



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS PARA DIFERENTES GRUPOS DE SEBACINALES (BASIDIOMYCOTA) MICORRIZICOS EN ERICÁCEAS A PARTIR DEL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE DNA RIBOSOMAL”

*Tesis previa a la obtención del título de:
Bioquímico Farmacéutico*

Autor:

Flor Maria Chacón Pesantez

Director:

Dr. Juan Pablo Suárez Chacón

Loja- Ecuador

Año 2009

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Flor Maria Chacón Pesantez, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 6 de Marzo del 2009.

.....
Dr. Juan Pablo Suárez Ch.
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Flor María Chacón Pesantez.

DEDICATORIA

A mis padres Carmen y Fidel por todo su amor, su esfuerzo constante durante mi carrera, su comprensión, su ayuda y apoyo incondicional y único; y por creer en mí cada momento en esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Como creyente quiero agradecer primero a Dios, con su luz divina me ha dado la vida y a la vez la libertad de escoger el camino que deseo seguir en mi paso por la tierra.

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis que no es más la continuación del amor, la amistad, la motivación, la lucha por mis sueños que supieron inculcar en mí desde el comienzo de mi vida. A mis hermanos y hermanas, cuyo amor fraternal siento y crece cada día.

A mi director de tesis Dr. Juan Pablo Suárez y mi amiga Dra. Sabrina Setaro, por su apoyo incondicional, por compartir sus invaluable enseñanzas y conocimientos conmigo y por acompañarme en este valioso pasó en mi vida.

A todas las personas del Centro de Biología Molecular y Celular (CBCM) por su colaboración y por haber permitido el desarrollo de esta investigación.

Quiero agradecer también en primer lugar por su amistad, y por los lazos de compañerismo y lealtad que hacen de los laboratorios un gran ambiente de trabajo. Quiero empezar por los becarios que tuvimos la suerte de ingresar juntos al CBCM: Andrea González, Doris Macas, Dayana Ochoa, Darío Cruz, Paulo Herrera, Oscar Vivanco, María Ramírez, Mayra Castillo. A mis profesores: Ing. Fabián Carrión, Ing. Beatriz Hernández, Dra. Paula Torres y Dra. Natalia Bailón.

A mis amigas/os de la universidad que quienes no menciono individualmente por temor de olvidarme de alguno, quiero agradecerles por su sincera amistad en estos cinco años de estudio, exámenes, viajes y fiestas, que pienso que han quedado marcados en cada uno de nosotros como parte de los mejores recuerdos de nuestra vida.

Flor María Chacón Pesantez

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Flor María Chacón Pesantez, declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamo o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 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 investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

Flor María Chacón Pesantez
TESISTA

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
- Que es un Marcador Morfológico y Bioquímico.....	3
- Identificación molecular de los hongos.....	4
- Definición de RFLP.....	5
- Definición de TRFLP.....	5
- Enzima de Restricción.....	6
- Sebacinales subgrupo B forman micorrizas con ericaceas.....	7
- Ericaceae.....	8
- Sebacina ssp.....	9
- Genes Ribosomales.....	10
o Aplicación en estudios fúngicos.....	11
- Importancia de los métodos moleculares.....	12
o Extracción del DNA y PCR.....	13
o Cloning y Templphi.....	14
o Secuenciación.....	14
OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
- Sitio de estudio y colección de muestras.....	16
- Extracción del DNA.....	17
- Amplificación del DNA.....	17
Electroforesis en gel de agarosa y	

- Cloning.....	18
- Secuenciación, Análisis filogenético.....	19
- Búsqueda de enzimas de restricción.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	33
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

El uso de marcadores moleculares acelera los programas de mejoramiento genético, en el sentido que estos pueden suplantar los tradicionales marcadores morfológicos o fenotípicos, en especial cuando la expresión de esta característica es ambientalmente inestable y difícil de observar. Los marcadores moleculares son utilizados para identificar grupos de genes o loci. La investigación tuvo como objetivo desarrollar un marcador molecular localizado en el rDNA de un cierto grupo de hongos llamados Sebacinales. Las técnicas moleculares nos permitieron realizar dicho trabajo, entre ellas la extracción del DNA, amplificación del rDNA, PCR donde se utilizaron diversos primers específicos para Sebacinales: NS23, MWS1628, SebITS3, MWS1467 y SSNS691 y un primer universal ITS1F, el clonaje y Templphi. Se amplificó la secuencia 18S, 5.8S-ITS, 28S rDNA, estos productos fueron analizados por medio de electroforesis y finalmente secuenciados. Las secuencias fueron analizadas en orden en el programa enzymex, para encontrar enzimas de restricción adecuadas y que corten específicamente a las Sebacinales. Se localizó algunos sitios para marcadores en la 28S rDNA, sin embargo solo una enzima de restricción, BstnII pudo ser identificada. BstnII podría ser aplicada para TRFLPs para el análisis de Sebacinales. Dentro de esta región encontramos secuencias específicas, pero no encontramos enzimas de restricción para dichas secuencias. Se propone utilizar estas secuencias para la realización de oligonucleótidos. Utilizando el gen nuclear ribosomal (18S, 5.8S-ITS, 28S) de secuencias de las Sebacinales se encontraron nueve (Aaul, Aval, AfIII, AfVIII, Bstul, Drdl, Eael, Styl, MslI) enzimas de restricción para RFLP. Tanto los RFLP y TRFLP encontrados en esta investigación, quedan tentativamente para ser utilizados para screening en Sebacinales.

Palabras claves: RFLPs, TRFLPs, Enzimas de Restricción, rDNA, templphi

ABSTRACT

The use of molecular markers accelerates the programs of genetic improvement or replacing traditional markers such as morphological or phenotypic characters, especially if the latter are environmentally instable or difficult to observe. Molecular markers are also used for identification of gene groups or loci. The investigation was to develop molecular markers located on the ribosomal DNA specific for a certain group of fungi, called Sebacinales. The molecular techniques allowed to be carried out this work, among them the DNA extraction, amplification of the ribosomal DNA, PCR using specific primers for Sebacinales: NS23, MWS1628, SebITS3, MWS1467 and SSNS691 as well as a universal primer ITS1F, cloning and TempliPhi. The sequence was amplified 18S, 5.8S-ITS, 28S rDNA, these products were analyzed by means of electrophoresis and finally sequenced. The sequences were analyzed with the program Enzymex in order to find restriction enzymes adequate for cutting Sebacinales specifically. There were several suitable markers located on the 28S of the ribosomal DNA, however only one restriction enzyme, BstnII could be identified. BstnII is considered to be applicable for T-RFLP analyses of Sebacinales. The other markers, for which no restriction enzymes were available, are considered to be applicable for oligonucleotide design. Using the nuclear ribosomal gene (18S, 5.8S-ITS, 28S) of sequences of Sebacinales (Aaul, Aval, Afill, Afilll, Bstul, Drdl, Eael, Styl, MslI) nine restriction enzymes could be found which would be adequate for RFLP analyses. The restriction enzymes found in this investigation, for RFLP as well as for T-RFLP, could be used to screen Sebacinales

Keywords: RFLPs, TRFLPs, Restriction Enzymes, rDNA, templphi

RESUMEN

El uso de marcadores moleculares acelera los programas de mejoramiento genético, en el sentido que estos pueden suplantar los tradicionales marcadores morfológicos o fenotípicos, en especial cuando la expresión de esta característica es ambientalmente inestable y difícil de observar. Los marcadores moleculares son utilizados para identificar grupos de genes o loci. La investigación tuvo como objetivo desarrollar un marcador molecular localizado en el rDNA de un cierto grupo de hongos llamados Sebacinales. Las técnicas moleculares nos permitieron realizar dicho trabajo, entre ellas la extracción del DNA, amplificación del rDNA, PCR donde se utilizaron diversos primers específicos para Sebacinales: NS23, MWS1628, SebITS3, MWS1467 y SSNS691 y un primer universal ITS1F, el clonaje y Templphi. Se amplificó la secuencia 18S, 5.8S-ITS, 28S rDNA, estos productos fueron analizados por medio de electroforesis y finalmente secuenciados. Las secuencias fueron analizadas en orden en el programa enzymex, para encontrar enzimas de restricción adecuadas y que corten específicamente a las Sebacinales. Se localizó algunos sitios para marcadores en la 28S rDNA, sin embargo solo una enzima de restricción, BstnII pudo ser identificada. BstnII podría ser aplicada para TRFLPs para el análisis de Sebacinales. Dentro de esta región encontramos secuencias específicas, pero no encontramos enzimas de restricción para dichas secuencias. Se propone utilizar estas secuencias para la realización de oligonucleótidos. Utilizando el gen nuclear ribosomal (18S, 5.8S-ITS, 28S) de secuencias de las Sebacinales se encontraron nueve (Aaul, Aval, AfIII, AfVIII, Bstul, Drdl, Eael, Styl, MslI) enzimas de restricción para RFLP. Tanto los RFLP y TRFLP encontrados en esta investigación, quedan tentativamente para ser utilizados para screening en Sebacinales.

