

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO*

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS DE INTERÉS PARA SU USO
INDUSTRIAL Y, EN ESPECIAL, EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA MEDIANTE EL USO DE
MÉTODOS MOLECULARES**

presentado por

LEYRE SÁNCHEZ ESCUDERO (e)k

aurkeztua

GRADO EN INNOVACIÓN EN PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Julio, 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias al grupo de investigación de Genética y Microbiología GENMIC de la Universidad Pública de Navarra por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo fin de grado con el que he aprendido tantas cosas y, en especial, a Gerardo Pisabarro por darme dicha oportunidad.

Gracias a Manuel Alfaro, por todo lo que me ha enseñado y por el tiempo que ha dedicado y elaborado y dar forma este trabajo.

Quiero dar las gracias a Koldo por su apoyo incondicional y entenderme en los buenos y malos momentos de esta etapa de mi vida.

Y, por supuesto, este trabajo se lo dedico a mis padres y mi hermano por todo su apoyo, su cariño y ánimos para seguir adelante.

Autor: Leyre Sánchez

Director: Antonio G. Pisabarro

Codirector: Manuel Alfaro

1 Julio 2016

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LOS HONGOS.....	1
1.1.1	CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS	2
1.2	LOS HONGOS DEL BOSQUE.....	4
1.2.1	MICORRIZAS	4
1.2.2	SAPRÓTROFOS.....	6
1.2.3	PARÁSITOS	7
1.3	PROBLEMAS DE CULTIVO	8
1.4	IMPORTANCIA DE LOS HONGOS.....	9
1.4.1	PERFIL NUTRICIONAL	9
1.4.2	PROPIEDADES SALUDABLES	10
1.4.3	PRODUCTORES DE ALIMENTOS.....	11
1.4.4	PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS.....	12
1.4.5	PRODUCTORES DE BIOCUMUSTIBLES	13
1.4.6	SALUD DE LOS BOSQUES.....	14
1.5	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS	14
1.5.1	EXÁMEN MACROSCÓPICO	14
1.6	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS	15
1.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN	15
1.6.2	DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	16
1.6.3	PRINCIPIOS DE LA PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	18
1.6.4	ESPACIO TRANSCRITO INTERNO O <i>INTERNAL TRANSCRIBED SPACER</i> (ITS)	20
2	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	23
3	MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	MATERIAL BIOLÓGICO	24
3.1.2	MEDIOS DE CULTIVO.....	25
3.1.3	REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	26
3.1.4	KITS.....	28
3.1.5	EQUIPAMIENTOS E INSTALACIONES.....	29
3.1.6	MATERIAL DE LABORATORIO	31
3.2	MÉTODOS	32
3.2.1	MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS PDA	32

3.2.2	MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS PDB	33
3.2.3	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE MICELIO	33
3.2.4	EXTRACCIÓN DEL ADN.....	34
3.2.5	CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	34
3.2.6	PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	35
3.2.7	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	36
3.2.8	EXTRACCIÓN DEL ADN DEL GEL DE AGAROSA.....	37
3.2.9	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ITS.....	38
3.2.10	ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS CON BLAST	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	EXTRACCIÓN DEL ADN.....	39
4.2	PCR Y ELECTROFORESIS	40
4.3	SECUENCIAS ITS OBTENIDAS.....	43
5	CONCLUSIONES	51
6	BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de un hongo mostrando hifas, micelio y cuerpo fructífero, (Carranza, 2006).	1
Figura 2: Ciclo sexual del filo <i>Ascomycota</i> , (Kuhar, Castiglia y Papinuti, 2013).	2
Figura 3: <i>Morchella spp.</i> , (Wikipedia, s.f.)	3
Figura 4: Ciclo sexual del filo <i>Basidiomycota</i> , (Kuhar et al., 2013).	3
Figura 5: División de una célula dicariótica, (Deacon, 2005).	4
Figura 6: <i>Cantharellus cibarius</i> , (Wikipedia, s.f.)	5
Figura 7: Esquema de una ectomicorriza, (García, 2010).	5
Figura 8: Esquema de una endomicorriza, (García, 2010).	6
Figura 9: <i>Calocybe gambosa</i> , (Wikipedia, s.f.)	7
Figura 10: <i>Armillaria spp.</i> , (Wikipedia, s.f.)	8
Figura 11: Procedimiento de aislamiento de un hongo, (Kuhar et al., 2007).	8
Figura 12: <i>Marasmius oreades</i> o seta de los corros de bruja, (Wikipedia, s.f.)	13
Figura 13: Estructura de la lignocelulosa	13
Figura 14: Proceso producción bioetanol, (Redin, 2010)	14
Figura 15: Estructura del ADN, (Wikipedia, s.f.)	15
Figura 16: Espectro típico de los ácidos nucleicos, (JOVE, 2010)	17
Figura 17: Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa, (Fierro, s.f.).	18
Figura 18: Pasos de un ciclo de PCR, (Tamay de Dios et al., 2013).	20
Figura 19: Agrupación de genes ARNr y posiciones de los primers de PCR de hongos, (Higgins, 2012).	21
Figura 20: <i>Macrolepiota procera</i> , (Wikipedia, s.f.)	23
Figura 21: NanoDrop 2000	29
Figura 22: Termociclador PT-200	30
Figura 23: Separación electroforética I	41
Figura 24: Separación electroforética II	42
Figura 25: Separación electroforética III	42
Figura 26: <i>Trichoderma polysporum</i> , (Wikipedia, s.f.)	44
Figura 27: <i>Arthrrium spp.</i> , (Mycportal, s.f.)	46
Figura 28: <i>Nemania diffusa</i> , (Aranzadi, s.f.)	47
Figura 29: <i>Fusarium spp.</i> (Mycology Online, s.f.)	48
Figura 30: <i>Fusarium avenaceum</i> cultivada en el laboratorio	49
Figura 31: <i>Pleurotus sapidus</i> , (Naturewatch, s.f.)	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional general de los hongos por 100 gramos de porción comestible (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAGRAMA, 2014).	10
Tabla 2: Pares de primers usados para amplificación de la región ITS en hongos, (Higgins, 2012).	21
Tabla 3: Material biológico del trabajo	24
Tabla 4: Fórmula en g/L del medio PDA	26
Tabla 5: Fórmula en g/L del medio PDB	26
Tabla 6: Material contenido en E.Z.N.A ® Fungal DNA Mini Kit	28
Tabla 7: Material contenido en E.Z.N.A ® Gel Extraction Kit	29
Tabla 8: Material no estéril necesario	31
Tabla 9: Material estéril necesario	31
Tabla 10: Composición de la mastermix	35
Tabla 11: Formulación del gel de agarosa al 1%	36
Tabla 12: Concentraciones requeridas ng/μL.....	38
Tabla 13: Datos de determinación de pureza y cuantificación del DNA	39
Tabla 14: Datos obtenidos en BLAST (<i>Trichoderma polysporum</i>) I.....	43
Tabla 15: Datos obtenidos en BLAST (<i>Trichoderma polysporum</i>) II	44
Tabla 16: Datos obtenidos en BLAST (<i>Arthrinium spp.</i>)	45
Tabla 17: Datos obtenidos en BLAST (<i>Nemania diffusa</i>)	46
Tabla 18: Datos obtenidos en BLAST (<i>Fusarium spp.</i>).....	48
Tabla 19: Datos obtenidos en BLAST (<i>Fusarium avenaceum</i>)	48
Tabla 20: Datos obtenidos en BLAST (<i>Pleurotus sapidus</i>)	49

ABREVIATURAS

- A: Absorbancia
- ADN: *Deoxyribonucleic acid* o ácido desoxirribonucleico
- ADNr: *Ribosomal DNA* o ADN ribosomal
- ARN: *Ribonucleic acid* o ácido ribonucleico
- ARNr: *Ribosomal RNA* o ARN ribosomal
- Atm: Atmósfera (unidad de presión)
- BrEt: Bromuro de etidio
- C-: Control negativo
- C+: Control positivo
- EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* o ácido etilendiaminotetraacético
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
- FW: *Forward* o hacia delante
- g: Gramo
- g/L: Gramo por litro
- g/mL: Gramo por mililitro
- h: Hora
- ITS: *Internal Transcribed Spacer* o Espacio Transcrito Interno
- L: Litro
- M: Mol
- mg: Miligramo
- mg/mL: Miligramo por mililitro
- MgCl₂: Cloruro de magnesio
- min: Minuto
- mM: Milimol
- mm: Milímetro
- mL: Mililitro
- ng/μL: Nanogramos por microlitro
- nm: Nanómetro
- pb: Pares de bases
- PCR: *Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa
- PDA: *Potato Dextrose Agar* o agar patata dextrosa
- PDB: *Potato Dextrose Broth* o caldo patata dextrosa
- rpm: Revoluciones por minuto
- RV: *Reverse* o reverso
- s: Segundos
- TAE: Tris-Acetato EDTA
- TBE: Tris-Borato EDTA
- Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano
- u/μL: Unidades por microlitro
- UV: Ultravioleta
- V: Volumen
- v: voltio
- VAM: Micorrizas vesiculoarbusculares
- x: Concentración X
- μL: Microlitro
- μM: Micromol
- μL/mL: Microlitro por mililitro
- °C: Grado Celsius

ABSTRACT

One of the research fields of the Genetics and Microbiology research group (GENMIC) of the Public University of Navarre is the identification and sequencing of fungal genomes. One of these fungi is *Macrolepiota procera* (parasol mushroom) was collected from the wild, isolated, identified and sequenced in this group.

The goal of this degree thesis has been the identification and characterization of wild fungi of interest for their use in industry, and especially in the food industry, by using molecular methods. With this aim, we performed a comparative analysis of ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences. ITS usage is the most suitable method because of: 1) Its size (600-800 bp) makes it easy to amplify with universal primers, 2) it is possible to have a good amplification from sample partially degraded or very diluted and 3) it is a really variable region between morphologically similar fungi, making possible an identification at a species level.

In this degree thesis we isolated and identified several fungal strains: *Trichoderma polysporum*, *Arthrinium spp.*, *Nemania diffusa*, *Fusarium spp.*, *Fusarium avenaceum* and *Pleurotus sapidus*. These strains have great interest in biotechnology and are now available to the scientific community and can be studied to become an industrial scale culture in the future. In addition, this work contributes to preserving microbial biodiversity adding strains to the fungal culture collection of the Genetics and Microbiology Research Group.

Keywords: PCR, Internal Transcribed Spacer, identification, food industry, fungi.

RESUMEN

Uno de los campos de trabajo del grupo de investigación de Genética y Microbiología GENMIC de la Universidad Pública de Navarra (UPNA) es la identificación y secuenciación del genoma de hongos. Por ejemplo, *Macrolepiota procera* (galamperna), un hongo con muy buenas propiedades organolépticas que fue recolectado, aislado, identificado y secuenciado en este grupo.

El objetivo del presente trabajo fin de grado ha sido la identificación y caracterización de hongos silvestres de interés para su uso en la industria y, en especial, en la industria agroalimentaria mediante el uso de métodos moleculares. Para ello, se llevó a cabo el análisis comparativo de secuencias ITS (Espacio transcrito Interno). El uso de ITS es idóneo debido a varios factores: 1) Su tamaño (600-800 pb) los hace fáciles de amplificar con cebadores (*primers*) universales, 2) se pueden realizar muchas copias de la secuencia a partir de muestras de ADN diluido o degradado y, además, 3) es una región muy variable entre hongos morfológicamente similares, lo que permite diferenciar incluso entre especies.

En este trabajo fin de grado se consiguieron aislar e identificar las cepas de hongos: *Trichoderma polysporum*, *Arthrinium spp.*, *Nemania diffusa*, *Fusarium spp.*, *Fusarium avenaceum* y *Pleurotus sapidus*. Estas cepas tienen gran interés biotecnológico y ahora están disponibles para su estudio por parte de la comunidad científica y para una posible explotación a escala industrial en el futuro. Además, este trabajo contribuye a preservar la biodiversidad microbiana añadiendo cepas a la colección de hongos del Grupo de Genética y Microbiología.

Palabras clave: PCR, Espacio Transcrito Interno, identificación, industria agroalimentaria, hongos.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS HONGOS

Los hongos son organismos pertenecientes al Reino *Fungi*. Estos son organismos eucariontes cuyas células contienen mitocondrias, un núcleo bien definido y otros orgánulos rodeados de membrana, carecen de clorofila y cloroplastos, por lo que no fotosintetizan. Las células de los hongos están rodeadas de paredes celulares constituidas por quitina, un polímero que consiste en subunidades de un azúcar nitrogenado y es un componente más resistente que la celulosa a la degradación por microorganismos (Alexopoulos y Mims, 1985). Dado que son heterótrofos son incapaces de sintetizar su propia materia orgánica, pero no ingieren alimento. Los hongos secretan enzimas digestivas y después absorben el alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática (Carranza, 2006).

En general, los hongos están constituidos por finas fibras denominadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos. También existen hifas llamadas cenocíticas porque no se dividen en células individuales, sino que tienen el aspecto de una célula gigante multinucleada alargada. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. Al conjunto de hifas, se le denomina micelio (Carranza, 2006).

Existen distintos tipos de micelios: vegetativo y reproductivo, principalmente. El micelio vegetativo tiene como función la absorción de nutrientes y presentan un crecimiento en el ápice únicamente que produce un crecimiento radial de la colonia. Por otro lado, el micelio reproductivo o aéreo crece en la superficie externa del medio y se encarga de formar las esporas para la formación de nuevos micelios (Alexopoulos y Mims, 1985).

Las estructuras encargadas de la producción de esporas se denominan cuerpos fructíferos o esporocarpos (figura 1). Las esporas producidas por el cuerpo fructífero son microscópicas, carecen de flagelos y son estructuras reproductivas inmóviles, dispersadas por el viento o por animales. Los hongos pueden producir esporas de manera sexual o asexual (Carranza, 2006). Estos se diferencian a partir de éstas estructuras ya que presentan una gran variedad de formas. Esto es debido a que pocos pueden identificarse mediante el micelio vegetativo ya que tienen un aspecto muy similar entre ellos (Alexopoulos y Mims, 1985). La dificultad que presenta diferenciar distintas especies de hongos comparando sus estructuras macroscópicas hace necesario el empleo de técnicas moleculares, entre las que la utilización de amplificación y comparación de las secuencias ITS es la más extendida debido a su fiabilidad.

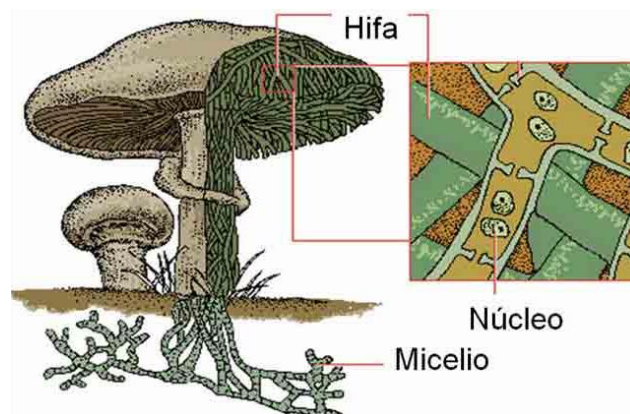


Figura 1: Estructura de un hongo mostrando hifas, micelio y cuerpo fructífero, (Carranza, 2006).

Además, los hongos se desarrollan mejor en hábitats oscuros y húmedos. Cuando el ambiente se torna demasiado seco, los hongos entran en fase latente o produciendo esporas resistentes a la desecación (Carranza, 2006).

1.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Inicialmente, los hongos fueron clasificados dentro del Reino *Plantae* ya que fueron considerados organismos inmóviles. Sin embargo, cuando se aplicó la biología molecular en los estudios taxonómicos se observó que los hongos están más próximos al Reino *Animalia* que al *Plantae*.

El reino al que pertenecen los hongos es el Reino *Fungi*, que se divide en cuatro filos denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*. Los hongos en los que no se conoce su reproducción sexual, constituyen un grupo heterogéneo denominado Deuteromicetos (Aristegui, 2002).

A continuación, se explicarán una serie de características diferenciales generales de los hongos más relevantes en este trabajo, *Ascomycota* y *Basidiomycota*.

1.1.1.1 Filo *Ascomycota*

El filo *Ascomycota* contiene aproximadamente el 75% de todos los hongos que se han descrito hasta ahora y es el filo que presenta mayor diversidad. Están caracterizados por la presencia de una célula denominada asca, donde se producen endógenamente las esporas sexuales. Estos, presentan tanto reproducción sexual como asexual (Deacon, 2005).

En la reproducción sexual dos micelios haploides (n) compatibles se unen mediante la plasmogamia, es decir, unen sus citoplasmas. Entonces, se forman dos estructuras, el ascogonio y el anteridio. El anteridio traspasa todos sus núcleos al ascogonio, donde estos se emparejan con los núcleos del otro micelio. Así, se forma un micelio dicarionte ($n+n$) y se produce la germinación, formando el ascocarpo. En las células más externas del ascocarpo se produce un estrechamiento dando lugar a las ascas. En estas se produce una cariogamia, es decir, se unen los núcleos obteniendo una célula diploide ($2n$), seguido de una meiosis y una mitosis final, originando un total de ocho ascosporas (figura 2). También los ascomicetes producen esporas de forma asexual mediante una mitosis, formando conidiosporas (Deacon, 2005).

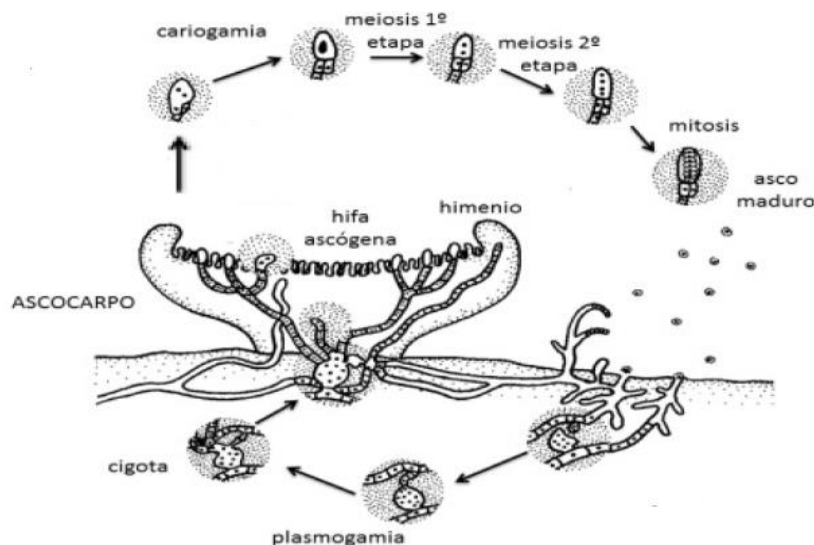


Figura 2: Ciclo sexual del filo *Ascomycota*, (Kuhar, Castiglia y Papinuti, 2013).

