CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CON POTENCIAL ANTIFUNGICO

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL QUE PRESENTA:

ARTURO GÓMEZ GUIRAO

CARRERA:

INGENIERO BIOQUÍMICO

ASESOR:

DRA. ROSA ISELA CRUZ RODRÍGUEZ

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS A 26 DE ENERO DE 2020

AGRADECIMIENTOS

El principio de la sabiduría es el temor a Jehová (Proverbios1:7).

En primer lugar, quiero darle gracias a mi Dios todo poderoso por haberme dado la fortaleza, la sabiduría y así mismo tener el honor de terminar la carrera profesional que marco mi vida y llegar a ser así un ingeniero Bioquímico ya que sin su fuerza y voluntad todo esto no sería posible.

Así mismo quiero agradecer a la Dra. Rosa Isela Cruz Rodríguez. Debido a su gran profesionalismo, paciencia y enseñanza demostrada de su parte a lo largo de mi carrera.

De igual manera agradezco al Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina. Por todos los conocimientos teóricos y prácticos impartidos hacia mi persona, ya que, con él, no solo encontré a un maestro sino también a un gran amigo.

Mi agradecimiento profundo al Dr. Víctor Ruiz Valdiviezo. Por aceptarme y poder llegar a ser parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de biología molecular, acto que marco mi vida profesional.

Mis mas sincera gratitud al Ing. Manuel Conrrado Ramírez Mazariegos. Por haberme inculcado la idea de ingresar a esta maravillosa carrera, cuyas materias son de gran importancia para el futuro de la humanidad.

Agradezco eternamente a mis abuelos Petrona Cruz Alfaro, Silvano Guirao Pérez, Norberta Cruz Palacios y Agustín Gómez Velázquez (+). Por nunca dejarme solo desde que era un infante hasta el día de hoy, ya que siempre tuvieron fe en mi, lo cual me sirvió como fundamento desde el inicio de esta carrera.

Estoy orgullosamente agradecido con mis padres Fernando Gómez Cruz y Mariber Guirao Cruz que son el pilar de mi existencia física y profesional, nunca olvidare sus consejos y su guía, así mismo su amor paternal demostrados cada día hacia mi persona.

Dedico este documento a mis hermanos menores: Fernando Gómez Guirao, Ana Jarin Gómez Guirao y Franklin Iván Guirao Cruz que me sirvieron de inspiración cada día de camino por este sendero profesional. Así mismo les exhorto que tomen de igual manera el horizonte de la sabiduría, que implica el respeto, la preparación, la diciplina y la constancia a pesar de las adversidades.

Estoy orgulloso de ser amigo, de mi primo el Lic. Hugo Sostenes Ruiz Ruiz (Huguito) y compartir los mismos ideales políticos y sociales con él, gracias hermano por tus consejos.

Así mismo mando un fuerte abrazo a todos mis tíos Familia Guirao Cruz y Gómez Cruz que siempre han estado pendiente de mi vida física y profesional, gracias por todo su apoyo demostrado a lo largo de este camino el cual hoy llega a su gran realización.

Y no podrían faltar en esta lista mis inolvidables amigos de la facultad: Rony, Enrique, Aron y Susan los que siempre compartieron conmigo no solo las investigaciones, tareas y trabajos sino también el pan y la sal. Vamos mis hermanos puro para adelante.

Gracias a todos.

RESUMEN

Se extrajo ADN genómico de tres cepas distintas de hongos con propiedades entomopatógenas empleando el protocolo de Fungal/bacterial Miniprep kit (Quick DNA). Posteriormente se cuantifico espectrofotométricamente el ADN extraído empleando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) para luego analizar la presencia y calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez comprobada la presencia y calidad del ADN extraído las muestras fueron llevadas al termociclador donde se realizaron las amplificaciones de las regiones ITS1 e ITS4 utilizando cebadores o primers correspondientes siguiendo el protocolo de PCR descrito en el trabajo.

INDICE

1.INTRODUCCIÓN.....9
2.DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA.....11
3.PROBLEMAS A RESOLVER.....12
4.OBJETIVOS 14
4.1 Objetivo general.....14
4.2 Objetivos específicos.....14
5. MARCO TEÓRICO.....15
5.1 Hongos Entomopatógenos.....15
5.2 Uso de los hongos entomopatógenos en el control biológico.....15
5.3 Modo de acción de los hongos entomopatógenos 18
5.4 Beauveria bassiana 21
5.5. Caracterización microbiológica.....22
5.6. Identificación morfológica y molecular de los hongos entomopatógenos.....22
5.7.PCR 24
5.7.1 Origen de la técnica PCR.....24
5.7.2 ¿Qué es la PCR?.....26
5.7.3 Reactivos necesarios para la PCR 31
5.7.4 Protocolo para PCR 35
5.7.5 Recomendaciones 38
5.7.6 Método de análisis 41
5.7.7 Aplicaciones 42
5.7.8 Ventajas y desventajas.....42
5.7.9 Perspectivas..... 43
5.8 Primers 44
5.8.1 ¿Qué son?..... 44
5.8.2 Especificidad..... 45
5.8.3 Secuencias Complementarias del primer.....45

5.9 Termocicladores..... 45
5.10 SYBR greenTM..... 47
5.11 ELECTROFORESIS 48
5.11.1 ¿Historia y concepto de la Electroforesis?..... 48
5.11.2 PROTOCOLO PARA LA ELECTROFORESIS.....53
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....64
6.1 Preparación de las cepas.....64
6.2 Extracción de ADN de las cepas (VER Anexo 1) 64
6.3 Cuantificación.....65
6.4 Preparación de TAE 1X (Buffer).....66
6.5 Preparación del gel de Agarosa al 1% 66
6.6 Preparación de la cámara de Electroforesis..... 66
6.7 Carga de las muestras en la cámara de Electroforesis y Corrida en Gel 67
6.8 Análisis del gel en la cámara de luz UV 67
6.9 PCR 68
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 69
7.1 Cuantificación de la Extracción de ADN de las cepas 69
7.2 Electroforesis 70
8. CONCLUSIONES 73
9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS 74
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75
11. ANEXOS 82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso infeccioso de Beauveria bassiana sobre un insecto ……20

Figura 2. Proceso de replicación del ADN a nivel celular……...27

Figura 3. Amplificación de ADN mediante PCR …… 28

Figura 4. Esquema de las etapas de la PCR …… 30

Figura 5. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares de una PCR…… 38

Figura 6. Cinética de amplificación de la PCR ……40

Figura 7. Termocicladores …… 47

Figura 8. Esquema de diferentes sistemas de Electroforésis …… .51

Figura 9. Etapas de la electroforesis ……52

Figura 10. Corrida en gel de agarosa Extracción # 1……...70

Figura 11. Corrida en gel de agarosa Extracción # 2 ……71

Figura 12. Ejemplo de marcador molecular ……72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos de hongos entomopatógenos utilizados para control biológico …… 17

Tabla 2. Hongos entomopatógenos empleados en el control biológico ……...19

Tabla 3. Clasificación taxonómica de Beauveria bassiana …… 21

Tabla 4. Propiedades y aplicaciones de las ADN-polimerasas termoestables…… 25

Tabla 5. Copias de ADN generadas por la PCR en cada ciclo …… 29

Tabla 6. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usadas para una reacción estándar de PCR …… 36

Tabla 7. Criterios principales para la selección de primers ……44

Tabla 8. Rango de separación de tamaños de ADN en función de la concentración y el tipo de agarosa utilizados ……53

Tabla 9. Reactivos y volumen de la preparación de la muestra madre para la PCR …… 68

Tabla 10. Resultados de las lecturas en el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) …… 69

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre esos está la capacidad de regular las plagas para mantenerlas en niveles adecuados. (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011), los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos. (Pucheta Díaz, Flores Macías, Rodríguez Navarro, & de la Torre, 2016).

La infección por hongos entomopatógenos inicia por la liberación de una espora germinada generalmente un conidio; estas esporas se dispersan por el aire, la lluvia y otros insectos parasitados para adherirse en la cutícula del insecto para penetrarla y dar origen a una hifa invasora la cual crece en el integumento del insecto y produce esporas y conidios en la superficie del insecto (García-Gutiérrez, Manual de técnica para el aislamiento, identificaciónón de Hongos y Nematodos entomopatógenos, 2009).

Para (LÓPEZ-LLORCA & HANS-BÖRJE, 2001), entre los géneros más importantes están: Metarhizium, Beauveria, Aschersonia, Entomophthora, Zoophthora, Erynia, Eryniopsis, Akanthomyces, Fusarium, Hirsutella, Hymenostilbe, Paecelomyces y Verticillium, mientras que para la (FAO., 2003), los géneros de importancia son Metarhizium, Beauveria, Paecilomyces, Verticillium, Rhizopus y Fusarium.

El control biológico se basa en el uso de organismos vivos para reducir poblaciones de plagas a umbrales económicos aceptables haciendo que estas sean menos abundantes, y por lo tanto menos dañinas. Las plagas de insectos son especies que interfieren con la actividad humana al causar un daño, pérdida o enfermedad a un cultivo, producto almacenado, animales o personas; y el papel del control biológico, es llevar a las poblaciones de insectos plaga a un punto de equilibrio tal que no afecte a la economía del producto (Rafikov, 2008). Se conoce

que hasta el 80% de los agentes etiológicos involucrados en la muerte de insectos son hongos, con aproximadamente 90 géneros, y más de 700 especies. Es por esto, que se ha invertido mucho en investigación y desarrollo de estos agentes entomopatógenos para ser usados dentro del control biológico como bioplaguicidas (Destéfano, Detection of Metarhizium anisopliae var. anisopliae within infected sugarcane borer Diatraea saccharalis (Lepidoptera, Pyralidae) using specific oligonucleóticos, 2004).

Durante las últimas tres décadas, la biología molecular ha facilitado el estudio de las comunidades microbianas del medio ambiente, que abarca una amplia gama de enfoques para facilitar las investigaciones con la ayuda de la informática haciendo esta labor más rápida, precisa y sensible (Gao D. &., 2012). La variabilidad genética de los hongos entomopatógenos puede ser considerada una gran ventaja en el control microbiano de insectos (Fernandes, 2009).

Los métodos clásicos para la identificación de hongos entomopatógenos están basados principalmente en la morfología del conidio, así como de las características bioquímicas y características genéticas. De hecho, las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas como herramientas para la identificación y análisis filogenéticos de muchas especies fúngicas, entre las cuales se encuentran la 14 técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN. Estas técnicas son particularmente valiosas en aquellos casos en el cual las especies de microorganismos son incapaces de crecer en condiciones de laboratorio (Bindslev & Oliver, 2002). Dado que es casi imposible aislar ADN puro de muestras de suelo, es necesario emplear técnicas específicas que nos brinden una opción para resolver esta problemática (TORRES, 2015).

2. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

El instituto tecnológico nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez se ubica en la capital del estado de Chiapas en Carretera Panamericana Km. 1080, con C.P. 29050, Apartado Postal: 599.

Durante más de 46 años, el Tecnológico Nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez ha formado profesionistas de calidad, con un claro compromiso social, cimentado en la ciencia, la investigación y el respeto a la dignidad de las personas, brindando el acceso en condiciones de igualdad a una formación profesional de calidad. Tiene el propósito de transformar vidas a través de la educación, formando profesionistas con ética, liderazgo y sensibles a la realidad social que se vive en el país. Profesionistas que generan un impacto positivo en su comunidad.

Valores

- El Ser Humano
- El Espíritu de Servicio
- El Liderazgo
- El Trabajo en Equipo
- La Calidad
- El Alto Desempeño
- Respeto al Medio Ambiente

Misión

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

Visión

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

3. PROBLEMAS A RESOLVER

México es un país con alta diversidad y forma parte de la región mesoamericana que conecta América del Norte y del Sur. Esta situación biogeográfica lo coloca como zona de riesgo a presentar plagas de insectos exóticos invasivos que entran del norte por los Estados Unidos, o del sur por América Central o el Caribe.

Se conoce hasta ahora que el 80% de los agentes para el control biológico involucrados en la muerte de insectos son hongos, que abarcan 90 géneros y más de 700 especies a estos hongos se le conocen como hongos entomopatógenos.

Uno de los aspectos importantes en la búsqueda de cepas mejoradas de hongos entomopatógenos para el control de plagas en cultivos de importancia económica se relaciona con su actividad enzimática y su capacidad de asimilar los sustratos presentes en el ecosistema.

Es por eso por lo que decimos que la identificación molecular de estos hongos es de mucha importancia no solo para la ecología si no para la economía de la sociedad ya que su producción no requiere de muchos gastos y su efectividad es grande. De esta manera se pueden desarrollar fungicidas orgánicos que sean nativos del propio ecosistema y que no sean químicos los cuales afectan más al mismo, así se pueda evaluar la prevalencia y actividad de estos agentes en condiciones naturales, para ampliar el conocimiento y hacer un mejor uso de estos.

La producción industrial y artesanal de hongos entomopatógenos que actúan como controladores biológicos, requiere un mayor entendimiento de su genética, aspectos fisiológicos, enzimas y metabolitos intra y extracelulares, toxinas, factores de virulencia, etc. Este conocimiento genético básico permitirá su manipulación para la obtención de cepas ambientalmente seguras, para la caracterización de los ceparios, así como para la producción de determinados biopreparados. La investigación sobre los hongos entomopatógenos se ha limitado a la entomología aplicada y a las consideraciones ecológicas relacionadas con el

manejo integrado de plagas, sin embargo, recientemente se están haciendo esfuerzos para estudiar la genética y la fisiología de estos hongos.