Palabras claves: RFLPs, TRFLPs, Enzimas de Restricción, rDNA, templphi

ABSTRACT

The use of molecular markers accelerates the programs of genetic improvement or replacing traditional markers such as morphological or phenotypic characters, especially if the latter are environmentally instable or difficult to observe. Molecular markers are also used for identification of gene groups or loci. The investigation was to develop molecular markers located on the ribosomal DNA specific for a certain group of fungi, called Sebacinales. The molecular techniques allowed to be carried out this work, among them the DNA extraction, amplification of the ribosomal DNA, PCR using specific primers for Sebacinales: NS23, MWS1628, SebITS3, MWS1467 and SSNS691 as well as a universal primer ITS1F, cloning and TempliPhi. The sequence was amplified 18S, 5.8S-ITS, 28S rDNA, these products were analyzed by means of electrophoresis and finally sequenced. The sequences were analyzed with the program Enzymex in order to find restriction enzymes adequate for cutting Sebacinales specifically. There were several suitable markers located on the 28S of the ribosomal DNA, however only one restriction enzyme, BstnII could be identified. BstnII is considered to be applicable for T-RFLP analyses of Sebacinales. The other markers, for which no restriction enzymes were available, are considered to be applicable for oligonucleotide design. Using the nuclear ribosomal gene (18S, 5.8S-ITS, 28S) of sequences of Sebacinales (Aaul, Aval, Afill, Afllll, Bstul, Drdl, Eael, Styl, MslI) nine restriction enzymes could be found which would be adequate for RFLP analyses. The restriction enzymes found in this investigation, for RFLP as well as for T-RFLP, could be used to screen Sebacinales

Keywords: RFLPs, TRFLPs, Restriction Enzymes, rDNA, templphi

INTRODUCCION

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre (Lopez, 1998).

Los marcadores morfológicos fueron el primer tipo de marcadores que el hombre utilizó, los mismos que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Rentarúa, 2007).

Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado (Gonzales et al., 2000). Existen varias limitaciones para su uso, de las que la principal es precisamente que se basan en las características morfológicas o expresadas en el individuo (fenotipo), en cualquier caso, son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales y que generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Bonamico, 2004).

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas. Las isoenzimas fueron descubiertas por Hunter y Markert en 1957. Este tipo de marcador tiene ciertas desventajas: 1) presentan problemas técnicos; 2) no permiten cubrir todo el genoma; 3) únicamente detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo; 4) se dificulta la precisión de los datos obtenidos debido al polimorfismo en el tejido de las isoenzimas y son específicas para determinados sustratos (Rodríguez & Velez, 2004).

Los marcadores de DNA (o moleculares) constituyen la nueva generación de marcadores y permiten solucionar los

problemas de los marcadores bioquímicos y morfológicos, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores (Fortubel, 2002).

Los marcadores moleculares están ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva. Y su uso ha permitido desarrollar a gran velocidad el análisis del genoma y la creación de mapas genéticos. Su potencial radica en su elevado número y en la facilidad de análisis por PCR (Said et al., 2007).

La mayoría de estudios a nivel intraespecífico, han demostrado que la electroforesis de isoenzimas y las enzimas de restricción, particularmente los "RFLPs", serían las técnicas a escoger para determinar marcadores, pues a menudo se necesita examinar un gran número de individuos sobre un gran número de loci (Crespo, 1999). Por ello esta investigación está enfocada a determinar marcadores moleculares tanto para RFLP y TRFLP.

La aplicación de los RFLP (*Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción*), permite obtener, para cada organismo, una serie de fragmentos del DNA de diferentes tamaños que dan lugar a un patrón de bandas PCR/RFLP. Ello se consigue fragmentando la región amplificada mediante el uso de enzimas de restricción (Zabeau, 1993). Primero se extrae el DNA del material que deseamos estudiar; luego se le adicionan enzimas de restricción (endonucleasas), las cuales cortan el DNA en fragmentos de diferente longitud; estos fragmentos son separados en geles de agarosa, para después realizar por capilaridad o al vacío la transferencia de los fragmentos a una membrana de papel de nitrocelulosa o de nylon (transferencia tipo Southern). Finalmente, se hibridizan los fragmentos de la membrana con sondas marcadas (radiactiva o no radiactivamente) para visualizar y detectar las bandas hibridadas (Solé, 2002; Iturralde, 2005).

El nivel de polimorfismo, que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio (Burke et al., 2005).

Dentro de las principales ventajas de los RFLP: Se requiere poca cantidad de DNA, metodología sumamente sólida y muy transferible entre laboratorios, recomendables para el análisis filogenético de especies emparentadas porque se basan en la homología de las secuencias, poder discriminatorio: tanto a nivel de especie o de población (sondas de copia única) como a nivel de individuo (sondas de copia múltiple) y simplicidad. Entre las desventajas tenemos: Necesitan disponer de una genoteca de sondas, apropiadas, lentos especialmente con sondas de copia única, costosos, requieren la distribución de sondas a los laboratorios colaboradores (Foolad et al., 1995).

El análisis de las comunidades microbianas en el ambiente también es posible por medio del método T-RFLP. Esta técnica hace posible determinar cualitativamente la diversidad de especies presentes y posee un principio muy similar al descrito anteriormente para RFLP. T-RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción terminal) hace uso de fragmentos marcados con fluorescencia (fluorocromos) que también han sido amplificados por medio de PCR. Estos productos marcados en su parte terminal se obtienen durante la amplificación con PCR utilizando un partidor fluorescente. Son posteriormente separados en un gel de electroforesis capilar, luego visualizados por medio de la excitación del compuesto fluorescente identificando peaks de fluorescencia y correlacionándolo con la abundancia de la especie en estudio. Esto permite evaluar los tamaños de los fragmentos terminales en un secuenciador capilar. Y solo se detectan las bandas fluorescentes, es decir el fragmento terminal de la digestión con enzimas de restricción (Dickie & FitzJohn, 2007).

Las ventajas de este método según Muyzer (1999) son: a) La alta resolución de la separación en un secuenciador automático, b) El uso de marcadores con diferente fluorescencia, permitiendo un análisis y comparación entre muestras, c) La posibilidad de cuantificar bandas o peaks por intensidad de fluorescencia, d) Permite resolver y comparar con mayor precisión los cambios que ocurren en el ecosistema, tanto espacial como temporal.

Lo que le diferencia a los TRFLP sobre la tradicional técnica de RFLP es la habilidad de distinguir múltiples especies en una muestra. Los RFLP no tienen esta capacidad dando así patrones difíciles de interpretar, ya que para su estudio se necesita muestras puras. Esto permite que la técnica de TRFLP sea usada en muestras donde están inevitablemente presentes varios hongos, además se obtiene patrones claros (Dickie & Koide, 2002), esto sugiere la habilidad que tienen los TRFLP para identificar múltiples especies, permitiendo así el estudio en muestras de raíces o muestras de suelo y ser usadas para caracterizar comunidades Fúngicas (Edwards, 2004) y en una prueba con productos de PCR encontraron que T - RFLP tienen una efectividad del 93 % para encontrar especies colonizadas en varios tipos de raíces (Gruntzin et al., 2002).

Las dos técnicas anteriormente mencionadas trabajan con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son sumamente específicas que catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos y son capaces de cortar ambas hebras del DNA en lugares específicos llamados sitio o diana de restricción. Los sitios de restricción cuentan entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos, creando de esta manera una serie de fragmentos (Nathans & Smith, 1975). La función de las enzimas de restricción es la proteger al organismo de DNA extraño (Curtis, 1996).

La presente investigación tiene como objetivo analizar secuencias de DNA ribosomal nuclear (nrDNA) de Sebaciales para desarrollar un marcador T-RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

Terminales) y RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción). El T-RFLP es importante porque es menos costoso que la secuenciación, facilita el trabajo cuando se tiene muchas muestras y es aplicable para el análisis de muestras ambientales (muestras que contienen diferentes organismos ejemplos DNA de plantas, DNA diferentes hongos). Las micorrizas siempre tienen la asociación de varios organismos de ahí la importancia de la aplicación del T-RFLP. Para lo cual será necesario (1) amplificar usando PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) secuencias de nrDNA 18S, 5.8S y 28S de Sebaciales asociadas a varias especies de Ericaceas. Luego, (2) Alinear las secuencias y buscar enzimas de restricción que corten de manera específica la región amplificada en nrDNA 28S para la determinación el TRFLP. Mientras para la determinación de enzimas de restricción para los RFLP, (3) analizar todo el DNA ribosomal nuclear (nrDNA). Esto permitirá a futuro poder desarrollar un protocolo para T-RFLP y RFLP y poder utilizarlo como método de screening en Sebaciales.