En este filo se encuentran las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, las trufas (*Tuber spp.*) y la colmenilla (figura 3) (*Morchella spp.*) entre otras.



Figura 3: *Morchella spp.*, (Wikipedia, s.f.)

1.1.1.2 Filo Basidiomycota

El filo *Basidiomycota* está formado por el 37% de los hongos descritos. Estos también se reproducen de forma sexual (figura 4) y asexual. En este caso las células encargadas de la producción de las esporas sexuales, denominadas basidiosporas, se llaman basidios (Deacon, 2005).

Las basidiosporas germinan formando micelios haploides hasta aparearse con otro compatible formando un nuevo micelio dicariótico ($n+n$) a partir del cual, se formará el cuerpo fructífero y en cuyo himenio se formarán los basidios. Cuando se produce la cariogamia este nuevo núcleo pasa a tener una carga genética diploide ($2n$) pero luego tiene lugar la meiosis, con lo cual su carga genética se reduce a la mitad generando nuevamente cuatro basidiosporas haploides (n) (Kuhar et al., 2013).

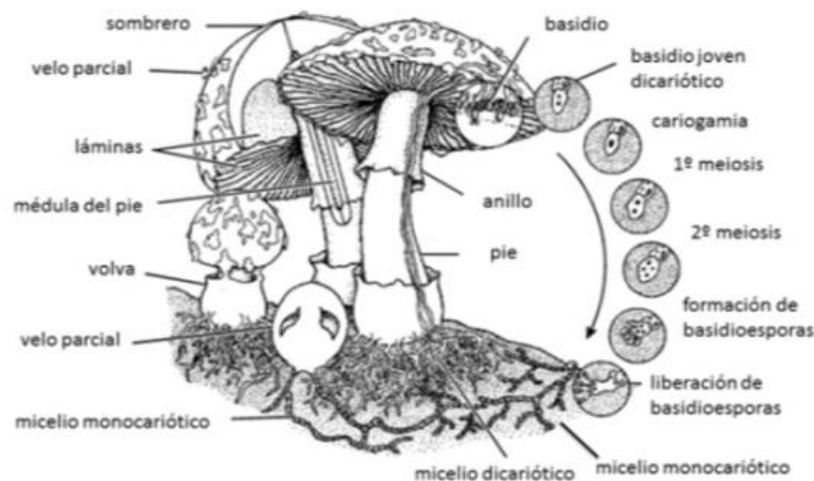


Figura 4: Ciclo sexual del filo *Basidiomycota*, (Kuhar et al., 2013).

Otro aspecto interesante de este filo de hongos es una estructura denominada fíbula cuya función es la manutención del estado dicariótico regular (figura 5). La célula dicariótica se extiende y sintetiza protoplasma hasta que se alcanza un volumen citoplasmático crítico. Una pequeña ramificación surge y se proyecta hacia atrás, entonces los dos núcleos se dividen de forma

sincronizada. Uno de los núcleos se divide a lo largo del eje de la hifa, y el otro se divide de forma que el núcleo “hijo” se introduce en la ramificación. La ramificación se corta por un septo que se desarrolla en el mismo eje de la hifa. Entonces, la ramificación se fusiona con la célula penúltima mediante la disolución de la pared, y el núcleo migra hacia dicha célula, restaurando la condición dicariótica. Este proceso ocurre siempre que la célula se divide (Deacon, 2005).

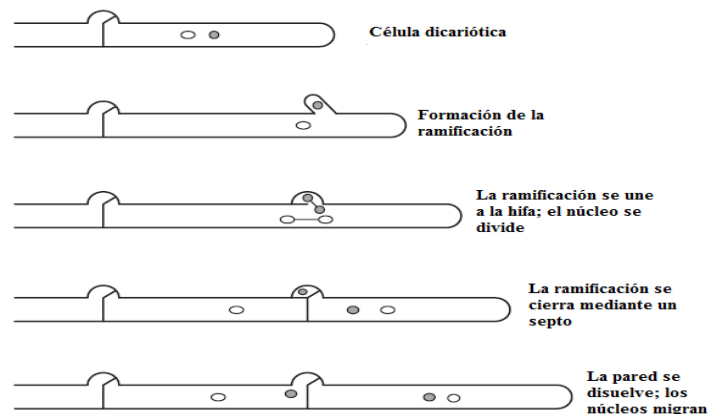


Figura 5: División de una célula dicariótica, (Deacon, 2005).

En este filo se encuentran hongos como el champiñón común (*Agaricus bisporus*), el *onddo beltza* (*Boletus aureus*), el *shii-take* (*Lentinula edodes*) y la amanita de los cesares (*Amanita caesarea*) entre muchas otras.

1.2 LOS HONGOS DEL BOSQUE

Los hongos por su carácter heterótrofo necesitan encontrar fuentes de material orgánico. Los hongos superiores o macromicetos llevan a cabo su actividad vital en grandes masas forestales y en su entorno (pastizales, turberas, hogueras o restos de incendios, excrementos de animales herbívoros, etc.). Esto es debido a la preferencia de estos hongos por la materia de origen vegetal, que se concentra casi en su totalidad en los grandes bosques (Cuesta, 2007).

Los hongos que se pueden encontrar en cualquier bosque son los cuerpos fructíferos de una red subterránea de filamentos muy delgados de hifas. Estos hongos, según su dependencia nutricional, se pueden clasificar en parásitos, saprótrofos y micorrícicos.

1.2.1 MICORRIZAS

Muchos de estos hongos del bosque, llamados micorrícicos, crecen alrededor de las raíces de los árboles. En realidad, la denominación micorriza se refiere al órgano mixto resultante de la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas y determinados hongos del suelo (García, 2010). Estas, no son visibles a simple vista (Fernández, 2008).

Gracias a esta asociación simbiótica, tanto la planta como el hongo hospedante, obtienen beneficios, principalmente una mejor nutrición (García, 2010).

La fisiología de esta asociación se basa en que ambos seres vivos aportan nutrientes al otro a través de la micorriza. En primer lugar, la energía se mueve principalmente de la planta al hongo, es decir, la planta suministra al hongo azúcares necesarios como pueden ser la fructosa, glucosa y sacarosa. El hongo cuando obtiene los nutrientes, los transforma en carbohidratos de reserva, como manitol o trehalosa. En segundo lugar, el hongo aporta recursos inorgánicos, elementos

como fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, azufre, cinc, cobre, etc. Estos son absorbidos del suelo por el hongo y cedidos a las plantas del hospedante (García, 2010).

Existen muchos tipos de micorrizas, pero, principalmente, hay dos grandes grupos que se encuentran en asociación con los cultivos tanto agrícolas como forestales. En primer lugar, se encuentran las ectomicorrizas, denominadas así porque el hongo crece alrededor de la raíz y entre las células de la corteza. En segundo lugar, están la endomicorrizas en las cuales sus hifas especializadas penetran en las células de las raíces (Kendrick, 2000).

Las ectomicorrizas presentan tres componentes estructurales principales: el manto, que es la estructura que envuelve a la raíz; la red de Hartig, formada por las hifas que crecen hacia dentro del manto penetrando entre las células de la corteza o córtex de la raíz a nivel intermolecular y, por último, el sistema hifal externo al manto. Este tipo de micorriza tiene lugar entre hongos de la división *Basidiomycota* o *Ascomycota* y plantas de los grupos gimnospermas o angiospermas. Además, son muy importantes ya que, estas asociaciones simbióticas, se establecen con plantas de gran interés forestal como: robles, pinos, abedules, encinas, tilos, nogales y sauces; y con hongos muy apreciados por su interés gastronómico como: *Tuber spp.*, *Boletus spp.*, *Lactarius spp.*, *Amanita spp.*, *Cantharellus spp.* (figura 6), *Russula spp.*, y *Morchella spp.* (García, 2010).



Figura 6: *Cantharellus cibarius*, (Wikipedia, s.f.)

Como se puede observar en la figura 7, este tipo de micorrizas presentan un manto de micelio del hongo formando una vaina alrededor de la raíz. Las hifas del hongo se extienden desde el manto hacia el suelo, y absorben agua y minerales. Las hifas también se extienden hacia dentro de los espacios extracelulares de la corteza de la raíz y proporcionan una superficie extensa de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta huésped (García, 2010).

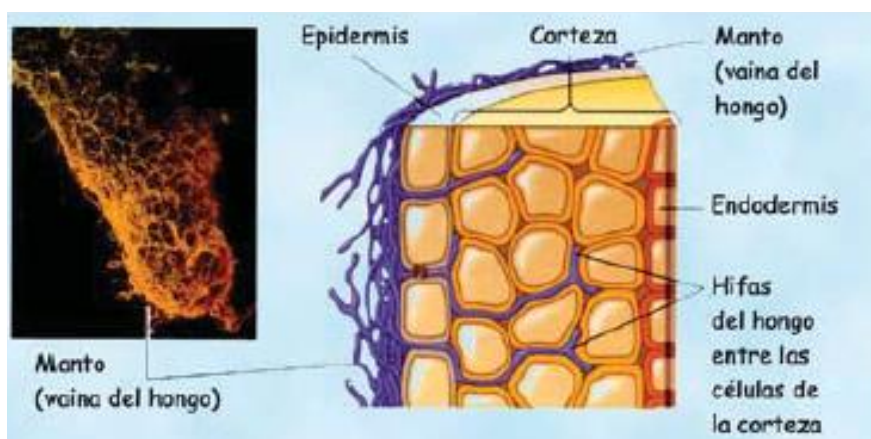


Figura 7: Esquema de una ectomicorriza, (García, 2010).

El segundo gran grupo importante son las endomicorrizas. Son también denominadas micorrizas vesículoarbusculares o VAM, aunque no todos los hongos de este grupo forman vesículas (Kendrick, 2000). En general, este grupo presenta hifas inter e intramoleculares, no tienen un manto como en el caso de las ectomicorrizas y forman vesículas dentro o entre las células de la planta. Estas vesículas están formadas por el hinchamiento de una hifa y tienen como función la contención de sustancias de reserva de los hongos. Muchas veces pasan a formar esporas debido a estrés del hongo o por la muerte inminente de la planta. (García, 2010). Los arbuscúlos son ramas de hifas especializadas que entran en las células corticales y forman al final una estructura ramificada similar a un árbol. Estas estructuras son los lugares de intercambio de nutrientes principales entre el hongo y la planta (Kendrick, 2000).

Aunque se cree que cerca de 300.000 especies de plantas, principalmente plantas herbáceas y leñosas, forman micorrizas endomórficas, solo unas 130 especies de hongos han sido descritas con dicha asociación. Este tipo de hongos solo crecerá en asociación con las raíces de la planta, es decir, son simbiosistas obligados (Kendrick, 2000).

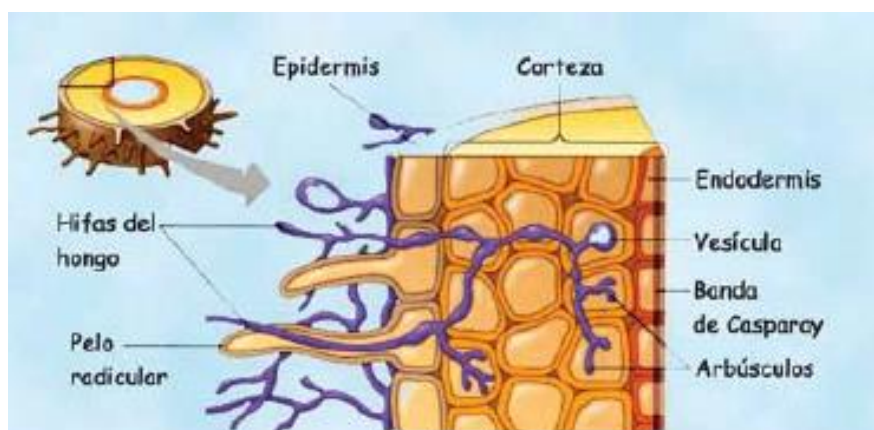


Figura 8: Esquema de una endomicorriza, (García, 2010).

En la figura 8 se puede observar un esquema de una endomicorriza en la cual no se forma un manto alrededor de la raíz, sino que las hifas microscópicas del hongo se extienden dentro de la raíz. Dentro de la corteza de la raíz, el hongo entra en contacto con la planta a través de ramificaciones de las hifas que forma arbuscúlos, lo que le proporciona una enorme superficie de contacto para el intercambio de nutrientes. Las hifas penetran en las paredes celulares de la corteza, pero no penetran la membrana plasmática (García, 2010).

En general, las micorrizas aportan grandes beneficios a las plantas ya que favorecen su crecimiento, mejoran su capacidad de absorción de agua y nutrientes, aumentan la superficie de contacto de la raíz con el suelo y presentan una asimilación de fósforo de diez veces mayor. Para los hongos el principal beneficio es el aporte de carbohidratos procedentes de la planta hacia el hongo (García, 2010).

1.2.2 SAPRÓTROFOS

Los hongos saprótrofos son organismos que se alimentan de la materia orgánica de seres vivos muertos. Estos, producen una amplia gama de enzimas que degradan los polímeros complejos como el almidón, la celulosa, proteínas, quitina, queratina e, incluso, los materiales lignificados más complejos como la madera (Deacon, 2005).

Según Carlile, Watkinson y Gooday (2001), los hongos que crecen sobre la madera y sus restos se clasifican en dos tipos: hongos de podredumbre marrón o *Brown-Rot Fungi* y los hongos de

podredumbre blanca o *White-Rot Fungi*. La diferencia general entre ellos es la apariencia de la madera podrida, de ahí el nombre de podredumbre blanca a los hongos que descomponen lignina y podredumbre marrón a los que solo descomponen la celulosa. Entre ellos se pueden encontrar hongos como *Morchella pseudoumbrina*.

Los hongos de podredumbre marrón o *Brown-Rot Fungi* son exclusivamente hongos *Basidiomycota*. Muchos pueden descomponer la celulosa solo cuando está asociada químicamente con la lignina. Sin embargo, muchos otros son capaces de degradar celulosa no leñosa. El efecto en la madera es que pierde fuerza y se forman grietas tanto longitudinales como transversales que se unen rompiendo la madera en forma de cubos de color marrón oscuro.

Por otro lado, los hongos de podredumbre marrón o *White-Rot Fungi* están formados tanto por hongos del filo *Basidiomycota* como *Ascomycota*. La mayoría degradan tanto la lignina como la celulosa dejando un residuo blanco brillante algo fibroso completamente distinto al polvo marrón que dejan los hongos de podredumbre marrón. Sin embargo, algunos descomponen la lignina primero y atacan a la celulosa más tarde, un proceso denominado deslignificación selectiva. Estos producen varias isoformas de oxidasas extracelulares incluyendo lacasas, manganeso peroxidasa y peroxidasa de lignina.

Además, existen hongos saprótrofos que se desarrollan sobre pastizales, prados y claros del bosque. Estos se desarrollan sobre el humus de la capa superficial del suelo, descomponiendo y alimentándose de la materia orgánica procedente de los restos de las raíces y de los tallos de las diferentes herbáceas. Dentro de estos se pueden encontrar hongos como especies del género *Agaricus*, *Calocybe gambosa* (muy apreciada gastronómicamente, figura 9) y *Pleurotus eryngii* (seta de cardo) entre otros (Cuesta, 2007).



Figura 9: *Calocybe gambosa*, (Wikipedia, s.f.)

Estos hongos pueden ser cultivados sobre distintos medios controlados para producir alimentos, medicinas y otros productos o producir la deslignificación de la madera.

1.2.3 PARÁSITOS

El artículo de Cuesta (2007) define a los hongos parásitos como aquellos que se desarrollan y llevan a cabo su existencia sobre tejidos vivos.

Según la relación nutritiva con el hospedante pueden ser: parásitos biotróficos, es decir, obtienen los nutrientes directamente de las células vivas, y parásitos necrotróficos, los que primero destruyen la célula parasitada y luego absorben sus nutrientes.

Los hongos parásitos que a menudo causan daño sobre el hospedante se denominan patógenos.

Entre los macromicetos es poco frecuente el parasitismo, y, cuando se produce, lo hacen casi exclusivamente en el mundo vegetal. Algunos ejemplos de estos pueden ser el caso de *Oudemansiella mucida*, parásito facultativo de las hayas o *Armillaria mellea*, parásito de coníferas (figura 10).



Figura 10: *Armillaria* spp., (Wikipedia, s.f.)

1.3 PROBLEMAS DE CULTIVO

Actualmente, solo se pueden cultivar ciertos tipos de hongos, aquéllos que para la producción de sus cuerpos fructíferos no necesiten la presencia de otros seres vivos, generalmente árboles (Ramírez, 2009). En el caso de las micorrizas aparecen problemas de cultivo tanto en laboratorio como a nivel industrial debido a que estos crecen en condiciones muy estrictas y por la estrecha simbiosis que presentan con las plantas (Kuhar, Castiglia y Papinuti, 2007). Este el caso de géneros como *Boletus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Cantharellus*, etc. (Ramírez, 2009).

Los principales problemas de este trabajo son los relacionados con el cultivo en laboratorio ya que es el cultivo practicado a lo largo de todo el estudio. Es muy difícil encontrar una forma viable de realizar un cultivo axénico, es decir, un cultivo en el cual el hongo de interés este separado de cualquier otro microorganismo para poder trabajar en el laboratorio con dicho organismo de forma aislada.

En el laboratorio lo primero que se realiza es un aislamiento (figura 11), es decir, realizar el cultivo axénico. Este proceso debe realizarse en condiciones de higiene máxima, mediante el uso de campanas de flujo laminar y material previamente esterilizado. En general, el proceso consiste en exponer una superficie del cuerpo fructífero que esté libre de gérmenes, por ejemplo, cortando con un bisturí estéril y accediendo a lugares que no han estado expuestos al medio. Con una pinza se recoge la porción de hongo y se coloca en un medio de cultivo sólido, en este caso PDA, de modo que disponga de nutrientes para reanudar el crecimiento (Kuhar et al., 2007).