Con esto damos por entendido la gran importancia que tienen estos microorganismos en el campo de estudio biológico y bioquímico, y es debido a eso que se realizó este trabajo de investigación el cual consiste en la identificación de hongos entomopatógenos con propiedades antifúngicas empleando el método molecular, que repito es de gran importancia para el empleo y uso de nuevos fungicidas ecológicos lo cual es un gran aporte al sector agroindustrial así como un aporte al conocimiento biológico.

4. OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar desde el punto de vista molecular cepas nativas de hongos entomopatógenos para ser evaluadas como antifúngicos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Extraer el ADN genómico de las cepas.
- Cuantificar espectrofotométricamente el ADN genómico extraído de las cepas.
- Analizar la presencia y calidad del ADN genómico extraído de cada cepa por electroforesis.
- Amplificar lar regiones ITS1 Y ITS4 del ADN genómico extraído.
- Secuenciamiento y análisis informático.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Hongos Entomopatógenos

Como una alternativa al uso de insecticidas químicos, para el control de plagas, se pueden usar productos de origen biológico, por ejemplo, aquellos cuyo ingrediente activo es un hongo entomopatógeno.

Un hongo entomopatógeno es un microorganismo capaz de infectar y causar enfermedad a insectos. Algunos presentan la cualidad de sobrevivir de manera saprófita lo cual es útil para su producción y posterior uso para control de plagas. Los hongos son los patógenos naturales predominantes en las poblaciones de insectos. No es raro observar la muerte de gran cantidad de insectos producida por algunos géneros fúngicos. Lo anterior indica el gran potencial que tienen estos microorganismos para la regulación de poblaciones insectiles (Lacey LA, 2015).

Los hongos entomopatógenos pueden desarrollarse sobre insectos de cuerpo duro o de cuerpo blando. En consecuencia, han sido ampliamente evaluados y en algunos casos utilizados de manera comercial contra diversos insectos plaga que afectan a la agricultura, silvicultura, ganadería, etc. (Lacey LA, 2015). Adicionalmente a esto son más específicos, son inocuos para el medio ambiente, carentes de residuos tóxicos y su producción es relativamente más económica. Además, existe una gran diversidad de especies, por tanto, tienen un gran potencial para controlar una gran variedad de plagas insectiles (Srivastava CN, Prospective role of insecticides of fungal origin, 2009).

5.2 Uso de los hongos entomopatógenos en el control biológico

En la actualidad hay una tendencia marcada para utilizar alternativas al manejo convencional de plagas en la agricultura, de tal manera que encontramos entre ellas la utilización de los hongos entomopatógenos, siendo una alternativa tanto en áreas de producción agrícola, forestal y animal.

Los bioplaguicidas microbianos consisten en un microorganismo (por ejemplo, una bacteria, hongo, virus o protozoos) como el ingrediente activo. Los plaguicidas

microbianos pueden controlar diferentes tipos de plagas, aunque cada principio activo por separado es relativamente específico para la plaga objetivo (Agency, 2015), los hongos entomopatógenos más utilizados son *Beauveria bassiana, Verticillium lecanii, Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae*.
El potencial para el control de insectos con hongos data desde la demostración de Augostino Bassi en 1835 de que un hongo podría causar una enfermedad transmisible deliberadamente en gusanos de seda (Jaronski S. T., 2014).

A finales de 1870 Metschnikoff observó una alta proporción de *Metarhizium* matando al gusano de la remolacha (*Cleonus punctiventris* Germar) y propusieron el concepto de control de este insecto con conidios producidos artificialmente en pasta de cerveza estéril (Jaronski S. T., 2014).

En los Estados Unido, se sugirió el uso de otro hongo, ahora conocido como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, para controlar la chinche (*Blissus leucopterus* (Say); Kansas, Nebraska, y los estados vecinos produjeron el hongo *in vivo* e intentaron aumentar las poblaciones naturales con el hongo en esporulación sobre cadáveres de esta chinche, en la década de 1880 y 1890 (Jaronski S. T., 2014).

Dentro de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial se encuentra el del algodón y una de las principales plagas que causan grandes pérdidas económicas es la larva de la bellota *Helicoverpa zea.* Se utilizó a *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinum* por su característica de endófitos, en tratamiento a semillas de algodón, dentro de los parámetros medidos se encuentra la supervivencia de larvas sobre plantas control y sobre plantas tratadas con endófitos, para el grupo de plantas control obtuvieron una supervivencia de las larvas de 20 días y para las tratadas con *Beauveria bassiana* de 14 días, en tanto las tratadas con *Purpureocillium lilacinum* 16.6 días (GA, 2015).
El escarabajo rojo de la trementina (RTB), *Dendroctonus valens* Leconte, es una plaga invasora y destructiva, que se ha convertido en una de las plagas forestales

de mayor importancia económica en China. En un estudio, se evaluaron 12 aislados de *Beauveria bassiana* dentro de los cuales se encontraron cepas con un tiempo letal medio de 4.6 días a una concentración de $1x10^7$ esporas por mL, sobre dicho escarabajo, lo cual puede ser considerado como una estrategia prometedora para el manejo del RBT (Zhang LW, 2011).

Tabla 1. Productos de hongos entomopatógenos utilizados para control biológico.

PRODUCTO	HONGO	PAIS
Botanigard®	*B, bassiana*	Chile
Aseronjia®	*A. aleyrodis*	Rusia
Biotrol® FBB	*B, bassiana*	USA
Boverin®	*B, bassiana*	Rusia
ABG-6178®	*B, bassiana*	USA
Mycar®	*H. thompsoni*	USA
Biotrol® FMA	*M. anisopliae*	USA
Green guard®	*M. anisopliae*	Australia
Metaquino®	*M. anisopliae*	Brasil
Vertalec®	*V. lecanii*	Inglaterra
Mycotol®	*V. lecanii*	Inglaterra
Mycotal®	*V. lecanii*	Holanda
Mycotrol® WP	*B, bassiana*	USA
Preferal®	*P. fumosoroseus*	Bélgica
Bea-SIN®	*B. bassiana*	México
Pae-SIN®	*P. fumosoroseus*	México
Micobiol® HE	*B. bassiana* *M. anisopliae* *L. lecanii* *H. thompsonii*	Colombia
Vertisol®	*Verticillium* spp.	Colombia
Couch®	*L. giganteum*	USA

5.3 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Una característica única de los hongos entomopatógenos es que pueden ser utilizados como insecticidas de dos maneras, una es la ingesta directa, la otra es que no tiene que ser ingeridos y pueden invadir insectos directamente a través del exoesqueleto o cutícula, por lo cual pueden infectar estadios que no se alimentan, como huevos y pupas. La mayoría de las especies de hongos causan la muerte de los insectos través de esporas asexuales llamadas conidios (Srivastava CN, 2009).

Estos conidios entran a través de la pared del cuerpo mediante la disolución por la acción combinada de las enzimas quitinasa y proteasa, secretadas por el hongo. La penetración de hongos es aún mayor por la fuerza mecánica.

El sitio de la invasión es a menudo entre las partes de la boca, en pliegues intersegmentales o a través de espiráculos, donde la alta humedad local favorece la germinación y la cutícula no está esclerotizada por ello es más fácilmente penetrado. Una vez que el insecto muere y bajo ciertas condiciones ambientales (> 95% de humedad) el hongo puede romper la cutícula y esporular; también puede crecer profusamente en la hemolinfa y dar al exoesqueleto una característica de aspecto momificado. Todo el procedimiento dura de 3 a 14 días para la muerte del insecto.

Alternativamente, los metabolitos secundarios de los hongos pueden contribuir a la muerte del insecto por la descomposición de los órganos internos, al dañar las membranas celulares y citoplasma de los tejidos; en este caso solo se puede producir cuando hay un extenso crecimiento del hongo sobre el cadáver del hospedero. En conclusión, la muerte del insecto es a menudo debido a una combinación de la acción de toxinas fúngicas, obstrucción física del sistema circulatorio, agotamiento de nutrientes y / o la invasión de los órganos (Srivastava CN, 2009).

Por tal razón, conocer la ecología entre insecto-entomopatógeno, que para (TÉLLEZ-JURADO, 2009), son los diferentes mecanismos que los hongos entomopatógenos tienen para infectar a los insectos y los mecanismos que los

insectos tienen para defenderse, puede ayudar en el aislamiento, selección y mejora de cepas fúngicas **(Tabla 2),** que según (DRIESCHE, 2008), se ha enfocado en la utilización de 20 especies de 12 géneros , de las más de 400 especies reconocidas como infectantes de insectos, para su utilización como agentes de control biológico y/o en el cuidado de especies benéficas de insectos.

Tabla 2. Hongos entomopatógenos empleados en el control biológico.

GENERO	ESPECIE
Metarhizium	*M. anisopliae*[1] *M. flavoviridae*
Beauveria	*B. bassiana*[1] *B. brongniartii*[1] *B. tenella*
Aschersonia *Entomophthora* *Zoophthora* *Erynia* *Eryniopsis* *Akanthomyces* *Fusarium* *Hirsutella* *Hymenostilbe*	*A. aleyrodis* *Entomophthora* spp. *Zoophthora* spp. *Erynia* spp *Eryniopsis* spp. *Akanthomyces* spp. *Fusarium* spp. *H. thompsonii* *Hymenostilbe* spp
Paecilomyces	*P. farinosus* *P. fumosoroseus*[1] *(Isaria fumosoroseus)*[3] *P. tenuipes* *P. lilacinus*
Lecanicillium[2] *(Verticillium)*	*L. lecanii* *L. longispoum* *L. muscarium (Verticillium lecanii)*
Rhizopus *Cordyceps* *Culicinomyces* *Lagenidium* *Nomuraea* *Gliocladium* *Pochonia*	*Rhizopus* spp. *Cordyceps* spp. *Culicinomyces* spp. *Lagenidium giganteum* *N. rileyi* *Gliocladium* spp. *P. chlamidiospora*[4] *(Verticillium chlamidiosporium).*

[1]Hongos de mayor utilización en el mundo según Tellez-Jurado et al. (2009).
[2]Actual clasificación taxonómica según Cortez-Madrigal (2006); Elósegui (2006); Eloségui y Elizondo (2010).
[3]Nueva denominación de *P. fumosoroseus* según Luangsa-Ard et al. (2005); Hoy et al. (2010).
[4]Según Elosegui (2006).

Durante la invasión, estos hongos comienzan la producción de diferentes sustancias que facilitan su penetración en el insecto huésped **(Figura 1).** De hecho, se han caracterizado enzimas y toxinas que están involucradas en los procesos de invasión y virulencia durante el proceso de infección (Pathan, 2007).

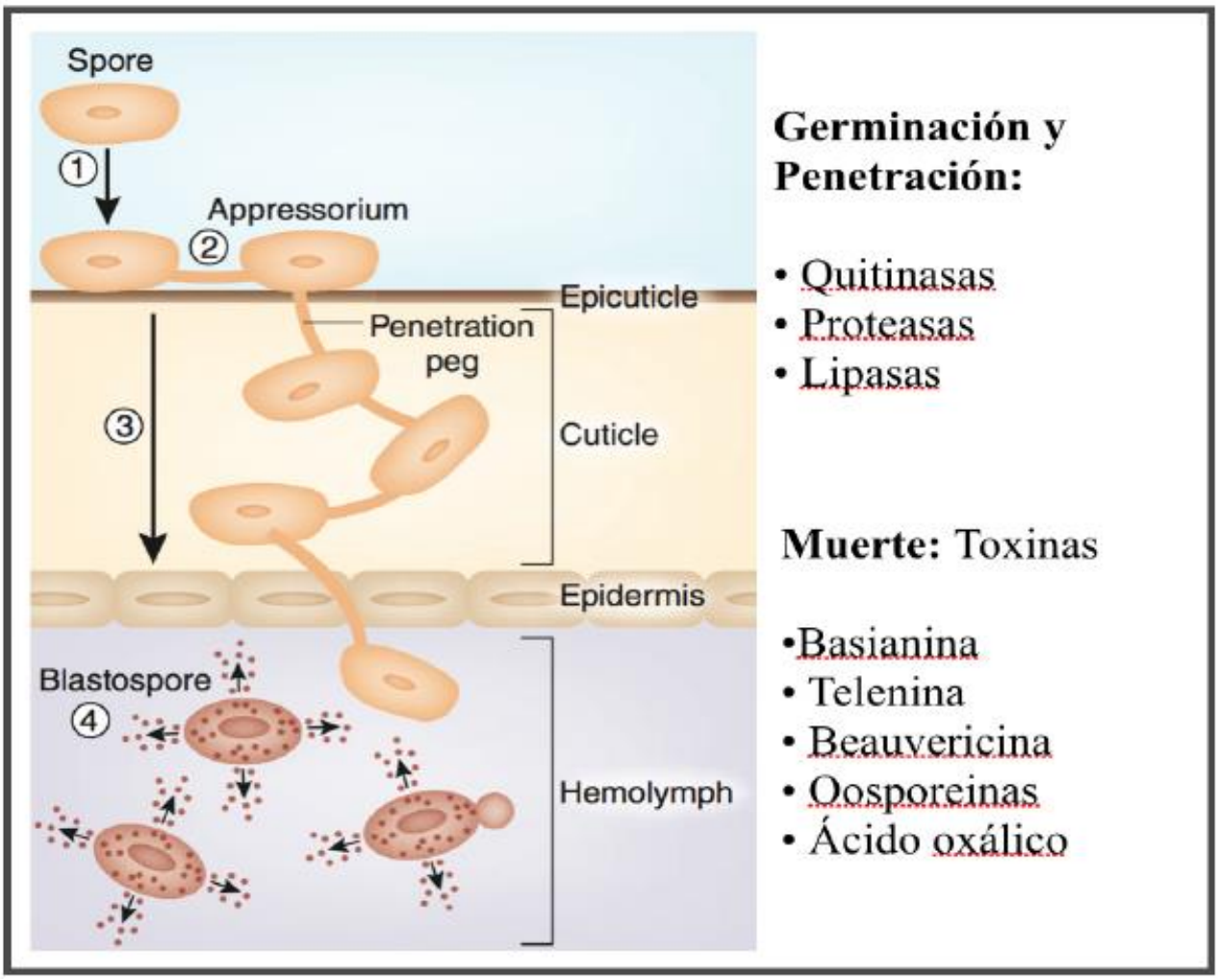


Figura 1. Proceso infeccioso de Beauveria bassiana sobre un insecto. 1) Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero. 2) Formación del apresorio. 3) Penetración a través de la cutícula. 4) Fase invasiva y liberación de toxinas (tomado de (Thomas, 2007)).