Sebaciales subgrupo B forman micorrizas con ericaceas

El Reino Fúngico cumple un rol muy extenso con respecto a su medio ambiente, por lo que también su evolución y desarrollo interfiere de manera directa a los humanos, ya sea en su mayoría de forma beneficiosa, o a la vez de manera nociva (Anderson et al., 2003). La relación entre las raíces y los hongos son diversas. Aparentemente las raíces secretan azúcares, aminoácidos y posiblemente algunas otras sustancias orgánicas que son usadas por los hongos. En tanto que los hongos transforman los minerales del suelo y materiales orgánicos en descomposición, para que así sean asimilables por las plantas (Finlay, 2004).

Las Ericaceae tienen una asociación obligatoria con diversos hongos, dando lugar a una simbiosis que forma categorías distintas de micorrizas no conocidas en otros grupos de plantas. Han desarrollado diferentes formas de vida en

diversos habitats que van de los arbustos terrestres a hemiepifitas y epifitas (Setaro et al., 2006a). Se adaptan a ambientes húmedos y frescos entre 1000 y 3000 m s.n.m. Por tanto las Ericaceae tienen una asociación micorrízica especial, permitiéndoles adaptarse a tierras acidas y pobres en nutrientes (Selosse et al., 2007).

La Ericaceae es una familia numerosa que comprende alrededor de 115 géneros y cerca de 2.500 especies distribuidas generalmente en los climas templados, con alguna incursión en zonas subárticas y en lugares elevados de los trópicos. En la región andina tropical se alberga aproximadamente el 73% de las Ericaceae (Setaro et al., 2006b). Existe poco conocimiento sobre la formación de micorrizas en Ericaceae Tropicales (Luteyn & Sylva, 1999).

En estudios recientes se encontró una interrelación simbiótica entre Ericaceae y Sebacinales en el Bosque Tropical del Sur del Ecuador (Setaro et al., 2006a). Además todas las Sebacinales han mostrado un gran potencial para formación de asociaciones micorrízicas (Weiss et al., 2004).

Otros trabajos sobre comunidades de micorrizas han estimulado el interés considerable en un grupo descuidado de hongos relacionados con el género *Sebacina*, el mismo que subió al orden Sebacinales recientemente (Weib, 2007). Incluye los géneros: *Cratecolla*, *Efibulobasidium*, *Sebacina*, *Tremellodendron*, *Tremelloscypha*. Sin embargo, estudios moleculares muestran que la taxonomía en estos grupos debe ser revisada, ya que géneros *Sebacina* es polifilético (Weiss et al., 2004).

Una nueva filogenia es reportada por Hibett et al. (2007) donde el Orden Sebacinales se encuentra dentro de la clase Agaricomycetes, junto a Auriculariales, Cantharellales, Phallomycetidae y Agaricomycetidae. Los Sebacinales tienen una capacidad muy amplia de formar varios tipos de micorrizas: ectomicorrizas, micorrizas de orquídeas,

micorrizas ericoides y actualmente micorrizas de hepáticas (Kottke et al. 2003; Setaro et al. 2006a; Suárez, 2008).

Genes Ribosomales

Los genes Ribosomales son utilizados para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Rivera, 2006).

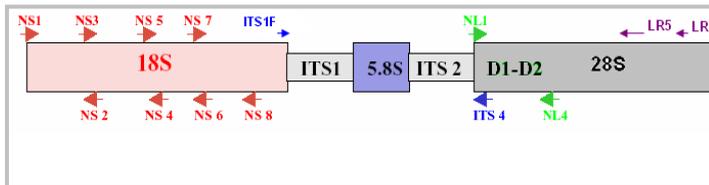


Figura 1. Representación esquemática de las regiones estudiadas del DNA ribosomal y los diferentes cebadores (Solé 2002). Hay que decir que los Eucariontes poseen un cuarto rRNA, el 5S cuyo gen no está incluido en el operón.

La figura 1 muestra las Regiones 18S, 5.8S, 28S las mismas que están relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles, el gen 5.8S está conservado evolutivamente como los genes 18S y 28S, pero su tamaño pequeño limita su utilidad en comparaciones filogenéticas (Luna et al. 2001; Yang et al. 2005; Said et al. 2007).

El gen más pequeño, 5S rRNA puede o no estar incluido en la unidad de rDNA dependiendo del grupo taxonómico que se esté analizando. Cuando se transcribe el rDNA que codifica los genes para cada uno de los rRNAs que forman los ribosomas eucariontes, las regiones espaciadoras (ITS) no codificantes quedan representadas en este transcrito primario, por lo que estas secuencias son removidas por un mecanismo específico de procesamiento del RNA ribosómico y sólo después de estas modificaciones los rRNAs pasan a formar parte del ribosoma (Said et al., 2007). Comparando con los genes los espaciadores ITS1 e ITS2 son mucho más variables porque sus transcritos son cortados desde el rRNA y

descargados en lugar de hacerse parte del ribosoma (Tedersoo et al., 2006).

Se encuentran también regiones espaciadoras no codificantes denominadas IGS, en cada una de ellas se incluyen dos regiones espaciadoras externas (ETS1 y ETS2) que no codifican pero que se transcriben y otras que no se transcriben NTS. La secuenciación de las regiones variables D1/D2 se utilizan en estudios genéticos de levaduras y también se han empleado en estudios de biodiversidad y sistemática en levaduras pertenecientes a los basidiomicetos (Hernández, 2005; Iturralde, 2005).

Debido a que el cambio en las secuencias de los genes de rRNA es muy lento, la comparación de éstas puede ser utilizada para estudiar la evolución entre organismos distantemente relacionados, mientras que las regiones no codificantes, ITS e IGS, cambian rápidamente y son útiles para la comparación de especies de hongos dentro de un género. Por este motivo, las regiones espaciadoras internas de transcripción de los RNA ribosómicos, ITS, surgen como un concepto de la Biología Molecular para la tipificación genética de microorganismos (Said et al., 2007).

Los análisis filogenéticos basados en el rDNA de la subunidad larga (nucLSU) fueron utilizados para determinar la asociación micorrizica de varias Sebacinas y Ericaceae (Setaro et al., 2006a). Por lo tanto, el análisis del rDNA de secuencias conocidas en el grupo de Sebacinaceae permitirá evidenciar que puede existir una gran biodiversidad de especies aún no descubiertas en este grupo.

White et al. (1990), diseñaron y describieron primers específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estos genes. La región del DNAr (18S, 5.8S y 28S) puede amplificarse con primers específicos como universales (Tabla 1)

Tabla 1. Primers utilizados en esta investigación		
PRIMER	SECUENCIA	FUENTE
MWS1628	GCCCACTAGAAACTCTCACC	Weiss 2004
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Brunus. 1993
NS23	GACTCAACACGGGAAACTC	Taylor 2002
SebITS3	TGAGTGTCATTGTAATCTCAC	Berbee 2004
MWS1467	CCGCACAAGGCTGATAA	Weiss 2004
SSNS691	TAGATGTTCTGGGCCGCACGC	Setaro 2006

En definitiva los genes ribosómicos 5,8S, 18S, y 28S así como los espaciadores ITS y NTS constituyen poderosas herramientas para el establecimiento de las relaciones filogenéticas y la identificación de especies por contener secuencias conservadas, así como una evolución concertada.

Importancia de los métodos moleculares

Las herramientas moleculares han permitido conocer la estructura, dinámica y variabilidad genética de la población fúngica. Hasta el momento han sido usadas numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las técnicas clásicas de DNA, basadas en la determinación del contenido guanina/citosina del DNA nuclear

hasta la hibridación DNA-DNA, para establecer la identidad o no de cepas morfológicamente similares (Orbera, 2004).

Varios recursos pueden ser usados para la extracción de DNA genómico de hongos que se encuentran en el suelo, esto incluye Kits comerciales que pueden ser designados para la extracción del DNA microbiano y técnicas que tienen que ser optimizadas para la extracción de ácidos nucleicos (Allen et al., 2003).

La más útil para el estudio de los hongos ectomicorrizicos ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) que permiten identificar los microorganismos (Gardes & Brunus, 1993).