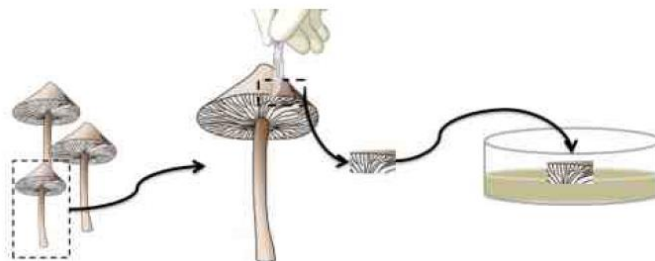


Figura 11: Procedimiento de aislamiento de un hongo, (Kuhar et. al., 2007).

A pesar de llevar a cabo dicho proceso de la forma más higiénica posible la mayoría de las veces el resultado de este cultivo no es satisfactorio debido a que en el propio aire y superficies existen esporas y otros microorganismos. Es por ello que se produce contaminaciones por otros hongos, crecimiento de otros microorganismos que se encuentran en la superficie del hongo o contaminación por bacterias. A pesar de utilizar antibióticos, algunas bacterias son capaces de crecer en las placas de cultivo. Estos pueden invadir la totalidad del cultivo o parte de él a una velocidad de crecimiento mucho mayor que el hongo que se intenta cultivar y, por lo tanto, no conseguir el aislamiento del hongo de interés para poder llevar a cabo la investigación que se desee realizar. Cabe añadir que en ocasiones el medio de cultivo no aporta los nutrientes necesarios a algunas especies de hongos ya que estos pueden ser muy estrictos.

Además, estudios recientes (Mediavilla, Olaizola, Santos del Blanco, Oria de Rueda y Martín-Pinto, 2016) han demostrado que especies micorrízicas como *Boletus edulis* presentan una simbiosis con bacterias como *Pseudomonas fluorescens* además de la simbiosis, ya conocida, con algunas plantas. Este hecho hace que el proceso del laboratorio se complique, porque se introducen nuevas variables que deben ser estudiadas.

1.4 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

Durante miles de años, los hongos han sido utilizados por los hombres como fuente de alimento o como remedio para algunas enfermedades. A estas utilidades se han sumado muchas otras en los últimos tiempos ya que son capaces de producir antibióticos y pueden remediar muchas enfermedades. Además, pueden degradar contaminantes, controlar otros microorganismos y producir enzimas que se utilizan en la industria. Por esto y por muchas otras razones los científicos tienen un gran interés por el estudio de ellos (Kuhar, et. al., 2007).

1.4.1 PERFIL NUTRICIONAL

En primer lugar, los hongos presentan una gran importancia en la alimentación debido a su buen perfil nutricional (tabla 1). Las setas presentan una concentración y variedad de nutrientes similar al grupo de alimentos de verduras y hortalizas. A pesar de que su contenido en macronutrientes es bajo, contiene un nivel significativo de vitaminas y sales minerales. Los hongos tienen un buen perfil proteico, además, contienen todos los aminoácidos esenciales. La calidad biológica de estos es buena, pero en concentraciones muy bajas, equivalentes a 1/10 de la proteína de la clara del huevo que se toma como patrón. Presentan un bajo contenido en lípidos, colesterol y ácidos grasos por lo que ayudan a controlar la hipercolesterolemia. Su contenido en hidratos de carbono digeribles es bajo por lo que elevan poco la glucemia haciendo que este sea un producto apto para diabéticos. Además, su contenido en hidratos de carbono no digeribles, mayoritariamente quitina, hacen que su contenido en fibra sea elevado. Por último, los hongos presentan un aporte de energía mínimo debido a su bajo contenido de macronutrientes, principalmente de grasas e hidratos de carbono (González, 2010).

Tabla 1: Composición nutricional general de los hongos por 100 gramos de porción comestible (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAGRAMA, 2014).

Energía (Kcal)	31
Proteínas (g)	1,8
Lípidos (g)	0,3
Hidratos de carbono (g)	4
Fibra (g)	2,5
Agua (g)	91,4
Calcio (mg)	9
Hierro (mg)	1
Sodio (mg)	5
Potasio (mg)	470
Fósforo (mg)	115
Tiamina (mg)	0,1
Riboflavina (mg)	0,41
Equivalente niacina (mg)	4,6
Vitamina B ₆ (mg)	0,1
Folatos (μg)	23
Vitamina B ₁₂ (μg)	0
Vitamina C (mg)	4
Vitamina A (μg)	217
Vitamina D (μg)	0
Vitamina E (mg)	0,12

1.4.2 PROPIEDADES SALUDABLES

Los hongos presentan una serie de beneficios importantes para la salud asociados al consumo de hongos o sus compuestos bioactivos aislados. Según un informe realizado por Roncero (2015) los hongos presentan una gran serie de propiedades saludables.

La capacidad antioxidante de los hongos, tanto cultivados como silvestres, es hoy en día un motivo de numerosos estudios y publicaciones científicas. El valor antioxidante de los hongos es comparable con el de los alimentos de origen vegetal; los compuestos responsables del poder antioxidante en los hongos son varios: selenio, compuestos fenólicos, ergotioneína, tocoferoles, carotenoides, etc.

Además, el consumo de hongos puede reducir el riesgo de padecer algunos tumores o prevenirlos debido a compuestos con actividad antitumoral como los polisacáridos de especies como el *Shiitake* o *Lentinula edodes*.

Hay que mencionar, además, que tienen capacidad inmunomoduladora, es decir, tienen la capacidad de aumentar o disminuir la producción de anticuerpos o secreción de antiinflamatorios.

Además, en los últimos años se han destacado los efectos beneficiosos de ciertas especies de hongos en la prevención de la obesidad y sus alteraciones asociadas. Muchos otros, como el género *Pleurotus*, previenen la ganancia de peso y la hiperlipidemia. Este género también destaca por su efecto potencialmente regulador del metabolismo del colesterol gracias a la producción de estatinas. Es por ello que muchos hongos y sus extractos son considerados una fuente de compuestos con actividad hipocolesterolemica porque son ricos en derivados del ergosterol y β -glucanos entre otros.

Otro beneficio asociado al consumo de hongos es su propiedad antidiabética, ya que los hongos son un alimento ideal para prevenir la hiperglicemia debido a su alto contenido en fibra y por los compuestos bioactivos que poseen, como los polisacáridos y las lecitinas. Muchos glucanos extraídos de hongos reducen el nivel de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre simulando la acción de la insulina.

Así mismo, los hongos y sus compuestos bioactivos juegan un papel muy importante en las funciones hepáticas ya que se ha comprobado que pueden reparar el daño causado en el hígado por toxinas, protegerlo frente a agentes tóxicos, regenerar los hepatocitos dañados, reducir la inflamación, etc.

Habría que añadir la capacidad antimicrobiana que presentan los hongos gracias a las sustancias antibacterianas y antifúngicas que producen para defenderse de otras especies. Muchos de los metabolitos secundarios que secretan los hongos se utilizan para combatir infecciones bacterianas y fúngicas y alargar la vida útil de otros productos alimenticios. Así, por ejemplo, estudios realizados con *Lentinula edodes* han demostrado que extractos aislados de ácido oxálico se muestran activos frente a algunas bacterias como *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Pophyromonas spp.*

En último lugar, cabe mencionar su importante papel en enfermedades neurodegenerativas, y en particular el Alzheimer. Diversos compuestos de diferentes especies de hongos pueden regular el crecimiento y desarrollo de las neuronas.

1.4.3 PRODUCTORES DE ALIMENTOS

Según Carlile et al. (2001), los hongos tienen un papel fundamental en la producción de muchos alimentos mejorando su textura, digestibilidad, valor nutricional, sabor o apariencia de las materias primas usadas.

En primer lugar, uno de los productos procesados por los hongos es el pan. Los primeros panes eran planos ya que no se les adicionaba levadura. Sin embargo, actualmente, se usa levadura en la elaboración del pan, y en concreto, *Saccharomyces cerevisiae* perteneciente a la división *Ascomycota*. Ésta fermenta los hidratos de carbono transformándolos en alcohol y en dióxido de carbono, proporcionando volumen a la masa.

Por otra parte, se encuentran los productos de la soja. La fermentación mediante hongos es muy importante ya que las semillas de soja son poco consumidas debido a inconvenientes como la presencia de compuestos tóxicos. Se producen productos como el *Tempeh*, pastel cubierto de

moho blanco, producido por hongos pertenecientes a la orden de los *Mucorales*, en concreto *Rhizopus spp.*

Cabe mencionar que, en la producción del queso, a pesar de que el papel fundamental lo tengan las bacterias lácticas que fermentan la lactosa en ácido láctico, los hongos también tienen un papel importante. En los quesos curados como el Brie o Camembert se rocían las superficies con esporas de *Penicillium camemberti* que producen lipasas, encargadas de disgregar ácidos grasos y éstos en cetonas de metilo, aportando sabor. Además, aporta la apariencia característica gracias al micelio blanco de la superficie que no penetra en el interior. En el caso de los quesos azules como el Roquefort y Gorgonzola las esporas de *Penicillium roqueforti* se introducen al principio o en la cuajada fresca. Este produce ácidos grasos libres, cetonas de metilo y lactonas, aportando sabor.

Algunos hongos patógenos vegetales como *Ustilago maydis* proporcionan cualidades nutritivas (aporte de aminoácidos) y organolépticas a los granos de maíz que infectan, convirtiéndolos en un nuevo producto alimenticio (el huitlacoche producido por el carbón del maíz).

Por último, las bebidas alcohólicas son producto de fermentaciones alcohólicas de levaduras. En vino, las levaduras, en concreto *Saccharomyces cerevisiae*, transforman el azúcar de las uvas en alcohol. En el caso de la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis* son las levaduras que fermentan los azúcares procedentes de la degradación previa del almidón por las enzimas del cereal.

1.4.4 PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son metabolitos secundarios producidos, principalmente, para la defensa del organismo que lo produce frente a otros organismos. Estos son producidos, particularmente, por ascomicetos y por hongos mitospóricos (no se conoce su ciclo sexual) que viven en el suelo y utilizan la materia muerta de plantas para sobrevivir. También son producidos por muchas bacterias del suelo, en concreto, los actinomicetos, bacterias con hifas.

La penicilina, descubierta en 1928 por Alexander Fleming, fue el primer antibiótico empleado ampliamente en medicina. Este antibiótico producido por *Penicillium notatum* es muy efectivo contra infecciones producidas por bacterias Gram-positivas y, además, tiene muy pocos efectos adversos. En las últimas décadas han ido surgiendo resistencias a este antibiótico por lo que se han elaborado penicilinas semisintéticas como la meticilina y la ampicilina, producidas gracias a cambios químicos de la penicilina biosintética. Otro antibiótico importante es la cefalosporina, producida por el hongo *Cephalosporium acremonium*. Este inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Por otro lado, el ácido fusídico, producido por el hongo *Fusidium coccineum*, ataca a bacterias Gram-positivas y actúa como bacteriostático ya que inhibe la síntesis de proteínas (Carlile et al., 2001). Estos son ejemplos de entre los muchos tipos de antibióticos que existen actualmente.

Los basidiomicetos también presentan una gran capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada. Los compuestos producidos con actividad antibiótica producidos por basidiomicetos son agrupados por su naturaleza química. El metabolismo secundario de este filo es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides. Por ejemplo, en la especie *Lactarius flavidulus* fue aislado un compuesto antimicrobiano, llamado flavidulol. El collybial, aislado de una cepa de *Collybia confluens*, es un sesquiterpenoide que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Otro grupo importante son los poliacetilenos ya que presentan una gran actividad antibiótica. Estos, han sido aislados a partir de especies de *Clitocybe*,

Coprinus, *Cortinellus*, *Marasmius* (figura 12), *Pleurotus*, entre otras (Brizuela, García, Pérez y Mansur, 1998).



Figura 12: *Marasmius oreades* o seta de los corros de bruja, (Wikipedia, s.f.)

Actualmente, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos afectan a millones de personas por lo que existen programas para el desarrollo de nuevos antibióticos y antifúngicos. Impulsados, en gran medida, por las resistencias de estos organismos a los fármacos usados comúnmente contra ellos. Son muy importantes los esfuerzos en la innovación en esta área y la decodificación del genoma de muchos de estos organismos ya que puede ayudar al proceso de producción de nuevos antibióticos para hacer frente a las resistencias (Persidis, 2000).

1.4.5 PRODUCTORES DE BIOCUMUSTIBLES

La bioenergía es una de las fuentes de energía renovables que puede reemplazar, en parte, el uso de combustibles fósiles. La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas siendo unas fuentes potencialmente utilizables: los desechos de la industria maderera, residuos de cosechas, hierbas, serrín y desechos sólidos de animales. Este material es de bajo costo y alta disponibilidad, sin embargo, no existe tecnología de bajo costo para degradar la fracción resistente de la biomasa (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009).

La lignocelulosa (figura 13) está formada por tres componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. En la degradación de esta sustancia, uno de los componentes más importantes es la lignina ya que es un polímero que actúa como barrera contra cualquier solución o enzimas mediante la unión a la hemicelulosa y celulosa y previene la penetración de enzimas lignocelulolíticas (Dashtban, Schraft y Qin, 2009).

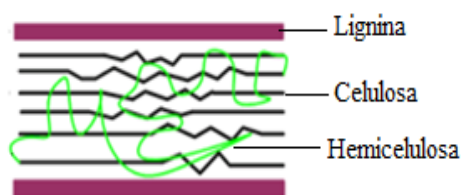


Figura 13: Estructura de la lignocelulosa

Para la obtención de bioetanol (figura 14) a partir de la lignocelulosa, primero se debe realizar un pretratamiento para mejorar el acceso de las enzimas para la hidrólisis de la celulosa. Este pretratamiento puede ser químico, físico o biológico. En este caso, interesa el realizado por hongos de podredumbre blanca, degradadores de lignina. Tras dicho pretratamiento, se lleva a cabo la hidrólisis. Esta, tiene como objetivo la obtención de monosacáridos para su posterior fermentación mediante una mezcla de enzimas (celobiohidrolasas I, endoglucanasas y β -

glucosidasas) procedentes de los hongos. Por último, se realiza una fermentación alcohólica mediante levaduras, generalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Redin, 2010). El alcohol producido en la fermentación se destila y se obtiene bioetanol (Cuervo et al., 2009).

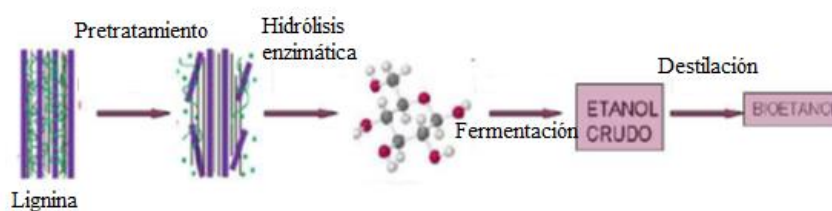


Figura 14: Proceso producción bioetanol, (Redin, 2010)

Muchos microorganismos son capaces de degradar y utilizar la celulosa y hemicelulosa como fuentes de carbono y energía; sin embargo, solo un pequeño grupo de hongos filamentosos son capaces de degradar la lignina. Entre ellos los que pertenecen al filo *Basidiomycota*. Estos hongos son conocidos como hongos de podredumbre blanca y son capaces de degradar selectivamente la lignina a CO_2 , dejando un material rico en celulosa. Esto permitiría la producción de bioetanol a partir de los desechos lignocelulósicos sin ser necesario un pretratamiento de alto valor y contaminante. De esta manera, se puede usar este material de forma más ecológica y económica (Redin, 2010).

1.4.6 SALUD DE LOS BOSQUES

Otro rasgo importante de los hongos es su incidencia directa en la salud de los bosques ya que las plantas micorrizadas están en mejor estado de nutrición y tienen mayor resistencia y capacidad de recuperación frente a factores de estrés como la sequía o las enfermedades causadas por los patógenos (Álvarez, 2016). Además, los hongos evitan la erosión del suelo, retienen agua, redistribuyen los minerales, rehabilitan los suelos y ayudan en la sustentabilidad de los agroecosistemas. En lugares contaminados son capaces de bioacumular y bioabsorber los metales pesados del suelo, con lo que evitan el efecto negativo que tienen en las plantas.

1.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS

La caracterización e identificación de hongos puede ser a dos niveles, dependiendo de la exactitud que se desee en función del trabajo que se esté realizando. El primer nivel se basa en comparar los especímenes frescos con ilustraciones a color disponibles en guías específicas y con claves simples, pudiendo definir el género del hongo. En el segundo nivel se encuentra el estudio microscópico del espécimen, la medición de esporas, test químicos, etc. (Carranza, 2006). En este estudio la caracterización e identificación de hongos principal será de primer nivel, es decir, de manera macroscópica ya que solo es necesario una identificación del hongo en género de interés para seguir con su estudio molecular.

1.5.1 EXÁMEN MACROSCÓPICO

Las setas están formadas por un sombrero y por un pie, generalmente. Estos elementos pueden tener diversas formas, coloraciones y ornamentaciones, y su estudio es imprescindible para la

correcta determinación de una seta ya que la diferenciación de hongos en base a su micelio es muy difícil debido a que tiene un aspecto muy similar entre especies diferentes.

Hay diversos tipos de setas en función de su forma, por ejemplo, a modo de paraguas, con láminas, poros, etc. Una vez examinada la forma, se comienza a estudiar el sombrero diferenciando de unas a otras en su medida, forma, color, etc. Seguidamente se examina el himenio y todos sus elementos, por ejemplo, si hay presencia de láminas, poros, agujas o pliegues. Por último, se examina el pie. Este elemento es muy importante y aporta mucha información para la identificación en función de su medida, forma, la inserción respecto al sombrero, consistencia o color, entre otras características.

1.6 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS

Los métodos morfológicos no son útiles para la discriminación entre especies estrechamente relacionadas y únicamente, en la mayoría de los casos, son útiles para la identificación taxonómica hasta el nivel de género. Actualmente, los métodos moleculares están disponibles para superar este problema ya que presentan una gran sensibilidad y especificidad para identificar hongos de una gran diversidad de niveles taxonómicos.

Ambos métodos, taxonómicos y moleculares, podrían ser útiles para la correcta identificación de especies de hongos. Los métodos moleculares más usados para dicha identificación son los análisis comparativos de secuencias de ADN ribosomal, especialmente la región ITS (Itoo, Reshi, Basharat, Majeed y Andrabi, 2014).