5.4 Beauveria bassiana

El hongo entomopatógeno B. bassiana pertenece al Orden de los Hipocreales (Ascomiceta) **(Tabla 3)** y es un enemigo natural de una gran variedad de insectos y arácnidos de distribución cosmopolita (Meyling, 2007). B. bassiana está registrado como biopesticida y se utiliza en todo el mundo para control biológico de diferentes plagas de insectos. Se sabe que tiene una muy amplia gama de hospederos (~700 especies) pertenecientes a casi todos los órdenes taxonómicos de la clase Insecta (Destéfano, 2004) y (de la Rosa, 2002).

La infección por hongos entomopatógenos inicia por la liberación de una espora germinada generalmente un conidio; estas esporas se dispersan por el aire, la lluvia y otros insectos parasitados para adherirse en la cutícula del insecto para penetrarla y dar origen a una hifa invasora la cual crece en el integumento del insecto y produce esporas y conidios en la superficie del insecto (García-Gutiérrez, 2009).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de Beauveria bassiana

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	*Beauveria*
Especie	*bassiana*

5.5 Caracterización microbiológica

Los métodos clásicos para la identificación de hongos entomopatógenos se basan principalmente en la morfología del conidio, así como de las características bioquímicas y características genéticas (TORRES, 2015).

5.6 Identificación morfológica y molecular de los hongos entomopatógenos

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentoso que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina. Las características más importantes de los hongos que se utilizan para su identificación son sus esporas y cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de las esporas) y, hasta cierto grado, las características de su soma (plasmodio o micelio). La forma, color, tamaño y manera en que se disponen las esporas sobre los esporóforos o cuerpos fructíferos, así como la forma, color, etc., de esas estructuras reproductoras, son características suficientes para sugerir (con una cierta experiencia en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo (Agrios-GN, 1998). Sin embargo, en la actualidad a la identificación morfológica, es necesario acompañarla con la identificación molecular para dar mayor certidumbre en los resultados, máxime tratándose de investigaciones de carácter científico; para tal efecto se cuenta con diversos procedimientos.

Cada vez es más común complementar la identificación de algunos microorganismos utilizando técnicas moleculares. Se han realizado estudios sobre variación molecular de *Beauveria bassiana* utilizando diversos marcadores cada uno con diferente poder de discriminación (Becerra V, 2007).

Dentro de los procedimientos basados en PCR para la identificación de hongos, existen un vasto número de protocolos; entre los más empleados están: a) Las regiones hipervariables del rDNA (IGS o espacio intergénico, e ITS o espacio

transcrito interno); b) Los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos de la PCR; c) La amplificación de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y d) La obtención al azar del DNA polimórfico (Rodríguez TA, 2004).

La PCR más estudiada ha sido la de los genes ribosomales y sus espacios intergénicos, esto debido a que estas regiones tienen muchas ventajas, dentro de ellas destaca que tienen una organización conservada en el genoma de todos los eucariontes y su presencia está en unidades repetidas una junta a la otra, un gran número de copias, lo que facilita su amplificación, contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S) lo que ha permitido un fácil diseño de iniciadores, además estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencias, debido a deleciones e inserciones; son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo (Gardes M, 1998).

Las regiones de los espacios intergénicos ITS y el IGS son las más divergentes de los genes ribosomales. Esta misma región ITS también se puede secuenciar y sus datos son probablemente los ideales para usar en la identificación taxonómica, porque tienen el poder resolutivo para ubicar hongos desconocidos dentro de una especie o al menos en un grupo de especies. Bastan las secuencias de los ITS de ejemplares desconocidos para buscar en el banco de genes (GenBank), o en la base de datos de nucleótidos del EMBL (European Molecular Biology Laboratory); la variación dentro de los espacios es tan amplia, que sólo los taxones muy cercanos se pueden encontrar (Horton TR, 2001).

Durante los últimos 30 años, las técnicas de biología molecular exploradas por la comunidad microbiana del medio ambiente han abarcado una amplia gama de enfoques para facilitar las investigaciones con la ayuda de la informática, haciendo esta labor más rápida, precisa y sensible (Gao D. &., 2012); (Leal-Bertioli, 2000).

5.7 PCR

5.7.1 Origen de la técnica PCR

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicarla replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores (K.Kleppe, 1971). Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation 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. Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli y* nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Faloona, 1987).

En un principio, para llevar a cabo el ciclo de PCR, se calentaba la mezcla en baño María, pero cuando llegaba a más de 90°C para desnaturalizar la doble hélice, la ADN polimerasa de E. coli se inactivaba. Por este motivo, cada que se calentaba a estas temperaturas se tenía que adicionar nueva enzima a la mezcla. El proceso original era poco eficiente, utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa y necesitaba de supervisión durante todo el proceso (Faloona, 1987).

El elemento que mejoró la técnica fue el descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y termoactivas (que no pierden su actividad con temperaturas altas). En 1976 se aisló la primera polimerasa termoestable conocida como Taq polimerasa, a partir de la bacteria Thermus aquaticus que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercana a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Saiki R. K., 1988).

La Taq polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, pero presenta la desventaja de que no tiene actividad “correctora” (actividad nucleasa 3´ → 5´), por lo que existe la probabilidad de introducir errores durante el copiado del ADN. Afortunadamente, se han encontrado ADN polimerasas termoestables, termoactivas y de alta fidelidad (con actividad “correctora”) (**Tabla 4**) provenientes

de bacterias del dominio Archaea, como la ADN polimerasa Pfu de Pyrococcus furiosus (Robb F. T., 2001).

Tabla 4. Propiedades y aplicaciones de las ADN-polimerasas termoestables.

Enzima	Organismo	Tempera-tura óptima	Actividad de Exonu-cleasa	Fide-lidad	Estabi-lidad	Produc-tor
Taq	*Thermus aquaticus*	75-80	5'-3'	Baja	9 min a 97.5 °C	MB, LT. Pro, Strat, P-E, T
Taq stoffel fragment	*T. aquaticus*	75-80	Ninguna	Baja	21 min a 97.5 °C	P-E
r*Tth*	*T. thermophilus*	75-80	5'-3'	Baja	20 min a 95 °C	BM, ET, P-E
Tft	*T. flavus*	70	Ninguna	Baja	120 min a 70 °C	Pro
Hot *Tub*	*T. ubiquitus*		Ninguna	Baja		Amr
Tbr	*T. brockianus*	75-80	5'-3'	Baja	150 min a 96 °C	Amr, Finnz
UlTina	*Thermotoga maritima*	75-80	3'-5'	Baja	50 min a 95 °C	P-E, Roche
r*Bst*	*Bacillus stero-thermophilus*	60-65	5'-3' (3'-5')b			ET
Isotherm *Bst*	*Bacillus stero-thermophilus*	60-65		Baja		ET, Bio-Rad
Pwo	*Pyrococcus woesei*	60-65	3'-5'	Baja	>2 hr a 100 °C	MB
Tli	*Thermoco-ccus litoralis*	70-80	3'-5'	Baja	100 min a 100 °C	Pro
Deep-Vent	*Pyrococcus strain* GB-D	70-80	3'-5'	Baja	480 min a 100 °C	NEB
Pfu	*Pyrococcus furiosus*	72-78	3'-5'	Baja	240 min a 95 °C	Strat

(BM) Boehriger Mannheim; (ET) Epicenter Technology; (LT) Life Technology; (Pro) Pormega; (NEB) New Englad Biolabs; (E-P) Perkin-Elmer; (T) TaKaRa; (Strat) Stratagene; (Amr) Amresco; (Finnz) Finnzymes OY.

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un cofactor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores. La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (L & Aguirre, 2007).

5.7.2 ¿Qué es la PCR?

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles *Polymerase Chain Reaction*) es, sin lugar a duda, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de acido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas en la replicación. Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como: 1) la identificación del sitio de origen de la replicación; 2) el desenrollamiento de la doble hélice; 3) la estabilización de la estructura desenrollada; 4) la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3’ libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora; 5) el avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento; 6) los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias; 7) la identificación de los sitios de terminación y 8) el superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN **(Figura 2).** Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la *polimerasa del ADN dependiente de ADN*, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bohinski, 1991).

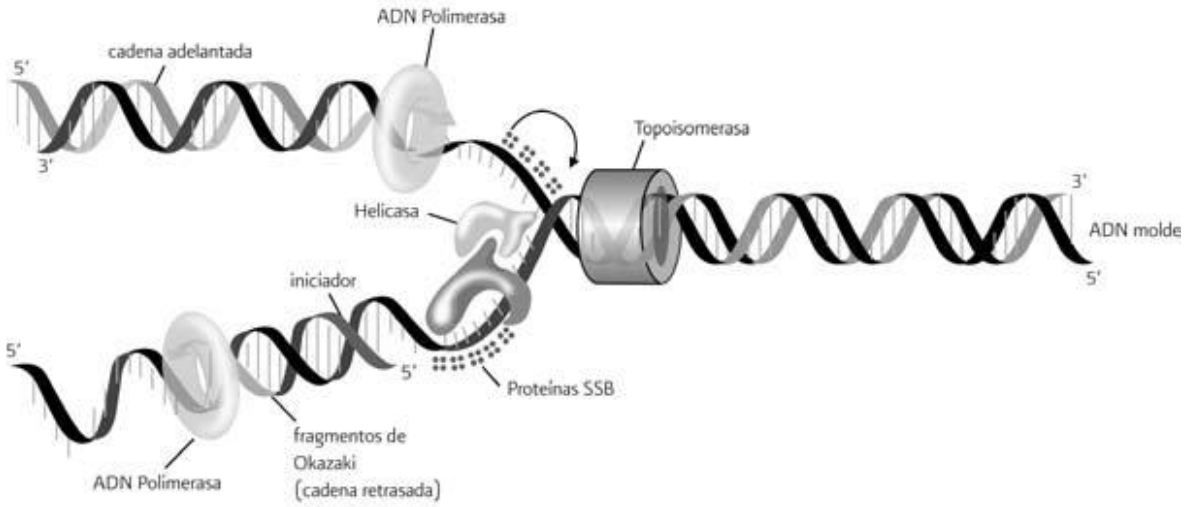


Figura 2. Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación (www.biologia. edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif, s.f.)

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3’ libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl2) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (L & Aguirre, 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular.

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores.

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5’ a 3’ para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias.

Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes **(Figura 3)**, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado **(Tabla 5)** (L & Aguirre, 2007).