La técnica amplifica fragmentos específicos de DNA desde un pequeñísimo número de células fúngicas de una sola espora, o aún más, de material de herbario seco, incluyendo especímenes que están extintos. Esta técnica permitió la amplificación de los fragmentos del rDNA en la mayoría de los hongos, conduciendo al desarrollo de los estudios taxonómicos y filogenéticos intra e inter especies fúngicas (Costa, 2005).

La ventaja de la PCR es su habilidad para producir literalmente millones de copias de un segmento de DNA particular con alta fidelidad en un tiempo de 3 a 4 horas (Tenover, 1997). El procedimiento requiere una plantilla de DNA que puede estar presente en la [muestra](#) en pequeñas cantidades; dos primers oligonucleótidos que flanquean las secuencias de la plantilla de DNA que va a ser amplificado; y una DNA-polimerasa estable al calentamiento. Una vez amplificado el fragmento de ADN, los fragmentos resultantes pueden ser caracterizados de diferentes maneras.

La DNA Polimerasa se produce naturalmente en los organismos vivos, donde funciona para duplicar el DNA cuando las células se dividen. Actualmente la *Taq* polimerasa se utiliza con frecuencia en la práctica de PCR. Una

desventaja de la *Taq* es que incurre a veces en equivocaciones al copiar el DNA, conduciendo a mutaciones (errores) en la secuencia del DNA (Sanders et al., 2001). La *Taq* polimerasa tiende a formar quimeras por eso se ha utilizado otro tipo de polimerasa la cual se denomina Phusion (Finnzymes), la ventaja de esta polimerasa es que no forma quimeras.

Es un hecho establecido que diversos factores pueden influenciar la validez de los resultados obtenidos por PCR, incluyendo la presencia de componentes inhibitorios, la calidad de la plantilla de DNA, y la carencia de optimización con respecto a componentes de la reacción y las condiciones de los ciclos termales. Todos estos factores pueden comprometer la especificidad y sensibilidad de la reacción, pudiendo llevar a resultados falsos-negativos, falsos-positivos, o no reproducibles (Satz, 1993).

El principio de la clonación en biología molecular consiste en insertar un segmento de DNA extranjero en una molécula pequeña capaz de autoreplicarse (plásmido, virus) que habita en una bacteria, de tal manera que de una molécula de DNA puede ser reproducida generando muchos miles de millones de copias idénticas. La aplicación del clonaje está dada para el estudio del DNA y para la diversidad de hongos en el suelo y plantas (Chen, 2007).

Luego de la clonación es necesario preparar las plantillas para la secuenciación. El templphi es un método nuevo, desarrollado específicamente para preparar plantillas de DNA. Este método utiliza un bacteriófago 29 DNA polimerasa que permite la amplificación exponencial de una o dos cadenas de DNA. Produce una gran cantidad de picó gramos de DNA en unas pocas horas. En la amplificación in vitro, las cantidades de DNA son muy pequeñas y posteriormente hay que realizar una purificación del DNA. Con la utilización de 29 DNA polimerasa se evita este problema y permite que se dé una alta y buena amplificación (Dean et al., 2001).

El análisis más detallado de la estructura del DNA consiste en averiguar la secuencia de nucleótidos. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del DNA, sin embargo, actualmente los métodos más utilizados son el de secuenciación automática y el método enzimático de terminación de cadena de Sanger también conocido por el método dideoxi (Pérez & Vidal, 2007).

El propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen, para lo cual se parte desde fragmentos de PCR o genes clonados (Vierstraete, 2000). Las secuencias de nucleótidos que se obtienen para la región diana en cada organismo y en diferentes laboratorios pueden ser comparadas y publicadas en bases de datos electrónicas (GENBANK, EMBL, etc) y de esta manera se facilita la comparación entre ellas y con las de otros taxones.

La posibilidad de combinar estas técnicas está permitiendo conocer la abundancia, composición y distribución de diferentes poblaciones de organismos en su hábitat natural.

La presente investigación contribuirá a ser un referente en el desarrollo y aplicación de nuevas herramientas moleculares en Sebaciales.

OBJETIVOS:

General:

- Desarrollar marcadores moleculares específicos para diferentes grupos de Sebaciales (Basidiomycota) micorrízicos en Ericaceae a partir del análisis de secuencias de DNA Ribosomal.

Específicos:

- Encontrar enzimas de restricción para RFLPs y TRFLPs
- Determinar que primer se utilizarían en la aplicación de RFLPs y TRFLPs
- Identificar secuencias específicas de Sebaciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y colección de muestras

La recolección de muestras tuvo lugar en el área perteneciente a la Reserva Biológica San Francisco y bordes del Parque Nacional Podocarpus, en la mitad de la vía entre Loja y Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe cercana a las 1000 hectáreas (3°58' S, 79°04' W).

Especies	Hábitat	Numero De individuos
Cavendishia bracteata (Ruiz & Pavón ex Jaume)	RBSF	14
Cavendishia nobilis var. Capitata Lindley	RBSF	7
Diogenesia floribunda (A.C. Smith) Sleumer	RBSF	4
Disterigma alaternoides (Kunth) Niedenzu	RBSF	6
Disterigma microphyllum (G. Don) Luteyn	RBSF	10
Gaultheria erecta Ventenat	RBSF	20
Gaultheria reticulata	RBSF	6
Oreanthes cf. Hypogaeus	RBSF	6
Orthaea secundiflora	RBSF	4
Psammisia guianensis Klotzsch	RBSF	2
Sphyrospermum cordifolium Bentham	RBSF	4
Total:		83

RBSF Reserva Biológica San Francisco.

Las muestras fueron recolectadas por la Dra. Sabrina Setaro. Se recogieron un total de 83 muestras de raíces, pertenecientes a especies de Ericaceae. Las muestras se conservaron en silica gel hasta su análisis en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja. En la tabla N°2 se muestra la especie de Ericaceae y el número de individuos para cada especie y el hábitat de donde fueron colectadas.

Extracción del DNA

Por cada muestra se tomó 3 cm de la raíz, esta tiene que ser la raíz más fina, se coloca en un microtubo de 1.5 ml (Eppendorf). El DNA fue extraído usando el kit y protocolo: DNeasy Plant Mini Kit extracción (Qiagen), incluyendo un paso previo de trituración del tejido con el uso del molino de extracción.

Amplificación del DNA

La amplificación del DNA se realizó mediante el uso de la PCR. Las secuencias amplificadas fueron 18S, 5.8S, 28S y ITS (internal transcript spacers), con el uso de primers específicos MWS1628, NS23, SebITS3, MWS1467 y SSNS691. Además de un primer universal, el ITS1F.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C por 2 min; 30 ciclos, cada ciclo consiste de un paso de desnaturalización a 98°C por 10seg; anillamiento, manejamos T° desde 52°C hasta 66°C, dependiendo de la combinación de los primers por 20seg y extensión a 72°C por 30seg; y una extensión final a 72°C por 10min (Setaro 2006). El volumen de reacción de la PCR fue de 19,6ul: 10ul de Bufer+Phusion polimeras, 7.2ul de Agua esteril, para ambos primers 0.4ul (25 pmol/μl) y 2ul de DNA.

Las combinaciones de los primers específicos y el universal que se utilizaron para la amplificación del DNA por medio de

la PCR fueron: NS23/MWS1628 (5'-GAC TCA ACA CGG GAA ACT C-3'/5'-GCC CAC TAG AAA CTC TCA CC-3'); SebiITS3/MWS1628 (5'-GAC TCA ACA CGG GAA ACT C-3'/5'-GCC CAC TAG AAA CTC TCA CC-3'); NS23/MWS1467 (5'-GAC TCA ACA CGG GAA ACTC-3'/5'-CCG CAC AAG GCT GAT AA-3'); SSNS691/MWS1628 (5'-TAG ATG TTC TGG GCC GCA CGC-3'/5'-GCC CAC TAG AAA CTC TCA CC-3'); ITS1F/MWS1628 (5'-CTT GG TCAT TTA GAG GAA GTA A-3'/5'-GCC CAC TAG AAA CTC TCA CC-3').

Electroforesis en gel de agarosa y Cloning

Una vez terminado el proceso de amplificación, todas las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis. Tomando de cada reacción 2ul de producto de PCR (+ 2ul de azul de bromofenol) y colocando en geles de agarosa al 0.7% disuelta en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA). Se corrió a 128V, 300mA, aproximadamente por 20 min., para finalmente ser teñida con una solución de bromuro de etidio $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ durante 20 min y un lavado final de 15 min. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 1000pb y observación en el transiluminador UV.