1.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción y purificación del ADN son la base de los laboratorios de biología molecular y depende de la naturaleza del material inicial (micelio, esporocarpio o esporas). Según un artículo de Velázquez, Martínez y Romero (2014), la extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula.

El ADN (figura 15) está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen la estructura helicoidal.

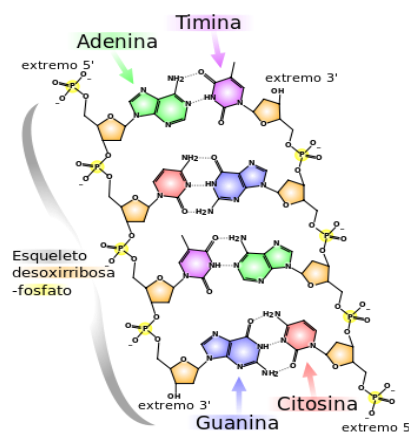


Figura 15: Estructura del ADN, (Wikipedia, s.f.)

El grupo fosfato está cargado negativamente y es polar, por lo que le confiere al ADN una carga negativa y lo hace altamente polar. Los grupos fosfatos se repelen entre sí, debido a su carga negativa, lo que permite que el ADN se disuelva en soluciones acuosas y formen una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfatos. En estas condiciones se favorece la unión con cationes, como Na^+ , que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite.

Existen protocolos tanto tradicionales como comerciales para la extracción de ADN. Ambos protocolos tienen en común la homogeneización del tejido y la lisis celular.

Los protocolos tradicionales se basan en: separación de proteínas y lípidos, precipitación, redisolución del ADN y además, las etapas iniciales comunes.

Los protocolos comerciales que usan membranas de sílice, presentan etapas distintas. Antes de comenzar, se debe realizar una colecta de la muestra. Este paso debe ser adecuado para obtener ADN sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR.

La primera etapa, consiste en la homogeneización, mecánica o química, que tiene como función romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético. A continuación, se lleva a cabo la lisis celular para modificar o destruir las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear. Se usan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación.

El siguiente paso consiste en la unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna se adiciona etanol a la solución, eliminando la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato. Con ello se facilita la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente. Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz.

Por último, es necesario liberar al ADN de la matriz. La membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación. Después, se centrifuga la columna vacía para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ADN se hidrate y se centrifuga para recuperarlo de la matriz y resuspenderlo.

Este tipo de extracción de ADN explicada, se basa en la cromatografía de adsorción, es decir, por diferente afinidad entre la fase estacionaria (membrana de sílice) y los solutos de la fase móvil. Es por ello, que al dejar expuestos los grupos fosfatos (carga negativa) se une el ADN a la membrana positiva mientras el resto de componentes eluyen. Al rehidratarlo el ADN eluye debido a que repele la membrana de sílice, pudiéndolo recolectar de forma aislada en otro recipiente.

1.6.2 DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La determinación de la pureza y cuantificación del ADN es muy importante a la hora de conocer la aptitud de la muestra de ADN extraída para seguir con los procedimientos oportunos en función del objetivo del trabajo que se realiza. Una de las razones de conocer la pureza del ADN es que las posibles impurezas existentes pueden afectar a las reacciones de PCR de forma negativa.

1.6.2.1 Espectrofotometría

Una vez obtenido el material genético es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Lambert-Beert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Gracias al espectrofotómetro Nanodrop 2000, no es necesario diluir la muestra y el equipo proporciona directamente la concentración en ng/μL de ADN en cada muestra (Velázquez et al., 2014).

Por otro lado, la determinación de la pureza se realiza mediante el uso de ratios. En primer lugar, los ácidos nucleicos y las proteínas presentan una absorbancia máxima a 260 y 280 nm, respectivamente. Un ratio de aproximadamente 1,8 corresponde a una muestra de ADN “pura”. Un ratio A260/280 menor puede ser indicador de contaminación de la muestra por proteínas o por algún reactivo utilizado o que la concentración de ADN de la muestra es muy baja (>10 ng/μl). Valores mayores no son indicativos de problemas (Thermo Scientific, s.f.).

Del mismo modo, la absorbancia a 230 nm es indicador de otras contaminaciones. Por lo tanto, el ratio A260/230 también es calculado. Los valores tomados como “puros” son 2,0-2,2. Los valores menores suelen asociarse a contaminaciones por carbohidratos o fenol. Los valores mayores suelen asociarse a que la medida del blanco en el espectrofotómetro se ha realizado o en superficie sucia o con una solución no adecuada ya que esta debe ser de pH similar a la solución de la muestra de ADN (Thermo Scientific, s.f.).

El espectro típico de un ácido nucleico se puede observar en la figura 16.

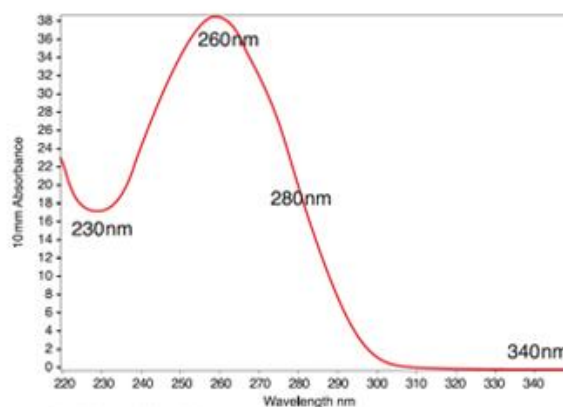


Figura 16: Espectro típico de los ácidos nucleicos, (JOVE, 2010)

1.6.2.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas, como los ácidos nucleicos, a través de una matriz sólida que funciona como filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (Tamay de Dios, Ibarra y Velásquillo, 2013).

En el caso de los ácidos nucleicos, su carga negativa hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se les fuerza a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero de agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras que las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño (figura 17) (Fierro, s.f.).

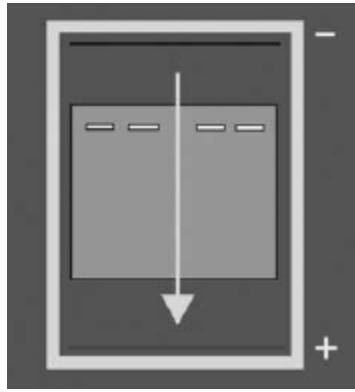


Figura 17: Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa, (Fierro, s.f.).

Para llevar a cabo la electroforesis, en primer lugar, es necesario el polímero de agarosa. Este, forma fibras helicoidales, que al solidificar forman una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y > 200 nm (Fierro, s.f.). El porcentaje al que se preparara el gel varía en función del tamaño de las moléculas. En este caso, el gel es al 1% de agarosa (Tamay de Dios et al., 2013).

Por otro lado, como *buffer* de electroforesis y para la preparación del gel puede utilizarse opcionalmente TAE o TBE. Ambos suelen prepararse como soluciones concentradas, que pueden almacenarse a temperatura ambiente, éstas se diluyen con agua antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso. Otro ingrediente importante es el *buffer* de carga. Éste debe tener una alta densidad que permita que la muestra se introduzca en el pocillo del gel, además de colorantes que indiquen cuando debe detenerse la electroforesis. También es necesario un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Existen varios compuestos como, el BrEt o el denominado *Red Safe* (Fierro, s.f.).

Por último, cuando los amplicones (fragmentos de ADN producidos por la PCR) son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos. Estos facilitan la identificación de los amplicones. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto al gel de agarosa expuesto a la luz UV (Tamay de Dios et al., 2013).

La aplicación básica de las técnicas de electroforesis de ADN es la separación de fragmentos de ADN en una muestra y su visualización, para comprobar aspectos como el tamaño de los fragmentos, la concentración, la entereza y otros. Los fragmentos que sean de interés pueden purificarse a partir del gel mediante diferentes técnicas de extracción, y utilizarse para diferentes propósitos, como la secuenciación, en este caso. Esta técnica presenta la ventaja de que es muy sencilla y que los costos de los equipos necesarios son asequibles. Sin embargo, algunos de los componentes utilizados son tóxicos y deben tomarse precauciones especiales en su manejo (BrEt) (Fierro, s.f.).

1.6.3 PRINCIPIOS DE LA PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores. Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. En un principio, se

utilizaba el ADN polimerasa de *Escherichia coli*, pero esta se degradaba a temperaturas altas. Sin embargo, la técnica mejoró cuando se consiguió aislar en 1976 la primera polimerasa termoestable conocida como *Taq polimerasa* (Serrato, Flores, Aportela y Sierra, s.f.).

En el artículo de Tamay de Dios et al. (2013) se define la reacción en cadena de la polimerasa o PCR como una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Los equipos en donde se realiza la reacción se denominan termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.

Los elementos importantes en la reacción son el molde de ADN, la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg²⁺), una solución amortiguadora o *buffer* y agua.

El elemento principal en la PCR es el ADN. El ADN molde son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La más usada es la *Taq DNA polimerasa*, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus* y vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar este tipo de temperaturas. Para que la enzima funcione con especificidad y la reacción sea exitosa, también se necesitan otra serie de compuestos.

En primer lugar, los *primers* u oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Son dos secuencias diferentes de *primers* las que se utilizan en la PCR, una denominada *forward* o directo y otra *reverse* o reverso. Ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el ADN molde y las cadenas puedan ser extendidas por la *Taq polimerasa* en dirección 5'-3'.

Por su parte, los dNTPs son las bases nitrogenadas con los que la *Taq polimerasa* construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario puede afectar la función de la *Taq polimerasa*. Normalmente, se usan a una concentración de 0,2 a 1,0 mM. El tampón o *buffer* es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCl (pH 8). El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por lo que debe estar a una concentración adecuada para que no afecte al rendimiento de la *Taq polimerasa*, generalmente suele ser entre 0,5 y 2,5 mM. Por último, el agua es el disolvente de la reacción y se usa en forma destilada libre de nucleasas (enzimas que degradan los ácidos nucleicos).

Cada ciclo de PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (figura 18).

En primer lugar, se produce la desnaturalización, es decir, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 s. Al final de esta etapa se obtendrán las cadenas separadas que servirán de templado en la siguiente etapa.

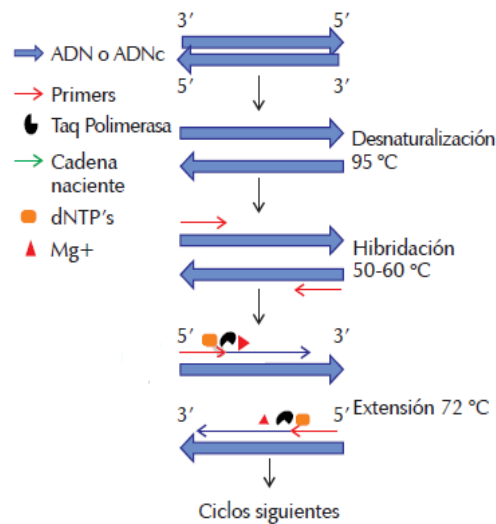


Figura 18: Pasos de un ciclo de PCR, (Tamay de Dios et al., 2013).

Después, ocurre la hibridación. En esta etapa, los *primers* se alinean en el extremo 3' del templado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo es importante que la temperatura de hibridación o temperatura *melting* de los oligonucleótidos cebadores (*primers*) sea la óptima. Generalmente oscila entre los 50-60 °C.

Por último, se produce la extensión donde la *Taq polimerasa* actúa sobre el complejo ADN molde-*primers* y empieza a catalizar a una velocidad muy rápida. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis de ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C. Este último paso conformaría un ciclo entero y se repetiría para producir muchas copias. Después de tres ciclos, la secuencia diana definida por los primers comienza a acumularse.

Según Serrato et al. (s.f.), la PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como la biotecnología, ecología, evolución y medicina entre otras. Antes del desarrollo de ésta, las técnicas de biología molecular eran muy onerosas y solo eran posibles cuando se obtenían numerosas copias del ADN por clonación. La PCR convirtió en una rutina la aplicación de estas técnicas, como es el caso de la secuenciación genética de muchos organismos.

1.6.4 ESPACIO TRANSCRITO INTERNO O *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

Los análisis moleculares más usados para la caracterización e identificación taxonómica y filogenética de los hongos consisten en el análisis de un gen o una región del genoma, en general, el ITS. El ITS (figura 19) es una región que se encuentra repetidamente entre los genes del ARN ribosomal de la subunidad mayor (28S) y menor (18S) del ADN nuclear. El ITS contiene dos regiones separadas por el gen 5,8S, obteniendo la región ITS1 e ITS2. Ambas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de pares de *primers* (Guevara, Garza y Cázares, 2004).

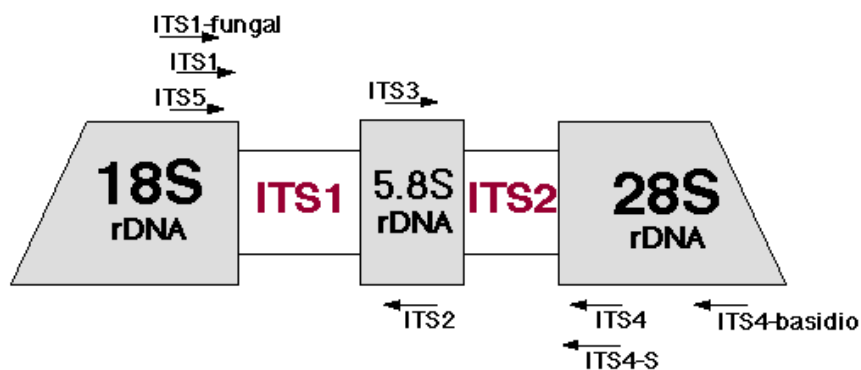


Figura 19: Agrupación de genes ARNe y posiciones de los primers de PCR de hongos, (Higgins, 2012).

Muchas características hacen a esta región conveniente para la identificación molecular de hongos. En primer lugar, en los hongos, la región ITS generalmente presenta un tamaño de entre 600 y 800 pb y puede ser fácilmente amplificado con *primers* universales que son complementarios a las secuencias de los genes de ARNr. En segundo lugar, los genes multicopia repetidos del ADNr hacen a la región ITS fácil de amplificar a partir de muestras de ADN pequeñas, diluidas o muy degradadas. Por último, muchos estudios han demostrado que la región ITS es muy variable entre especies de hongos morfológicamente distintos (Gardes y Bruns, 1993).

Depende del par de *primers* que se utilice y en función del objetivo final se pueden amplificar ambas regiones ITS o las regiones ITS1 e ITS2 por separado ya que existen una gran combinación de pares de *primers* que pueden usarse (tabla 2).

Tabla 2: Pares de primers usados para amplificación de la región ITS en hongos, (Higgins, 2012).

<i>Fw primer</i>	<i>Rv primer</i>	Aplicación
ITS1-F	ITS4	Se amplificarán ambas regiones ITS1 e ITS2 de cualquier hongo, ya que la región de ADN a la que se unen está presente en todos los hongos superiores.
ITS1-F	ITS4-B	Se amplificarán ambas regiones ITS1 e ITS2, pero solo de hongos <i>Basidiomycota</i> ya que la región en la cual se une el ITS4-B solo se encuentra en estos.
ITS1-F	ITS4-A	Se amplificará ambas regiones ITS1 e ITS2, pero solo de hongos <i>Ascomycota</i> ya que la región en la cual se une el ITS4-A solo se encuentra en estos.
ITS1-F	ITS2	Se amplificará únicamente la región ITS1. No es de gran utilidad. Se usa cuando el ADN de la muestra está degradado o es antiguo.
ITS3	ITS4 / ITS4-B	Se amplificará únicamente la región ITS2. Usado, generalmente, para conocer contaminaciones por <i>Ascomycota</i> .

En este trabajo, se usaron dos pares de *primers*. Un par estaba compuesto por ITS1-F e ITS4, mientras que el otro par estaba compuesto por ITS1-F e ITS4-B.

Gracias al uso de ambos pares en análisis independientes, se puede conocer con el par ITS1-F e ITS4 si la muestra contiene ADN de hongo. Con el par ITS1-F e ITS4-B se podrá determinar si la muestra se trata de un hongo *Basidiomycota* o no.

Si en ambas reacciones se produce amplificación, se puede afirmar que el ADN de la muestra se trata de un hongo *Basidiomycota*. Si únicamente se produce amplificación en el primer caso, se descartará que se trate de un hongo *Basidiomycota*, siendo un *Ascomycota*.

Las reacciones de amplificación se verifican una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa.

Las secuencias usadas en este trabajo fueron:

- ITS1-F: 5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3', Gardes y Bruns (1993).
- ITS4-B: 5'CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG3', Gardes y Bruns (1993).
- ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3', White, Bruns, Lee y Taylor (1990).

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el grupo de grupo de investigación de Genética y Microbiología GENMIC de la Universidad Pública de Navarra se ha trabajado en la identificación y secuenciación del genoma de hongos. Este es el caso de *Macrolepiota procera* (figura 20) conocida como galamperna o parasol, que fue recolectada, aislada e identificada en este laboratorio. Este hecho es importante ya que es un excelente comestible y un candidato a ser cultivado de manera industrial.



Figura 20: *Macrolepiota procera*, (Wikipedia, s.f.)

En este trabajo se lleva a cabo el primer paso, es decir, la recolección, cultivo en placa e identificación (sin llegar a realizar la secuenciación del genoma) siendo interesante encontrar cepas de especies comestibles para poder cultivarlas de manera industrial o, por sus diversas utilidades en la industria alimentaria.

El objetivo general de este trabajo es la identificación y caracterización mediante técnicas moleculares de hongos del bosque, principalmente comestibles o que presenten características interesantes para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria.

Los objetivos particulares son:

- Realizar medios de cultivos axénicos, tanto sólidos como líquidos, de los hongos de trabajo identificados para poder disponer de ellos para fines de investigación
- Aplicar técnicas moleculares como la extracción del ADN, PCR, electroforesis y secuenciación con fines de caracterización
- Realizar una revisión bibliográfica para conocer las utilidades para la industria de los hongos identificados
- Intentar identificar encontrar nuevas cepas de especies comestibles que puedan acabar siendo cultivadas de manera industrial mediante las técnicas aplicadas en este trabajo

3 MATERIAL Y MÉTODOS




3.1 MATERIAL

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en este trabajo consistió en las especies *Cantharellus lutescens*, *Cratarellus tubaeformis*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Hydnellum spp.* y *Ramaria fragilis* (tabla 3). Estos hongos de estudio fueron aportados por la Sociedad de Ciencias Naturales de Navarra GOROSTI situada en Pamplona en la calle Calderería. En GOROSTI se estudia la naturaleza, en especial la de Navarra, con una sección de estudio dedicada a la micología.

