



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 60  
HONGOS QUE FORMAN PARTE DEL CEPARIO  
MICOLÓGICO DEL C.B.C.M. DE LA UNIVERSIDAD  
TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA”**

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

**AUTOR:**

Dayana Vanessa Ochoa Cueva

**Director de Tesis:**

Dr. Juan Pablo Suárez Ch.

Loja-Ecuador

2008

## **CERTIFICACIÓN**

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

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Dayana Vanessa Ochoa Cueva, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja,      de      de 2008.

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.

Dayana Vanessa Ochoa Cueva

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo lo dedico:*

A Dios, por haberme dado luz y fortaleza para alcanzar mis metas.

A mis padres, Fabián y Sonia, por su sacrificio y constancia en forjar mi personalidad y por brindarme siempre todo su amor y comprensión; a mis hermanos, por su apoyo incondicional para el logro de mis fines.

A mi sobrino, Daniel, por ser la persona que ha iluminado mi vida, que ha sido mi principal motivación en todos estos años de estudio.

A mis maestros, por sus sabias enseñanzas; y a mis compañeros, por su amistad fraternal; para ellos, mi respeto y gratitud.

Dayana

## **AGRADECIMIENTO**

Dejo constancia de mi especial agradecimiento, al Dr. Juan Pablo Suárez Ch., Director del presente trabajo investigativo, ya que gracias a su sabia dirección y vocación educativa, hizo posible la culminación de ésta mi tesis.

A todos y a cada uno de los Catedráticos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Técnica Particular de Loja, quienes con sus vastos conocimientos propiciaron mi formación, hasta la culminación de mis estudios. Siempre seguirán siendo mi guía y ejemplo de rectitud, equidad y sabiduría.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por permitirme realizar mi trabajo de investigación y por darme la oportunidad de formarme y prepararme profesionalmente.

A mis compañeros y amigos, por brindarme su apoyo y comprensión, tanto en los buenos como en los malos momentos.

Dayana Vanessa Ochoa Cueva

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, Dayana Vanessa Ochoa Cueva 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”

Dayana Vanessa Ochoa C.  
TESISTA

Dr. Juan Pablo Suárez Ch.  
DIRECTOR DE TESIS

## **INDICE DE CONTENIDOS**

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
- Clasificación de los hongos	4
- Interés biotecnológico de los hongos	5
- Identificación morfológica y molecular de los hongos	8
- Técnicas de Biología Molecular en taxonomía fúngica	9
o DNA mitocondrial (mtDNA)	9
o DNA ribosómico (rDNA)	10
- Reacción en Cadena de la Polimerasa y Electroforesis	14
- Secuenciación del DNA	16
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
- Ejemplares de hongos	19
- Extracción del DNA	19
- Amplificación del DNA	19
- Electroforesis en gel de agarosa	20
- Ensayo de aislados con malas secuencias	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
- Caracterización molecular de los aislados del banano	24
- Caracterización molecular de los aislados de plantas medicinales	28
CONCLUSIONES	31

PERSPECTIVAS FUTURAS	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	41



## RESUMEN

Nuestro país constituye un amplio campo para el estudio de hongos, pues por su variedad de climas, existe una gran diversidad de hongos altamente adaptables, que se encuentran presentes en prácticamente todos los ecosistemas. Si bien en su mayoría cumplen con una función indispensable y benéfica, existen algunas especies que, desde el punto de vista humano, son dañinas o indeseables de que se presenten en gran volumen, dado que son los organismos que más afectan a los cultivos de importancia comercial.

El estudio de hongos fitopatógenos mediante el uso de técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta útil para la diferenciación de hongos estrechamente relacionados y que por sus caracteres morfológicos no pueden ser clasificados taxonómicamente. En esta investigación se analizaron sesenta muestras de hongos de las cuales 41 fueron obtenidas en las plantaciones de banano y 19 de 4 plantas medicinales: *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria laevis*, todos los hongos fueron cultivados en Potato Dextrosa Agar (PDA). Mediante PCR y el uso de primers universales ITS1, NL4, ITS1F, LR5, se amplificó la secuencia ITS-5.8S-LSU rDNA con alrededor de 1200pb, estos productos fueron analizados por medio de electroforesis y finalmente secuenciados. Utilizando el BLAST del GenBank se obtuvo como resultado que la mayoría de hongos de las plantaciones de banano pertenecen al orden *Hypocreales* predominando *Fusarium*; en cuanto a los hongos obtenidos de plantas medicinales su mayor parte pertenecen al orden *Pleosporales*, con predominio del género *Alternaria*, estos hongos se encuentran comúnmente en el ambiente, sin embargo en pruebas de antagonismo realizados previamente, estos tuvieron resultados positivos, considerándolos como posibles endófitos de las plantas medicinales.

**Palabras clave:** Diversidad de hongos, PCR, primers universales, electroforesis.

## ABSTRACT

Our country constitutes a wide field for the study of fungi, because for its variety of climates, a great diversity of highly adaptive fungi exists that are present in practically all the ecosystems. Although in their majority they fulfill an indispensable and beneficent function, there are some species that, from the human point of view, they are harmful or undesirable that they are presented in great volume, since they are the organisms that more they affect to the cultivations of commercial importance.

The study of pathogenic fungi by means of molecular methods has become a useful tool for the differentiation of closely related fungi were based on morphological characters can't be classified. In this investigation sixty samples of fungi were analyzed of which 41 were obtained in banana tree plantations and 19 from four medicinal plants: *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* and *Borreria laevis*. All fungi were cultivated in Potato Dextrosa Agar (PDA). By means of PCR and using a combination of the universal primers pairs ITS1-NL4 and ITS1F-LR5, the sequence ITS-5.8S-LSU rDNA was amplified with around 1200pb. These products were analyzed by gel electrophoresis and finally sequenced. BLAST searches on GenBank shown that most of fungi of the banana tree plantations belong to the order Hypocreales mainly *Fusarium*. The fungi obtained from medicinal plants mostly belong to the order Pleosporales, with prevalence of *Alternaria*. This fungus is frequently found in the air, however in tests of antagonism carried out previously, these they had positive results, considering them as possible endophytic fungi of the medicinal plants.

**Keywords:** Fungi diversity, PCR, universal primers, electrophoresis.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. La mayor parte de los hongos juegan un papel de vital importancia en el mantenimiento de los ecosistemas (Jabra *et al.* 1999). Muchos hongos son estrictamente saprófitos, sin embargo también existen parásitos (obligados y no obligados), patógenos de plantas, del hombre y otros organismos, algunos pueden ser hiperparásitos (incluyendo los mismos hongos) (Montealegre 2002). La mayoría posee un cuerpo o talo vegetativo filamentosos llamado micelio. Las ramas del micelio se denominan hifas, que crecen en todas direcciones, en algunos hongos el micelio consiste de muchas células que contienen una o dos núcleos por célula. En otros, el micelio es multinucleado y puede o no tener paredes celulares (Montealegre 2002).