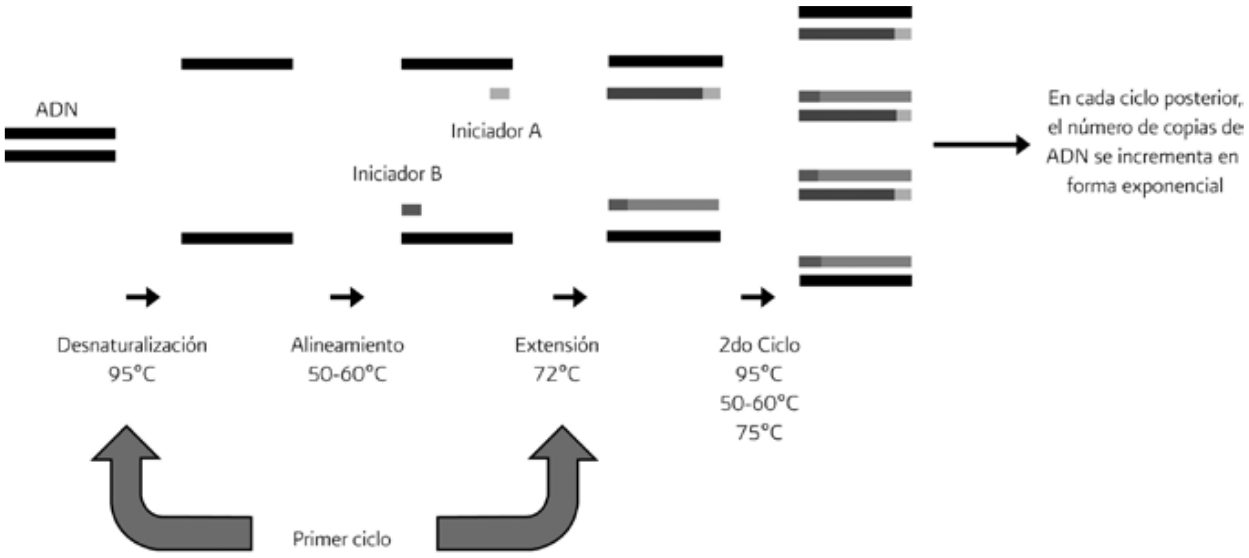
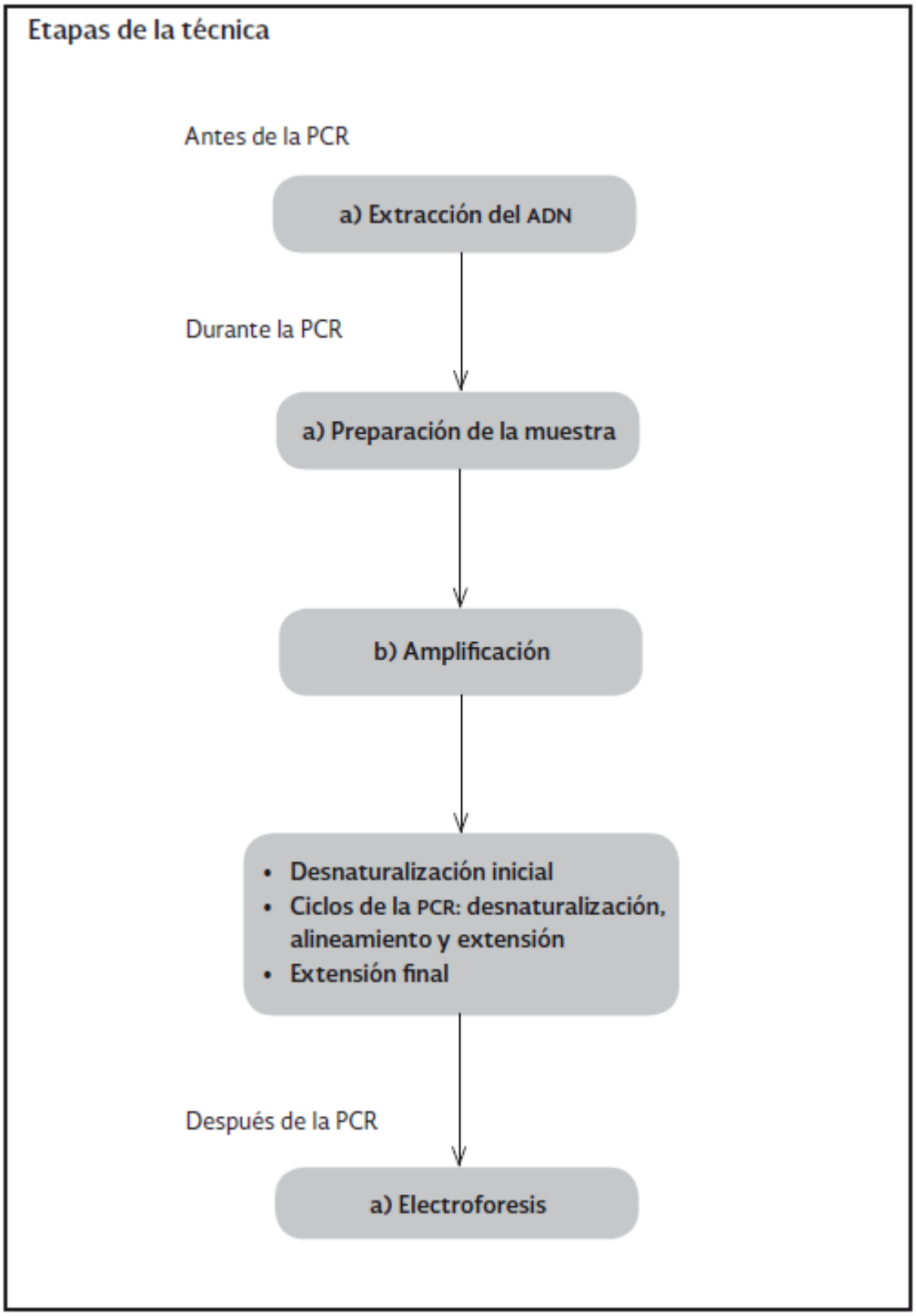


Figura 3. Amplificación de ADN mediante PCR. Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. Teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula. (https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material docente/objeto/244484, s.f.).

Tabla 5. Copias de ADN generadas por la PCR en cada ciclo (RINCON, 2004).

Ciclos	Copias de ADN
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	4,092
12	8,192
13	16,384
14	32,768
15	65,536
16	131,072
17	262,144
18	524,288
19	1,048,576
20	2,097,152
21	4,194304
22	8,388,608
23	16,777,216
24	33,554,432
25	67,108,864
26	134,217,728
27	268,435,456
28	536,870,912
29	1,073,741,824
30	2,147,483,648

Figura 4: Esquema de las etapas de la PCR (Alejandra Serrato D., 2018)



5.7.3 Reactivos necesarios para la PCR

Muestra: Puede ser ADN de doble o de una sola cadena de cualquier origen (animal, microbiano, plantas, etc.), también las moléculas de ARN pueden servir de molde para generar productos amplificados. En teoría, es suficiente con una sola copia intacta de ácido nucleico para la PCR, pero es recomendable utilizar como mínimo un nanogramo de ADN clonado, un microgramo de ADN genómico ó 105 moléculas de ácido nucleico para la técnica de PCR. Por lo general es importante visualizar el ADN en un gel de agarosa para evaluar su integridad.

Sin embargo, existen muestras con muy baja concentración que no se pueden observar, pero si se pueden amplificar debido a la eficiencia de la técnica. La pureza del ácido nucleico (ADN o ARN) empleado en la PCR no necesita ser tan alta para algunas aplicaciones, una sola célula, un lisado proveniente de una célula e incluso una pequeña cantidad de muestra de ADN degradada puede ser adecuada para una buena amplificación. Los requerimientos fundamentales deben ser que se tenga un mínimo de copias intactas de una de las hebras ADN que abarque la región a amplificar y que las impurezas asociadas a la muestra estén adecuadamente diluidas a fin de no inhibir la actividad enzimática.

Sin embargo, para algunas aplicaciones tales como PCR de fragmentos largos o para la secuenciación, es necesario considerar la calidad y la cantidad de la muestra de ADN (S. Cheng, 1994 ;1995). En algunas ocasiones, para poder llevar a cabo la amplificación o para optimizarla, es recomendable probar diluciones del ADN 1/10,1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 en una misma reacción.

Esta acción conlleva a la dilución de algún contaminante inhibidor de la PCR o a la optimización de la cantidad de moléculas molde de ADN.

Buffer o solución amortiguadora: Provee la fuerza iónica y la capacidad amortiguadora necesaria durante la reacción. Es importante señalar que la concentración de sales afecta la Tm de los iniciadores y por lo tanto la temperatura de alineamiento.

El ion magnesio: Es un co-factor esencial para la ADN polimerasa, su concentración debe ser optimizada para cada iniciador. Muchos componentes de la reacción se unen al ión magnesio, incluyendo iniciadores, ADN, productos de la PCR y nucleótidos. El principal aglutinante o secuestrador del ion magnesio es la alta concentración de nucleótidos, por lo que la concentración total del ion magnesio debe exceder la concentración total de dNTPs. Normalmente para iniciar la optimización del proceso de la PCR se comienza con 1.5 mM de magnesio en la reacción en presencia de 0.8 mM de dNTPs, esto deja alrededor de 0.7 mM de magnesio libre para ser usado por la ADN polimerasa. De forma general se puede mencionar que las concentraciones de magnesio en la reacción pueden ir de 1.5 a 4 mM (M. A .Innis ., 1990). El magnesio tiene influencia sobre la temperatura de alineamiento de los iniciadores, la temperatura de disociación de las hebras de las moléculas del ADN, la especificidad de los productos, la fidelidad de la enzima y la formación de dímeros a partir de los iniciadores.

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): La concentración del stock de dNTPs contiene 10mM de cada uno de los cuatro dNTPs a pH 7. La concentración final en la reacción puede ir de 20 a 200 µM de cada uno de los dNTPs, dependiendo del fragmento a amplificar y la concentración de magnesio, la cual resulta en un óptimo balance en rendimiento, especificidad y exactitud.

Esta concentración representa un exceso suficiente que permite tener una concentración adecuada durante toda la reacción. Una alta concentración de dNTPs conlleva a un decrecimiento de la especificidad y fidelidad del PCR, por lo que es importante que la concentración de dNTPs usada esté equilibrada, con el objetivo de minimizar la incorporación de errores. En general 200 µM de cada uno de los dNTPs puede usarse para la amplificación de un fragmento de 2kb durante 30 ciclos (J. G. Viljoen., 2005).

Iniciadores: La concentración óptima de los iniciadores debe ser de 0.1-0.5 µM en una reacción estándar, una concentración superior a 0.5 µM puede causar la acumulación de productos no específicos debido a uniones inespecíficas en el ADN molde y una concentración menor a 0.1 µM puede generar que se terminen los

iniciadores antes finalizar los ciclos de la PCR, lo que generaría un bajo rendimiento de amplificación. De manera general, 5 pmol de cada iniciador es adecuado para 25 µL de reacción. Para la elección de los iniciadores, existen una serie de normas que se deben seguir, afortunadamente existen programas computacionales que nos facilitan esta tarea (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/, s.f.).

A continuación, se mencionan algunas de las características deseables de los iniciadores:

- Generalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.
- El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50-60 %. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con más de tres repeticiones consecutivas de una sola base.
- No seleccionar iniciadores que en su extremo 3´ tenga una importante estructura secundaria.
- Se recomienda que en el extremo 3´ las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores. Si ésta se da entre los extremos 3´, existe la posibilidad de que se formen dímeros de iniciadores.
- Si el iniciador es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (Tm), se calcula con base en la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Tm = 4(G+C) + 2(A+T)}$$

Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos.

- La temperatura de alineamiento de los dos iniciadores utilizados en una reacción debe ser similar.

Polimerasa: La concentración recomendada de enzima ADN polimerasa en PCR es de 1-2.5 unidades por 100 µL de volumen de reacción (generalmente la enzima se comercializa a una concentración de 5U/µL). Esto representa en equivalencia molar, un valor bajo en comparación a los otros componentes de la

reacción. Una baja concentración de enzima garantiza la fidelidad de la amplificación del ADN, una alta concentración de enzima resulta en la amplificación de productos inespecíficos.

Otros factores que pueden modificar la fidelidad de la enzima ADN polimerasa son la presencia de actividad exonucleasa 3'-5´, la tendencia natural de la enzima para insertar errores, la facilidad con que los errores pueden ser retirados, la concentración de sales, específicamente la concentración de magnesio.

Aditivos: En algunas ocasiones, para optimizar la PCR es recomendable la adición de sustancias adyuvantes que incrementan la especificidad y fidelidad (Landre et al. 1995), entre las más usadas están:

- DMSO (dimetilsulfóxido): en una concentración entre 2 y 10% disminuye la estructura secundaria del ADN.
- Glicerol: en una concentración entre 15 y 20% mejora la amplificación de fragmentos con alta proporción de G+C e incrementa la estabilidad térmica de la enzima.
- Detergentes no iónicos: Tritón X-100, Tween 20 o Nonident P-40. Estabilizan a la Taq polimerasa e inhiben la formación estructuras secundarias en el ADN. Se utilizan en concentraciones entre 0.1 y 1%. Concentraciones mayores pueden generar amplificaciones no específicas.
- BSA (Albúmina de suero bovino): En una concentración final de 0.1 a 0.8 µg/µL es particularmente útil para amplificar ADN antiguo o muestras de ADN con inhibidores de PCR como la melanina.
- Betaina: A una concentración final de 1 a 1.7 M, mejora la amplificación de los fragmentos.
- Aditivos comerciales: hay adyuvantes comerciales disponibles que optimizan la reacción de PCR. Sin embargo, no revelan su composición química. (Alejandra Serrato D., 2018)

5.7.4 Protocolo para PCR

Este protocolo está diseñado para la amplificación de fragmentos estándar que no sobrepasan las 2 kb (dos mil bases). Es necesario seleccionar previamente la o las regiones a amplificar, así como seleccionar o diseñar los iniciadores, de acuerdo con los objetivos de la investigación. Asimismo, se deben establecer las condiciones de amplificación de la PCR y las concentraciones de los reactivos.

Antes de empezar

- Esterilizar el material (puntas y tubos) que se va a utilizar.
- Etiquetar todo el material y reactivos con nombre, fecha de preparación, concentración y nombre del usuario.
- Determinar las condiciones de la PCR basados en la ADN polimerasa que se utilice, el tamaño del fragmento y la temperatura de fusión de los iniciadores (también denominado Tm, por las siglas en inglés de melting temperature).
- Limpiar el área de trabajo con cloro 10%, hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N o etanol 70%.
- Descongelar todos los reactivos en baño de hielo y mezclarlos perfectamente. Únicamente la enzima se mantiene en el congelador hasta el momento de usarse para prevenir su inactivación, debido a que contienen glicerol no se congela a -20º C y está lista para usarse inmediatamente.
- Programar el termociclador. Para ello es necesario determinar el ramping (tiempo que tarda el equipo en cambiar de una temperatura a otra). En general es deseable que sea lo más rápido posible (3-4º C/seg.), pero esto dependerá de la capacidad de cada equipo y de las condiciones que se requieran para la amplificación.

Reactivos

- Muestra de ADN que contenga la región(es) que se desea amplificar
- Buffer o solución amortiguadora
- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

- Iniciadores
- Taq polimerasa
- Agua destilada o desionizada estéril

Método

1. <u>Preparación de la muestra</u>: En un tubo para PCR se agregan los siguientes reactivos: el ADN molde, los iniciadores, los nucleótidos o dNTPs, la solución amortiguadora, el cloruro de magnesio (MgCl2), el agua y la ADN polimerasa **(Tabla 6),** pueden agregarse otros compuestos que ayudan a la estabilidad de la polimerasa (ver tema 5.7.3).

1.1- Mezclar los componentes de la reacción con un vórtex durante 2-3 segundos o dando unos golpecitos con el dedo o invirtiendo el tubo varias veces (Stirling 2004).

1.2 - Centrifugar brevemente para reunir la mezcla en el fondo del tubo.