Todos ellos pertenecían al filo *Basidiomycota* y eran comestibles, salvo *Hydnellum spp.* que está en duda su toxicidad.

Tabla 3: Material biológico del trabajo

Nombre	Descripción	Foto
<i>Cantharellus lutescens</i> (angula de monte)	Sombrero: amarillento. Borde ondulado Himenio: liso o arrugado, amarillo Hábitat: pinares. Meses otoñales	
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (rebozuelo atrompetado)	Sombrero: color pardo con matices amarillentos u ocráceos Himenio: nervios grisáceos sobre fondo amarillo Hábitat: bosques caducifolios o coníferas. Meses otoñales	
<i>Clavariadelphus pistillaris</i> (Porra)	Carpóforo: forma de porra (hasta 20 cm). Color ocre anaranjado. Parte superior lisa mientras que en el estrechamiento hasta la base, arrugas o deformaciones Himenio: inmerso en la superficie del carpóforo. Zona de la base, estéril Hábitat: bosques planifolios. Meses otoñales.	

<p><i>Hydnellum spp.</i></p>	<p>Sombrero: rojizo, anaranjado. Borde blanco</p> <p>Himenio: agujones. Exuda gotas color sangre o pardo herrumbre</p> <p>Hábitat: bosque coníferas</p>	
<p><i>Ramaria flava</i> (pie de gallo)</p>	<p>Sombrero: amarillo monocolor</p> <p>Himenio: liso, blanquecino</p> <p>Hábitat: zonas sombrías de los bosques. Meses de verano y otoño</p>	
<p>Hongo no identificado</p>	<p>Micelio blanco y ramificado</p>	

3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

3.1.2.1 Medio sólido de Agar de Dextrosa y Patata (PDA)

El cultivo inicial de las cepas, se realizó en medios de cultivo PDA (tabla 4). En algunos casos, se puede añadir ampicilina (almacenada a -20 °C con una concentración de 100 mg/mL) ya que es un antibiótico de amplio espectro que inhibe el crecimiento microbiano.

Tabla 4: Fórmula en g/L del medio PDA

Peptona de patata	4
Glucosa	20
Agar	15

$pH_{final} = 5,6 \pm 0,2$ a 25 °C

3.1.2.2 Medio líquido de Caldo de Dextrosa y Patata (PDB)

Los inóculos de las cepas se realizaron en medios de PDB (tabla 5).

Tabla 5: Fórmula en g/L del medio PDB

Peptona de patata	4
Glucosa	20

$pH_{final} = 5,6 \pm 25$ °C

3.1.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES

3.1.3.1 RNAsa A

La función de este compuesto, procedente del páncreas bovino, es la eliminación del ARN de los precipitados de ADN durante su extracción. Almacenado a temperatura de refrigeración de 4 °C.

3.1.3.2 Cloruro de magnesio

MgCl₂ es un cofactor enzimático en la reacción de PCR. Este fue usado a una concentración de 50 mM y es almacenado a una temperatura de congelación de -20 °C.

3.1.3.3 Buffer

Esta solución amortiguadora para la reacción de PCR, almacenada a -20 °C, está compuesta por Tris-HCl (pH=8) con una concentración de 1 x (Tamay de Dios et al., 2013).

3.1.3.4 Bases nitrogenadas

Los denominados dNTPS o bases nitrogenadas fueron utilizadas a una concentración de 40 mM en la reacción de PCR. Son almacenados a una temperatura de congelación de -20 °C.

3.1.3.5 Oligonucleótidos o primers

Los oligonucleótidos o *primers* se utilizaron durante la reacción de PCR para amplificar la secuencia objetivo. Se necesitó un *forward* común, denominado ITS1-F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3') y dos *reverse* distintos, denominados ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS4-B (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3').

Además, se necesitó el oligonucleótido *forward* ITS1-F en una concentración de 1mM para el envío de las muestras para la secuenciación de los ITS. Para ello, se diluyeron 2 µL de dicho oligonucleótido en 18 µL de agua destilada libre de nucleasas.

3.1.3.6 *Taq. polimerasa o Biotq*

Esta enzima se encarga de la catálisis de la reacción de PCR, sintetizando las nuevas cadenas de ADN. Se mantiene en unas condiciones de -20 °C para evitar su degradación y es usada con una concentración de 5 u/μL.

3.1.3.7 *Buffer amortiguador TAE 25 x*

Para su elaboración se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- 121 g de tris base: usado generalmente para la realización de disoluciones tampón
- 25,55 mL de ácido acético glacial: este compuesto es muy volátil por lo que es aconsejable que se trabaje en campana
- 50 mL a 0,5 M de EDTA a pH 8
- Se ajustó a 1 L con agua destilada

3.1.3.8 *EDTA 0,5 M pH 8*

Para su elaboración se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- 148,9 g de EDTA
- 800 mL de agua destilada
- Se ajustó el pH a 8 mediante pellets de 20 g, aproximadamente, de NaOH. Gracias a estos pellets de NaOH el EDTA se disuelve mejor ya que a mayor pH mejor solubilidad presenta

3.1.3.9 *Buffer amortiguador TAE 20 x*

Para la obtención de 1 L de TAE 20x, que será usado posteriormente para la elaboración de TAE 1x, se partió del TAE 25x realizado anteriormente. Mediante la fórmula de $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ se calculó el volumen necesario de TAE 25x. Se obtuvo:

- 800 mL de TAE 25x
- Se ajustó a 1L con agua destilada, es decir, 200 mL

3.1.3.10 *Buffer amortiguador TAE 1x*

El TAE 1 x se suele preparar en grandes cantidades para luego ser almacenadas en un bidón. Este es preparado tanto para el buffer amortiguador con el que se cubre el gel para realizar la electroforesis como para hacer el propio gel. En este caso se prepararon 4000 mL de TAE 1 x a partir de TAE 20 x. Se usó la fórmula de $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ para el cálculo del volumen necesario de TAE 20 x. Se obtuvo:

- 200 mL de TAE 20 x
- Se ajustó a 4 L con agua destilada, es decir, 3800 mL

3.1.3.11 *Red Safe*

El *Red Safe* es un tinte de ácidos nucleicos nuevo y seguro, usado como alternativa al BrEt, ya que este tiene un gran poder mutagénico. Se añadió al gel de agarosa para que, tras la electroforesis, el ADN pueda ser visualizado mediante excitación UV ya que este, emite luz fluorescente verde cuando está ligado al ADN. Fue usado a una concentración de 5 μL/100 mL. Es almacenado en condiciones de refrigeración a una temperatura de 4 °C para evitar su degradación.

3.1.3.12 *Tampón o buffer de carga*

Este compuesto fue añadido en una cantidad de 5 µL a las muestras de 25 µL antes de cargarlas en el gel y comenzar la electroforesis. Es almacenado en condiciones de congelación a una temperatura de -20 °C y presenta una concentración de 6 x.

3.1.3.13 *Marcador de peso molecular o marker*

Los marcadores de peso molecular son fragmentos de ADN de tamaño conocido que nos permite conocer el tamaño aproximado del ADN de estudio.

En este caso se usó un marcador de 100-1000 pb con una concentración de 0,5 µg/µL debido a que los fragmentos que se querían identificar tenían tamaños de 700 pb y 800 pb. Este viene suministrado en una solución 10 mM de Tris-HCl a un pH de 7,5-8,0 y EDTA a una concentración de 1 M. Es almacenado en condiciones de congelación a una temperatura de -20 °C.

Este compuesto no viene preparado para cargar directamente por lo que hay que seguir un protocolo para su uso. Este es:

- Agitar antes de su uso
- Preparar el marcador antes de su carga:
 - 10 µL de marker
 - 5 µL de buffer de carga
 - 10 µL de agua esterilizada y desionizada
- Calentar a 65 °C durante 5 min para que el ADN se desnaturalizara y no se mantuviera enrollado. Posteriormente, incubar en hielo durante 3 min.

3.1.4 KITS

3.1.4.1 *E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit Protocols*

Este kit es usado para la extracción del ADN de las muestras. Es almacenado a temperatura ambiente y puede mantenerse estable por lo menos 24 meses. El kit contiene todo lo necesario para poder realizar la extracción (tabla 6).

Tabla 6: Material contenido en E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit

<i>HiBlind DNA Mini Columns</i>	DNA wash buffer o tampón de lavado
<i>Collection Tubes</i> o tubos de recogida	<i>Elution buffer</i> o tampón de elución
<i>Buffer</i> o tampón FG1, FG2 y FG3	RNAsa A

3.1.4.2 *E.Z.N.A® Gel Extraction Kit*

Este kit es usado para la purificación del ADN del gel de agarosa así posteriormente poder enviarlo a secuenciar el fragmento de ADN correspondiente al ITS. Es almacenado a temperatura ambiente y puede ser usado al menos 12 meses. El kit contiene todo lo necesario para realizar la purificación del ADN (tabla 7).

Tabla 7: Material contenido en E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit

<i>HiBind DNA Mini Columns</i>	SPW Wash buffer o tampón de lavado
<i>Collection Tubes</i> o tubos de recogida	<i>Elution buffer</i> o tampón de elución
<i>Blinding buffer</i> o tampón cegador (XP2)	

3.1.5 EQUIPAMIENTOS E INSTALACIONES

3.1.5.1 *NanoDrop 2000*

Este equipo (figura 21) es un espectrofotómetro de luz UV visible de espectro completo que fue usado para cuantificar y evaluar la pureza del ADN de las muestras de un volumen de únicamente 1 µL.



Figura 21: NanoDrop 2000

3.1.5.2 *Campana flujo laminar (Teistar MH-100)*

Los procesos como extender los medios en las placas Petri, cultivarlas, inocular medios líquidos y realizar las mastermix de las PCR que necesitan esterilidad se realizaron en campana de flujo laminar. Antes de su uso, la campana se esterilizó con luz ultravioleta y etanol.

3.1.5.3 *Autoclave*

El autoclave, fue usado para esterilizar los medios de cultivo líquido y sólido, y todo el material que en su uso debía estar esterilizado para evitar contaminaciones como por ejemplo: tela de filtro Miracloth, morteros, embudos, etc.

3.1.5.4 *Congelador*

Este equipo fue usado para almacenar a una temperatura de -20 °C con el fin de evitar la degradación de compuestos y conservar los siguientes elementos: las cepas trituradas con nitrógeno líquido, el ADN extraído de estas, los compuestos químicos necesarios para realizar la PCR y otros reactivos citados anteriormente.

3.1.5.5 Baño termostático

Para los compuestos que necesiten una temperatura concreta para su uso se utilizó un baño termostático, controlando la temperatura.

3.1.5.6 Centrifugadora

Este equipo fue usado cada vez que en los protocolos de extracción de ADN indicara una centrifugación. Se usó tanto a máxima potencia (13.000 rpm) como a 10.000 rpm. El tiempo de uso fue distinto en función de lo indicado por los protocolos.

3.1.5.7 Cámara de crecimiento

Para el crecimiento de las placas de Petri cultivadas en estático se usó una cámara de crecimiento en las que se controlaron las condiciones de crecimiento (temperatura, luz y humedad). Para los medios líquidos inoculados se usó la cámara de crecimiento del sótano del edificio de los Olivos, ya que estos debían mantenerse en agitación. En ambos casos las condiciones fueron: temperatura constante de 24 °C, humedad del 85% y en oscuridad.

3.1.5.8 Agitador orbital

El crecimiento de las cepas inoculadas en medio líquido se mantuvo en la cámara de crecimiento sobre un agitador orbital a 120 rpm, facilitando la aireación de los cultivos.

3.1.5.9 Agitador vórtex

Para la mezcla de soluciones en tubos de ensayo se usó este equipo.

3.1.5.10 Termociclador PTC-200

El termociclador PTC-200 (figura 22) se usó para realizar la PCR para la amplificación de la secuencia ITS del ADN.

Debido a que las reacciones incubadas en el aparato son soluciones acuosas el termociclador incluye una tapa calentada a temperatura constante para evitar la condensación de agua en las tapas de los tubos y evitar que los solutos se concentren.



Figura 22: Termociclador PT-200

3.1.5.11 Balanza

La balanza fue usada tanto para pesar la cantidad de PDA para los medios sólidos y PDB para los medios líquidos.

También se usó una balanza analítica digital, que puede medir en dos sistemas de unidades, en este caso se midió en gramos. La agarosa necesaria para realizar el gel de la electroforesis fue pesada con este tipo de balanza. Además, se pesaron tanto los tubos eppendorf vacíos como con la banda de gel de la electroforesis de interés para conocer la cantidad de *buffer* XP2 necesario para la extracción del ADN de estas bandas, ya que la diferencia de peso era la cantidad de dicho compuesto. Esta balanza presenta una incertidumbre de 0,0001 g (0,1 mg).

3.1.5.12 Equipo de revelado y visualización para electroforesis

Cuando se completó la electroforesis se usó este equipo para poder visualizar la separación de los ácidos nucleicos en el gel. El reactivo usado (*Red Safe*, ver punto 3.1.3.11) tenía propiedades fluorescentes por lo que se usó un equipo de luz ultravioleta.

3.1.6 MATERIAL DE LABORATORIO

Se usó tanto material de laboratorio estéril como no estéril. El material no estéril (tabla 8) usado fue, por ejemplo:

Tabla 8: Material no estéril necesario

Vasos de precipitados	Moscas
Bombona de nitrógeno líquido	Termo para nitrógeno líquido
Gradillas	Jarra de metal para nitrógeno líquido
Bombona de gas	Guantes de oso
Cubetas de electroforesis	Erlenmeyers de 250 mL

El material de laboratorio estéril (tabla 9) necesario fue:

Tabla 9: Material estéril necesario

Tela de filtro Miracloth	Asa de siembra
Embudos	Pinzas
Morteros	Bisturí
Tubos Falcon	Cucharillas
Tubos eppendorf	Micropipetas
Placas de Petri	Puntas de pipeta

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS PDA

Todos los medios de cultivos sólidos usados fueron de PDA distribuidos en placas de Petri de tamaño tanto de 90 mm como de 55 mm de diámetro (ver punto 3.1.2.1).

3.2.1.1 Preparación de los medios de cultivo sólidos PDA

Para la preparación del medio sólido se incorporó en 1 L de agua destilada, 39 g de PDA. Cuando la solución estaba completamente disuelta se esterilizó en autoclave (121 °C, durante 20 min a una presión de 1 atm). Una vez la temperatura del medio hubiese disminuido moderadamente, se adicionó 1 mL de ampicilina para así, obtener una concentración final de ampicilina en el medio de 100 mg/L.

Por último, se extendió en placas de Petri en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) y almacenadas en frigorífico a 4 °C.

3.2.1.2 Inoculación de los medios de cultivo sólidos PDA

A partir de los hongos citados en el punto 3.1.1 se inocularon en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) tres placas de Petri de 90 mm de diámetro que fueron identificadas con el nombre de la especie y la fecha de inoculación. Cada vez que el bisturí entraba en contacto con el hongo o la superficie de la campana se volvía a esterilizar mediante un mechero para evitar contaminaciones cruzadas.

Las inoculaciones se realizaron de formas distintas para intentar evitar contaminaciones procedentes de esporas de otros hongos, bacterias, etc. Una de ellas, fue recoger partes internas del cuerpo fructífero. También se mantuvo a los hongos en lejía rebajada en agua para esterilizar su superficie. Esto conllevaba el riesgo de que también muriera el hongo. Por último, se aplicaron baños de etanol y agua, también para esterilizar la superficie del hongo.

En el centro de cada placa de Petri se colocó un solo trozo del hongo y se introdujeron en cámaras de crecimiento estáticas en unas condiciones de 24 °C, 85% de humedad y oscuridad.

3.2.1.3 Aislado de las cepas

El aislado fue llevado a cabo tras el tiempo que le tomó al hongo colonizar la placa de Petri previamente cultivada que, en función del hongo y las condiciones, podría variar entre 5-7 días aproximadamente.

De cada placa previamente cultivada se traspasaron tres fragmentos cuadrados de la parte más externa del cultivo, ya que son los que más actividad presentan. Cada uno de estos fragmentos se colocó en una placa de Petri de 55 mm de diámetro obteniendo así tres placas de Petri por cada cultivo previo de 90 mm de diámetro. Todo esto en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar). Además, en cada traspaso de fragmento, de una placa a otra, se esterilizó el asa de siembra con el mechero para evitar contaminaciones cruzadas. Todas las placas de Petri usadas para el aislado fueron identificadas con el nombre de la especie aislada y la fecha de realización.

El aislamiento de las cepas se realizó para asegurar que en dichas placas solo crecía un hongo. Así al realizar la secuenciación de los ITS e identificar la especie, tener su cepa aislada para posteriores estudios o investigaciones.

3.2.2 MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS PDB

Todos los medios de cultivo líquidos fueron de PDB contenidos en erlenmeyers de 250 mL (ver punto 3.1.2.2).

3.2.2.1 Preparación de los medios de cultivo líquidos PDB

Para la preparación del medio líquido se añadieron a 1 L de agua destilada, 24 g de PDB. El medio, una vez disuelto completamente, se colocó en erlenmeyers de 250 mL con tapón de algodón sintético y papel de aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min a una presión de 1 atm. Tras el autoclavado, se dejó enfriar antes de realizar la inoculación.

3.2.2.2 Inoculación de los medios de cultivo líquidos PDB

Tras el tiempo en que las cepas colonizaron las placas de Petri se llevó la inoculación de los medios de cultivo líquidos de PDB.

Por cada cepa se inocularon dos erlenmeyer de 250 mL que fueron identificados con el nombre de la especie y fecha de inoculación. Cada erlenmeyer fue inoculado con tres inóculos procedentes de la misma placa. Esto se realizó en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) para evitar las contaminaciones de las muestras. El asa de siembra se esterilizó las veces que fue necesario mediante el mechero.

Una vez fueron inoculados los erlenmeyers, se taparon con un tapón de algodón sintético y papel de aluminio. Después se introdujeron en cámaras de crecimiento y en agitación, con una temperatura de 24 °C, 120 rpm, 85% humedad y oscuridad.

3.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE MICELIO

Para la posterior extracción de ADN, fue necesario preparar las muestras de micelio de las cepas, por ello se congelaron con nitrógeno líquido y se machacaron hasta conseguir un polvo.

En primer lugar, los duplicados de las cepas recogidos en erlenmeyers se filtraron juntos a través de un embudo y tela de filtro Miracloth autoclavados. El micelio quedó en la tela de filtro Miracloth y, tras escurrirlo, se procedió a su congelación mediante nitrógeno líquido.