Una característica importante entre grupos de hongos, usada como un escalón evolutivo, es la presencia o ausencia de septos. En ciertos grupos de hongos, considerados más primitivos, generalmente no se observan septos, solo en la base de los órganos reproductores o para separar porciones viejas de las hifas (Popoff 2005).

En cuanto al tipo de nutrición, estos organismos desprovistos de clorofila e incapaces de sintetizar los glúcidos que necesitan para vivir, han desarrollado tres sistemas de vida: Los saprobios, que pueden descomponer residuos orgánicos para alimentarse, este es el caso de los hongos comúnmente hallados sobre troncos muertos; otros son parásitos y extraen las sustancias orgánicas que necesitan de un hospedador al que debilitan y a la larga lo matan. El tercer modo de vida es el de los hongos simbióticos, que extraen las sustancias orgánicas de un hospedador, pero que en contrapartida le procuran cierto número de ventajas (Popoff 2005).

## Clasificación de los hongos

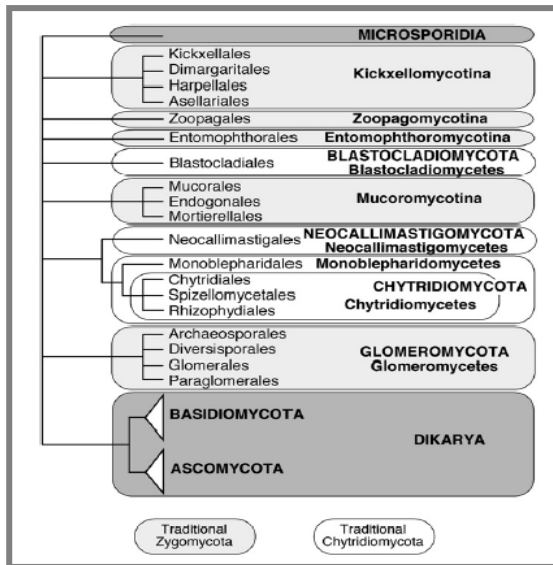
La clasificación de los hongos es muy compleja y discutida. La ubicación de un hongo en un grupo u otro es revisada constantemente, muchos se mantienen en su clasificación original para su estudio, sin embargo Hibbet *et al.* (2007), ha planteado una nueva clasificación, la cual abarca a los organismos monofiléticos del Reino Fungi, es decir los cuales han evolucionado a partir de un ancestro común, incluyendo también formas sexuales y asexuales. Esta clasificación usa un lineamiento jerárquico (Tabla 1), modificado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Hibbet *et al.* 2007).

**Tabla 1.** Lineamiento jerárquico adoptado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Hibbet *et al.* 2007).

CATEGORÍA	TAXON
Reino	Fungi
Subreino	Dicarya
Phylum	-mycota (excepto Microsporidia)
Subphylum	-mycotina
Clase	-mycetes
Subclase	-mycetidae
Orden	(Sufijo –ales)

La nueva clasificación reconoce un reino, un subreino, siete phyla, diez subphyla, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes (Hibbet *et al.* 2007). Los phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* se encuentra clasificados en el subreino *Dikarya* (Fig.1), debido a estudios de las hifas dicarióticas (Hibbet *et al.* 2007). Los cambios más relevantes que se pueden observar en esta

nueva clasificación, se incluyen en algunos taxa que se encontraban dentro de los phylum *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, ya que basándose en análisis con el rRNA estos grupos son reconocidos como polifiléticos (Hibbet *et al.* 2007).



**Fig 1. Filogenia y clasificación de los hongos. Hongos Basales y Dikarya (Hibbet *et al.* 2007).**

Los criterios usados para distinguir entre estos grupos incluyen tanto características de su estructura básica (morfología), patrones moleculares (estudios de la secuencia de DNA) y ciertos patrones de reproducción, particularmente de reproducción sexual (Guisiano 2005; Mendoza 2000).

### **Interés biotecnológico de los hongos**

Los hongos son organismos altamente adaptables, que se encuentra presentes en prácticamente todos los ecosistemas.

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad de hongos en el mundo, sin embargo hace falta profundizar en su estudio, de allí se podrían beneficiar muchas áreas como la medicina, agricultura, la industria ya que constituyen un reto para las farmacéuticas en la elaboración de antibióticos y antifúngicos. En la agricultura, hoy los hongos están reemplazando a los insecticidas porque controlan y evitan el ataque de insectos, nemátodos u otros hongos (Martin *et al.* 2000). Además, algunos hongos son empleados como organismos de laboratorio para el estudio de procesos biológicos fundamentales (*Saccharomyces*, *Neurospora*, *Coprinus*, *Schizophyllum*, *Phycomyces*, *Aspergillus*, *Ustilago*, etc). Por ello la importancia de esta investigación, ya que por medio de técnicas moleculares se contribuye al estudio de los hongos, principalmente de aquellos que en la actualidad están siendo evaluados en el área biotecnológica, como son los hongos que han sido aislados de plantaciones bananeras, para la determinación de sus metabolitos secundarios; y, los aislados de plantas medicinales (*Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria lavéis*), con los cuales se realiza pruebas de antagonismo.

La identificación de hongos fitopatógenos presentes en un ecosistema es de suma importancia para su manejo y conservación; nos puede permitir, en primer lugar, manejar las especies vegetales a cultivar para minimizar enfermedades, especialmente de aquellas que tienen mayor importancia a nivel mundial; realizar la utilización oportuna y controlada de fungicidas químicos o mejor aún, para aplicar metodologías de control biológico efectivas (Zambrano 2002; Blanco *et al.* 2004). En la actualidad muchos investigadores están buscando nuevas estrategias para el uso de hongos en el control de plagas, especialmente del banano, que constituye uno de los primeros cultivos a nivel mundial. Los bananos son cultivados en más de 125 países del mundo, siendo parte importante de la economía y alimentación básica de muchos países (Pocasangre *et al.* 2006). El uso de hongos endofíticos, se plantea hoy en día como una buena alternativa, ya que la interacción entre el patógeno y el

antagonista ocurre directamente dentro de un mismo nicho: el tejido interno de las plantas. Los hongos endofíticos colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntoma, y confieren una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos. En diferentes sistemas de producción de banano comercial de Centroamérica y el Caribe, se ha identificado que las raíces son colonizadas por hongos endofíticos, denotándose una dominancia de géneros específicos como *Fusarium* y *Trichoderma*. Con este hecho, se deduce que estos géneros podrían tener un mutualismo específico con las plantas de banano, que podría resultar en efectos de supresividad al ataque de plagas (Meneses 2003). En diversos estudios, *Fusarium* spp se ha reportado como endofítico natural en cultivares diversos de banano, pertenecientes a genomas diploides, triploides y tetraploides. Por ejemplo, Pocasangre (2000), reporta una frecuencia mayor de *Fusarium*, tanto en las raíces, la corteza y el cilindro central del cormo, en diferentes cultivos de banano. El cultivo del banano es atacado por diversos patógenos, que incluyen hongos, bacterias y virus. Entre las principales plagas y enfermedades que han tenido impactos negativos en la historia del banano están: Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. diiformis), Sigatoka Amarilla (*M. musicola*), Moko (*Ralstonia solanacearum*) y Mal de Panamá (*Fusariumoxysporum* var. cubense), Nemátodos (*Radopholus similis*, *Pratylenchus* spp, *Meloydogine incógnita* y *Helicotylenchus* spp) (Meneses 2003).

