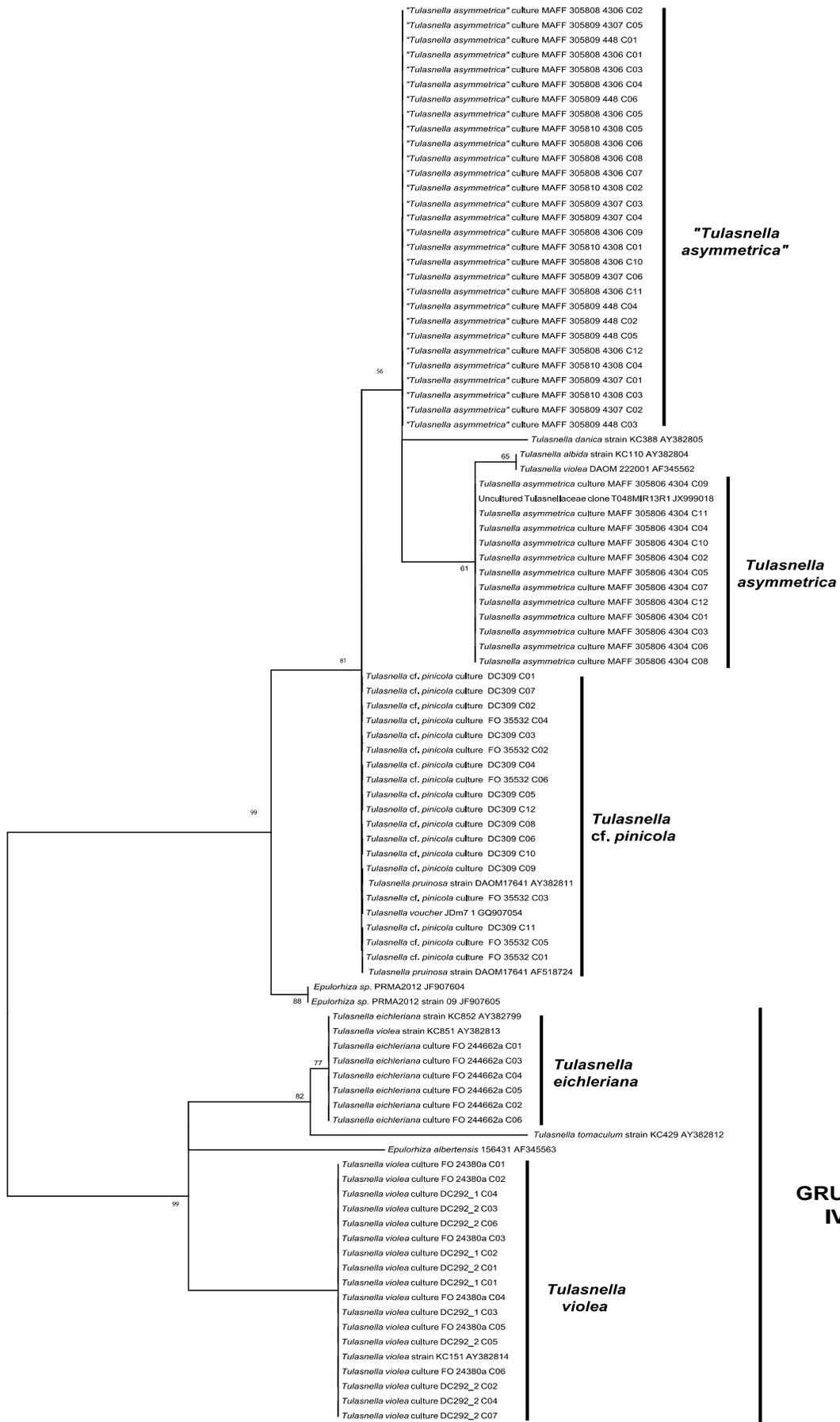


Figura 10. Árbol filogenético inferido desde Maximun likelihood para la región SL parcial de ADNmt. Valores de bootstrap mostrados para los diferentes clados son superiores al 87%. El árbol se encuentra enraizado en punto medio..El programa fue MEGA v5. Las secuencias nuestras son clonales desde cinco especies de *Tulasnella* más las secuencias cercanas obtenidas desde la base de datos del GenBank.