Dicha congelación se realizó por separado para cada cepa. Los micelios de las cepas se echaron en pequeños tamaños en morteros autoclavados e independientes y, posteriormente, se echó nitrógeno líquido. Con la ayuda de la mano del mortero o mazo, se machacó el micelio hasta obtener polvo alternando la adición de más nitrógeno líquido para evitar que se descongelara.

Una vez obtenido el polvo de cada cepa, se introdujeron respectivamente en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente congelados con nitrógeno líquido. Además fueron identificados con el nombre de la cepa. Conforme las muestras fueron preparándose se introdujeron en un termo con nitrógeno líquido para evitar la descongelación de estas.

Por último, todas las muestras de las distintas cepas fueron almacenadas en un congelador a -20 °C.

3.2.4 EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN de cada muestra se realizó mediante E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit. El protocolo a seguir fue el indicado por el fabricante para muestras de tejidos congeladas.

Antes de empezar, se preparó el DNA *wash buffer*. Para ello, se diluyó con etanol como indicaba el protocolo. Además, se preparó un baño termostático a 65 °C para precalentar tanto el agua desionizada estéril y el *elution buffer*. También, se dispuso de una caja con hielo.

Por último, se dejaron preparados e identificados de forma adecuada los tubos eppendorf y los *HiBlind® DNA Mini Column* necesarios.

A continuación, se siguieron las indicaciones del fabricante que se describen brevemente:

- Colocar 100 mg de micelio pulverizado congelado en un tubo eppendorf de 1,5 mL y añadir inmediatamente 600 µL de FG1 *Buffer* y vortexear. Este tampón tiene como función la lisis de las membranas para que así, el ADN salga al exterior
- Durante 10 min incubar a 65 °C y vortexear un par de veces durante este tiempo
- Adicionar 140 µL de FG2 *Buffer*, vortexear y dejar en el hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, centrifugar a 10.000 x g durante 10 min
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf con cuidado de no recoger precipitado
- Adicionar 0,7 volúmenes de isopropanol al nuevo tubo eppendorf y vortexear. En este punto, el ADN precipitará debido a su polaridad ya que el isopropanol es apolar y no se disuelve en él. Inmediatamente, centrifugar a 10.000 x g durante 2 min
- Aspirar y descartar el sobrenadante e invertir el tubo eppendorf en una toalla de papel durante 1 min para drenar el líquido residual
- Adicionar al tubo eppendorf 300 µL de agua desionizada estéril precalentada a 65 °C ya que esta tendrá un pH más adecuado y vortexear
- Añadir 4 µL de RNAsa A para destruir el ARN que quede y vortexear
- Añadir 150 µL de FG3 *Buffer* y 300 µL de etanol al 100% y volver a vortexear. Insertar un *HiBlind® DNA Mini Column* en un tubo de recogida
- Transferir las muestras enteras a los *HiBlind® DNA Mini Column* y centrifugar a 10.000 x g durante 1 min, descartar el filtrado y sustituir el tubo de recogida
- Añadir 750 µL de *Wash Buffer* para limpiar el ADN, centrifugar a 10.000 x g durante 1 min, y descartar el filtrado. Repetir este paso para un segundo lavado
- Centrifugar el *HiBlind® DNA Mini Column* vacío a velocidad máxima durante 2 min para secar la membrana. Así, se eliminará cualquier traza de etanol que, posteriormente, podría interferir
- Introducir el *HiBlind® DNA Mini Column* en un tubo eppendorf y adicionar el *Elution Buffer* precalentado a 65 °C. Incubar durante 3 ó 5 min
- Centrifugar a 10.000 x g durante 1 min y repetir el paso anterior y este
- Almacenar el tubo eppendorf, donde se encuentra el ADN, a -20 °C

3.2.5 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Tras las extracciones siempre se cuantificó el ADN contenido en las muestras para asegurar que el ADN extraído, estaba lo suficientemente puro y en cantidad suficiente antes de realizar la PCR. Para ello se usó un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Según el protocolo de Desjardins y Conklin (2010), se deben seguir los siguientes pasos que fueron los realizados:

- Limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema con agua desionizada
- Abrir el software NanoDrop y seleccionar la aplicación de ácidos nucleicos. Se recoge 1 μL con una pipeta calibrada y se coloca en la superficie óptica inferior. Bajar el brazo de la palanca y seleccionar “En blanco”. El compuesto usado para realizar el blanco debería ser del mismo pH o similar que el de la solución de la muestra ya que podría dar en las mediciones ratios equivocados. En este caso se usó el *Elution Buffer*
- Una vez medido el blanco, limpiar las superficies ópticas y seguir el mismo procedimiento que con el blanco, pero con las muestras. Seleccionar en el software “medida”. Después de realizar la medición, revisar el espectro de medida
- Este software calcula automáticamente los coeficientes de concentración y pureza del ácido nucleico. Los datos a recoger son: la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$), las absorbancias en una longitud de onda de 260 nm y 280 nm y los ratios 260/280 y 260/230

Conociendo las concentraciones y las absorbancias dadas por NanoDrop, se evaluó cada muestra para conocer la aptitud de cada una de ellas para seguir con el procedimiento. También ayudó a conocer si era necesario realizar concentraciones o diluciones en función de la concentración final necesaria. Estas cuantificaciones se realizaron siempre tras la extracción del ADN de las muestras y del gel de agarosa tras la electroforesis.

3.2.6 PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR se realizó para amplificar la región ITS o *Internal Transcribed Spacer*. En el caso de los hongos, dicha región tiene un tamaño de entre 600 y 800 bp (Gardes y Bruns, 1993).

En este caso, se llevaron a cabo dos reacciones distintas en tubos independientes por cada muestra de ADN; una para identificar todo tipo de hongos, y otra, para la identificación solo de basidiomicetos. Se usó el *primer forward* ITS1-F en ambas reacciones ya que es común en todos los hongos. Además, se usaron dos *primers reverse* diferentes en cada reacción. En una el *primer reverse* ITS4 (para todos los hongos) y en otra el ITS4-B (solo para basidiomicetos). Los fragmentos obtenidos en la reacción con el ITS4 fueron de un tamaño de 700 bp y los obtenidos con el ITS 4B de 800 bp, aproximadamente.

Para llevar a cabo las dos reacciones distintas, se elaboraron dos mastermix, denominado así al conjunto de productos necesarios para que se lleve a cabo la PCR. Su composición se indica en la tabla 10.

Tabla 10: Composición de la mastermix

Compuesto	Cantidad (μL)
H ₂ O ultrapura estéril	17,8
MgCl ₂ [50 mM]	1
<i>Buffer</i>	2,5
dNTPs [40 mM]	0,5
<i>Primer FW</i> [10 μM]	1
<i>Primer RV</i> [10 μM]	1
BioTaq (0,2 u/ μL)	0,2

La diferencia entre ellas fueron los *primers RV* usados ya que en una solo se añadió el ITS4 mientras que en la otra el ITS4-B. A la mastermix para todos los hongos o *all fungi* se le denominó con una A (ITS4) y a la de basidiomicetos con una B (ITS4-B) para poder ser identificadas de forma más simple.

La composición básica de cada mastermix, que se muestra en la tabla 10, se debió multiplicar por el número de muestras a analizar más el blanco antes de comenzar a realizarla. De este modo, se obtuvo cada mastermix, A y B, con toda la cantidad total requerida que, posteriormente, se repartió en cada tubo de PCR donde se realizaría la reacción.

Por cada tubo de PCR se añadió 24 μL de la mastermix correspondiente. Después, se les añadió a todas 1 μL del ADN de la muestra. Las marcadas como blanco estaban formadas únicamente por 24 μL de mastermix y 1 μL de agua esterilizada. Cabe destacar que la concentración de ácidos nucleicos en las muestras ideal para la reacción es de aproximadamente 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. En función de los resultados obtenidos en la cuantificación, se llevaron a cabo las correspondientes diluciones o concentraciones.

Cada tubo de PCR fue identificado también en función de la mastermix que se le añadió, de tal forma que había tubos A y B, además de su identificador de la especie de hongo que se creía que era.

Por último, todos estos tubos se introdujeron en el termociclador con el programa ITS-BAS en donde los ciclos eran:

- 1° Ciclo a 94 °C durante 1 min 30 s
- 2° Ciclo a 95 °C durante 30 s
- 3° Ciclo a 55 °C durante 55 s
- 4° Ciclo a 72 °C durante 1 min
- 5° Repetición del paso 2° al 4°, 34 veces
- 6° Ciclo a 72 °C durante 10 min
- 7° Ciclo a 4 °C durante 16 h (en este paso se da por finalizada la PCR)

3.2.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis. Para ello, se elaboró un gel mediano de agarosa al 1% (p/v) (tabla 11) en *buffer* amortiguador TAE 1 x (ver punto 3.1.3.10) en el que se colocó un peine estándar. La formulación del gel se muestra en la tabla 4. Se añadió el TAE 1 x en un erlenmeyer de 250 mL con la agarosa y se calentó hasta que ésta se diluyera. Cuando la temperatura de la disolución disminuyó, se adicionó el *Red Safe*, la mezcla se vertió al portageles con el peine puesto y se dejó solidificar (20 min aproximadamente). Una vez solidificado, se retiró el peine y se introdujo en la cubeta de electroforesis. A continuación, se cubrió todo el gel con el *buffer* amortiguador TAE 1 x.

Tabla 11: Formulación del gel de agarosa al 1%

Componente	
TAE 1 x	140 mL
Agarosa	1,4 g
<i>Red Safe</i>	7 μL

Los pocillos del gel se colocaron en el cátodo de la cubeta (color negro) ya que el ADN es negativo. Así, una vez que el gel es cargado con las muestras de ADN y se aplica la corriente, correrá hacia el ánodo (color rojo).

En el primer pocillo del gel, se depositó 25 µL de *marker* de 100-1000 pb previamente preparado (ver punto 3.1.3.13). A continuación, a cada una de las muestras se le adicionó 5 µL de *buffer* de carga de color azul y se depositaron en el resto de los pocillos (ver punto 3.1.3.12).

Cabe destacar que previamente a la carga del gel, los productos de la PCR fueron precalentados a 65 °C durante 5 min e incubadas en hielo durante 3 min para desnaturalizar las hebras de ADN, al igual que en el caso del *marker*.

Se conectó la cámara de electroforesis y se aplicó un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 1 h. Una vez terminada la migración, se retiró el gel y se examinó con luz UV para ser fotografiado y poder observar los resultados. Se extrajeron las bandas de interés para obtener su ADN y enviarlo a secuenciar.

3.2.8 EXTRACCIÓN DEL ADN DEL GEL DE AGAROSA

Las bandas de gel obtenidas tras la electroforesis se sometieron a otra extracción de ADN para poder enviar los fragmentos de los ITS a secuenciar posteriormente. Para ello se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante de E.Z.N.A ® Gel Extraction Kit.

Antes de comenzar, se preparó un baño de agua a 60 °C. Se prepararon los *HiBlind® DNA Mini Column* y tubos eppendorf de 1,5 mL correctamente identificados necesarios. El *SPW Wash Buffer* se acondicionó de acuerdo con las instrucciones: diluir en etanol al 96-100%. En resumen, el protocolo indicaba:

- Determinar el volumen de gel pesándolo en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para ello, se pesó primero el tubo vacío, con el gel y se hizo la diferencia de las masas. Asumir que la densidad del gel es de 1 g/mL. Añadir el mismo volumen de *Binding Buffer XP2*, por ejemplo: un gel con una masa de 0,3 g tendrá un volumen de 0,3 mL por lo que se le adicionará una cantidad de *buffer* de 0,3 mL. Por último, incubar la mezcla a 60 °C durante 7 min o hasta que se derrita. Cada dos minutos vortexear
- Colocar el *HiBlind® DNA Mini Column* en un tubo de recogida de 2 mL y añadir la solución de ADN -agarosa del paso anterior. Centrifugar a 10.000 x g durante 1 min. Retirar el líquido filtrado y colocar la columna en el tubo de recogida de nuevo
- Añadir 300 µL de *Binding Buffer XP2* a la columna, centrifugar a 13.000 x g durante 1 min y retirar el líquido filtrado. Usar el mismo tubo de recogida
- Añadir 700 µL de *SPW Wash Buffer* en la columna, centrifugar a 13.000 x g durante 1 min y retirar el líquido filtrado. Usar el mismo tubo de recogida. Opcionalmente este paso se puede repetir; además es recomendable para que el ADN tenga menos impurezas
- Centrifugar la columna vacía a velocidad máxima durante 1 min. para secar la matriz de la columna. Este paso es crítico para la eliminación de todo el etanol de la columna
- Introducir el *HiBlind® DNA Mini Column* en un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio. En función de la concentración final adicionar 30-50 µL de *Elution buffer* y mantenerlo durante 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 min a velocidad máxima para diluir el ADN. Esto representará el 70% el ADN total. Se puede realizar una segunda elución opcional arrastrará el ADN residual, aunque esta tendrá menor concentración que la primera.
- Almacenar las muestras de ADN a -20 °C

Una vez completado el protocolo se realizó la cuantificación del ADN de acuerdo con el punto 3.2.5.

3.2.9 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ITS

El ADN extraído de las bandas, correspondiente a los fragmentos de ITS de interés para poder identificar a las especies, fue enviado a secuenciar a Sistemas Genómicos®. Para ello se siguieron las instrucciones proporcionadas por la empresa secuenciadora. En resumen:

- Usar tubo eppendorf de 1,5 mL por cada reacción que se desee secuenciar.
- Rotular el nombre de la reacción en la tapa del tubo
- Añadir 2,5 µL de ADN en la concentración indicada en la tabla 12, en función del tamaño de la muestra. Si se desea utilizar un *primer* específico, añadir 3,5 µL del oligo a partir de una concentración 1 µM. Por último, añadir 13 µL de agua ultrapura estéril. En caso de querer utilizar un primer universal suministrado por la empresa, indicarlo y enviar solo ADN +agua (2,5 µL de ADN + 13 µL de agua)
- Todos los productos de PCR deben estar purificados

Tabla 12: Concentraciones requeridas ng/µL

ADN molde	Concentración requerida
ADN clonado	100 ng/µL
PCR hasta 1200 bp	10 ng/µL
PCR: 1200-3000 bp	25 ng/µL
Más de 3000 bp	50 ng/µL

En este caso, se usó una concentración de 10 ng/µL ya que los productos de la PCR eran de un tamaño de 700-800 pb. Cuando fue necesario el ADN se diluyó o concentró en función de la concentración de partida.

3.2.10 ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS CON BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) es un programa informático de alineamiento de secuencias de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la base de datos. Gracias a su uso, se mostró en todos los casos a que hongo pertenecía cada secuencia problema analizada pudiendo identificar de que género y especie de hongo se trataba.

El uso es sencillo. En primer lugar, se acudió a la página web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> y se selecciona la opción de *Nucleotide BLAST*. Después, se introdujo en la sección que indica *Enter query sequence* la secuencia y se seleccionó el botón “BLAST”.

Además, BLAST proporciona una serie de datos interesantes a la hora de evaluar la comparación. El valor de *Query cover*, aporta el porcentaje de la longitud de la secuencia introducida que se ha conseguido encontrar en la base de datos. El *E. value*, es un dato estadístico que representa cuanto se parece la secuencia problema con la que ha encontrado el software. Cuanto más se acerque a cero, más se parecerán ambas secuencias (significativo < 0,01). Por último, el *Ident.*, aporta el porcentaje de identidad que posee la secuencia de la base de datos dentro de la longitud que se ha encontrado.

4 RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN DEL ADN

Tras la extracción se llevó a cabo la determinación de pureza y cuantificación del ADN de las muestras mediante el equipo NanoDrop 2000. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 13.

Gracias a estos datos se puede determinar la aptitud de cada muestra extraída en función de la concentración y de las relaciones 260/280 y 260/230. Los valores de referencia que se toman como puros son: 1,8 y 2,0-2,2, respectivamente.

Tabla 13: Datos de determinación de pureza y cuantificación del ADN

Nombre	ng/μL	Absorbancia (nm)		Relación 260/280	Relación 260/230
		260	280		
<i>C. tubaeformis</i> (1)	1700,7	34,0	17,8	1,9	1,8
<i>C. lutescens</i>	127,2	2,5	1,4	1,8	1,6
<i>C. tubaeformis</i> (2)	97,6	1,9	1,0	2,0	2,1
<i>R. flava</i>	15,4	0,3	0,2	1,5	0,6
<i>Hydnellum spp.</i> (1)	34,9	0,7	0,4	1,9	1,4
<i>Hydnellum spp.</i> (2)	85,5	1,7	0,8	2,1	1,9
Hongo no identificado (1)	25,9	0,5	0,3	2,0	1,9
Hongo no identificado (2)	22,5	0,5	0,2	2,0	1,8

En el caso de la muestra de *C. tubaeformis* (1) se observó una elevada concentración, por lo que para la PCR posterior se realizó una dilución 1/10 para obtener una concentración de 10 ng/μL ya que es la necesaria para la PCR. Por un lado, la relación 260/280 indicó que el ADN extraído fue “puro” con respecto a contaminaciones por proteínas ya que presentó un valor superior a 1,8 (valor de referencia). Por otro lado, la relación 260/230 indicativa de otras contaminaciones, se acerca a los valores de referencia (2,0-2,2) por lo que también, en este aspecto fue “puro”.

En la muestra de *C. lutescens* se obtuvo una concentración mayor a la necesaria, por lo que también se realizó una dilución 1/10. La relación 260/280 presentó un valor correspondiente a un ADN “puro”. Además, la relación 260/230 presentó un valor un poco inferior a los valores de

referencia por lo que fue probable que existiese una pequeña contaminación por fenol o carbohidratos.

Con respecto a la muestra de *C. tubaeformis* (2) se obtuvo también una concentración mayor a la necesaria, por lo que se diluyó como las muestras anteriores. La relación 260/280 presentó un valor por encima del de referencia por lo que se determinó como una muestra “pura”. Además, la relación 260/230 estaba dentro de los valores por lo que se descartó contaminaciones de otras fuentes.

Acerca de la muestra de *R. flava* se obtuvo una concentración mucho menor que en los casos anteriores por lo que no se realizó ninguna dilución. Ambas relaciones resultaron inferiores a los valores de referencia. Debido a estos datos se consideró que dicha muestra presentaba contaminación por proteínas y por fenoles o carbohidratos de manera elevada, dejando en duda su aptitud para continuar con el procedimiento.