Los productos de PCR que se observaron como bandas claras, se efectuó el clonaje molecular, usando Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen). Las colonias crecieron en Medio LB AGAR, MILLER (Difco™) de donde se tomaron ocho colonias individuales, para ser amplificadas directamente en PCR.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30seg, anillamiento dependiendo de la combinación de los primers 45°C por 45seg y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min para finalizar la PCR. El volumen de reacción de la PCR fue de 50 ul, con concentraciones de 1.5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.5 mM de cada primer, Bovine Serum Albumin (BSA-SIGMA) 1%, 1U Taq polimerasa,

con un buffer free Mg 10 X de amplificación. Con los primers MR13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') y MF13 (5'-GTA AAA CGAC GGC CAG-3'). Esta PCR se la evaluó en electroforesis anteriormente mencionada.

Los productos positivos de la PCR, se tomarón como referencia para seleccionar las colonias que se amplificarón, usando el TempliPhi 100 Amplification Kit (invitrogen) y protocolo del mismo.

Secuenciación, Análisis filogenético y Búsqueda de enzimas

Los productos de DNA fueron secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul, Korea), las reacciones se llevaron a cabo utilizando los primers MR13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y MF13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') para secuenciar las regiones 18S, 5.8S y 28S rDNA. La edición de secuencias fue realizada con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). La búsqueda de secuencias similares se llevó a cabo utilizando BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

Para realizar el anillamiento primero se corto el vector. Las secuencias solo tenían aproximadamente 800 pares de bases (pb), pero la region de interes (parte de la SSU, ITS1, 5.8, ITS2 y parte de la LSU) se encontraban aproximadamente entre 2300-3100 pb. Por eso se ensambló las secuencias de un clon, pero de diferentes lugares en el programa Sequencher, para tener una secuencia completa.

De las secuencias editadas se hizo una secuencia consenso y esta se usó para hacer el alineamiento. Las Secuencias de Sebacinales fueron alineadas usando MAFFT(Katoh el al. 2002). Posteriormente el alineamiento fue editado usando el programa POA (Lee C, Grasso C, Sharlow M: Multiple sequence alignment using partial order graphs. Bioinformatics 2002, 18: 452-464) en combinación con un shall wrapper de Dr. Markus Göker. Las secuencias que se obtuvo se colocaron dentro de un arbol filogenético en función de su

afiliación con las secuencias de referencia de la Dra. Sabrina Setaro.

Para encontrar las enzimas de restricción, usamos el programa Enzymex. Para determinar las enzimas de restricción para TRFLP, se analizó la región 28S. En tanto que para RFLP las regiones 18S, 5.8S y 28S.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El encontrar marcadores moleculares para el género *Sebacinales* es potencialmente importante tanto para el estudio de su taxonomía y evolución molecular. De las 83 muestras de raíces de *Ericaceae*, 19 muestras fueron positivas para *Sebacinales* y 64 muestras fueron negativas (Tabla 3).

Tabla 3. Extracción de DNA, PCR, Cloning, Templphi				
Métodos Moleculares	Numero de muestra	Total de Clones	Numero de muestras o Clones positivos	Numero de muestras o Clones negativos
Extracción de DNA y PCR	83 Muestras		19 Muestras	64 muestras
Cloning:		152 Clones		
PCR después del Cloning:			144 Clones	8 Clones
Templphi:			141 Muestras	3 Muestras

Nota. Se obtuvo 141 muestras para ser secuenciadas.

El tener un alto número de muestras negativas puede estar dado por el mal funcionamiento de los primers en donde la temperatura de anillamiento escogida para la amplificación pudo haber sido demasiado alta. Cuando la temperatura es demasiada alta, la especificidad de los primers es muy alta,

evitando que los primers puedan hibridar y estos híbridos no hayan sido extendidos o amplificados (Palacio, 2006), por esta razón no se obtuvo ningún producto cuando la temperatura de anillamiento fue alta.

Las 19 muestras positivas para Sebacinales se las obtuvo al aplicar temperaturas bajas, aunque esto no es la condición óptima para los primers y la polimerasa, ya que a temperaturas muy bajas los primers pueden formar muchos productos en la PCR, esto debido a que los primers no son tan específicos a temperaturas muy bajas y pueden insertarse en varios sitios de la plantilla de DNA y al finalizar la reacción tendríamos productos en la PCR (Lotti & Zambonelli, 2000). Pero este no es nuestro caso, ya que al aplicar temperaturas bajas en todas las muestras la mayoría de los resultados fueron negativos.

También hay que tener en cuenta que la calidad y pureza de la extracción son esenciales para que se dé una adecuada amplificación en la PCR. Ya que ciertos inhibidores presentes en la mezcla de reacción (por ejemplo, procedente de la muestra original) o la presencia de ácidos húmicos o sustancias húmicas que son co-extraídas con el DNA o trazas, de los reactivos pudieron haber inhibido fuertemente la actividad de la DNA polimerasa y finalmente pudo no haber ningún hongo en la raíz, dándonos como resultado el alto número de muestras negativas.

A cada una de las 19 muestras se le realizó el clonaje. Cabe recalcar que en cada muestra puede existir más de un solo individuo, en mi caso más de una Sebacina es decir si hay más Sebacinales en una muestra, los picos de la secuencia no estarían claros, porque contienen más de un hongo, existiendo una sobreposición de picos en la secuencia. Para separarlas hay que hacer el clonaje, de ahí radica la importancia de su aplicación en esta investigación.

En el clonaje obtuvimos 152 clones. Para comprobar que estos clones se encuentran dentro del rango de pares de bases correspondientes a Sebacina (entre 2300 a 3100 pares de bases), se hizo una electroforesis de los cuales obtuvimos 144 clones positivos para Sebacina. Las ocho negativas correspondieron al vector, en ocasiones durante el proceso de incorporación del producto de PCR al vector no se da dicha incorporación, esto puede estar dado porque el vector ha incorporado solamente primer, pero ningún producto. Los primers son tan pequeños que prácticamente se ve solo el vector en el gel (S. Setaro, comunicación personal).

De las 141 muestras secuenciadas, 66 fueron buenas para ser analizadas y 75 muestras fueron de mala calidad. Entre algunas de las causas que pueden influir, en la obtención de un número elevado de secuencias de mala calidad, en la secuenciación constan las siguientes: el primer no encuentra el sitio de hibridación, está mal diseñado o la temperatura de *melting* no es la adecuada; el primer tiene varias dianas o se encuentra degenerado; o que la cantidad entre el DNA y el cebador no es la equilibrada. Una causa muy común para que se presenten problemas durante la secuenciación es la insuficiente cantidad de DNA en la muestra, así como la presencia de compuestos contaminantes (mala calidad del DNA). La calidad del DNA molde es el factor más importante para una secuenciación exitosa. Cualquier resto de proteínas, RNA, sales, carbohidratos, fenol, cloroformo, etanol, detergentes, va a contribuir a la obtención de una mala secuencia (Pérez & Vidal, 2007).

Para la identificación molecular de los hongos, se utilizó la combinación de primers específicos y un primer universal de los cuales tenemos: NS23/MWS1628, SebITS3/MWS1628, NS23/MWS1467, SSNS691/MWS1628 y ITS1F/MWS1628, los mismos que fueron enviados a secuenciar por la empresa Macrogen (Seoul-Korea), los primers utilizados para la secuenciación fueron M13F y M13R.

Tabla 4. Código de muestra, Clones, Primer Forward-Reverse, Criterio del BLAST (*Sebacina sp*, *Serendipita vermifera*, *Piriformospora*)

Código	Clones	Primers Forward				Primers Reverse		% Probabilidad		
		SSNS NS23	ITS1F	SebITS	691	MWS 1628	MWS 1467	S	SV	P
07A02	C141	+	-	-	-	+	-		98	
07AE3	C6	+	-	-	-	+	-	99		
	C8	+	-	-	-	-	+	88		
	C9	+	+	+	-	+	-	88		
07AE4	C10	+	-	-	-	+	-		80	
	C11	+	-	-	-	+	-	98		
	C14	+	+	-	-	+	-		80	
	C15	+	+	-	-	+	-		80	
07AE5	C16	+	+	-	-	+	-	95		
	^a C17	+	+	+	-	+	-	95		
	C18	+		-	-	+	-	97		
	C19	+	+	-	-	+	-	97		
	C20	+	-	-	-	+	-	97		
	C22	+	-	-	-	+	-	95		
07AE6	C68	+	-	-	-		-			98
07A07	C23	+	-	-	-	+	-	90		
	^a C24	+	+	+	-	+	-	95		
07A08	C29	+	-	-	-	+	-	98		
	C30	+	-	-	-	+	-	99		
	^a C31	+	+	+	-	+	-	99		
	C32	+	+	-	-	+	-	98		
	C33	+	-	-	-	+	-	99		
07A12	C80	+	-	-	-	+	+	85		
	C81	+	-	-	-	+	+	80		
	C82	+	-	-	-	-	-	85		
07A16	C62	+	-	-	-	-	-		99	
	C83	+	-	-	-	+	-			