Tabla 6. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usadas para una reacción estándar de PCR.

Reactivo	Volumen (50 µL)	Concentración final
ddH_2O	41.25 µL	n/a
BUFFER [10X]	5 µL	1X
$MgCl_2$ [50 mM]	1.5 µL	1.5 mM
dNTPs [10 mM]	0.5 µL	100 µM
Iniciadores [20 µM]	0.25 µL	0.1 µM
ADN	1 µL	10 ng
ADN Polimerasa [5 U/µL]	0.5 µL	1-2.5 unidades

<u>2. Amplificación:</u> Colocar las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente, por lo general se utilizan los siguientes pasos **(Figura 5):**

2.1 - Desnaturalización inicial: Habitualmente la PCR utiliza un ciclo de desnaturalización (separación de la doble hélice porque los puentes de hidrógeno

se rompen), la temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo con las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, por lo general es entre 94 y 96 °C durante 5-10 minutos.

2.2 - Ciclos de la PCR: Se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, generalmente estas etapas se repiten entre 25 y 35 veces.

2.2.1 - Desnaturalización: En esta etapa es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94ºC durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene un alto contenido de guaninas y citosinas, se recomienda aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la enzima decrece muy rápido a partir de los 95 ºC, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.

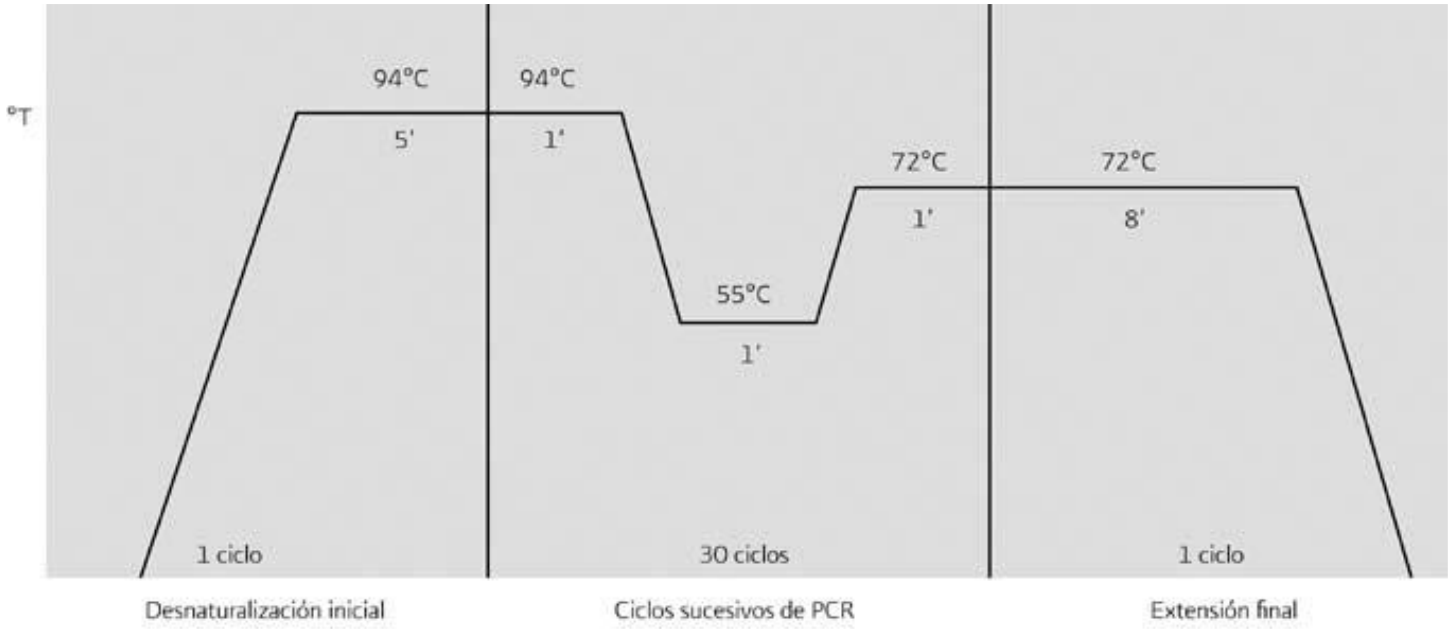
2.2.2 - Alineamiento: Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3´complementarias. Ambos iniciadores se unen de manera específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65 ºC durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde. (ver tema 5.7.3.)

2.2.3 - Extensión: Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3’ del iniciador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 ºC porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la Taq polimerasa añade de 500 a 1000 nucleótidos por minuto.

2.3 - Extensión final: Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 ºC para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

3. <u>Realizar electroforesis del producto obtenido</u> (véase capítulo de electroforesis).

Figura 5: Temperaturas, tiempos y ciclos estándares de una PCR.



5.7.5 Recomendaciones

En cualquier PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, un tubo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde, para poder monitorear posibles contaminaciones.

También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que sabemos amplifica sin problemas bajo las condiciones establecidas. Este control es muy útil para asegurarnos que los reactivos ocupados se encuentran en

condiciones apropiadas. Es importante utilizar siempre materiales consumibles (tubos, puntas, etc.) nuevos y estériles. Para aplicaciones muy sensibles a la contaminación se recomienda emplear puntas con filtro. Se recomienda usar pipetas exclusivas para PCR y tener áreas exclusivas para extracción de ADN, PCR y electroforesis. Los reactivos de PCR son sensibles a la temperatura, por lo cual durante su uso se deben mantener en hielo e inmediatamente después de utilizarlos se les debe regresar al congelador.

Es recomendable hacer alícuotas de todos los reactivos, si se tiene alguna contaminación o hidrólisis se puede tomar una nueva alícuota. Asegurarse de que las concentraciones de cada reactivo sean las que se establecieron para el experimento (ver Tabla 3). La fórmula que permite calcular las concentraciones requeridas a partir de los reactivos en stock es:

$$V1 = (C2 * V2) / C1$$

Donde:

V1= es el volumen que se tiene que tomar del reactivo en stock para obtener la concentración deseada.

C1= es la concentración a la cual se encuentra el reactivo en stock.

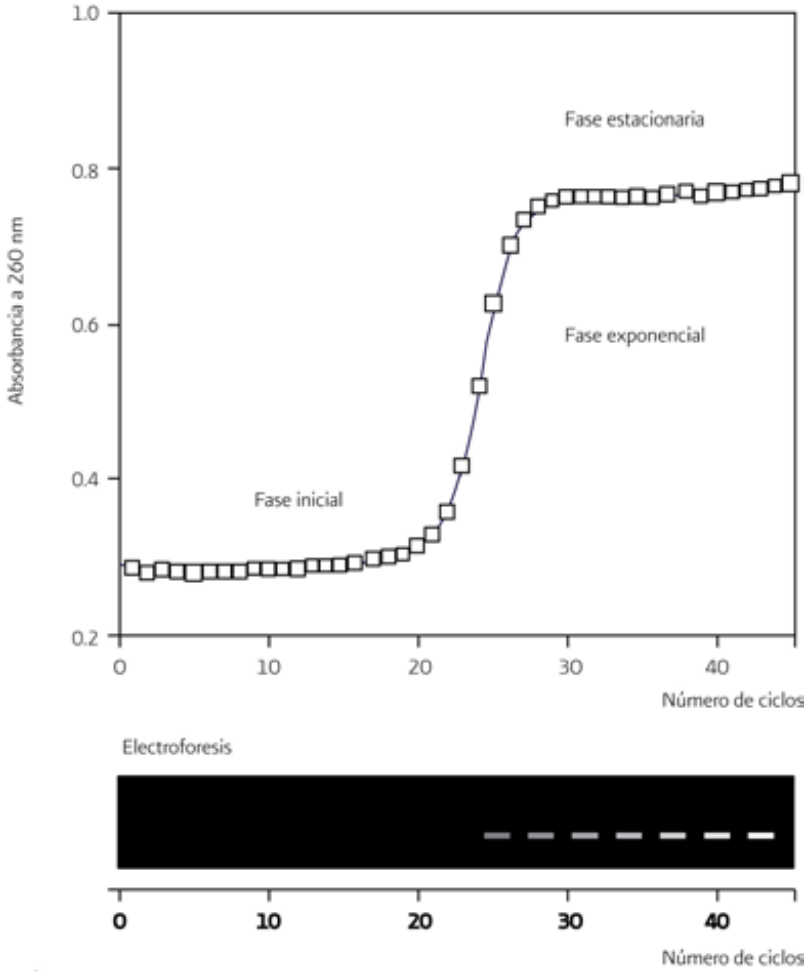
V2= es el volumen final de la reacción de PCR.

C2= es la concentración que necesitamos en la reacción de PCR.

El número de ciclos de la PCR **(Figura 5)** puede ser optimizado con respecto al número de copias de ADN inicial. En una PCR optima, se duplica la cantidad de copias de ADN en cada ciclo, bajo la ecuación 2^n, donde n es el número de ciclos. Pero en la práctica se alcanzan eficiencias de 80-95%, por lo que el factor de amplificación está más cercano a $(1.9)^n$. No es aconsejable realizar más de 40 ciclos porque los productos inespecíficos, no deseables, se forman en mayor proporción cuando el número de ciclos es mayor (Erlich, 1989). Después de un número determinado de ciclos, la amplificación deja de producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria (lo que se conoce como efecto de

meseta), generalmente en esta fase, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para cualquier uso **(Figura 6).**

Figura 6: Cinética de amplificación de la PCR. En los primeros ciclos de la PCR no hay un incremento significativo en la cantidad de ADN sintetizado. El punto donde inicia el incremento de ADN sintetizado (absorbancia) se conoce como fase inicial, posteriormente se presenta la fase logarítmica donde la eficiencia de la amplificación es cercana a 2n. Finalmente se encuentra la fase estacionaria, cuando la enzima presenta un decaimiento en su actividad y los reactivos se empiezan a agotar. En un gel de agarosa se aprecia como incrementa la concentración de la región que se está amplificando conforme pasan los ciclos. Modificado de (J. P. Herveg, 2006)



Sugerencias para mejorar la amplificación por PCR (Aoyaki, 2001)

Para mejorar:

a) Fidelidad y especificidad

- Seleccionar una enzima con actividad 3'-5' exonucleasa.
- Utilizar iniciadores con más de 15 nucleótidos.
- Incrementar la temperatura de alineamiento.
- Reducir el tiempo de desnaturalización y alineamiento en el ciclo.
- Reducir la concentración de iniciadores.
- Reducir el número de ciclos.
- Reducir la concentración de Mg^{2+}.
- Revisar que el termociclador funcione adecuadamente.

b) Eficiencia de amplificación

- Incrementar la concentración de dNTPs y enzimas.
- Usar en concentración baja algún aditivo.
- Reducir el tamaño del fragmento que se desea amplificar (amplicon).
- Probar con *Pfu* polimerasa.
- Confirmar que los iniciadores no forman dímeros.

5.7.6 Método de análisis

La manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (véase capítulo de electroforesis) se recomienda cargar el 50% del volumen del control negativo con el objetivo de visualizar cualquier amplificación que nos pueda dar indicio de una probable contaminación de los reactivos de PCR.

En caso de que no haya producto amplificado o que este tenga un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador.

5.7.7 Aplicaciones

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 biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras.

Antes del desarrollo de la PCR 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, permitiendo la lectura completa del genoma humano, así como de muchos organismos que se toman como modelos en la investigación de distintos problemas biológicos.

Hasta noviembre del 2013 existen clasificados en el sistema bibliográfico PubMed 320,953 publicaciones científicas internacionales que mencionan el uso de la técnica PCR.

5.7.8 Ventajas y desventajas

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde (D. Shibata, 1988). Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos (en este caso de los iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios (Mullis, 1990).

La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso.

5.7.9 Perspectivas

Como hemos comentado, la PCR es la herramienta fundamental en biología molecular y son innumerables las aplicaciones que se derivan de ella. Las técnicas asociadas a la PCR han avanzado de forma vertiginosa en los últimos años y cada vez se encuentran nuevas aplicaciones a la PCR.

El avance tecnológico actual ha proporcionado a la técnica un mayor poder de resolución al lograr la amplificación a partir de una molécula de ácido nucleico empleando técnicas de la nanotecnología (E. T Lagally ., 2001).

Los termocicladores han evolucionado enormemente en cuanto a la velocidad de amplificación, el número de muestras por placa, la capacidad de almacenamiento de datos en la memoria interna, de controlar distintas placas o bloques de amplificación y de manejar distintas temperaturas de las filas o hileras de tubos en una misma placa de amplificación. En los últimos años se ha logrado una reducción importante del tiempo de las pruebas y se espera que los equipos sean cada vez más rápidos y compactos.

Las compañías de reactivos para biología molecular han desarrollado productos que hacen que la técnica sea más rápida o sencilla y para pruebas específicas, como *kits* para trabajar muestras forenses degradadas.

Los costos de los equipos y los reactivos para la PCR han disminuido, en referencia a las décadas pasadas, haciendo que los procedimientos de análisis y diagnósticos de materiales biológicos aumentaran el empleo de esta técnica.

Sin embargo, la PCR aún no está reconocida como una metodología estandarizada a nivel mundial. Lo anterior hace que los diagnósticos moleculares no tengan valor legal en la reglamentación oficial en algunos países. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud, no incorpora técnicas moleculares dentro de sus métodos estandarizados debido a que en muchos países de tercer mundo es imposible comprar equipos y reactivos para hacer los diagnósticos con técnicas moleculares, entre ellos la PCR (H.Kator & Rhodes, 2003).

5.8 Primers

5.8.1 ¿Qué son?

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio. En la **Tabla 7** se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers.