Se han propuesto umbrales para cada gen que nos ayuden a delimitar especies moleculares o también llamadas especies filogenéticas. Para ADNnr-LSU parcial se propone un umbral de 0,8% esto contrastando con la presencia de otros umbrales definidos para ITS-5.8S por ejemplo McCormick et al. (2006) sugirieron un umbral de 2% para separar cultivos puros aislados de *Tulasnella*. Nilsson et al. (2008) sugirio en cambio 3% de umbral, mientras que Cruz et al., (2014) propone de 3-5% para la definición de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en *Tulasnella*. Sin embargo nosotros proponemos un umbral de 0.8% para LSU debido a que es una región mucho mas conservada que ITS-5.8S. Este porcentaje al ser contrastado con la regla 10X propuesta por Heber et al., (2004) donde multiplicamos el porcentaje de la media intra-especifica (Tabla 9) por 10 nos da el mismo resultado. Además que al comprobar con las filogenias realizadas observamos que este umbral resulta útil para separar especies.

Para ADNmt-SL parcial no se pudo proponer un umbral puesto que en todas las secuencias obtenidas para cada especie se observó el 0% de diferencias intra-especifica, frente a la minima variacion inter-especies que fue de 1.23%. Esta variación al ser prácticamente nula en nuestras secuencias no nos permite sugerir o proponer un umbral para delimitar las especies en *Tulasnella*. Más bien está nos da un indicio que el marcador ADNmt no es un buen candidato para definir umbrales y buscar el denominado “Barcode gap”. Según Meyer & Paulay (2005) explica que cuando la distancia entre la máxima variación intra-especie y la mínima variación inter-especie es muy baja o corta se puede solapar facilmente estos niveles de división, y que está sería más notorio cuando el set de secuencia a analizar es más grande.

Para RPB2 se propuso un umbral de 3% basados en la maxima variación intra-especies que fue de 2.6% para “*T. asymmetrica* “. El umbral propuesto fue comparado nuevamente con el valor obtenido por medio de la regla de 10X (Heber et al., 2004) el cual fue 6,7%. Esto quiere decir que nuestro umbral del 3% es adecuado e inclusive inferior a lo obtenido po la regla 10X demostrando que RPB2 podria ser un buen candidato para la busqueda del denominado “Barcode gap” ya que el espacio obtenido entre la maxima variacion intra-especies (2,6%) y la

minima variacion inter-especies (21,91%) es bastante amplio. Según Meyer & Paulay (2005) mientras el "Barcode gap" sea mas amplio es mucho mas útil para delimitar especies.

CONCLUSIONES

Los genes ADNnr-LSU parcial, y RPB2 fueron más informativos y permiten mejores resoluciones filogenéticas, así como porcentajes de variabilidad para los especímenes estudiados de *Tulasnella* spp. Estos genes podrían ser una opción alternativa a ITS-5.8S considerado el marcador universal para hongos

El ADNmt-SL parcial mostró una baja variabilidad imposibilitando la definición de umbrales, por lo que no se considera un buen marcador para la identificación de especies en *Tulasnella*.

Para nuestro set de secuencias, debido a la variabilidad de los alineamientos de *Tulasnella* spp., concluimos que la opción “partial deletion” es la más adecuada para analizar los porcentajes de diferencias.

La taxonomía integrativa molecular, más datos morfológicos u otras evidencias son la mejor vía para delimitar especies en cualquier grupo taxonómico.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Scha ¨ffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-Blast: a new genera- tion of protein database search programs. *Nucleic Acids Re- search* 25: 3389–3402.
- Anderson, I. C. y Cairney, J. W. G. (2004). ‘Diversity and ecology of soil fungal communi- ties: Increased understanding through the application of molecular techniques’, *Envi- ronmental Microbiology*, vol. 6, pp. 769–779.
- Aguileta, G., de Vienne, D. M., Ross, O. N., Hood, M. E., Giraud, T., Petit, E., & Gabaldón, T. (2014). High variability of mitochondrial gene order among fungi. *Genome Biology and Evolution*, 6(2), 451–65. doi:10.1093/gbe/evu028.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. (W. John & Sons, Eds.) (Fourth., pp. 0–2). New York.
- Andreatta, A., & Ribeiro, C. (2002). Heuristics for the phylogeny problem. *Journal of Heuristics*,, 8(4), 429–447.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification proce- dures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 99–108.
- Binder, M., & Hibbett, D. (2003). Oligonucleotides Primer sequences.
- Brown A.H.D. (1979). Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Po- pulation Biology* 15:1-42.
- Bower, M., Spencer, M., Matsumura, S., Nisbet, E., & Howe, C. (2005). How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? *Nucleic Acids Research*, 33(8), 2549–56. doi:10.1093/nar/gki550.
- Brandon, M. (2006). PCR primers to amplify and sequence rpb2 (RNA polymerase II second largest subunit) in the Basidiomycota (Fungi), 2, 1–4. Retrieved from <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/>.