07A17	C84	+	+	-	-	-	-		85	
	C85	-	+	-	-	-	-	95		
	^a C87	+	+	-	+	+	-	95		
07A18	C117	-	-	-	-	+	-	98		
	C118	-	-	+	-	-	-	95		
	C120	-	+	-	-	-	-	95		
	C121	-	+	+	-	+	-		97	
	C123	-	+	+	-	+	-		97	
	C124	-	+	-	-	+	-	95		
07A24	C133	+	-	-	+	+	-	95		
	C134	+	-	-	-	+	-	95		
	C135	+	-	-	-	+	-	95		
	C136	+	-	-	+	+	-	95		
	C137	+	-	+	-	-	-	95		
	C140	+	-	-	+	+	-	95		
07A28	C70	+	-	-	+	-	-	98		
07A36	C104	+	-	-	-	+	-		97	
07A39	C34	+	+	-	-	+	-		99	
	C35	+	+	-	-	+	-		99	
	C36	+	+	-	-	-	-	99		
	C37	+	-	+	-	-	-	99		
	C38	+	-	-	-	+	-	99		
	C39	+	-	-	-		-	99		
	C40	+	-	+	-	+	-	99		
07A41	C42	+	-	-	-	+	-	97		
	C44	+	-	-	-	+	-	97		
	C45	+	-	-	-	+	-	97		
	C46	+	-	-	-	+	-	97		
	C47	+	-	-	-	+	-	99		
07M66	C89	+	+	-	-	+	-			98
	C90	+	-	-	+	+	-			98
	C91		-	+	+	-	-			98
	C92	+	-	-	-	-	-			97
07M72	C96	-	+	-	-	+	-	90		
	C97	-	+	-	-	-	+	90		
	C100	-	+	-	-	-	-	90		
	C111	+	-	-	-	-	+			80

07M68	C112	+	-	-	-	-	+			80
	C116	+	-	+	-	-	+			80

Leyenda: + Resultado del primer en la secuenciación, - Resultado del primer en la secuenciación, S: *Sebacina sp*, P: *Piriformospora*, SV: *Serendipita vermifera*, ^aC: Secuencias Completas

El objetivo principal de utilizar varios primers era obtener la secuencia completa del rRNA de los hongos del género *Sebacina*, pero no se pudo tener dicho resultado. Como podemos observar en el cuadro 4, que solo cuatro muestras de las 66, se obtuvo secuencias completas. La mayoría de las secuencias no se ensamblaron porque faltaba una parte para hacer la sobreposición al momento de ensamblar la secuencia consenso. Este cuadro también nos muestra que la combinación NS23/MWS1628 predomina en la mayoría de las secuencias, las mismas que fueron de buena calidad, pero no tuvieron los pares de bases que requeríamos para determinar enzimas de restricción para RFLP. En el cuadro también podemos ver que el primer reverse MWS1628 fue mas efectivo que el MWS1467. En el estudio realizado por Weiss et al. (2004), utilizando estos primers pudo determinar la presencia de *Sebacinales* en diferentes especies de orquídeas y además es el precursor del primer MWS1628. Esto demuestra la efectividad de estos primers específicos para *Sebacinales*.

En cuanto a las secuencias obtenidas, al compararlas en el BLAST; los resultados sugieren que las muestras identificadas pertenecen a los siguientes especies: *Sebacina sp*, *Piriformospora sp*, *Serendipita vermifera*. La probabilidad de que todos los clones sean del género *Sebacina* fue de entre 80% a 99%. De las 66 muestras 68% pertenecen a *Sebacina sp*, 18% a *Serendipita vermifera*, 14% a *Piriformospora*.

Dándonos como resultado que todas las muestras pertenecen al orden *Sebacinales*. Esto concuerda con estudios realizados, en las secuencias de rDNA de *Sebacinales* del grupo B, las que fueron amplificadas de varias raíces de *Ericaceae* (Berch et al. 2002; Allen et al. 2003; Cairney, 2005;

Setaro et al. 2006a), en donde sugieren que las Ericaceae mantienen una asociación micorrízica con hongos Sebacinales.

Es importante el estudio de las Ericaceae ya que constituyen una familia grande y ecológicamente interesante ya que están presentes en todo el mundo (Kron et al., 2002). Todas las Ericaceae tienen una asociación micorrízica especial que les permiten adaptar nutrientes y así poder sobrevivir en tierras pobres y acidas. A esta asociación se la denomina micorriza ericoide (ERM).

En investigaciones recientes se ha demostrado que las Sebacinales del grupo B han permitido el crecimiento, desarrollo y protección contra patógenos, por ejemplo tenemos la interacción de *Sebacina vermifera* con *Nicotiana tabacum*, esta interacción le permitió su crecimiento y resistencia a cierto herbívoro (Barazani et al., 2005). *Piriformospora* sp. permite el crecimiento de plantas e incrementa la resistencia en contra de agentes patógenos en un amplio rango de plantas hospedadoras (Varma et al., 2001). En otros estudios, las Sebacinaceae se asocian con la *N. nidus-avis*, ayudándola así a la germinación y también al crecimiento de las raíces (Mckendrick et al., 2002).

Los resultados de la filogenia de esta investigación demostraron que todas las secuencias pertenecen a Sebacinales del grupo B. A su vez este grupo se subdivide en grupo Uno (I) y grupo Dos (II) (Figura 2). Algunas secuencias se encontraron distribuidas en el grupo I y otras en el grupo II.

Estos datos permitirán dilucidar la hipótesis de la Dra. Sabrina Setaro en donde menciona “Que el grupo I solamente se encuentra en los Neotrópicos y que el grupo II se encuentran en varios lugares del mundo”. De donde vienen las secuencias que pertenecen a un grupo es importante para saber más de la evolución y biogeografía de los organismos. Hasta ahora no se sabe nada de la biogeografía en Sebacinales.

En el análisis de las regiones nrDNA se observó que la región 18S no era muy variable y no teníamos secuencias completas de esta región, por lo tanto no se pudo encontrar marcadores específicos para esta región. La región 28S es mas variable pero no tanto como la ITS y además en todas las muestras, esta región estaba completa y fue más apropiado para buscar secuencias específicas, para así obtener enzimas de restricción.

Tabla 5. Marcadores específicos para TRFLPs				
Lugar	Sec. del Grupo I	Enzima	Sec. del Grupo II	Enzima
2845 a 2844	CCTGG	BstnII		
2830 a 2841			TGTTTGGGTGT	-
2754 a 2758			ACACGCGC	-
2875 a 2885	GATCATCTAC	-	GATCATCTAC	-

Obtuvimos una enzima de restricción para el grupo I y ninguna enzima de restricción para el grupo II (Tabla 5). Pero encontramos regiones de ADN específicas o marcadores de ADN específicos para el grupo II y una secuencia específica para ambos grupos. Por lo tanto las secuencias TGT TTG GGT GT; ACA CGC GC; GAT CAT CTAC; GAT CAT CTAC no sirven para métodos con enzimas de restricción, además son regiones cortas (2830-2841, 2754-2758, 2875-2885) y un primer está formado entre 15 a 20 pb normalmente, por tanto podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos primers específicos para Sebaciales.

Para obtener Las enzimas de restricción para RFLPs se utilizó las secuencias completas que eran 4 secuencias de esta investigación, más las secuencias de la Dra. Sabrina Setaro,

ya que para el análisis de los RFLPs se necesita todas las regiones del rDNA. Se encontraron 4 enzimas de restricción para el grupo I, 4 para el grupo II y una enzima para ambos grupos.

Tabla Nº 6. Marcadores específicos para RFLPs			
Enzima	Secuencia en el grupo I	Enzima	Secuencia en el grupo II
AfIII	CTTAAG	AvaI	CCCGAG
AfIII	ACACGT	DrdI	CACTTGGAGCTC GACCAAGGAGTC GACAGACTTGTC
Bstul	CGCG	StyI	CCAAGG
MslI	CACTCTGGTG CATACCTGTG CATATCTGTG	AcuI	TGTACA

Nota. La enzima EaeI (TGGCCG) se encuentra en ambos grupos

En total se encontró nueve enzimas de restricción (Tabla 6) para RFLP y una sola enzima para T-RFLP. Esto se da porque los RFLP trabajan con todas las regiones del rDNA de la secuencia, dándonos como resultado un alto número de patrones característicos, que tiene varios pedazos, mínimo dos como en nuestro caso, tanto para el grupo I y grupo II facilitando así el encontrar enzimas de restricción. Mientras que para los T-RFLP es mucho más difícil encontrar enzimas de restricción y aun más que sean específicas para cada grupo, debido a que se limita solo a una región terminal (28S).