Tabla 7: Criterios principales para la selección de primers.

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C
contenido GC	40-60%
auto-complementariedad	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dimeros de primer
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 µM. Altas concentraciones de primer pueden promover “mispriming” y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.

Los primers pueden contener extensiones en el extremo 5’ o “mismatches” para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG, o secuencias promotoras en la secuencia blanco. Pueden ser usados primers degenerados para extraer genes nuevos en base a su similitud o su secuencia de aminoácidos.

Una razón menos obvia por la que los primers fallan es la presencia de estructuras secundarias en el templado de DNA (MARTÍNEZ & RINCÓN, 2004).

5.8.2 Especificidad

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados. Sin embargo, el mismo primer puede dar una sola banda si se amplifica una sola clona de una biblioteca genómica (MARTÍNEZ & RINCÓN, 2004).

5.8.3 Secuencias Complementarias del primer

Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología

entre ellos. Si un primer tiene tal región de homología se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento. Si la homología ocurre en el extremo 3' de cualquier primer, ocurrirá la formación de dímeros de primer que, a menudo, prevendrá la formación del producto deseado por competición (MARTÍNEZ & RINCÓN, 2004).

5.9 Termocicladores

El termociclador es el aparato que permite llevar a cabo de forma automática y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura necesarios para la PCR.

Los primeros termocicladores eran robots que movían una gradilla de tubos entre varios baños termostáticos a tiempos preestablecidos. Los actuales constan,

básicamente, de un bloque de metal que puede ser calentado o enfriado, con posibilidad de programar las temperaturas y los tiempos.

Existen multitud de termocicladores en el mercado, aunque las características principales son las siguientes:

- Constan de un bloque térmico, cuyo calentamiento y enfriamiento se produce a gran velocidad, gracias al denominado sistema Peltier. Las rampas de subida y bajada de temperatura son importantes para trasladar los protocolos entre termocicladores, y uno de los factores de falta de reproducibilidad, lo que hace que deban ajustarse de nuevo las condiciones de tiempos y temperaturas.

Actualmente, están diseñados mayoritariamente para tubos de 0,2 ml, aunque aún existen también para 0,5 ml. Es importante el perfecto ajuste del tubo en el bloque. Por ello, se recomienda utilizar los de la misma marca que el fabricante.

El rango de temperaturas suele abarcar de 4ºC a 110ºC, aunque el rango habitual debe ser de 15ºC a 95ºC. No debe sobrecargarse al aparato con temperaturas extremas para prolongar su supervivencia. Los 4ºC se utilizan para refrigerar muestras tras una PCR, pero
15ºC también es una temperatura apta para ello. Respecto a llegar a 100ºC o más, tampoco es aconsejable, al menos, de forma habitual. Es preferible emplear termobloques para llevar a cabo esta labor (MARTÍNEZ & RINCÓN, 2004).

Existen bloques que permiten ajustar distintas temperaturas en función de las zonas del mismo. Se dice que tienen función gradiente. Son muy útiles cuando se realiza ajuste continuo de programas de PCR, especialmente de temperaturas de hibridación, o cuando se necesitan realizar diversos protocolos de forma simultánea.

- Tapa térmica: los más antiguos no la poseen, pero es un elemento indispensable para evitar la evaporación de la muestra, al contactar totalmente con la tapa del tubo.

- Software para programación de tiempos y temperaturas: se denomina programa a cada conjunto de datos térmicos y temporales de un protocolo de PCR. Cada termociclador tiene su propio software. Puede ajustarse también la velocidad de subida y bajada de temperaturas, es decir, las rampas.

Figura 7. Termocicladores

(MARTÍNEZ & RINCÓN, 2004)**.**

5.10 SYBR greenTM

Es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR.

Es simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se necesitan sondas específicas. Sin embargo, durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de primers y a otros productos inespecíficos, resultando en una sobreestimación de la concentración del DNA blanco.

5.11 ELECTROFORESIS

5.11.1 ¿Historia y concepto de la Electroforesis?

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Éste es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo **(Figura 8, A).** Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

Mediante la electroforesis en gel de agarosa, Thorne logró separar y visualizar tres formas topológicas diferentes del ADN del polyomavirus: superenrollada, relajada y lineal, tras haber marcado el ADN con [^{3}H] timidina (Thorne, Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA, 1996) (Thorne, 1967). El trabajo de Thorne recibió poca atención hasta principios de los años 70, cuando el empleo de enzimas de restricción permitió el análisis de moléculas de ADN mucho más grandes que los genomas virales. También resultó de gran importancia el desarrollo de métodos no radiactivos de tinción del ADN con suficiente sensibilidad para detectar cantidades de ADN del orden de nanogramos e inferiores. La utilización de bromuro de etidio para la detección de ADN en geles se desarrolló independientemente por dos grupos (Aaij & Borst, 1972), (Sharp & Sambrook, 1973), cuyos métodos siguen utilizándose hasta hoy sin apenas variaciones.

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación. (Fierro F. F., 2019)

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que

pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción, lo que puede combinarse con otras técnicas como el Southern blot, así como para analizar los productos de una reacción de PCR. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante.

La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Por lo tanto, no es posible separar el producto de digestiones con enzimas de restricción de corte infrecuente, como NotI o SfiI, y menos aún separar cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb). Reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo, estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular (Fierro F. F., 2019).

Esta limitación de tamaños se superó con el desarrollo de una técnica denominada electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Figura 1B). Esta técnica fue descrita inicialmente por Schwartz y Cantor (1984), quienes construyeron un aparato de electroforesis ortogonal en el cual dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionaban de forma alterna. El fundamento de esta técnica es la reorientación de las moléculas cuando cambia la dirección del campo eléctrico; en la electroforesis convencional las moléculas de ADN de gran tamaño quedan “atrapadas” en la malla que forma la agarosa en su avance a través del gel, pero la aplicación de dos campos eléctricos alternantes en ángulo permite una reorientación de las moléculas que de esta forma avanzarán un tramo más, antes de quedar de nuevo atrapadas. Cuanto más grandes son las moléculas mayor debe ser la duración de los campos eléctricos alternos para permitir la reorientación y en última instancia la separación de las mismas. Además de la duración del tiempo de los pulsos, otros parámetros como la intensidad y el ángulo que forman los campos eléctricos determinan el rango de tamaños que pueden separarse. Desde la invención del primer aparato de PFGE, la técnica se

ha mejorado y se ha aumentado el límite superior de tamaños (Fierro, Gutiérrez, & Martín, Karyotyping of fungi by Pulsed Field Gel Electrophoresis, 2001), desarrollándose otros sistemas como el CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) (**Figura 1C**), que han permitido la resolución de cromosomas de eucariotas inferiores como los de los hongos Neurospora crassa (M. J. Orbach, 1988)y Penicillium chrysogenum (Fierro, Gutiérrez, & Martín, 1993) con tamaños de hasta 10-12 Mb.

Figura 8. Esquema de diferentes sistemas de Electroforésis: A) Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa. El rectángulo representa la cámara de electroforesis con los electrodos positivo y negativo, y en el centro en gris más claro el gel de agarosa con sus pocillos. La flecha indica la dirección de migración del ADN. B) Esquema del fundamento del sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis), en este sistema dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionan de forma alternante. C) Esquema de uno de los sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado más utilizados, el CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field). Las líneas formando un hexágono representan los electrodos. La distribución de cargas permite que el campo eléctrico sea homogéneo en todo el gel y de esta forma evitar distorsiones en la migración del ADN en los diferentes carriles.

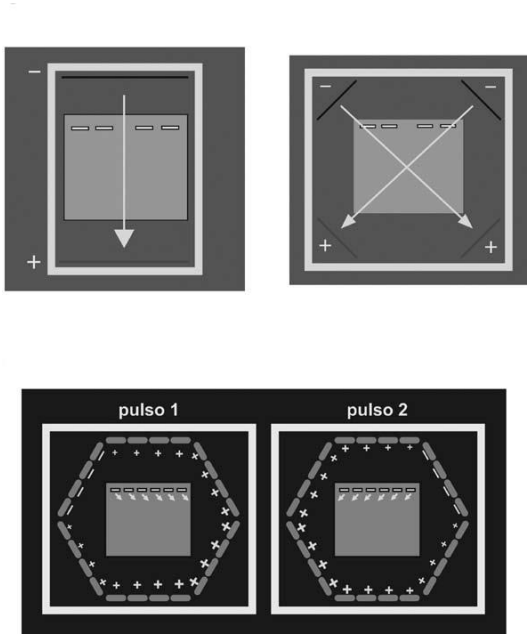
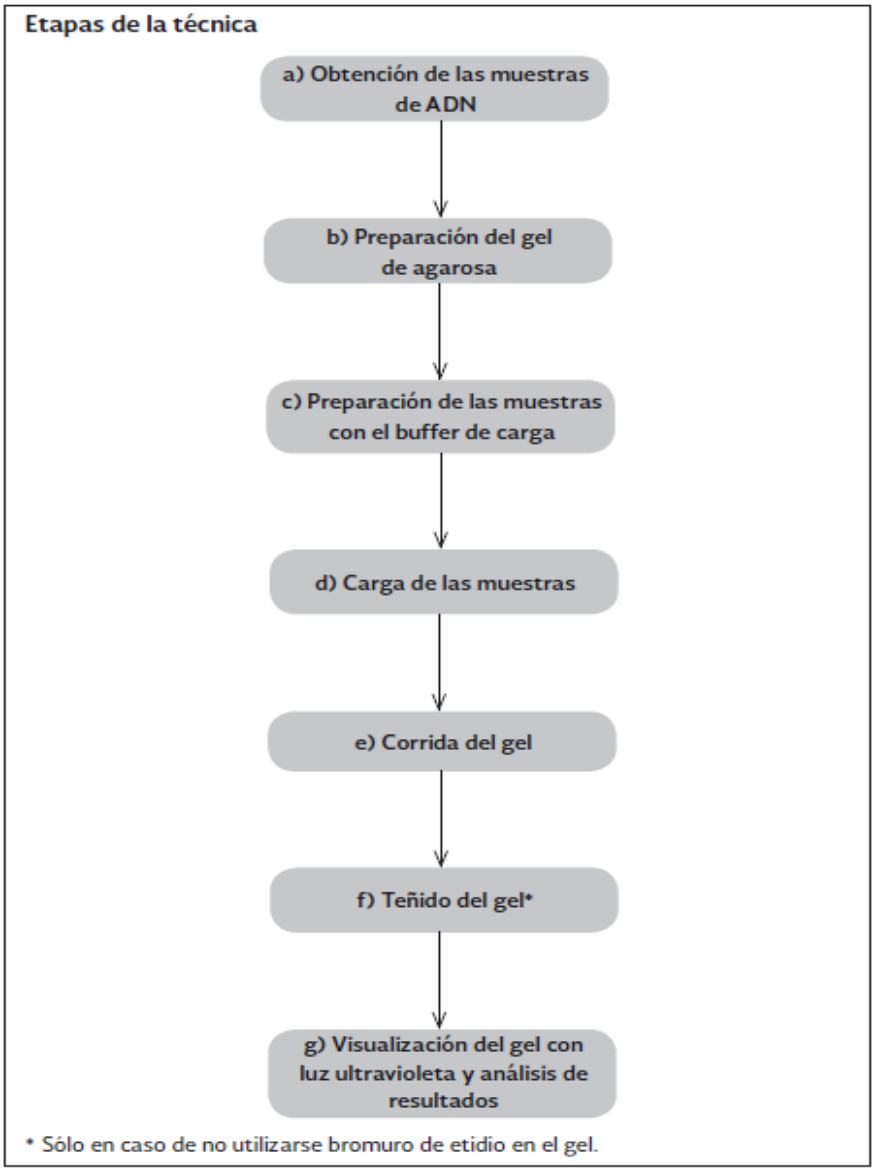


Figura 9. Etapas de la electroforesis (Fierro F. F., 2019).



5.11.2 PROTOCOLO PARA LA ELECTROFORESIS

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos α (1→3) y β (1→4). Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de Fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. En la **Tabla 8** se muestran las concentraciones de agarosa que es recomendable utilizar en función del rango de tamaño que pretendamos separar (Fierro F. F., 2019).

Tabla 8. Rango de separación de tamaños de ADN en función de la concentración y el tipo de agarosa utilizados.

Agarosa (%)	Estándar	Alta fuerza de gel (*High gel strength*)	Gel de baja temperatura de fusión (*Low gelling/ melting temperature*)	Gel de baja temperatura de fusión y baja viscosidad (*Low gelling/melting temperature, low viscosity*)
0.3	1 kb – 40 kb			
0.5	700 pb – 25 kb			
0.8	500 pb – 15 kb	800 pb – 10 kb	800 pb – 10 kb	
1.0	250 pb – 12 kb	400 pb – 8 kb	400 pb – 8 kb	
1.2	150 pb – 6 kb	300 pb – 7 kb	300 pb – 7 kb	
1.5	80 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	
2.0	60 pb – 2.5 kb	100 pb – 3 kb	100 pb – 3 kb	
3.0			50 pb – 1 kb	50 pb – 1 kb
4.0				100 pb – 500 pb
6.0				10 pb – 100 kb

Antes de empezar

Para realizar la técnica de electroforesis de ADN en gel de agarosa debe estar preparado el siguiente material antes de comenzar: muestras de ADN, marcador de tamaño o peso molecular, buffer de electroforesis (TAE o TBE), buffer de carga, solución de teñido de bromuro de etidio, además de todo el equipo de laboratorio y material que se indican en las secciones correspondientes. Marcador de tamaños. La utilización de un marcador de tamaño es fundamental para tener una referencia de los tamaños del ADN en las muestras. Algunos de los más utilizados son: Lambda 1 kb Ladder (fermentas), GeneRuler 50 bpd DNA Ladder (Fermentas), y ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind*III (Fierro F. F., 2019).