Al igual que en las plantaciones bananeras, el cultivo de plantas medicinales es de gran importancia en nuestro país. Datos sobre asociaciones de hongos a plantas ecuatorianas son muy escasos, en especial de plantas medicinales. Sin embargo, los hongos en asociación endofítica con estas especies vegetales podrían jugar un rol importante en las propiedades medicinales de las mismas (Ramírez *et al.* 2006).

## **Identificación morfológica y molecular de hongos**

Hoy en día los biólogos evolutivos usan tanto datos morfológicos como moleculares para establecer relaciones filogenéticas entre organismos. Sin embargo, es común observar incongruencias entre los análisis basados en datos morfológicos y los basados en datos moleculares.

El principal argumento en favor de la utilización de caracteres moleculares es que son universales. En muchos casos, principalmente cuando se requiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio, existen genes presentes en todos los genomas celulares como los ribosomales, que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables. En los estudios morfológicos, en cambio, los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen el potencial de ser arbitrarios (Rentarúa 2007).

Por todo lo mencionado anteriormente resulta oportuno la identificación rápida y confiable de hongos, sin embargo, la limitación de los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico, ha propiciado el uso de las técnicas moleculares (Franco 2005). Hasta el momento han sido usadas numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las clásicas técnicas 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 (Solé 2002).



## **Técnicas de biología molecular en taxonomía fúngica**

Existen varias técnicas reportadas para el análisis del DNA y búsqueda de información de su secuencia en regiones específicas. Dentro de las técnicas más importantes, se pueden utilizar por ejemplo alguna de las siguientes para la caracterización de hongos fitopatógenos. RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism Analysis*), esta técnica 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 (Iturralde 2005; Solé 2002; Zabeau 1993). Con el mismo objetivo se ha usado la técnica de RAPD (*Random Amplification of polimorphic DNA*). Este método fue propuesto como una alternativa al estudio de las relaciones genéticas entre organismos, generando patrones de bandas polimórficas, producidas por iniciadores de secuencias arbitrarias a través de la técnica de la PCR (Xena 2000; Dávila 2001; Luna 200; Rocha 2005). AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis*). El análisis por AFLP en los hongos ha permitido discriminar variación genética interespecífica así como intraespecífica de *Cyphomyrmex minutus*, micorrizas y *Fusarium* spp. (Ayra 2001; Zambrano 2002; Pratap 2006). Todas éstas técnicas se basan en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Apoyándose en el empleo de las técnicas antes mencionadas, existen una serie de métodos que analizan el genoma completo para lograr la identificación de los organismos, desde el análisis del DNA mitocondrial, hasta el DNA nuclear, aunque siguen siendo los genes del RNA ribosomal los más estudiados.

### **DNA mitocondrial (mtDNA)**

Las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) son genomas relativamente pequeños que coevolucionan a su propia tasa evolutiva en relación con el genoma nuclear de los

organismos en los cuales ellos están alojados. Particularmente en animales y hongos dichos genomas evolucionan más rápidamente que su contraparte de DNA nuclear (Uribe *et al.* 2007).

El mtDNA es ampliamente empleado para la determinación de relaciones taxonómicas y filogenéticas entre los grupos de organismos eucarióticos que poseen dicho organelo. Las razones para su popularidad reside en características intrínsecas de esta molécula tales como su reducido tamaño, la alta tasa evolutiva, la falta de bases metiladas, el alto contenido de residuos adeninatimina (AT) y el hecho de ser una molécula haploide donde la mayoría de los alelos poseen la misma función e inclusive poseen regiones universalmente conservadas. Dentro del genoma mitocondrial las secuencias de RNA ribosomal (rRNA) han sido empleadas como herramienta molecular para identificar relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos. A pesar de las diferencias en tamaños, todos los genomas mitocondriales pertenecientes a hongos examinados hasta la fecha poseen un número similar de genes, incluyendo una serie de genes de rRNA, 23-26 RNA de transferencia (tRNA) y varios genes codificantes de proteínas. La diferencia en tamaño en relación con los genomas más grandes está determinada principalmente por intrones y regiones ricas en A-T (Uribe *et al.* 2007).

El genoma mitocondrial (mtDNA) tiene un tamaño de 15 a 17 kb y su longitud varía considerablemente entre especies: 20 micrómetros en *Neurospora*; 25 micrómetros en levaduras; 30 micrómetros en plantas superiores; 5 micrómetros en algunos animales metazoarios (multicelulares). Se considera que la mayoría del mtDNA de hongos y plantas no codifica, ya que el mtRNA contiene intrones (Rentaría 2007).

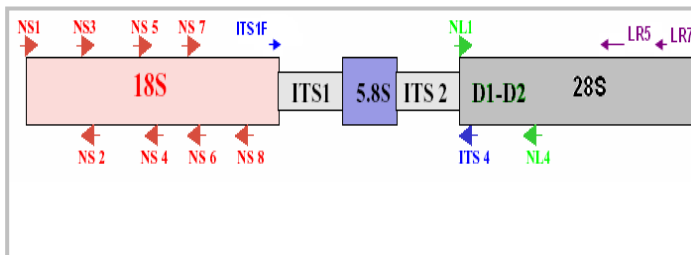
### **DNA ribosómico (rDNA)**

La revolución molecular en cuanto a taxonomía de hongos comenzó a inicios de 1990, con la amplificación del rDNA, con la ayuda de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Hibbet *et al.* 2007). Efectivamente, las regiones de DNA

mitocondrial y nuclear que tienen un mayor interés tanto en estudios de filogenia como en taxonomía de hongos, son las que codifican para el RNA ribosómico (rDNA) (Iturralde 2005). El rDNA puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo, y contiene la información para el RNA que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce (Rentarías 2007). La principal razón para el estudio de rDNA es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas, y que estas copias están repetidas en tándem, (facilitando así su amplificación) (Calle 2005). En el DNA ribosómico existen fragmentos con distinto grado de conservación de una longitud cercana a 6Kb, lo que permite realizar estudios a diferentes niveles. Las regiones que se encuentran altamente conservadas nos permiten realizar estudios evolutivos a nivel de géneros y familias y suelen usarse para el diseño de cebadores universales. La heterogeneidad de estas secuencias nucleotídicas ha sido utilizada para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Rivera 2006; Solé 2002; Baschien 2003; Franco 2005). Entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran regiones variables, denominadas espaciadores (internal transcribed spacers), cuya función es desconocida (Peintnen *et al.* 2004). La tasa de variabilidad en estas regiones espaciadoras es más elevada que en los genes, pero sus secuencias se pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados (Insua 2003).

La región del rDNA incluye el gen 18S (esta región también se denomina SSU), el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (también denominado LSU). Las regiones 18S, 5.8S, 28S 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; Said *et al.* 2007; Yang *et al.* 2005).