Con los resultados obtenidos se deja tentativamente la utilización de la enzima de restricción BstnII, para una realización futura de un protocolo para TRFLP y el primer marcado sería el MWS1628, y para RFLP tenemos AfIII, AvaI, AfIII, DrdI, Bstul, MslI, StyI, AcuI, EaeI.

No se ha encontrado información sobre la aplicación de RFLP y TRFLP en Sebaciales, pero se ha comprobado en otros estudios, que los TRFLP pueden analizar taxas poco comunes (Ayra et al., 2001). En dos publicaciones que trataba sobre la aplicación de T-RFLP para Ectomicorrizas de comunidades fúngicas se obtuvieron buenos resultados. Y su aplicación incrementó el entendimiento de la ecología micorrízica y su uso (Dickie & FitzJohn, 2007) por ende la aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos y diversidad genética (Becerra & Gepts, 1994). Estos marcadores moleculares reconocen directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un "perfil molecular" o "fingerprinting" característico para cada organismo e independiente de las condiciones de crecimiento (Morel, 1995). Además, permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, así como información sobre frecuencias alélicas, nivel de heterocigocidad de una población y subdivisión de poblaciones, entre otras, en un período de tiempo menor al ocupado mediante estrategias convencionales (Ayad et al., 1997). Perotto et al. (1996) usó RFLPs para mostrar múltiples especies micorrízicas que pudieron existir en las raíces y poder separar en poblaciones. En este estudio, el poder de discriminación de la técnica fue aceptable y corroboró como lo hicieron otros autores.

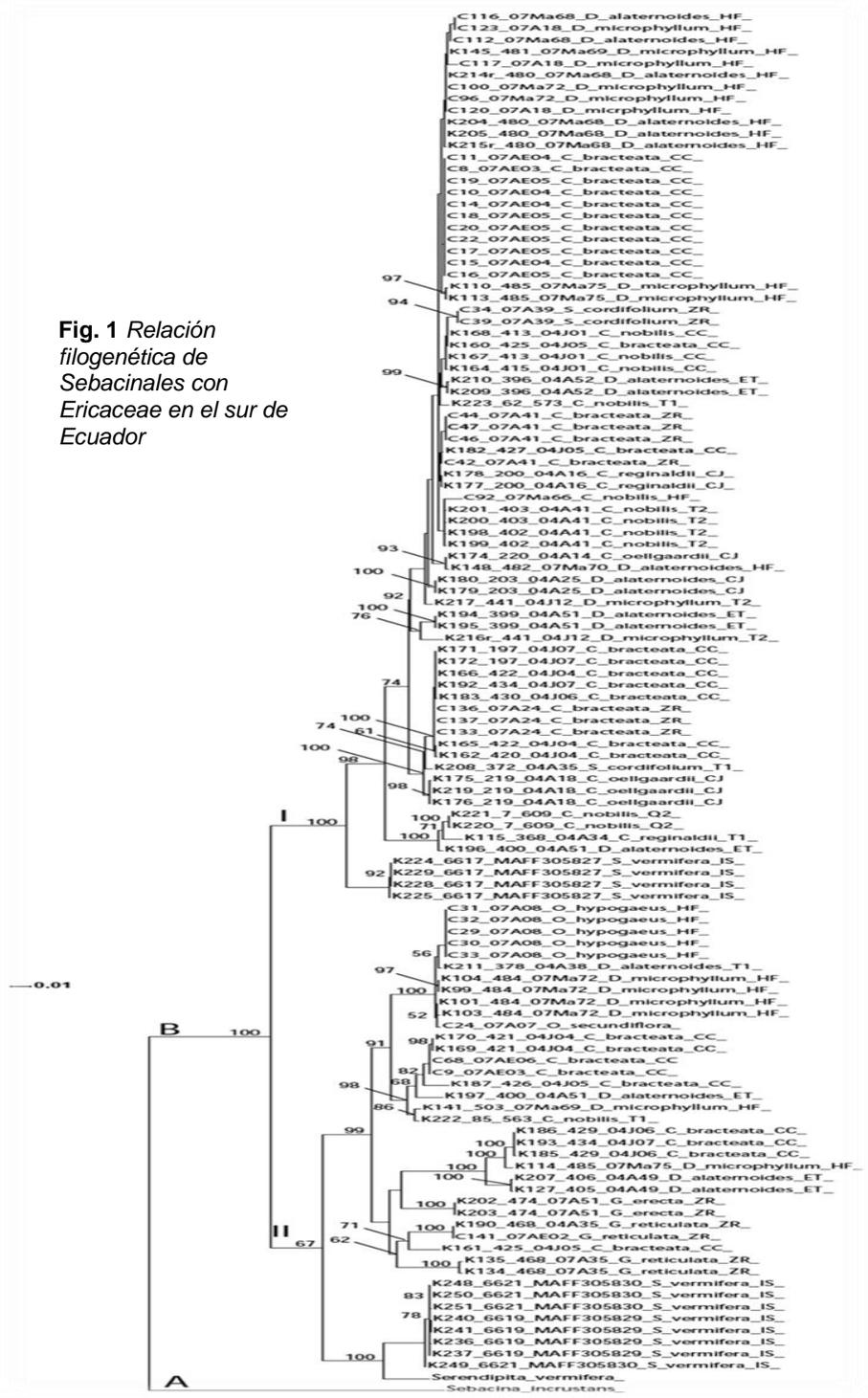
Al utilizar estos marcadores de DNA, es que estos no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, permiten una detección rápida, son universales, muy abundantes, se requiere poca cantidad de DNA para los análisis y el DNA es muy estable y específico para cada individuo (huella génica). Por ende los T-RFLP y RFLP, podrían ser una técnica en la diferenciación molecular de Sebaciales en nuestro país y su aplicación para posteriores investigaciones.

Los avances recientes en la ecología de los hongos está dada gracias a la aplicación de técnicas moleculares las mismas

que han permitido determinar los cambios en la estructura de las diferentes comunidades fúngicas (Klamer et al., 2002). Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Lean et al. (1999) en micorrizas ericoide asociada con Ericaceae y Epacridaceae.

Actualmente la mayor desventaja de las técnicas moleculares es su costo. Sin embargo, en menos de 20 años el costo de las herramientas moleculares ha bajado y hoy por hoy son más accesibles. Y con los avances de la tecnología (equipo especializado, mejores reactivos, técnicas etc.) cada vez será más fácil y rápido la obtención marcadores moleculares.

Fig. 1 Relación filogenética de Sebaciales con *Ericaceae* en el sur de Ecuador



CONCLUSIONES

- Existe una asociación micorrízica de Sebacinales del grupo B con Ericaceae de la Región Andina Tropical del Sur del Ecuador.
- Las Sebacinales del grupo B se subdivide en dos grupos, el grupo I y el grupo II. La enzima de restricción BstnII perteneciente al grupo I de Sebacinales será útil para la aplicación de T-RFLP. Las enzimas de restricción Afill, Aflll, Bstul, MslI, pertenecientes al grupo I y las enzimas Aval, Drdl, Styl, Acul, pertenecientes del grupo II y una enzima perteneciente a ambos grupos (EaeI) serán útiles para la aplicación de RFLP, permitiendo realizar un screening de las muestras antes de secuenciar o solamente usar el patrón para distinguir las Sebacinales.
- Con la combinación de los primers específicos NS23/MWS1628 se obtuvo secuencias de buena calidad, pero no tuvieron los pares de bases que requeríamos para determinar enzimas de restricción para RFLP, pero si obtuvimos enzimas de restricción para TRFLP. Por tanto la combinación de estos primers es la recomendable para la aplicación de estas técnicas en Sebacinales.
- El primer reverse MWS1628 fue más efectivo que el MWS1467. En el estudio realizado por Weiss et al. (2004), utilizando estos primers pudo determinar la presencia de Sebacinales en diferentes especies de orquídeas y es el precursor del primer MWS1628.
- La aplicación de los marcadores moleculares dependerá de la necesidad del investigador, por ejemplo: si el investigador solo necesita determinar la presencia de Sebacinales en un gran número de

muestras, entonces se recomienda utilizar los RFLP y T-RFLP en lugar de la secuenciación, permitiéndonos ahorrar tiempo y dinero. La utilización de estos marcadores moleculares permitirán detectar las variaciones a nivel de DNA. De ahí que los RFLP y TRFLP serán una herramienta precisa y rápida, para encontrar polimorfismos en Sebacinales y otros grupos.