Equipo:

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación).
- Fuente de alimentación o de poder.
- Transiluminador (fuente de luz ultravioleta).
- Equipo fotográfico que permita tomar fotos del gel.

Estos dos últimos aparatos es preferible sustituirlos por un equipo de análisis de geles, el cual incluye la fuente de luz ultravioleta, el equipo fotográfico para la toma y digitalización de imágenes, y un equipo de cómputo con *Software* que permite distintos tipos de análisis, como el densitómetro. Ejemplos de este tipo de equipos son el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad, o el ImageQuant 300 de GE Healthcare. Además, se requerirá de un potenciómetro, una balanza y una autoclave para preparar y esterilizar las soluciones necesarias (Fierro F. F., 2019).

Material:

• Micropipetas.

• Puntas para micropipeta.

• Tubos tipo *eppendorf.*

• Probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones.

• Espátulas.

• Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio.

Reactivos:

• Agarosa (CAS N° 9012-36-6).

• Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1).

• Ácido acético glacial (CAS N° 64-19-7).

• EDTA (acido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4).

• Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3).

• NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2).

• Sacarosa (CAS N° 57-50-1).

• Glicerol (CAS N° 56-81-5).

• Azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9).

• Xileno cianol (CAS N° 2650-17-1).

• Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8).

Soluciones y buffers

Como buffer de electroforesis y para la preparación del gel puede utilizarse opcionalmente TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). El TAE tiene una menor capacidad de amortiguación que el TBE, y puede resultar en una acidificación del medio si la electroforesis se desarrolla durante un periodo muy prolongado, pero funciona muy bien con tiempos normales de electroforesis, además tiene una mayor capacidad de resolución que el TBE para tamaños grandes de ADN. Ambos suelen prepararse como soluciones concentradas, que pueden almacenarse a temperatura ambiente (previa esterilización en autoclave), éstas se

diluyen con agua antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso: 1x para el TAE y 0.5x para el TBE.

Buffer TAE (50x) 1 L

Tris base, 242 g; ácido acético glacial, 57.1 ml; 0.5 M EDTA pH 8, 100 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Buffer TBE (5x) 1 L

Tris base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g; 0.5 M EDTA pH 8, 20 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada o desionizada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de carga

El buffer de carga debe tener una alta densidad que permita que la muestra se introduzca en el pocillo del gel, además de colorantes que nos indiquen cuando debe detenerse la electroforesis. Existen varios tipos de buffers de carga, a continuación, se detallan los dos más utilizados (la inclusión de xileno cianol es opcional)

- Buffer de carga tipo I (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 40% sacarosa, en agua. Almacenar a 4°C.
- Buffer de carga tipo II (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 30% glicerol, en agua. Almacenar a 4°C.

Solución de bromuro de etidio

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El BrEt absorbe luz ultravioleta de $\lambda \approx 300$ nm, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis.

La solución stock de BrEt se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua, y se conserva a temperatura ambiente o a 4°C en un tubo envuelto en papel de aluminio. Existen dos formas diferentes de realizar el teñido del ADN:

1. Preparar el gel con BrEt incorporado.

2. Teñir el gel una vez finalizada la electroforesis con una solución de BrEt.

En ambos casos, la concentración final del BrEt en el gel o en la solución de teñido debe ser de 0.5 µg/ml.

Existen alternativas a la tinción con BrEt. El SYBR Gold (nombre comercial) es un colorante muy sensible con una elevada afinidad por el ADN, que puede detectar cantidades de tan sólo 20 pg de ADN. Se utiliza en una dilución 1/10 000 en agua para el teñido del gel tras la electroforesis. Su elevado precio hace que sólo sea recomendable su uso para la detección de cantidades muy pequeñas de ADN que no sean detectables mediante tinción con BrEt. Otros colorantes disponibles actualmente son el SYBR Green, también de alta sensibilidad, y el SYBR Safe, con una sensibilidad similar al BrEt, pero menor capacidad mutagénica.

Existen además toda una nueva gama de colorantes con diferentes propiedades para la tinción del ADN; compañías como Invitrogen han desarrollado un buen número de estos colorantes, con diferentes niveles de sensibilidad y destinados a diferentes aplicaciones (http://www.invitrogene.com, s.f.).

Método: (Fierro F. F., 2019)**.**

1. Preparación del gel de agarosa

    1.1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada (ver **Tabla 8**) en función del volumen de gel.

    1.2. Añadir la agarosa al buffer (TAE 1x o TBE 0.5x) en un matraz.

    1.3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.

    1.4. Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C (Nota: si se opta por añadir el BrEt al gel debe realizarse en este momento, a una concentración final de 0.5 µg/ml).

    1.5. Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.

    1.6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.

2. Preparación de las muestras

    2.1. Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 µl.

3. Carga de las muestras y corrida del gel

    3.1. Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.

    3.2. Añadir buffer de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.

3.3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.

3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 7.

Nota: Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.

3.5. Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos).

El ajuste del voltaje es muy variable dependiendo de la cámara y de los tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN.

Nota: Debe tenerse en cuenta que el ADN migra hacia el ánodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables.

3.6. Correr el gel hasta que el colorante azul de bromofenol esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Si no se añadió el BrEt al gel (paso 1.4), éste debe teñirse una vez finalizada la electroforesis. Para ello se saca el gel de su molde y se sumerge en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 15 min.

Nota: Ambas formas de tinción rinden resultados similares, pero se recomienda la tinción una vez finalizada la electroforesis para mantener el molde, peine y cámara libres de BrEt.

4.2. Colocar el gel sobre un Transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

4.3. (Opcional) Si hay bandas de tamaño pequeño que no se visualizan bien puede hacerse una etapa de desteñido con H_2O o 1 mM $MgSO_4$ durante 20 min.

4.4. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

Métodos de análisis

El análisis de los geles de agarosa y poliacrilamida se realiza preferiblemente en un aparato documentador de geles (por ejemplo, el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad), los cuales tienen incorporado un software que permite guardar fotografías del gel en formatos como TIFF, JPG, etc., además de llevar a cabo análisis densitométricos cuando se necesite realizar una cuantificación precisa de la intensidad de las bandas en el gel. Esta cuantificación puede tener distintas aplicaciones, por ejemplo, la estimación de la concentración de ADN en una muestra mediante comparación con otra muestra de concentración conocida, y la comparación de las cantidades de ADNc en un experimento de RT-PCR semicuantitativa. Además, los programas de análisis pueden realizar una estimación del tamaño de los fragmentos por comparación con los marcadores de peso molecular utilizados (Fierro F. F., 2019).

Aplicaciones

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 (clonación, secuenciación, mutagénesis, fusión con otros fragmentos, utilización como sondas, etc.). De forma particular, cada una de las tres técnicas que se describen en este capítulo tiene aplicaciones específicas que se indican a continuación: La electroforesis en gel de agarosa es la más utilizada, y se aplica en

todos los procedimientos indicados en el párrafo anterior. Se utiliza además muy frecuentemente para la realización de mapas de restricción, separándose los fragmentos que resultan de la digestión con diferentes enzimas de restricción, mediante digestiones individuales y dobles. Con frecuencia la electroforesis en gel de agarosa se utiliza también para separar fragmentos que se transferirán a una membrana (de nailon o nitrocelulosa) para llevar a cabo la técnica de Southern blot. También permite la separación de fragmentos de productos de PCR y la asignación de tamaño de estos.

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) tiene como objetivo la separación de fragmentos de ADN de tamaño elevado. Se utiliza para separar fragmentos de restricción y elaborar mapas de restricción cuando se utilizan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, como NotI o SfiI (Y. G El-Osta., 2005). Asimismo, ha tenido una gran aplicación en la separación de cromosomas enteros de eucariotas inferiores, principalmente hongos, para elaborar cariotipos (Fierro, Gutiérrez, & Martín, 1993), (Fierro, Gutiérrez, & Martín, 2001). Al igual que la electroforesis convencional, la PFGE puede aplicarse como parte de la técnica de Southern blot, para localizar sondas y genes específicos en un determinado cromosoma o fragmento de restricción de elevado tamaño. Una aplicación particular de la PFGE es el estudio de los polimorfismos en la longitud de los cromosomas (CLP: Chromosome Length Polymorphims). Estos estudios tienen diferentes aplicaciones, como son: 1) estudios de tipificación de cepas, como en el caso de Candida spp. en estudios epidemiológicos, donde la comparación del cariotipo electroférico resultó ser un buen marcador para la identificación intra- e inter-específica de cepas de Candida (Pittet, Monod, Filthuth, Frenk, & Auckenthaler, 1991); 2) análisis de reorganizaciones cromosómicas causadas por procesos de mutagénesis o transformación genética; 3) análisis de la plasticidad y variabilidad genómica en poblaciones silvestres y asignación de cariotipos específicos a fenotipos particulares; 4) estudio de la herencia de los polimorfismos cromosómicos; 5) estudio de cromosomas supernumerarios o minicromosomas.

La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante persigue objetivos similares a la electroforesis en gel de agarosa, pero se utiliza para la separación de fragmentos más pequeños y cuando se quiere obtener una mayor resolución. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de poliacrilamida es un procedimiento sencillo y permite la obtención de ADN de alta pureza que puede utilizarse para aplicaciones que requieran un ADN totalmente libre de impurezas. La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante no se utiliza para la técnica de *Southern blot*. Otra aplicación frecuente de este tipo de electroforesis es la detección de complejos ADN-proteína en la técnica denominada EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), también denominada geles de retardo. Esta técnica se basa en el retraso que provoca en la migración de un fragmento de ADN la unión al mismo de una proteína que reconozca alguna secuencia del fragmento y se una a él de forma específica (Carey, 1988), (Cann, 1989).

Ventajas y desventajas

Las técnicas de electroforesis de ADN, en especial la electroforesis en gel de agarosa es una técnica básica e imprescindible en cualquier laboratorio que utilice técnicas moleculares con ADN incluso en el nivel más básico. A la hora de montar un laboratorio de biología molecular lo primero que debe plantearse es la adquisición de los equipos necesarios para la realización de electroforesis en geles de agarosa. Resulta imprescindible una Cámara de electroforesis con sus accesorios y una fuente de alimentación, así como un Transiluminador y un sistema de fotodocumentacion. Los costos de estos equipos son asequibles y no requieren de grandes inversiones.

Algunos de los componentes utilizados en las técnicas de electroforesis de ADN son tóxicos y deben tomarse precauciones especiales en su manejo:

Bromuro de etidio. El bromuro de etidio es toxico a elevadas concentraciones debido a su capacidad mutagénica. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularlo en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes.

Las soluciones de teñido de bromuro de etidio pueden descontaminarse de la siguiente forma: agregar agua hasta que su concentración este por debajo de 0.5 µg/ml, a esta solución añadirle 0.2 volúmenes de ácido hipofosforoso al 5% recién preparado y 0.2 volúmenes de solución fresca de nitrito de sodio
0.5 M, mezclar con cuidado y checar que el pH sea inferior a 3, dejar incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h y agregar un volumen de bicarbonato de sodio 1 M. En este momento la solución puede desecharse.

Acrilamida. La acrilamida en polvo y en solución es toxica, y tiene la capacidad de penetrar a través de la piel. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularla en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes. Una vez polimerizada los geles ya no resultan tóxicos, sin embargo, se recomienda la utilización de guantes para su manipulación.

Luz ultravioleta. Los ojos y la piel deben protegerse adecuadamente mediante el uso de pantallas que filtren las longitudes de onda correspondientes a luz UV (Fierro F. F., 2019).

Perspectivas

Las técnicas de electroforesis de ADN son hoy en día básicas e insustituibles para cualquier trabajo en biología molecular con ácidos nucleicos, por lo que seguirán utilizándose previsiblemente durante mucho tiempo. A lo largo de los años se han ido desarrollando avances en este tipo de técnicas, como la PFGE, así como aplicaciones nuevas, como el EMSA. El continuo desarrollo de las técnicas de biología molecular hace prever que se encontrarán nuevas aplicaciones para los diferentes métodos de electroforesis de ácidos nucleicos en gel (Fierro F. F., 2019).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación de las cepas

Se realizo la resiembra de las tres cepas diferentes en tubos de ensayo con 10 ml de medio Czapek Dox Agar en cada tubo, la resiembra se hizo por triplicado así que se prepararon 90 ml del medio. Posteriormente las resisembras fueron puestas a incubación a temperatura ambiente durante 6 días.

6.2 Extracción de ADN de las cepas (Ver **Anexo 1**)

En primer lugar, se etiqueto cada tubo de las tres sepas quedando de la siguiente manera:

Cepa #1- **Z**

Cepa #2 - **S**

Cepa #3 – **U**

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de Fungal/bacterial Miniprep kit (Quick DNA) realizando los siguientes pasos. (la siguiente metodología fue aplicada a cada muestra de hongos):

1. Se centrifugo la muestra; 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

2. Una vez terminada la centrifugación se esperó que la muestra decantara.

3. Se tomaron 200 µL de la muestra y se colocaron en un tubo de lisis ZR BashingBead ™ (0.1 mm y 0.5 mm).

4. Se le agrego 750 µL de BashingBead™ Buffer al tubo de lisis con la muestra y se vortexeó por 10 minutos.

5. Luego del vortexeó, la muestra fue puesta nuevamente a centrifugación con las siguientes condiciones; 10,000 rpm a 4°C durante 1 minuto. Mientras tanto se preparó la primera columna de tubos; filtro Zymo-Spin ™ III-F sobre un tubo de recolección.