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 (Fig. 2) (Herrera 2007; Tedersoo *et al.* 2006; Guevara 2004).



**Fig 2. Representación esquemática de las regiones estudiadas del DNArribosomal y los diferentes cebadores(Solé 2002).**

Se encuentran también regiones espaciadoras no codificantes denominadas IGS, que incluyen cada una de ellas 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).

White *et al.* (1990), diseñaron y describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del

rDNA mitocondrial y nucleico de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estos genes (Calle 2005). La región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales (Tabla 2); la naturaleza multicopia de las repeticiones del rDNA hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aún cuando se utilicen muestras de DNA pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (DNA obtenido de material viejo y especímenes de herbarios) (Villalobos *et al.* 2005; Suvi 2005).

**Tabla 2.** Primers universales utilizados en esta investigación

<b>PRIMER</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>FUENTE</b>
<b>ITS1</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Binder 2003)
<b>ITS1F</b>	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA	(Suvi 2005)
<b>LR5</b>	TCCTGAGGGAAACTTCG	(Suvi 2005)
<b>NL4</b>	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	(O'Donnell 1993).

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 o cepas dentro de una especie. 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).

## Reacción en Cadena de la Polimerasa y Electroforesis

Desde su primera descripción por Kary Mullis en 1983, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un efecto importante en muchos de los campos de investigación de la Biología (Ayra *et al.* 2007). 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. La primera vez que se utilizó este tipo de análisis en micología consistió en la amplificación y secuenciación del rDNA, estableciéndose relaciones filogenéticas de hongos. Uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de esta metodología fue el diseño de los cebadores, los cuales fueron elaborados a partir de regiones conservadas. Ello 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 (Said *et al.* 2007; Gutiérrez *et al.* 2002; Costa 2004).

Su principio es muy simple y se basa en la amplificación *in vitro* del DNA, lo que trae como resultado la replicación exponencial de la secuencia blanco hasta en un millón de veces, aun en presencia de gran cantidad de moléculas de DNA no relacionadas, obteniéndose como producto un DNA altamente homogéneo que se convierte en fuente excelente para diversas manipulaciones moleculares (Ayra *et al.* 2001). Para la amplificación del DNA se requiere la preparación del master mix que consiste en la adición de una DNA polimerasa, los primers adecuados para la amplificación de la cadena de DNA deseada, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (Vierstraete 2000).

La reacción consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas, cada una de las cuales se realiza a una temperatura determinada. En la primera etapa, la muestra se calienta, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el DNA, hecho que se conoce como "desnaturalización", la

temperatura oscila entre 92-95°C. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "anillamiento" de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del DNA molde. Se trata de segmentos de DNA de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de DNA que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del DNA molde. En la tercera etapa, la enzima DNA polimerasa, sintetiza las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde. Para ello, la enzima usa desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima DNA polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, anillamiento, extensión) el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de DNA delimitado por los primers (Costa 2004).

Los ciclos se repiten de 25 a 45 veces. La estandarización del funcionamiento del termociclador es esencial para garantizar la calidad y repetibilidad de los resultados. Los productos de la reacción se separan por tamaño (peso) en un gel de electroforesis.

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Padilla *et al.* 2006).

## **Secuenciación del DNA**

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 2007, Rentaría 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. Hay tres pasos en la reacción de secuenciación (como en la PCR), que son repetidos por 30 a 40 ciclos (Vierstraete 2000).

*Desnaturalización a 94°C:* Durante la desnaturalización, la doble cadena se funde abriéndose para dejar DNA de cadena simple.



*Anillamiento a 50°C:* Se usa sólo un primer, así se copia una sola cadena (en PCR: se usan dos primers, y dos cadenas son copiadas). Se forman enlaces iónicos entre la cadena simple del primer y la cadena plantilla simple. La polimerasa copia la plantilla generando una nueva cadena de DNA.

*Extensión a 60°C:* Normalmente es a 72 °C, por que la polimerasa tiene que incorporar ddNTP's (dideoxinucleótidos trifosfato) que están químicamente modificados con un marcador fluorescente.

Cuando un ddNTP es incorporado, la reacción de extensión se detiene, porque un ddNTP contiene un átomo H en el 3er átomo de carbono (dNTP's contienen un átomo OH en esta posición). Desde que el ddNTP's es marcado fluorescentemente, es posible detectar el color de la última base de este fragmento en un secuenciador automático (Vierstraete 2000).

Después de la reacción de secuenciación, la mezcla de cadenas, todas de diferente longitud y todas terminadas en una marca fluorescente ddNTP tienen que ser separadas. Esto se hace en un gel de acrilamida, que es capaz de separar una molécula de 30 bases de una de 31 bases, y también una molécula de 750 bases de una de 751 bases (Vierstraete 2000).

Los fragmentos marcados fluorescentemente que migran a través del gel, se pasan por un haz de láser en el gel. El láser excita la molécula fluorescente, que despidе luces de distinto color. Esta luz es condensada y enfocada por lentes en un espectrógrafo. Basado en la longitud de onda, el espectrógrafo separa las luces a través de una cámara CCD (charge coupled device). Cada base tiene su propio color, así el secuenciador puede detectar el orden de las bases en el gen secuenciado. Cuando todos los fragmentos son secuenciados, un programa de computadora ajusta apropiadamente las diferentes partes y reúne la secuencia del

gen total (Vierstraete 2000), que finalmente podrá ser comparada en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) del GenBank, para determinar el posible organismo que pueda ser.

## **OBJETIVOS**

En esta investigación se planteó como objetivo principal identificar molecularmente 60 hongos que forman parte del cepario micológico del C.B.C.M, de los cuales 41 fueron obtenidos de plantaciones bananeras y 19 hongos fueron extraídos de 4 plantas medicinales: *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria lavéis*.

Para la identificación del género de los hongos se amplificó la región ITS-5.8S-LSU rDNA con alrededor de 1200 pb utilizando los primers universales ITS1, NL4, ITS1F, LR5. Así mismo se pretende determinar las mejores condiciones para la realización de la PCR y electroforesis. Finalmente las secuencias obtenidas serán alineadas y comparadas con la base de datos provista por BLAST.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **EJEMPLARES DE HONGOS**

Los hongos utilizados en esta investigación fueron obtenidos de distinta procedencia, los cuales previamente ya han sido objeto de estudio en el área biotecnológica del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL. De los 60 hongos aislados, 41 fueron obtenidos de plantaciones bananeras, y 19 a partir de hojas de plantas medicinales (*Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria lavéis*). Estos hongos fueron cultivados en medio PDA (Potato Dextrose Agar), para lograr un crecimiento más rápido de los hongos.