- Todas las técnicas moleculares son de vital importancia para el estudio ecológico, taxonómico y filogenético de la diversidad de organismos existentes, por ende las Sebacinales no están exentas de ellas. Sin estas técnicas sería imposible contrastar, apoyar o refutar la información morfológica o molecular ya existente. Además permiten la búsqueda de nueva información.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Para futuros estudios se debería analizar de manera más detallada la ecología, filogenia y distribución de este fascinante orden fúngico, quien dice que en un futuro muy cercano no lleguen a tener una gran importancia económica o beneficiosa que ha sido pasado por alto hasta ahora.
- De las secuencias específicas obtenidas en esta investigación pueden ser utilizadas para elaboración de primers específicos para Sebaciales.
- Que se realice protocolos de TRFLP y RFLP en Sebaciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, I.C.; Campbell, C.D.; y Prosser, J.I. (2003). Diversity of fungi in organic soils under moorland – Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) *ENVIRON MICROBIOL* 1121–1132.
- Allen, TR.; Millar, T.; Berch, S.; Berbee, ML. (2003). Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytol* 160:255–272
- Ayra, L.; Cabrera, I.; Gómez, M.; Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Dpto. de ácaros y hongos entomopatógenos, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Habana
- Avise C.J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. New York.
- Ayad, W.G.; Hodgkin, A.; Jaradat, V.; Ramanatha, Rao. (1997). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Reporte de un taller del IPGRI, octubre 9-11 Roma. IPGRI, Roma.
- Barazani et al. (2005). Estudio de *Sebacina vermifera* en la *Nicotiana attenuata*.
- Bécerra, S y Grepts, N. (1994). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* 32:314-331
- Berch, SM.; Allen, TR.; Berbee, ML. (2002). Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244:55–66.
- Bonamico, N. (2004). Caracterización y clasificación de híbridos simples de Maíz con marcadores SSR1. INTA Argentina
- Burke, A.; Blanco, O.; Oscar, F.; Molina, M. (2005). Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados Departamento de Biología Vegetal II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. E-28040, Madrid.

- Cairney, J.W. (2005) Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* 87:467–475 Q Springer-Verlag 2000
- Costa, J. (2005). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis para el grado de Maestro en Ciencia en Agronomía. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Chen, N. (2007). Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis para el grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica.
- Curtís, H. (1996). *Biología*. Editorial Medina Panamericana. Sexta edición.
- Crespo, M. (1999). Uso de la técnica RFLP para la identificación de fragmentos de DNA posiblemente relacionados con la virulencia de hongos entomopatógenos. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. *Bioagro* 13(3): 93-98.
- Dickie, I.A. y Koide, R.T. (2002). Vertical distribution of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *NEW PHYTOL* 156: 527–535.
- Dickie, I.A. y FitzJohn, R.G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLS) to identify mycorrhizal fungi: a methods review.
- Dean F. et al. (2001). *Genome Research* 11, 1095–1099. 2001.
- Edward, D.W. (2004). Further advances in orchid mycorrhizal
- Finlay, R. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles
- Fortubel, F. (2002). *Tecnología de DNA recombinante: principios y aplicaciones*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz Bolivia.
- Foolad, A. (1995). Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Gardes, J.D. y Bruns, D.T. y (1993). In vitro germination of nonphotosynthetic, myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. NEW PHYTOLOGIST, 148, 335±342.
- Gonzalez, A.; Honrubia, M.; Morte, A.; Diaz, G.(2000). Edible fungi adapted to arid and semi-arid areas. Molecular characterization and in vitro mycorrhization of micropropagated plantlets. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. España.
- Gruntzin, V.; Stres, B.; Ayala, H.; Tiedje, J. (2002). Improved Protocol for T-RFLP by Capillary Electrophoreses. Center for Microbial Ecology, Michigan State University.
- Hernández, J. (2005). Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Hibbett D. et al. (2007). “A higher-level phylogenetic classification of the Fungi ELSEVIER 5 0 9 – 5 4 7
- Iturralde, J. (2005). Identificación genética de hongos. Sociedad Mitológica de Madrid. España.
- Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Kottke I. et al. (2003). Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with liverworts: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species., MYCOLOGY RESEARCH 107 (8): 957–968
- Klamer, A.; Edwards K.J.; Bruford S.; Funk B.; Vosman M.; Morgante, O. (2002). Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol.* 15:625-628.
- Kron, K.A.; Judd, W.S.; Stevens, P.F.; Crayn, D.M.; Anderberg, A.A.; Gadek, P.A.; Quinn, C.J.; Luteyn, J.L. (2002). Phylogenetic classification of Ericaceae:

molecular and morphological evidence. Bot Rev 68:335–423

- Lopez, F. (1998). Aplicación de marcadores moleculares para el diagnóstico de parasito de Bivalos.
- Luteyn, J.L. y Sylva, D.S. (1999). (Antioqui Department, Colombia): hotspot for neotropical blueberries (Ericaceae: Vaccinieae). Brittonia 51:280–302.
- Lotti, M. y Zambonelli, A. (2000). A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR ELSEVIER
- Luna, M.; Flores, A.; Ponce, P. (2001). Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Pag. 44-60.
- Nathans, D. y Smith, H. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules Annu. Rev. Biochimic 44, 273-293.
- Morel, B. (1995). Diversidad del picoplancton Ecuariotico marino mediante métodos moleculares. Universidad de Barcelona.
- McKendrick, S.; Leake, L.; Taylor, J. y Lee, J. (2002). Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. NEW PHYTOLOGIST
- Muyzer, B. (1999) Diversidad del picoplancton Ecuariotico marino mediante métodos moleculares. Universidad de Barcelona.
- Orberá, T.R. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico REV IBEROAM MICOL 2004; 21: 15
- Palacio, P. (2006). Empleo de técnicas moleculares para la caracterización de hongos que afectan la palma de aceite. Laboratorio de Caracterización Molecular, Ceniavances. Colombia
- Perotto, S.; Girlanda, M.; Martino, E. (2002). Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. Plant Soil 244:41–53

- Pérez, J. y Vidal, L. (2007). La importancia de la secuenciación del ADN. Biotecnología. FARMESPAÑA INDUSTRIAL.
- Rentarías, M. (2007). Herramientas Moleculares. Breve revisión de los marcadores moleculares. Cap. 18. Pag. (541-566).
- Rivera, G. (2006). Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis doctoral. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Rodríguez, A. y Velez, M. (2004). Ecología molecular de los hongos Ectomicorrizicos REVISTA FITOTECNIA MEXICANA pp267-278
- Said, N.; Fernández, J.; Acevedo, E. (2007). Aplicación de técnicas de Biología molecular y análisis bio-informático en la tipificación de levaduras nativas procedentes de diversos ambientes. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.
- Sanders, IR.; Alt, M.; Groppe, K.; Boller, T.; Wiemken, A. (2001). Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130:419–427
- Satz, L. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones. Revista científica y tecnológica. Vol 4. No. 23.
- Setaro S. et al. (2006a). “Sebacinales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia Nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador”. NEW PHYTOLOGIST 169: 355–365
- Setaro, S.; Kottke, I.; Oberwinkler, F. (2006b). Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae., MYCOLOGY PROGRESS., 5: 243–254
- Selosse, M.; Setaro, S.; Floren, G. (2007) Sebacinales are common mycorrhizal associate of Ericaceae NEW PHYTOLOGIST

- Solé, M. (2002). Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden *Onygenales*. Tesis doctoral. Unidad de Microbiología. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Rovira y Virgili.
- Suárez, J.P. (2006). "Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest". ELSEVIER 1257-1270.
- Lean, S.E.; Read, D.J.; Brown, M. (1997). Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edn. Academic Press., San Diego, California.
- Tedersoo, L.; Suvi, T.; Larsson, E.; Koljalg, U. (2006). Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research* 110: 734- 748.
- Taylor JW. 2002. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 1992, 84:589-592.
- Tenover, D. (1997). PCR in estudios de arbuscular mycorrizal fungi. *Molec Ecol*.
- Varma, A.; Singh, A.; Sahay, N.; Sharma, J.; Roy, A.; Kumari, M.; Rana, D. (2001) *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In *Fungal Associations* (B. Hock, ed.): 125–150. Springer-Verlag, Berlin.
- Vierstraete, A. (2000). The Central Dogma of Molecular Biology. Department of Biology. University of Ghent. Belgium.
- White, J.H. (1990). IVmycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera* NEW PHYTOLOGIST 110,227-231
- Weib, M. (2007). Molecular phylogenetic reconstruction.
- Weiss M. et al. (2004). "Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential", MYCOLOGY RESEARCH 108 (9): 1003–1010.
- Yang, Z.; Matheny, P.; Slot, J.; Hibbet, D. (2005). New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoidclade) based on morphology and

ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 109 (11): 1259-1267.

- Zabeau, M. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.