Las muestras de *Hydnellum spp.*, realizadas por duplicado, mostraron concentraciones diferentes. También se diluyeron. Con respecto a la relación 260/280 ambas muestras presentan valores similares al de referencia. Por otro lado, la relación 260/230 difiere un poco entre las muestras ya que la (1) presenta más contaminación que la (2) debido a que su valor se aleja al de referencia.

Por último, las muestras de hongo no identificado, también realizado por duplicado, mostraron concentraciones similares. Acerca de las relaciones 260/280 y 260/230, en ambos casos presentaron valores similares a los tomados como referencia.

En conclusión, la mayoría de las muestras presentaron una buena aptitud para seguir con el procedimiento. La única que presentó una menor aptitud es la muestra de *R. flava*. Sin embargo, se decidió que continuara también.

4.2 PCR Y ELECTROFORESIS

A continuación, se llevó a cabo la PCR y la electroforesis.

En todas las electroforesis en los carriles impares y en el control negativo (C-) se usó el par de *primers* ITS1-F/ITS4 para realizar la amplificación de la región común para todos los hongos. Por otro lado, en los carriles pares y en el control negativo prima (C'-) se usó el par de *primers* ITS1-F/ITS4-B para realizar la amplificación de la región de los hongos *Basidiomycota*.

La figura 23 muestra la primera electroforesis realizada con las muestras de *C. tubaeformis* (1) y *C. lutescens*.

Se representa el amplificado de la región ITS con una talla de 600-800 pb aproximadamente según el marcador molecular que se encuentra en el primer carril.

El amplificado de 700 pb de *C. lutescens* (carril 1) y de *C. tubaeformis* (1) (carril 3) indica que el ADN de las muestras son de hongo ya que en dichos casos se usó el par de *primers* para *all fungi*. Sin embargo, que en el carril 2 y 4 de *C. lutescens* y de *C. tubaeformis* (1) no exista amplificación indica que el ADN de las muestras es probable que no pertenezca a un hongo *Basidiomycota*.

En los carriles C- y C'- se observa que no hay amplificación por lo que ni en la reacción para *all fungi* ni en la de *Basidiomycota* hubo contaminaciones.

Las bandas de los carriles 1 y 3 fueron extraídas del gel y purificadas para ser enviadas a Sistemas Genómicos® y secuenciar la región ITS.

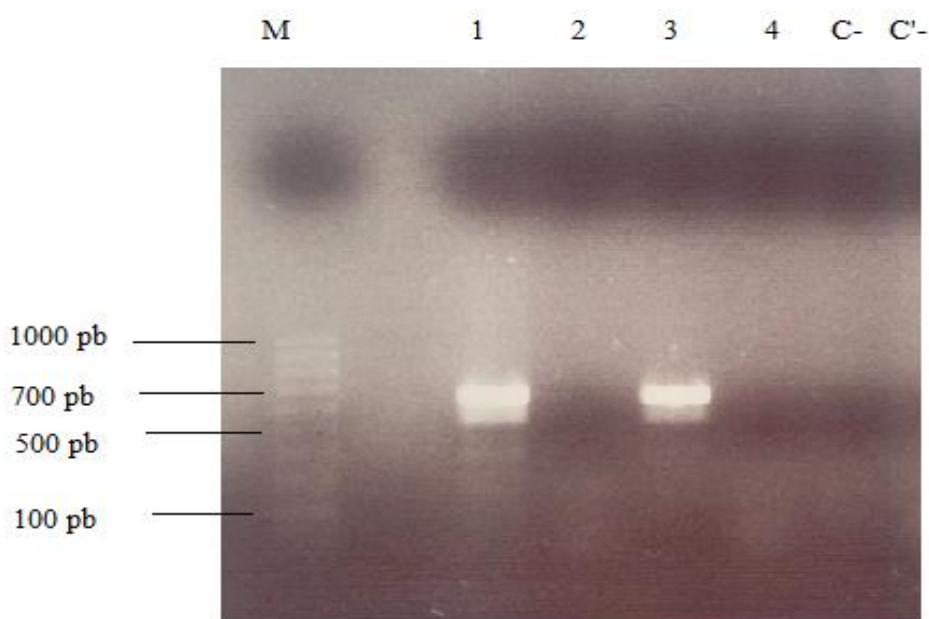


Figura 23: Separación electroforética I utilizando el par ITS1F/ITS4 y el par ITS1F/ITS4B. (M) marker (1) *C. lutescens* (2) *C. lutescens* (3) *C. tubaeformis*1 (4) *C. tubaeformis*1 (C- y C'-) Negativos.

La figura 24 muestra la segunda electroforesis realizada con las muestras de *C. tubaeformis* (2) y *R. flava*.

Se representa el amplificado de la región ITS con una talla de 500-800 pb aproximadamente según el marcador molecular que se encuentra en el primer carril.

El amplificado de 700 pb aproximadamente de *R. flava* y de *C. tubaeformis* (2) del carril 1 y 3 indican que el ADN de las muestras son de hongo ya que en dichos casos se usó el par para *all fungi*. Sin embargo, las amplificaciones extrañas del carril 2, 4 y C'- muestran problemas durante la PCR.

En primer lugar, en el carril 2 de la muestra de *R. flava* aparecen dos amplificaciones por lo que es probable que en dicha reacción hubiese más de un ADN molde. La doble amplificación puede ser debida a una contaminación. Esto se justifica con el amplicón que aparece en el carril C'- (negativo para *Basidiomycota*). Cabe destacar que una de ellas presenta un tamaño de 800 pb por lo que podría tratarse de un hongo *Basidiomycota*.

Además, en el mismo carril 2 se puede observar que las bandas están extendidas. Este hecho puede asociarse a que: el ADN de la muestra este degradado por acción de nucleasas, el ADN presenta un alto contenido en sales o proteínas, o que el ADN podría estar desnaturalizado entre otras causas. La causa más razonable en este caso es que la muestra estaba bastante contaminada por proteínas y compuesto fenólicos o carbohidratos como se observó en la determinación de pureza y cuantificación previamente.

En segundo lugar, en el carril 4 de la muestra *C. tubaeformis* (2) la banda es muy débil. Este problema puede ser debido a que el ADN de la muestra se ha degradado.

La banda del carril 1, las dos que aparecen en el carril 2 y la del 3 fueron extraídas del gel y purificadas para ser enviadas a Sistemas Genómicos® y secuenciar la región ITS.

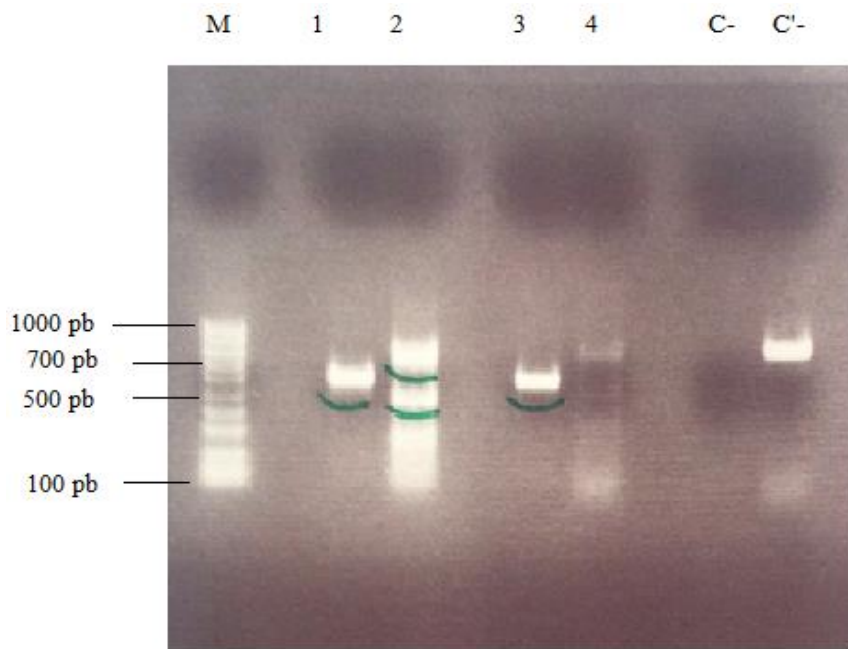


Figura 24: Separación electroforética II utilizando el par ITS1F/ITS4 y el par ITS1F/ITS4B. (M) marker (1) *R. flava* (2) *R. flava* (3) *C. tubaeformis*2 (4) *C. tubaeformis*2 (C- y C'-) Negativos

En la figura 25 se observa la última electroforesis realizada con las muestras de *Hydnellum spp.* y del hongo no identificado.

Como C+ se usó ADN de la muestra de *C. tubaeformis* (2). Su amplificado indica que la reacción de PCR ocurrió correctamente. Sin embargo, el amplificado que se muestra en el C'- (negativo para *Basidiomycota*) indica que se produjeron contaminaciones durante el proceso.

Se representa el amplificado de la región ITS con tallas diversas según el marcador molecular. Son amplificaciones de 900, 700 y 500 pb, aproximadamente.

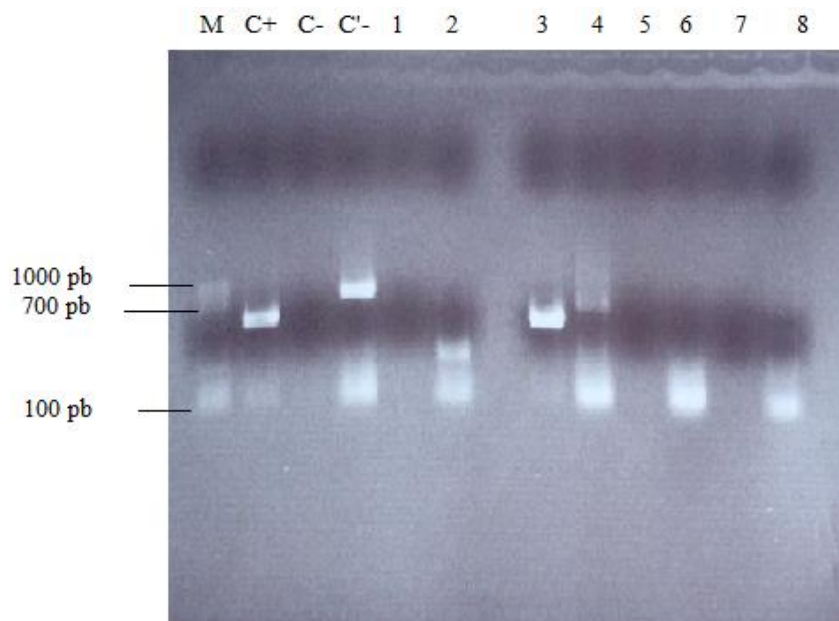


Figura 25: Separación electroforética III. utilizando el par ITS1F/ITS4 y el par ITS1F/ITS4B. (M) marker (C+) positivo (C- y C'-) negativos (1, 2, 3 y 4) *Hydnellum spp.* (5, 6, 7 y 8) hongo no identificado

En los carriles de *Hydnellum spp.* se observa que en el carril 1 no se produjo amplificación. Este problema puede ser debido a una baja concentración de ADN en la muestra. En el carril 2 y 3, aparece amplificación de unos 500 pb y 600 pb, respectivamente. Esto hace que sea probable que el ADN de la muestra, pertenezca a un hongo *Basidiomycota* ya que se ha producido amplificación de las dos regiones. Tanto de todos los hongos como la de *Basidiomycota*. Sin embargo, el tamaño de estas no concuerda con el de hongos *Basidiomycota*. Por último, en el carril 4 aparece una amplificación muy débil y difusa. Esto puede ser ocasionado por una degradación del ADN de la muestra.

En los carriles del hongo no identificado no aparece amplificación o se muestra bandas extendidas. Esto puede ser debido a que las muestras de ADN de estos carriles se han degradado por acción de nucleasas, que el ADN se ha degradado o que estaba superenrollado.

Las bandas de los carriles C'-, 2, 3 y 4 fueron extraídas del gel y purificadas para ser enviadas a Sistemas Genómicos® y secuenciar la región ITS.

4.3 SECUENCIAS ITS OBTENIDAS

Las muestras extraídas y purificadas tras la electroforesis fueron enviadas a Sistemas Genómicos® para conocer la secuencia de la región ITS. Los resultados fueron los siguientes:

- En el caso de la muestra extraída del carril 1 de *C. lutescens*, la secuencia ITS fue:

```

NNNNNNNNNNNCTCGTNGGNGACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTAT
GTGAACGTTACCAAAATGTTGCCTCGGCGGGGAATTTATTCATGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGAC
CAAGGCGCCCGCCGAGGACCAACCAAAACTCTTTTGTATGTCCCCTCGCGGACTTTTATAATTCTGAA
CCATCTCGGCGCCCTTTCGGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAACGAAATGNGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGCATCATCGAA
CCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTC
GAACCCCTCCGGGGGTACGGAGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAACACAGNGGCGG
TCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTATTTTGTATCCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGT
AAAACACCCAACCTTCTGAAATGTGGACGCACGACCTTGTATATAATATTCTCTGAATTCATNACCGAGT
GAAGGGTTGATTACTTTTCTCTATTATACACTATATAATAACAGAGTCTTTCTTTATCTATCTGCTCTC
TTCNCCTTTTATATTTTTTTTTTTCTTTTTCTCGTCCTTGGCGTAGGGGAGACGAAAAAGNNTAAAGTAG
TATTTTTATTATTTACTTTTTNTTTTTATTTTTCTTTATTATACTATTACCTCTTTATTTNTNGATTGCT
NNNTNNT

```

Tras introducir dicha secuencia en BLAST se obtuvo, mediante comparación de la secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias de la base de datos, que se trataba de *Trichoderma polysporum*.

Además, se obtuvieron los datos de la tabla 14 siendo el más relevante el *E. value* ya que cuanto menor sea más significativo es el alineamiento como es en este caso.

Tabla 14: Datos obtenidos en BLAST (*Trichoderma polysporum*) I

<i>Query cover</i>	65%
<i>E. value</i>	0,0
<i>Ident.</i>	97%

- En el caso de la muestra extraída del carril 3 de *C. tubaeformis* (1), la secuencia ITS fue:

```

NNNNNNNNNNNCTCCGTNGGTGANNGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTA
TGTGAACGTTACCAAAATGTTGCCTCGGCGGGGAATTTATTCATGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGAC
CCAAGGCGCCCGCCGAGGAGCAACCACTCCTTNTGTATGCCCCCTCGCGGACTTTTATAATTGAGA
ACACTCACGGCGCCCTTGAGGGCGTTTCGAAAATGAATCATCAANTTCTGCAANGGATNTTTTGGTTC

```

TGGTATTGAGGTNCAATTCAGAGTATTCCACCAAGTCTGTGTTTTCCNTGACGTCACCGAAACAATAAA
 NCNTTCATCNNTTCCTTTTTGTGGCCGNACTTTACCTCNTCTTGCAGCTTAAAACTTACNGCAATCCAAA
 TTTTGAATTTNTTTTTTAAATCNTTTTAATCGACCTGTNCCGACTCTTCCTCCTGTACCTN

Tras introducir en BLAST se obtuvo que la secuencia problema pertenecía a *Trichoderma polysporum* (figura 26), como en el caso anterior.

Los datos obtenidos se representan en la tabla 15. Se puede observar que el porcentaje de la longitud de la secuencia introducida que se ha conseguido encontrar en la base de datos es baja. Sin embargo, el alineamiento es significativo ya que *E. value* es menor que 0,01.

Tabla 15: Datos obtenidos en BLAST (*Trichoderma polysporum*) II

<i>Query cover</i>	55%
<i>E. value</i>	2e-97
<i>Ident.</i>	91%

Su clasificación científica es:

- División *Ascomycota*
- Clase *Sordariomycetes*
- Orden *Hypocreales*
- Familia *Hypocreaceae*
- Género *Trichoderma*

Según Rincon (2012), las especies del género *Trichoderma* son hongos filamentosos fundamentalmente por su capacidad antagonista con otros hongos. Además, posee la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y, más recientemente descubierto, de colonizar las raíces de las mismas provocando la inducción de su sistema de defensa. Por ello, es un hongo utilizado como agente de control biológico contra hongos fitopatógenos de gran importancia en la agricultura.



Figura 26: *Trichoderma polysporum*, (Wikipedia, s.f.)

Además, es un excelente productor de celulasas y otras enzimas hidrolíticas de alto valor añadido en la industria alimentaria, papelera, textil y para la producción de etanol. También producen antibióticos y otros metabolitos secundarios como saborizantes. Estos últimos útiles en la industria alimentaria. Por último, debido a su gran diversidad metabólica es capaz de degradar algunos insecticidas y fijar metales pesados siendo útil para la biorremediación de contaminantes en el medio ambiente.

Cabe destacar que presentan alta velocidad de crecimiento. Son muy agresivos con respecto a la competencia por espacio, inhibiendo el crecimiento de otros hongos (Romero, Huera, Damián, Domínguez y Arellano, 2009). Además, *Trichoderma spp.* es un hongo que se encuentra en todo tipo de suelos (Harman, Howell, Viterbo, Chet y Lorito, 2004).

- Con respecto a la muestra extraída del carril 1 de *R. flava*, la secuencia ITS fue:

```
NNNNNNNNNNNCTCNTTGGTGACCNCGCGGAGGGATCATTACAGAGTTATACAACCTCCCATACCATCTG
TTAACCTACCCAGTTATGCCTCGGCGTAAGCTCGGTTGGAGGCACCTGCAGCTACCCTGTAGTTGCGGA
CTGCCAACTCCAGCCGCGGCCCGCGGGTACACTAAACTCTGTTTTATTTATATTCTGAGCGTCTTA
TTTTAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATCAGT
ATTCTGGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTATCTTANTGTTGGGAATCTGCTG
TACTGCATTTCTTAAAGACAGTGGCGGATCGGCGGTAGTCCTCCGATCGTATTACCTTATTCCTCGCTT
TTGCCANGCCCCGCCCTCCCTCCTTAATCCT
```

Tras el análisis con BLAST se obtuvo que la muestra de ADN se trataba de *Arthrimum spp.* (figura 27).

Con los datos de la tabla 16 se puede concluir que BLAST ha conseguido encontrar el 95% de la longitud de la secuencia problema. Este valor es más elevado que en los casos anteriores. Además, de presentar un valor de alineamiento significativo e identificación elevado.