### **EXTRACCIÓN DE DNA**

Es importante trabajar con micelios puros, a fin de asegurar la identidad de las muestras. Para la extracción del DNA se utilizaron micelios obtenidos del cultivo de hongos en medio PDA. Una pequeña porción de micelio fúngico fue extraído desde los cultivos aislados y colocados en microtubos 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. La secuencia amplificada fue ITS-5.8S-LSU rDNA con alrededor de 1200pb, con el uso de primers universales ITS1, NL4, ITS1F, LR5,

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 30s, anillamiento dependiendo de la combinación de los primers por 45s y

extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min para finalizar la PCR (Suárez *et al.* 2006). El volumen de reacción de la PCR fue de 50 ul, con concentraciones de 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 0.5 mM de cada primer, Bovine Serum Albumin (BSA-SIGMA) 10%, 1U Taq polimerasa, con un buffer free Mg 10 X de amplificación (Suárez *et al.* 2006). Para la optimización de los resultados se llevaron a cabo ensayos con diferentes concentraciones de algunos de los componentes de la reacción: MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, BSA, primers universales.

Las combinaciones de los primers universales que se utilizaron para la amplificación del DNA por medio de la PCR fueron: ITS1/NL4 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' / 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') o ITS1F/LR5 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' / 5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3'). ITS1F/LR5 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'/5'- TCCTGAGGGAACTTCG-3')

## **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Una vez terminado el proceso de amplificación, todas las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis. Tomando de cada reacción 5ul 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 µg ml<sup>-1</sup> durante 20 min y un lavado final de 15 min. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 1000pb.

Los productos de PCR que se observaron como bandas claras fueron purificados usando el kit de purificación de DNA y protocolo QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Qiagen). Los productos de DNA fueron secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul, Korea), las reacciones se llevaron a cabo utilizando los primers ITS1, NL4, ITS1F, LR5, para secuenciar la región ITS-5.8S-LSU rDNA. La edición de

secuencias fue realizada con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Las secuencias generadas fueron alineadas y comparadas con la base de datos provista por BLAST. [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

## **ENSAYO CON AISLADOS DIFICILES DE SECUENCIAR**

Este ensayo se llevó a cabo con 24 muestras de las cuales se obtuvo productos de PCR pero no se obtuvieron buenos resultados durante la secuenciación. Doce productos fueron almacenados a temperatura ambiente y 12 en refrigeración después de la PCR, durante un período de 17 días que es el tiempo máximo que requiere el transporte de las muestras para secuenciación. Además se tomaron en cuenta otros factores (anexo 1) para determinar la calidad de los productos de PCR obtenidos, tales como: el uso de colorantes o sustancias sin colorantes en la PCR, así como también se probó dos polimerasas de diferentes casas comerciales, esto con el fin de determinar si existía alguna diferencia en la obtención de los productos de PCR. Finalmente se tomó en cuenta el factor de purificación, para determinar si luego de este proceso, se perdía cantidad considerable del DNA, de tal manera que la mitad de las muestras almacenadas a temperatura ambiente fueron purificadas y la otra mitad no; lo mismo fue para los productos almacenados en refrigeración. A los 5, 10 y 17 días respectivamente después de la PCR, se realizó la electroforesis para analizar los productos de PCR.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 41 hongos endofíticos aislados de plantaciones bananeras se realizó la comparación de secuencias utilizando BLAST del GenBank de 22 aislados; mientras que de los 19 hongos obtenidos de plantas medicinales (*Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria lavéis*), se logró caracterizar 11 muestras.

No se obtuvieron secuencias de todos los aislados debido posiblemente a problemas durante la secuenciación. Por este motivo se realizó un ensayo para determinar la calidad del DNA durante el almacenamiento y transporte de las muestras a ser secuenciadas por la empresa MACROGEN (Seoul, Korea). El tiempo requerido para este ensayo fue de 17 días, y las muestras fueron almacenadas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.

A los 5, 10 y 17 días respectivamente después de la PCR, se realizó la electroforesis para analizar los productos y determinar si a diferentes condiciones de almacenamiento se producía degradación del DNA. Sin embargo los productos de PCR se observaron como bandas claras en las diferentes etapas del ensayo (anexo 2). Lo que sugiere que el DNA no se degrada en el transcurso de los 17 días ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración y que posiblemente durante el proceso de secuenciación existen algunos errores que impiden que se realice la reacción. No se observaron diferencias de las bandas con el uso de las sustancias empleadas en la PCR, así mismo no se manifestó diferencia en la electroforesis con los productos purificados y no purificados.

Entre algunas de las causas que pueden influir en la secuenciación constan las siguientes: el primer no encuentra el sitio de hibridación o 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). Esto depende en gran medida de un proceso previo a la secuenciación, la purificación 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.

De cualquier manera, se puede afirmar que el protocolo utilizado para la extracción de DNA es el adecuado, así como los procesos de PCR y de purificación con los cuales se realizó esta investigación, así lo indican las bandas claras de DNA de alto peso molecular en el gel de agarosa, obtenidas después de la PCR.

Para la identificación molecular de los hongos se utilizó la combinación de primers universales: ITS1/NL4 e ITS1F/LR5. Con los que se obtuvo productos de DNA de buena calidad, los mismos que fueron purificados y enviados a secuenciar por la empresa MACROGEN (Seoul-Korea), los primers utilizados para la secuenciación fueron ITS1 y NL4; sin embargo en el momento de la secuenciación los productos que fueron amplificados con ITS1/NL4 obtuvieron buenos resultados, mientras que los amplificados con ITS1F/LR5 mostraron errores en las secuencias obtenidas.

Algunos aislados mostraron problemas en la obtención de productos de PCR. Para dar solución a esto se varió en las concentraciones MgCl y de BSA (Bovine Serum Albumin). Se obtuvo buenos productos de PCR en forma de bandas claras, con la adición de 0.2ul de BSA al 10%. Se recomienda el uso de BSA en la PCR ya que permite la captura de sustancias que pueden inhibir o inactivar a la Taq Polimerasa.

## Caracterización Molecular de los aislados de Banano

En cuanto a las secuencias obtenidas de los diferentes aislados, una vez comparadas en el BLAST se observó que la mayoría de los hongos pertenecían al filum Ascomycota (26 aislados); 1 al filum Basidiomycota y también otros organismos fúngicos no clasificados (5 aislados). Esto concuerda con Pocasangre *et al.* (2001), que sugieren que la mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes en la mayoría de su ciclo de vida dentro del tejido de las plantas.

En la presente investigación especies de *Fusarium* fueron encontrados con elevada frecuencia (Tabla 3) y un género *Crinipellis sp.*, perteneciente al filum Basidiomycota, en cuanto a los aislados obtenidos de banano.