- Bruns TD, White TJ, Taylor JW (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 525–564.
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M, Li Y. (1998). A sequence database for the identification of ectomycor- rhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7(3):257–272.
- Bruns, T.D. and Shefferson, R.P. (2004). Evolutionary studies of ectomycor- rhizal fungi: recent advances and future directions. *Can. J. Bot*, 82:1122–32.
- Campion, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos* (p. 48).
- Carranza, Z. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Universidad Autonoma Del Estado De Hidalgo.
- Cedergren R, Lang BF (1985). Probing fungal mitochondrial evolution with transfer-RNA. *Biosystems* 18: 263-267.
- Cullings KW (1994) Molecular phylogeny of the Monotropeoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *J Evol Biol* 7:501–516.
- Cruz, D. J., Suárez, J. P., Kottke, I., & Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, 106(4), 708–722. doi:10.3852/12-386.
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., Piepenbring, M., & Oberwinkler, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*, 10(2), 229–238. doi:10.1007/s11557-010-0692-3.
- Dirienzo A. y C. Wilson. (1991). Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1597-1601.
- Dorado, G. (2007). *Secuenciación del DNA* (pp. 1–35). Argentina.

- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791, doi:10.2307/2408678.
- Frøslev, T.G., Matheny, P.B., Hibbett, D.S., (2005). Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): a comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 602–618.
- Girlanda, M., Segreto, R., Cafasso, D., Liebel, H. T., Rodda, M., Ercole, E., Perotto, S. (2011). Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany*, 98(7), 1148–63. doi:10.3732/ajb.1000486.
- Greif, G. (2012). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos. (pp. 1–16).
- Greslebin, G., & Rajchenberg, M. (2001). The genus *Tulasnella* with a new species in the Patagonian Andes forests of Argentina. *Mycol Res*, 105, 1149–1151.
- Hao, D., Xiao, P., Peng, Y., Dong, J., Liu, W. (2012). Evaluation Of The Chloroplast Barcoding Markers by mean and smallest interspecific distances, 44(4), 1271–1274.
- Hebert PDN, Stockle MY, Zemlak TS, Francis CM. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2:312, doi:10.1371/journal.pbio.0020312.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. (1995). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. Wallingford, UK: CAB International. 616 p.
- Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B. P. a, Brys, R., & Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19(18), 4086–95. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04785.x.
- Jones DT, Taylor WR & Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T, (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511–518.
- Kirk PM, Cannon PM, David JC, Stalpers JA (2008) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford.
- Kottke, I., Beiter, A., Weiß, M., Haug, I., Oberwinkler, F., & Nebel, M. (2003). Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycol Res*, 107, 957–968.
- Kottke, I., Suárez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., & Garnica, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1685), 1289–98. doi:10.1098/rspb.2009.1884.
- Kottke, I., Setaro S, Haug I, Herrera P, Cruz D, Fries A, Gawlik J, Homeier J, Werner F, Gerique A, Suarez JP. (2013). Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem—perspectives for understanding complex communities. In: *Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of south Ecuador*. Ecological studies. Heidelberg, Germany: Springer Verlag.
- Lang BF, Laforest M-J, Burger G (2007). Mitochondrial introns: a critical view. *Trends in Genetics* 23: 119-125.
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD, (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808.
- Lou, D. I., Hussmann, J. A., Mcbee, R. M., Acevedo, A., Andino, R., & Press, W. H. (2013). High-throughput DNA sequencing errors are reduced by orders of magnitude using circle sequencing. doi:10.1073/pnas.1319590110/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1319590110.

- Malkus A, Linda Chang PF, Zuzga SM, Chung K, Shao J, Cunfer BM, Arseniuk E, Ueng PP (2006). RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research* 110: 1152-1164
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse MA. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Mol Ecol* 21:5098–5109, doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x.
- Matheny, P.B., (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *Evol.* 35, 1–20.
- Matheny, P. B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J. M., Lim, Y. W., Nilsson, R. H., Hibbett, D. S. (2007). Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2), 430–51. doi:10.1016/j.ympev.2006.08.024.
- Meacham, F., Boffelli, D., Dhahbi, J., Martin, D. I. K., Singer, M., & Pachter, L. (2011). Identification and correction of systematic error in high-throughput sequence data. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 451. doi:10.1186/1471-2105-12-451.
- Meier R, Zhang G, Ali F. (2008). The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Syst Biol* 57:809–813, doi:10.1080/10635150802406343.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422. doi:10.1371/journal.pbio.0030422.
- McCormick M, Whigham DF, Sloan D, O, Malley K, Hodkinson B (2006) Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87:903–911.
- Moncalvo, J.-M., Nilsson, R. H., Koster, B., Dunham, S. M., Bernauer, T., Matheny, P. B., ... Vilgalys, R. (2006). The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia*, 98(6), 937–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486970>.

- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., & Hallenberg, N. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification, 193–201.
- Nontachaiyapoom S, Sasirat S, Manoch L. (2010). Isolation and identification of Rhizoctonia-like fungi from roots of three orchid genera, Paphiopedilum, Dendrobium and Cymbidium, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. Mycorrhiza 20:459–471, doi:10.1007/s00572-010-0297-3.
- Pakendorf, B. y Stoneking, M. (2005): "Mitochondrial DNA and human evolution". Annual Review of Genomics and Human Genetics. 6: 165-83.
- Pereira, M., Coelho, I., Valadares, R., Oliveira, F., Bocayuva, M., Pereira, O., Kasuya, M. (2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of Epidendrum secundum, a widespread Brazilian orchid. Symbiosis, 62(2), 111–121. doi:10.1007/s13199-014-0276-0.
- Pfenning, L. H., & Abreu, M. De. (2000). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. In Manual de Biología de Suelos Tropicales (pp. 243–280).
- Ramirez Florez, A. (2010). Clonación celular Clonación terapeutica o andropatrica (pp. 1–4).
- Roberts, P. (1999). Rhizoctonia-forming fungi. A taxonomic guide. Royal Botanic Gardens.
- Rodriguez, R., Cullen, D., Kurtzman, C., Khachatourians, G., & Hegedus, D. (2003). Molecular methods for discriminating taxa , monitoring diversity.
- Saverio, A. (2000). LA CLONACIÓN. In Cuadernos de Bioética (pp. 48–55).
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406–425.
- Sharon M, Kuninaga S, Hyacumachi M, Naito S, Sneh B. (2008). Classification of Rhizoctonia spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. Mycoscience 49:93–114, doi:10.1007/S10267-007-0394-0.

- Shefferson RP, Taylor DL, Weiß M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Tali K, Yukawa T, Kawahara T, Miyoshi K, Lee Y. (2007). The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61:1380–1390, doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00112.x.
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS One*, 6(12), e27310. doi:10.1371/journal.pone.0027310.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., & Spouge, J. (2012). The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 6241–6246.
- Schwartz, M., & Vissing, J. (2002). Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *Revista New England Journal of Medicine*, 347, 576–580.
- Sharma, J., Zettler, L., & Sambeek, J. (2003). A Survey of Mycobionts of Federally Threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *Symbiosis*, 34, 145–155.
- Sonnenberg, R., Nolte, A. W., & Tautz, D. (2007). An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*, 4, 6. doi:10.1186/1742-9994-4-6.
- Suárez, J. P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(Pt 11), 1257–1270. doi:10.1016/j.mycres.2006.08.004.
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2008). Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75–85. doi:10.1007/s11557-008-0554-4.
- Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two non-photosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5410–5415.

- Taylor DL, McCormick MK. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol* 177:1020–1033, doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–9. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Valcárcel, V. (2010). Breve introducción a las técnicas y métodos de reconstrucción filogenética, 1–8.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11030–11035.
- Warcup, J., & Talbot, P. (1967). Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol*, 66, 631–641.
- Warcup JH. (1973). Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytol* 72: 387– 392, doi:10.1111/j.1469-8137.1973.tb02046.x.
- Warcup, Talbot PHB. (1971). Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids II. *New Phytol* 76:35–40, doi:10.1111/j.1469-8137.1971.tb02506.x.
- Warcup, Talbot PHD. (1980). Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids III. *New Phytol* 86:267–272, doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb00787.x.
- Weiss, M., & Begerowd, B. (2004). Spotlights on heterobasidiomycetes. In: Agerer, R., Piepenbring, M., Blanz, P. IHW-Verlag (Frontiers., pp. 7–48). Germany.
- Wells, K., & Bandoni, R. (2001). Heterobasidiomycetes. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA., Systematics and evolution. (Systematic., pp. 85–120.). Berlin.

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Chapter 38. In: Inns AM, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press. p 315–324.

Zhanga, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics Jun. *National Institute of Health*, 38(3), 95–109. doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003.