Tabla 16: Datos obtenidos en BLAST (*Arthrimum spp.*)

<i>Query cover</i>	95%
<i>E. value</i>	0,0
<i>Ident.</i>	97%

La clasificación de este hongo es:

- División *Ascomycota*
- Clase *Sordariomycetes*
- Orden *Incertae sedis*
- Familia *Apiosporaceae*
- Género *Arthrimum*

Crous y Groenewald (2013) definen el género *Arthrimum* como un hongo muy extendido y muy diverso ecológicamente. Se presenta como saprótrofo en pastos y también en hojas, tallos y raíces de muchas plantas. Además, algunas de sus especies son patógenas de plantas como puede ser *A. arundinis* que produce el tizón de la cebada. También es endófito en tejidos vegetales, de líquenes y algas marinas. Es decir, viven en el interior del organismo sin importar el tipo de relación que existe entre ellos.

Algunas especies son consideradas causantes de una forma de intoxicación alimentaria aguda denominada “intoxicación por la caña de azúcar mohosa”. Estos producen un metabolito secundario denominado ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) (Peraica, Radic, Lucic y Pavlovic, 1999). En concreto, *A. phaeospermum* causa infecciones en humanos (Crous y Groenewald, 2013).

Un aspecto importante de este género es que algunos aislados de *Arthrimum* producen una amplia gama de metabolitos interesantes en cultivos. Algunos de ellos presentan toxicidad aguda contra cánceres humanos. Otros pueden inhibir el crecimiento de una amplia gama de hongos filamentosos, levaduras y bacterias patógenas para los humanos (Crous y Groenewald, 2013).



Figura 27: *Arthrimum* spp., (Mycportal, s.f.)

- Por otro lado, las muestras extraídas del carril 2 de *R. flava* fueron secuenciadas.

En el caso del fragmento de una longitud de 700 pb aproximadamente la secuencia ITS fue:

```
CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNTNNNNNGCTTCNANTCCCANACCTGTCAANCTTGACCACCACC
ATGACGGCTGCTGCTNCNTTGTAAAGCACGG
```

En el caso del fragmento de longitud de 500 pb aproximadamente la secuencia ITS fue: NNNNN.

Por desgracia, tras la comparación, BLAST no pudo aportar resultados debido a que las secuencias no aportaban gran información debido a su corto tamaño y a su falta de bases nitrogenadas. Esto era esperable ya que, previamente, en la determinación de pureza y cuantificación se observó que la muestra de ADN no tenía una gran aptitud para seguir con el procedimiento debido a que estaba muy contaminada y no era “pura”. Afirmación que se justificó, también, en la electroforesis ya que apareció la banda muy extendida, problema que aparece por contaminaciones de la muestra con sales o proteínas.

- La secuencia ITS de la muestra extraída del carril 3 de *C. tubaeformis* (2) fue:

```
NNNNNNNGNNTCGTTGGTGACNNCGGANGGATCATTAAGAGTGTAATAACTCCCAAACCCATGTGAA
CATACCTCATGTTGCCTCGGCAGGTCGCGCCTCCCTCGTAGGCCCTACCCCGTAGGCTCCTACGCGGAA
GGCGCGGGTACCCCTGCCGGTGGCCACGAAACTCTGTCTCATCGTTGAATTCTGAACCTATAACTAAA
TAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCCCATTAGTATTCTA
GTGGGCATGCCTGTTCAAGCGTCATTTACCCCTTAAGCCCTTGTTGCTTACCGTTGGGAGCCTACGGCA
CCGTAGCTCCCAAAGTCAGTGGCGGAGCCGGCTCACACTCTGCACGTAGTAATTACTIONACTCACCTCGCCTA
TCGTTGGACCGGTCCCTGCCGTAATNGCC
```

Tras introducir en BLAST se obtuvo que la secuencia problema pertenecía a *Nemania diffusa* (figura 28).

Los datos proporcionados por BLAST se observan en la tabla 17. Los valores obtenidos son similares a los obtenidos en la tabla 16, siendo los porcentajes muy elevados y con un alineamiento significativo.

Tabla 17: Datos obtenidos en BLAST (*Nemania diffusa*)

<i>Query cover</i>	96%
<i>E. value</i>	0,0
<i>Ident.</i>	98%

La clasificación de este hongo es:

- División *Ascomycota*
- Clase *Sordariomycetes*
- Orden *Xylariales*
- Familia *Xylariaceae*
- Género *Nemania*

Según Davis, Franklin, Shaw y Vilgalys (2003), las especies del género *Nemania* son habitantes comunes de la madera (en concreto de angiospermas) especialmente en avanzado estado de descomposición. Es por ello que se consideran saprótrofos. En los últimos años se ha visto que este género de hongo es endófito de plantas. Se demostró que algunas especies de *Nemania* habitaban los follajes de *Pseudotsuga menziessi* (Abeto de Douglas). Por esta razón fueron denominados “Ascomicetos forrajeros”. Por último, estos hongos pueden invadir a sus huéspedes sin activar su sistema de defensa para así, reducir la actividad celulolíticas y lignolíticas del hongo.



Figura 28: *Nemania diffusa*, (Aranzadi, s.f.)

- La secuencia ITS de la muestra extraída del carril 2 de *Hydnellum spp.* fue:

```
CNNNNNNNNNNNNNGNNTNCGTNGCTGNNGGTATAANTAGCTAGATGGCAGTCTAGATCCAGTCCNT  
TACTCNAGTACACNAAAAGGGGTCACCGCA
```

Debido a su pequeña longitud y elevada falta de bases nitrogenadas BLAST no pudo identificar dicha secuencia.

- La secuencia ITS de la muestra extraída del carril 3 de *Hydnellum spp.* fue:

```
NNNNNNNNNNNCTNCGTTGGTGACANCGGAGGGATCATTACCAGAGGTTTACAACCTCCCAAACCCCTG  
TGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCCGCCAGAGG  
ACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAA  
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCAATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT  
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTCAAGC  
GTCATTTCAACCCTCAA
```

Tras introducir en BLAST se obtuvo que la secuencia problema pertenecía a *Fusarium spp.* (figura 29).

Los datos de la tabla 18 aportan unos porcentajes muy elevados. El porcentaje de identidad es el más elevado hasta el momento, es decir, entre la secuencia problema y la secuencia de la base de datos, a falta de 1%, son idénticas.

Tabla 18: Datos obtenidos en BLAST (*Fusarium spp.*)

<i>Query cover</i>	96%
<i>E. value</i>	2e-171
<i>Ident.</i>	99%



Figura 29: *Fusarium spp.* (Mycology Online, s.f.)

- La secuencia ITS de la muestra extraída del carril 4 de *Hydnellum spp.* fue:

NNNNNNNNNNNNNNNTNNTTGGTGACCNGCGGANGGACATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCC
TGTGAACATACCTTNNNTNNGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCGGCC

Tras introducir en BLAST se obtuvo que la secuencia problema pertenecía a *Fusarium avenaceum*.

Los datos de la tabla 19 concluyen que BLAST ha conseguido encontrar el 84% de la longitud de la secuencia problema con un porcentaje de identidad elevado. Además, de presentar un valor de alineamiento significativo ya que es menor que 0,01.

Tabla 19: Datos obtenidos en BLAST (*Fusarium avenaceum*)

<i>Query cover</i>	84%
<i>E. value</i>	2e-41
<i>Ident.</i>	93%

La clasificación de estos dos últimos hongos es:

- División *Ascomycot*
- Clase *Sordariomycete*
- Orden *Hycocreale*
- Familia *Nectriaceae*
- Género *Fusarium*.

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Algunas especies de *Fusarium* descritas, producen toxinas que afectan al hombre (Tapia y Amaro, 2014).

En concreto, la especie *Fusarium venenatum*, es usada para producir un producto proteico elaborado para vegetarianos denominado “Quorn”. La elaboración se realiza en grandes tanques de fermentación donde se cultiva el hongo. La micoproteína resultante es tratada con calor para

eliminar el ARN y las purinas, evitando que se metabolicen en ácido úrico en el cuerpo humano. Después, el producto se seca y se mezcla con albúmina de huevo rehidratada, actuando como aglutinante, y condimentos, dándole características organolépticas semejantes a la carne picada. Por último, se asigna su forma definitiva, se cocina y congela para darle la textura adecuada (Burde, 2015).



Figura 30: *Fusarium avenaceum* cultivada en el laboratorio

Sin embargo, la especie del hongo identificado en el laboratorio (figura 31) se trataba de un hongo fitopatógeno y saprófito que causa grandes pérdidas en los cultivos y en la post-cosecha de estos provocando infecciones a una amplia gama de cultivos (Quaade, Lysoe, Erup, Khorsand-Jamal, Fog y Normand, 2014).

- Por último, la secuencia ITS de la muestra extraída del carril C' - del control negativo para *Basidiomycota* fue:

```
NNNNAANNNNNNNNNNNNNNTTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAATGAATTCACCTATGGAGTTGT
TGCTGGCCTCTANGGCCATGTAAAACGCTTCACTAGTCTTTCAACACCTGTGAACTTTTGATAGANCTG
TGAAGTCGTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGC
```

Tras introducir en BLAST se obtuvo que la secuencia problema pertenecía a *Pleurotus sapidus* (figura 32).

En la tabla 20 se observa que el alineamiento es significativo. Gracias a esto se puede conocer que la contaminación procede de dicha especie.

Tabla 20: Datos obtenidos en BLAST (*Pleurotus sapidus*)

<i>Query cover</i>	87%
<i>E. value</i>	1e-60
<i>Ident.</i>	95%

La clasificación de este hongo es:

- División *Basidiomycota*
- Clase *Agaricomycete*,
- Orden *Agaricales*
- Familia *Pleurotaceae*
- Género *Pleurotus*



Figura 31: *Pleurotus sapidus*, (Naturewatch, s.f.)

Las especies del género *Pleurotus* son excelentes comestibles y pertenecen al grupo de hongos saprófitos de podredumbre blanca. Tiene diversas aplicaciones biotecnológicas y medicinales debido a su complejo enzimático lignocelulósico (Andrino, Morte y Honrubia, 2011).

Todos estos hongos están siendo mantenidos en cultivo en placas de agar y pasan a formar parte de una colección de hongos mantenida por el Grupo de genética y Microbiología de la UPNA.

5 CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevas cepas de hongos es el primer paso para la obtención de compuestos de gran interés en la industria agroalimentaria y farmacéutica. La realización de cultivos axénicos (especialmente evitar que varios hongos crezcan en el mismo cultivo) es quizás el reto más importante al que nos hemos enfrentado a lo largo de este trabajo fin de grado. Hemos logrado aislar e identificar seis cepas salvajes (*Trichoderma polysporum*, *Arthrinium spp.*, *Nemania diffusa*, *Fusarium spp.*, *Fusarium avenaceum* y *Pleurotus sapides*) con gran interés biotecnológico que ahora están disponibles para su estudio por parte de la comunidad científica y para una posible explotación a escala industrial en el futuro, además de contribuir a preservar la biodiversidad microbiana añadiendo cepas a nuestra colección de cultivos.

En los últimos 200 años, la ciencia y la casualidad se han combinado para proporcionarnos gran parte del conocimiento de que hoy disponemos. La más famosa de éstas observaciones fue quizás la que tuvo lugar cuando Fleming, en 1929, observó la lisis de colonias de estafilococos adyacentes a colonias del hongo *Penicillium notatum*.

Hoy, la aparición de resistencias microbianas y de nuevas cepas de patógenos hace necesaria la sustitución de los compuestos utilizados como antibióticos que ya no funcionan. Algo similar ocurre en la industria alimentaria; el crecimiento del mercado de sabores, olores y colorantes para el uso en alimentos, bebidas y cosméticos requiere nuevas estrategias de producción respetuosas con el medio ambiente y con un modelo de nutrición sana, natural y económica.

El aislamiento e identificación de nuevas cepas de hongos, que además pueden ser secuenciados para explorar su capacidad de producción de metabolitos secundarios, es un paso imprescindible que abre un gran campo de gran interés para la innovación en la industria agroalimentaria.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Ácido desoxirribonucleico. s.f. En Wikipedia. Consultado en junio 22, 2016, desde https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_desoxirribonucleico
- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; (1985). *Introducción a la micología*. Edición omega. Barcelona. 1ª edición
- Álvarez, J. P.; (2016). El papel de los hongos micorrícicos en la salud de los bosques. Barcelona: *Investigación y Tecnología Agroalimentaria, IRTA*
- Andino, A.; Morte, A.; Honrubia, M.; (2011). Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios
- Aristegui, B.; (2002). El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp: 1-4
- Armillaria. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 24, 2016, desde <https://es.wikipedia.org/wiki/Armillaria>
- Arthrimum spp.* S.f. En Mycoportal. Consultado en junio 27, 2016, desde <http://mycoportal.org/portal/imagelib/imgdetails.php?imgid=338438>
- Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M.; (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, pp: 69-74
- Burde, M.; (2015). Quorn, la micoproteína del laboratorio
- Calocybe gambosa*. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 24, 2016, desde https://es.wikipedia.org/wiki/Calocybe_gambosa
- Cantharellus*. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 24, 2016, desde <https://en.wikipedia.org/wiki/Cantharellus>
- Carlile, M.; Watkinson, C.; Gooday, G.; (2001). *The Fungi*. Academic PR inc. 2nd edition
- Carranza, Z.; (2006). Tesis de ingeniero agroindustrial. “Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido”
- Crous, P.; Groenewald, J.; (2013). A phylogenetic re-evaluation of *Arthrimum*. *IMA Fungus*, 4, pp: 133-154
- Cuervo, L.; Forch, J.; Quiroz, R.; (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, vol:13, n°: 3, pp: 11-25
- Cuesta, J.; (2007). Ecología de los hongos (1ª parte). *FORESTA*
- Dashtban, M.; Schraft, H.; Qin, W.; (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5, pp: 579-595.
- Davis, E. C.; Franklin, J. B.; Vilgalys, R.; (2003). Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis.
- Deacon, J. W.; (2005). *Fungal Biology*. Blackwell Publishing. UK. 4th edition
- Desjardins, P.; Conklin, D.; (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments JOVE*, 45
- Fernández, R.; (2008). Las micorrizas: desenterrando un tesoro. *Revista Agricultura Orgánica, ACTAF*, pp: 22-25

- Fierro, F.; (S.f.). Electroforesis en gel de agarosa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, pp: 27-51
- Fusarium spp.* (S.f). En Mycology online. Consultado en junio, 28, 2016, desde http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/hyaline_moulds/
- García, G. J.; (2010). Hongos simbiosis: micorrizas. *Boletín micológico lazarrillo*, 4, pp: 67-81
- Gardes, M.; Bruns, T. D.; (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118
- González, I. C.; (2010). Dietas y setas: declaraciones nutricionales y propiedades. *Boletín Micológico Lazarillo*, 3, pp: 55-66
- Guevara, G.; Garza, F.; Cázares, E.; (2004). Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL*, 3, pp: 371-378
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M.; (2004). Trichoderma species opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp: 43–56.
- Higgins, J.; (2012). PCR amplification of Fungal ITS1 and/or ITS2 rDNA gene regions
- Ito, Z. A.; Reshi, Z.; Basharat, Q.; Majeed, S. T.; Andrabi, K. I.; (2014). Identification and Characterization of Ectomycorrhizal *Cortinarius* Species (Agaricales, Basidiomycetes) from Temperate Kashmir Himalaya, India, by ITS Barcoding
- Kendrick, B.; (2000). *The Fifth Kingdom*. Focus publishing. Canada. 3th edition.
- Kuhar, F.; Castiglia, V.; Papinuti, L.; (2007). Los hongos en el laboratorio: de la naturaleza al cultivo axénico. *Revista Boletín Biológica*, 27, pp: 5-7
- Kuhar, F.; Castiglia, V.; Papinutti, L.; (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*, 28, pp: 11-18
- Marasmius oreades*. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 24, 2016, desde https://es.wikipedia.org/wiki/Marasmius_oreades
- Mediavilla, O.; Olaizola, J.; Santos del Blanco, L.; Oria de Rueda, J. A.; Martín-Pinto, P.; (2016). Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Mycorrhiza*, vol: 26, n°: 2, pp: 161-168
- Meléndez, A.; S.f. Consultado en junio 26, 2016, desde <http://cocinandosetas.blogspot.com.es/2012/10/macrolepiota-procera-identificacion.html>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAGRAMA; (2014). Verduras y hortalizas: Setas, pp: 207-208
- Morchella*. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 24, 2016, desde <https://es.wikipedia.org/wiki/Morchella>
- Nemania diffusa*. S.f. En Aranzadi. Consultado en junio 27, 2016, desde <http://www.aranzadi.eus/micologia/n>
- Osorio, D.; (2012). Aplicaciones biotecnológicas de los hongos. *Notas: Ciencias biológicas*, pp: 19.
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M.; (1999). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 77, pp:754-766.

- Persidis, A.; (2000). Antibacterial and antifungal drug Discovery. *Nature Biotechnology*, 18, pp: 24-26
- Pleurotus sapidus*; (S.f.) En Naturewatch. Consultado en junio, 28, 2016, desde <http://naturewatch.org.nz/observations/203862>
- Quaade, L.; Lysoe, E.; Erup, J.; Khorsand-Jamal, P.; Fog, K.; Normand, R.; (2014). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and the development of a USER-Brick vector construction system. *BMC Molecular Biology*
- Ramírez, A. C.; (2009). Tesis doctoral. “Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales”
- Redin, A.; (2010). Trabajo fin de carrera de ingeniero técnico agrícola. “Efecto de la inducción con extractos acuosos de paja de trigo sobre la producción de enzimas lignolíticas en *Pleurotus ostreatus*”
- Rincón, A. M.; (2012). Aplicación biotecnológica de *Trichoderma*. *Revista de los másteres de Biotecnología Sanitaria y Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria*.
- Romero, O.; Huera, M.; Damián, M.; Domínguez, F.; Arellano, D.; (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, vol: 9, nº: 2, pp: 143-151.
- Roncero, R.; (2015). Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. *Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja*
- Serrato, A.; Flores, L.; Aportela, J.; Sierra, E.; (s.f.). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, pp: 53-73
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C.; (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, vol: 2, nº: 2, pp: 70-78.
- Thermo Scientific. S.f. Assessment of Nucleic Acid Purity. *Technical Bulletin*, 042.
- Trichoderma polysporum*. S.f. En Wikipedia. Consultado en junio 27, 2016, desde <https://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma>
- Velázquez, L. P. A.; Martínez, M. D. C. A.; Romero, A. C.; (s.f.). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, pp: 1-25.