**Tabla 3.** Secuencias obtenidas de aislados del Banano

Secuencias con mayor similitud en la región ITS-5.8S -LSU obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizando Blast			
Código Endófito	Busqueda en Blast	Orden	Similitud
50M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	948/960 (98%)
52M	<i>Crinipellis sp.</i>	Agaricales	605/625 (96%)
53M	<i>Uncultured endophytic fungus</i>		508/510 (99%)
57M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	980/981 (99%)
58M	<i>Uncultured Saccharomycetales</i>	environmental samples	806/815 (98%)



60M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	810/823 (98%)
65M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	1021/1022 (99%)
66M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	758/763 (99%)
68M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	1037/1052 (98%)
69M1	<i>Fusarium equiseti</i>	Hypocreales	979/983 (99%)
71M	<i>Fusarium chlamyosporum</i>	Hypocreales	1028/1031 (99%)
73M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	854/872 (97%)
78M	<i>Fusarium chlamyosporum</i>	Hypocreales	1004/1004 (100%)
80M	<i>Uncultured endophytic fungus</i>		464/500 (92%)
82M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	1033/1047 (98%)
85M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	511/524 (97%)
88M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	628/633 (99%)
95M	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	913/927 (98%)
97M	<i>Fusarium sp</i>	Hypocreales	599/611 (98%)
104M	<i>Fungal endophyte</i>		973/1001 (97%)
110M	<i>Fungal sp.</i>		556/568 (97%)
119M	<i>Fusarium sacchari</i>	Hypocreales	633/633 (100%)

Según Menesses (2003), en diversos estudios, *Fusarium spp.* se ha reportado como endofítico natural en cultivares diversos de banano pertenecientes a genomas diploides, triploides y tetraploides. Por ejemplo, Pocasangre (2000) reporta una frecuencia mayor de *Fusarium*, tanto en las raíces, la corteza y el cilindro central del corno, en diferentes cultivos de banano, en un estudio hecho en Centroamérica y Cuba.

Zum Felde (2002), encontró una dominancia de hongos endofíticos pertenecientes a *Fusarium* y *Trichoderma*, en suelos de plantaciones bananeras de Guatemala. Con estos antecedentes, se deduce que estos géneros podrían tener un mutualismo específico con las plantas de banano que podría resultar en efectos de supresividad al ataque de plagas, especialmente de nemátodos.

Es importante resaltar que a nivel de patógenos de suelo, un buen número de investigadores están de acuerdo en privilegiar los hongos endofíticos del género *Trichoderma* y *Fusarium* como excelentes controladores de nemátodos (Osorio 2006).

Los hongos endofíticos colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntoma, y confieren una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos (Menesses 2003). Existen estrategias fundamentalmente distintas para que los hongos endofíticos presenten una simbiosis con las plantas: (a) desarrollando una infección que induce algún tipo de resistencia sistémica; (b) produciendo potentes toxinas que presentan un efecto letal hacia patógenos de la plantas y (c) mediante un mutualismo inducido, que envuelve una simbiosis menos precisa o más difusa entre el hospedero y el endofítico (Osorio 2006).

La utilización de hongos endofíticos podría considerarse como una buena estrategia para el control biológico de plagas, como por ejemplo, en diferentes sistemas de producción de banano comercial de Centroamérica y el Caribe

donde no se reportan niveles altos de nemátodos, se ha identificado que las raíces son colonizadas por hongos endofíticos, denotándose una dominancia de géneros específicos como *Fusarium* y *Trichoderma* (Pocasangre *et al.* 2000).

Cabe destacar que especies de género *Fusarium* también actúan como fitopatógenos causando enfermedades, tal es el caso de *Fusarium oxysporum*, aunque en esta investigación no se lo encontró, se debe mencionar que cepas patogénicas de este hongo producen la enfermedad de Panamá o Marchitamiento en el banano que ataca a las hojas de la planta. En diversos estudios se ha demostrado que no es posible controlar esta plaga mediante el uso de microorganismos.

Chaves (2007), ha encontrado la presencia de *Fusarium solani* junto con *Fusarium moniliforme*, *Cylindrocarpon musae* y *Acremonium stromaticum* en lesiones causadas por diferentes nemátodos en el sistema radical de las plantas del banano. *Fusarium solani* es una especie altamente distribuida y diversa con un gran rango de hospederos, estos hongos son parte de la flora radical de tal manera que se convierten en patogénicos cuando hay heridas en la raíz.

*F. equiseti* es una especie con menor distribución que la anteriormente descrita, y en esta investigación no se la encontró significativamente.

Las cepas patogénicas y no patogénicas de *Fusarium* son comunes en todo tipo de suelos. Las cepas no patogénicas viven saprofiticamente, aunque pueden colonizar la superficie de las raíces de las plantas sin inducir síntomas de daño, incluso pueden penetrar en el interior de las raíces y generar reacciones de defensa (Chaves 2007).

Adicionalmente, se están realizando estudios con *Trichoderma viride* y *Cylindrocarpon destructan*, como agentes de control biológico, los cuales han sido aislados de las lesiones frescas

causadas por *R. similis* en las plantaciones de las zonas bananeras de nuestro país (Triviño 2003).

*Crinipellis sp.* es el agente causal de la enfermedad "escoba de bruja" del cacao, no se ha reportado la presencia de este hongo en los diferentes estudios realizados en el banano, sin embargo este hongo afecta las plantaciones de cacao en gran medida en nuestro país (Quiroz 2002).

### **Caracterización Molecular de los aislados de Plantas Medicinales**

En la tabla 4 se muestran los resultados de la caracterización molecular de los aislados de plantas medicinales que no fueron identificados por Ramírez (2006), y se encontró el predominio de los géneros: *Alternaria* y *Phoma*, seguido por *Mycosphaerella*, *Sphaeriothyrium* y *Fusarium*.

**Tabla 4.** Secuencias obtenidas de aislados de *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum* y *Borreria lavéis*.

<b>Secuencias con mayor similitud en la región ITS-5.8S -LSU obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizando Blast</b>			
<b>Código Endófito</b>	<b>Busqueda en Blast</b>	<b>Orden</b>	<b>Similitud</b>
1	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	1070/1097 (97%)
DJ1	<i>Phoma sojicola</i>		998/1004 (99%)
DJ-3	<i>Mycosphaerella iridis</i>	Capnodiales	1300/1308 (99%)
DJ 6	<i>Phoma herbarum</i>		1020/1025 (99%)

DJ 7	<i>Sphaeriothyrium filicinum</i>		967/977 (98%)
DJ 8	<i>Alternaria tenuissima</i>	Pleosporales	1055/1055 (100%)
DJ 9	<i>Mycosphaerella linorum</i>	Capnodiales	995/1016 (97%),
DJ 10	<i>Alternaria arborescens</i>	Pleosporales	881/884 (99%)
DJ 11	<i>Sphaeriothyrium filicinum</i>	Pezizomycotina incertae sedis	1031/1050 (98%)
DJ 12	<i>Alternaria arborescens</i>	Pleosporales	719/720 (99%)
DJ 13	<i>Phoma medicaginis</i>		1025/1035 (99%)
DJ 14	<i>Alternaria arborescens</i>	Pleosporales	621/626 (99%)

En cuanto a los géneros: *Alternaria* y *Phoma* se los puede considerar como hongos ambientales comunes, estos se los encuentra en el aire, también como epífitos o en asociación con numerosos sustratos. Su presencia en las plantas analizadas podría ser indicativa de una colonización eventual temporánea de los tejidos del hospedero, sin excluir un eventual significado ecológico como endófitos (Ramírez 2006). El género *Phoma* posee más de 2000 especies descritas (Calle 2005). Las especies de este género son generalmente saprófitas, pero también, existen especies económicamente importantes que afectan diversos cultivos. Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en los suelos y sustratos orgánicos, y además, es el hongo más frecuentemente aislado por los fitopatólogos (Calle 2005).

A diferencia de la investigación realizada por Ramírez (2006), se encontró la presencia de *Mycosphaerella*, *Sphaeriothyrium*,

cuyo rol dentro de la planta es desconocido, ya que podrían actuar como fitopatógenos o como endofíticos beneficiosos para las plantas. Los hongos que se pueden encontrar en asociación endofítica con estas especies vegetales podrían jugar un rol importante en la propiedad medicinal de las mismas (Ramírez 2006).

## CONCLUSIONES:

- Los procedimientos de extracción de DNA, PCR, electroforesis y purificación, seguidos en esta investigación son los adecuados para la obtención de DNA a partir de hongos en medios de cultivo. Los aislados de los que se obtuvo malas secuencias, luego de la purificación mostraron bandas claras de DNA en el gel de agarosa, lo que permite afirmar que si se obtuvo DNA de estas muestras, y que posiblemente durante la secuenciación hubieron errores que no permitieron obtener secuencias de calidad.
- Con la combinación de los primers universales ITS1/NL4 e ITS1F/LR5, se obtuvo bandas claras de alto peso molecular, lo cual se pudo evidenciar mediante la electroforesis. Además, el uso de BSA al 10%, permitió la obtención de productos PCR de buena calidad.
- Los hongos más frecuentemente aislados son pertenecientes al filum Ascomycota más cercanos principalmente a los órdenes *Hypocreales* y *Pleosporales* y también algunos organismos fúngicos todavía no clasificados.
- Se encontró predominio del género *Fusarium sp.* de los aislados obtenidos de plantaciones bananeras.
- La especie *Crinipellis sp.*, identificada en esta investigación, no ha sido reportada anteriormente en otros trabajos realizados en las plantaciones del banano.
- Las especies de *Alternaria* más frecuentes encontradas en las plantas medicinales fueron *Alternaria arborescens*, *Alternaria tenuissima*; y de *Phoma* fueron *P. sojicola*, *P. herbarum*, *P.*

*medicaginis*. Estos hongos se encuentra libremente en el ambiente, sin embargo en las pruebas de antagonismo realizadas por Ramirez (2006), con estos aislados, los resultados fueron positivos.

- *Mycosphaerella iridis* y *Sphaeriothyrium filicinum*, no se reportó la presencia de estos hongos en el trabajo realizado por Ramírez (2006), sin embargo estos podrían ser contaminantes de los hongos aislados en los medios de cultivo.



## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Sería necesario continuar con la identificación de todos los demás aislados aún no secuenciados, y realizar la secuenciación con otros primers, así como también ajustar la temperatura del *melting*( $T_m$ ) para que no existan errores en las secuencias. Además se podría hacer clonning con las muestras, ya que con este método se obtienen secuencias más claras.

Con los resultados obtenidos de los aislados del banano podrían realizarse nuevas investigaciones para determinar si realmente el género *Fusarium* podría ser utilizado como control biológico de plagas, ya que actualmente en nuestro país se están utilizando químicos para el control de enfermedades, que resultan en daños para el hombre y para el ecosistema.

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Baschien C. 2003. Development and evaluation of rRNA targeted in situ probes and phylogenetic relationships of freshwater fungi. Universidad de Berlin. Diplom-Biologin.
- Binder M, Hibbett D. 2003. Oligonucleotides. AFTOL project.
- Blanco G, Islas I, Canto B, Rodríguez C, James A, Castillo E, Peraza L, TPEC M, Brito L, Grijalva R, Peraza S. 2005. Clonación y caracterización de un gen tipo *nik1* en el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra en plátano. Unidad de Biotecnología, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Calle 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.
- Chaves 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.
- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínica Provincial. Barcelona. España. Cap12.
- Dávila M, Zambrano K, Castillo M. 2001. Uso de la técnica RAPD 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.
- Franco A, 2005. Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
  - Guevara G, Garza F, Cázares E. 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. Ciencia UANL. Vol VII, No. 003.
  - Guisiano G. 2005. Los hongos son seres mágicos y dañinos pero también beneficiosos. Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste de Argentina.
  - Gruntzin V, Stres B, Ayala H, Tiedje J. 2002. Improved Protocol for T-RFLP by Capillary Electrophoreses. Center for Microbial Ecology, Michigan State University.
  - Gutierrez A, Honrubia M, Morte A, Diaz G. 2002. 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.
  - Hernández J. 2005. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
  - Herrera P. 2007. Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epifitas. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
  - Hibbett D *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
  - Insua a, López M, Freire R, Méndez J. 2003. Sequence analysis in the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca:Bivalvia:Pectinidae). Departamento de biología Celular y Molecular. La Coruña, España. *Genome*. Vol 46.

- Iturralde J. 2005. Identificación genética de hongos. Sociedad Micológica de Madrid. España.
- Iturrítza E, Barredo A. 2006. *Fusarium circinatum*, el hongo causante de la enfermedad del chancro resinoso. Departamento de Producción y Protección Vegetal. País Vasco. Basoko Teknika.
- Jabra-Rizk *et al.* 2002. El reino de los hongos. De la Revista Iberoamericana de Micología.
- López A, Vélez M, Sánchez M, Bonilla C, Gallo P. 2006. Evaluation of vegetable extracts for control of the pathogenic fungi in banana and strawberry in post harvest storage. *AGRON (Colombia)* 55(4): 39-44.
- 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.
- Martin R, James D, Lévesque C. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytophatol.* 38: 207-239.
- Mendoza A. 2000. Desarrollo de técnicas de detección molecular de hongos fitopatógenos para detectar su presencia en los suelos. Centro de Biotecnología Genómica. México.
- Mendoza A. 2002. Diagnóstico de plantas (cultivos) genéticamente modificados. Centro de Biotecnología Genómica. México.
- Menesses A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis para Migístes Scientiae. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Montealegre J. 2002. Micología. Cátedra de Microbiología General. Depto. de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Quiroz J, Amores F. 2002. Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63: 73-80.

- Osorio G. 2006. Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* morelet) en banano. Tesis para el grado de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Padilla C, Diez J, Martínez E, Bárcena J, García C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.
- Peintnen U, Moncalvo J, Vilgalys R. 2004. Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius*(Agaricales, Basidiomycota). *Mycologia*, 96(5):1042-1058.
- Pérez J, Vidal N. 2007. La importancia de la secuenciación del ADN. Biotecnología. FARMESPAÑA INDUSTRIAL.
- Pocasangre L, Menjivar R, Felde Z, Riverosa A, Rosales F, Sikora R. 2006. Endophytic fungi as biological control agents of plant parasitic nematodes in banana. Joinville. Brasil.
- Pocasangre L. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholussimilis* and the Panama disease (*Fusariumoxysporumf. sp. cubense*). Tesis Ph.D. Bonn, Germany. Universität Bonn. 117 p.
- Popoff O, Gonzalez A. 2005. Reino Fungi. Hipertextos del Area Biológica. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Pratap B, Saikia R, Yadav M, Singh R, Chauhan V, Arora D. 2006. Molecular characterization of *Fusariumoxysporumf. sp. cicerica* causing wilt of chickpea. National Bureau of Agriculturally Important Microorganisms, Kushmaur. African Journal of Biotechnology 5. (6): 497-502.
- Ramirez J, Fernandez E, Rodoldi M, Solveig T. 2006. Antagonic activity of endophytic fungi from medicinal

plants of Ecuador on pathogenic bacteria. Boletín Micológico Vol. 21: 49 - 53.

- 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.
- Rocha P. 2005. Empleo de técnicas moleculares para la caracterización de hongos que afectan la palma de aceite. Laboratorio de Caracterización Molecular, Ceniavances. Colombia.
- 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.
- Satz L, Kornblihtt. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones. Revista científica y tecnológica. Vol 4. No. 23.
- 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.
- Suvi T. 2005. Ectomycorrhizal fungal diversity of birch in Tagamoisa wooded meadow and the adjacent forest. Master of Science Thesis. Tartu University. Institute of Botany and Ecology.
- 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.
- Triviño C. 2003. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Manejo de nematodos en musáceas del Ecuador. Sección Nematología del Departamento Nacional de Protección

Vegetal. Estación Experimental Boliche del INIAP. Ecuador.

- Uribe D, Khacha G. 2007. Analysis and applications of the molecular typification of the mitochondrial genome of *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Entomología*. Vol.33. No.2
- Vierstraete A. 2000. The Central Dogma of Molecular Biology. Department of Biology. University of Ghent. Belgium.
- Villalobos A, Escobar M, Santerre A. 2005. Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en *psilocybe* (agaricales, fungi). Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular y Molecular. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. Pag 548-553.
- Wang Z, Binder M, Schoch C, Johnston P, Spatafora J, Hibbet D. 2006. Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41:295–312.
- Xena N. 2000. Una década de aplicación del método RAPD: Alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. Laboratorio de Biosistemática y Citogenética Vegetal, Instituto de Biología Experimental. Caracas, Venezuela.
- Yang Z, Matheny P, Ge Z, Slot J, Hibbet D. 2005. New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoid clade) based on morphology and ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 109 (11): 1259-1267.
- Zabeau, M and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.
- Zambrano K, Dávila M, Castillo M. 2002. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. Universidad Centroccidental

Lisandro Alvarado. Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ).  
2002, 19: 185-193.



## Anexo 1: Cuadro de condiciones del ensayo

No.	Refrigeración	CONDICIONES para refrigeración y temperatura ambiente		No.	Temperatura ambiente
1	<b>61A</b>	Colorante y Got Taq	Purificación	13	<b>56A</b>
2	<b>64A</b>	Colorante y Got Taq	Purificación	14	<b>85A</b>
3	<b>61A<sub>sp</sub></b>	Colorante y Got Taq	Sin purificación	15	<b>56A<sub>sp</sub></b>
4	<b>64A<sub>sp</sub></b>	Colorante y Got Taq	Sin purificación	16	<b>85A<sub>sp</sub></b>
5	<b>61B</b>	Sin colorante y Got Taq	Purificación	17	<b>56B</b>
6	<b>64B</b>	Sin colorante y Got Taq	Purificación	18	<b>85B</b>
7	<b>61B<sub>sp</sub></b>	Sin colorante y Got Taq	Sin purificación	19	<b>56B<sub>sp</sub></b>
8	<b>64B<sub>sp</sub></b>	Sin colorante y Got Taq	Sin purificación	20	<b>85B<sub>sp</sub></b>
9	<b>61C</b>	Colorante y Taq Flexi	Purificación	21	<b>56C</b>
10	<b>61C<sub>sp</sub></b>	Colorante y Taq Flexi	Sin purificación	22	<b>56C<sub>sp</sub></b>
11	<b>64D</b>	Sin colorante y Taq Flexi	Purificación	23	<b>56D</b>
12	<b>64D<sub>sp</sub></b>	Sin colorante y Taq Flexi	Sin purificación	24	<b>56D<sub>sp</sub></b>

## Anexo 2. Fotos del ensayo

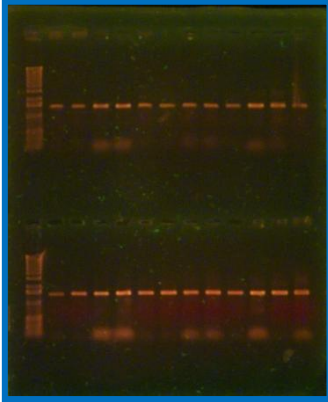


Fig a: A los 5 días del ensayo días. Marcador de peso molecular 1Kb. Productos en refrigeración (sup): 61A, 64A, 61Asp, 64Asp, 61B, 64B, 61Bsp, 64Bsp, 61C, 61Csp, 61D, 61Dsp. Productos a temperatura ambiente (inf): 56A, 85A, 56Asp, 85Asp, 56B, 85B, 56Bsp, 85Bsp, 56C, 56Csp, 56D, 56Dsp.

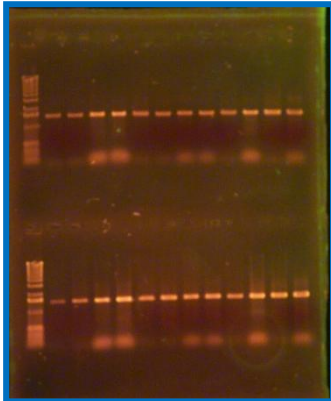


Fig b: A los 10 días del ensayo días. Marcador de peso molecular 1Kb. Productos en refrigeración (sup): 61A, 64A, 61Asp, 64Asp, 61B, 64B, 61Bsp, 64Bsp, 61C, 61Csp, 61D, 61Dsp. Productos a temperatura ambiente (inf): 56A, 85A, 56Asp, 85Asp, 56B, 85B, 56Bsp, 85Bsp, 56C, 56Csp, 56D, 56Dsp.

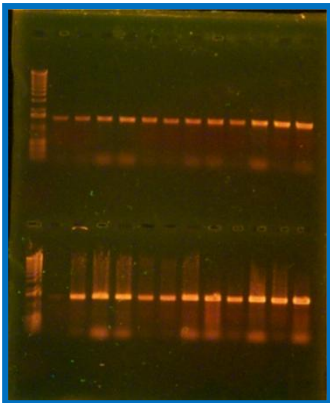


Fig c: A los 17 días del ensayo días. Marcador de peso molecular 1Kb. Productos en refrigeración (sup): 61A, 64A, 61Asp, 64Asp, 61B, 64B, 61Bsp, 64Bsp, 61C, 61Csp, 61D, 61Dsp. Productos a temperatura ambiente (inf): 56A, 85A, 56Asp, 85Asp, 56B, 85B, 56Bsp, 85Bsp, 56C, 56Csp, 56D, 56Dsp.