6. Terminada la centrifugación se transfirieron 400 µl del sobrenadante a la columna para luego centrifugarla con las siguientes condiciones; 8000 rpm a 4°C durante 1 minuto.

7. Se le agregó 1,200 µL de Genomic Lysis Buffer[1] al filtrado en el tubo de recolección del paso 6. (homogenizar bien la mezcla)

8. Posteriormente se le agrego 800 µL de la nueva mezcla del paso 7 a otra columna nueva IICR Zymo-Spin ™ 3 en un Tubo de recolección y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto.

9. Se Desechó el flujo o sobrenadante del tubo de recolección (lo que importa está en el filtro del tubo).

10. De la muestra del paso 8 agregar todo lo restante a una nueva columna IICR Zymo-Spin ™ 3 en un Tubo de recolección.

11. Se le agregó 200 µl de DNA Pre-Wash Buffer2 a la columna Zymo-Spin ™ IICR en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto.

12. Después se le agregó 500 µl de g-DNA Wash Buffer a la columna IICR Zymo-Spin ™ y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto.

13. A la misma columna se le agregó 40 µL de agua libre de nucleasas, pero antes la columna debe de tener por debajo un microtubo eppendorf.

14. Una vez que se agregó el agua libre de nucleasas, se centrifugó 10,000 x g a 4°C durante 1 minuto.

15. Lo que quedo en el microtubo después de la centrifugación es el producto final de la extracción, es decir, nuestra muestra de ADN.

Se realizaron 2 extracciones por cepa para tener mayor cantidad de muestra.

6.3 Cuantificación

Una vez extraído el ADN genómico de cada cepa se recurrió a la cuantificación de cada muestra agregando 1µL de cada una al equipo utilizado que en este caso fue un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La técnica fue fácil solo se tuvo que limpiar con etanol al 70% la lente del equipo antes de colocar cada muestra. Como blanco se utilizó el agua libre de nucleasas ya que fue nuestro último diluyente utilizado en la extracción.

Las muestras obtenidas fueron guardadas en congelamiento para su conservación.

6.4 Preparación de TAE 1X (Buffer)

Partiendo de una solución de TAE 50 X, se agregó 4 mL de esta solución a 96 mL de agua destilada. De esta manera se obtuvo 100 mL de una solución de TAE a concentración de 1X.

6.5 Preparación del gel de Agarosa al 1%

Se tomo la relación de que para preparar 100 mL de la solución del gel se agregaba 1 g de agarosa en 100 mL de TAE 1X. Así que como solo se necesitaba 50 mL de la solución del gel, se agregaron 0.5 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X. De esta manera se obtuvo 50 mL de solución de agarosa al 1%, la cual se calentó utilizando un microondas en rangos de 10 segundos hasta que esta solución se observó clara.

6.6 Preparación de la cámara de Electroforesis

En primer lugar, se taparon las paredes del molde del gel con cinta masking tape de tal manera que las paredes quedaran selladas y no hubiera fuga de la solución de agarosa al agregarla. Una vez tapada las paredes del molde se colocó el peine el cual sirve para crear las celdas del gel. Luego de haber colocado el peine cuidadosamente se agregó la solución de agarosa al 1% la cual se encontraba caliente, esta parte se realizó con mucho cuidado observando que la solución cubriera un poco más de la mitad de los dientes del peine. Una vez que la solución fue agregada correctamente se esperó por un lapso de 15 minutos a que esta enfriara y así el gel solidificara. Después que el gel solidificó se procedió a retirar el peine del gel, así como la cinta que sirvió para sellar (con mucho cuidado), ya retirado el peine la cámara quedo lista para realizar la carga de las muestras.

6.7 Carga de las muestras en la cámara de Electroforesis y Corrida en Gel

En primer lugar, se tomó un pedazo de 3 x 3 cm de Paraflint ya fue sobre este material que se realizaron las mezclas de las muestras. Las mezclas se prepararon de la siguiente manera; se mezclaron 2 µL del colorante SYBR Green con 3 µL del marcador de peso molecular más 3 µL del ADN extraído de cada cepa. Se prepararon cuatro muestras para cargar, una para cada muestra de ADN de cepa extraído y la cuarta fue solo de SYBR Green con el marcador de peso molecular la cual se utilizó como blanco.

Las mezclas se revolvieron bien antes de agregarse a cada celda del gel, todo esto fue utilizando una micropipeta. Una vez agregada las mezclas a su celda correspondiente se tapó la cámara de electroforesis conectando correctamente los cables de corriente de manera que se formaran los polos negativo y positivo **(Figura 8 A)**. después de colocar los polos se procedió a configurar la cámara de voltaje dejando así las condiciones de 90 volts, 400 miliamperios durante 30 minutos. Luego de configurar la cámara de voltaje esta se cubrió con una manta de modo que la cámara quedara totalmente oscura, después de eso se esperó a que la electroforesis corriera durante 30 minutos.

Una vez terminada la corrida del gel se procedió a destapar la cámara y despegar con mucho cuidado el gel con las muestras corridas para su posterior análisis en la cámara de luz UV.

6.8 Análisis del gel en la cámara de luz UV

Después de haber despegado el gel del molde este se pasó a la lente de la cámara de luz UV la cual antes se limpió con algodón y etanol al 70%. Una vez colocado el gel sobre la lente de la cámara esta se cubrió un domo de cartón para lograr un ambiente totalmente oscuro. Luego de cubrir bien la cámara de luz UV con el gel adentro se procedió a encender la luz UV para poder confirmar la presencia y calidad del ADN en las muestras. La visualización de la cámara UV se realizaron utilizando gafas especiales que contrarrestan la refracción de los rayos UV. Una vez

terminado el análisis se tomó evidencia de los resultados y se procedió a limpiar todo el equipo para después guardarse.

6.9 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando la **tabla 9** donde se muestran los reactivos junto con las cantidades utilizadas para la reacción.

Tabla 9. Reactivos y volumen de la preparación de la muestra madre para la PCR.

Reactivo	1 muestra (1X)	4 muestras (4X)
Buffer $MgCl_2$	2.5 µL	10 µL
Primer ITS 1	0.5 µL	2 µL
Primer ITS 4	0.5 µL	2 µL
dNTP´s	2.5 µL	10 µL
Taq Polimerasa	0.25 µL	1 µL
H_2O	16.75 µL	67 µL
ADN	2 µL	2 µL

Se preparó una mezcla madre para 4 muestras ya que contábamos con tres muestras de ADN genómico más un blanco que es el que no llevó ADN, por eso se preparó una solución madre para 4 microtubos.

A cada tubo se le agrego 23 µL de la mezcla madre, solo a tres se le agregaron 2 µL de cada muestra de ADN de tal manera que se realizara una reacción de 25 µL para cada muestra de ADN a excepción del blanco.

Una vez preparada las muestras con el blanco se llevaron a un termociclador para llevar acabo los diferentes ciclos de la PCR.

7. Discusión de Resultados

7.1 Cuantificación de la Extracción de ADN de las cepas

De cada cepa de hongo se obtuvo una muestra de 40 µL de ADN genómico con las siguientes concentraciones:

Tabla 10: Resultados de las lecturas en el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

EXTRACCION # 1			
Lecturas	ng / µL	(A) 260 / 280	(A) 260 / 230
Blanco	0.6	0.45	0.31
Muestra (**Z**)	74.5	1.17	0.48
Muestra (**S**)	19.6	1.37	0.19
Muestra (**U**)	9.0	1.57	0.08
EXTRACION # 2			
Lecturas	ng / µL	(A) 260 / 280	(A) 260 / 230
Blanco	0.1	0.59	0.43
Muestra (**Z**)	40	1.86	0.33
Muestra (**S**)	13.3	1.90	0.26
Muestra (**U**)	32.2	1.67	0.31

Para saber que extracción fue más exitosa nos guiamos de las lecturas donde la absorbancia tiene un rango de 260 a 280 ya que en este no hay mucha diferencia en la longitud de onda a comparación con es el 260 a 230, es decir que, para saber la calidad del ADN extraída nos basamos del rango de absorbancia de 260 a 280.En estudios anteriores se ha demostrado que, en el rango ya mencionado de absorbancia, cuando se obtiene lecturas de menores de 1.6 la calidad del ADN es baja, en cambio las lecturas mayores a 1.6 son consideradas de alta calidad. Como se observa en la **Tabla 10** fue en la segunda extracción donde se obtuvo lecturas en el rango de absorbancia de 260 a 280 mayores a 1.6, ya que la menor fue 1.67 y la mayor de 1.90.

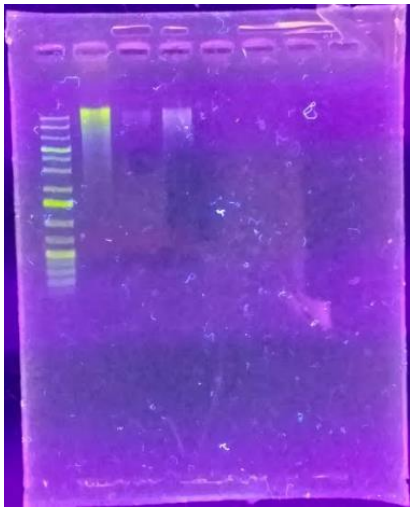
Esto significa que la segunda extracción resulto ser más exitosa que la primera ya que en esta no solo se obtuvo una buena cantidad de concentración de ADN por muestra, sino que este de buena calidad.

7.2 Electroforesis

Extracción # 1

Como se observa en la (**Figura 10)** debido a la calidad del ADN las bandas no se ven muy definidas, esto se debe a las bajas concentraciones y la calidad del ADN extraído por primera vez y cuyas lecturas se muestran en la **Tabla 10.**

Figura 10. Corrida en gel de agarosa Extracción # 1



Extracción # 2

En este caso (**Figura 11**) observamos lo contrario es decir unas bandas mas definidas y con mayor intensidad debido a las nuevas concentraciones y calidad de la nueva extracción reportada en la tabla 10. Aquí si se pudo observar la comparación con el marcador molecular que se encuentra en los rangos de ADN fúngico.

Figura 11. Corrida en gel de agarosa Extracción # 2

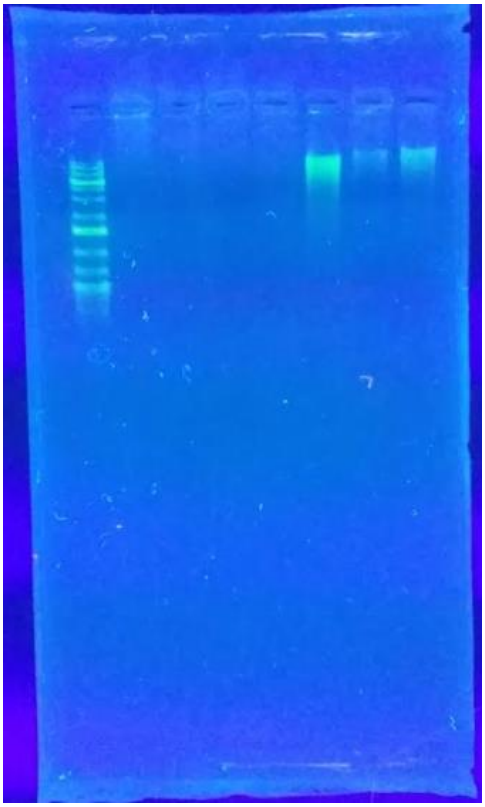
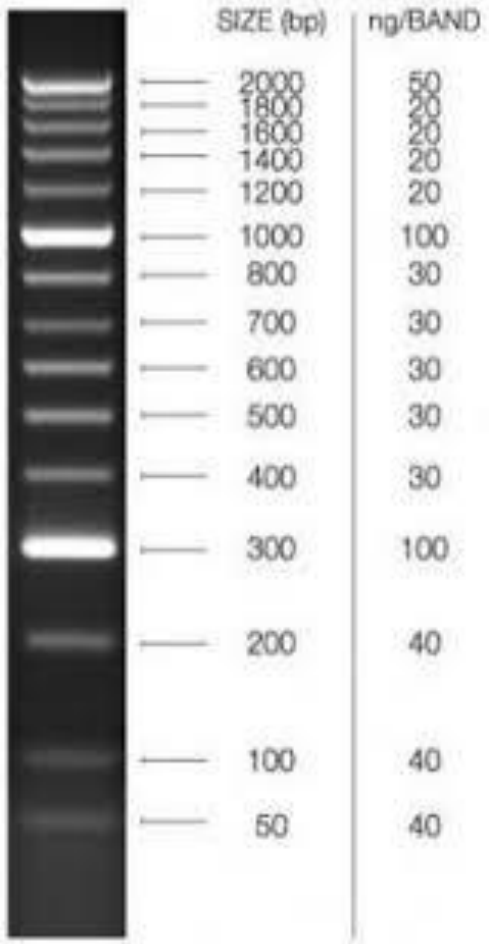


Figura 12: Ejemplo de marcador molecular



8. Conclusiones

Se logro la extracción de ADN genómico con buena concentración y calidad de tres cepas distintas de hongos entomopatógenos empleando el protocolo de Fungal/bacterial Miniprep kit (Quick DNA).

Esto es de gran importancia ya que este método es perfecto para la extracción de ADN no solo bacteriano si no también fúngico y la mejor parte es que se realizó de manera rápida en comparación a los métodos convencionales, este método permite obtener una buena muestra de ADN genómico de buena concentración, alta calidad y de manera rápida, claro, si se cumple bien con el protocolo.

Se pudo comprobar la presencia del ADN fúngico en la lectura de los geles de agarosa al 1%, ya que se logró observar la presencia de bandas más definidas en el rango del marcador molecular, con esto se comprobó también la presencia y la calidad del ADN extraído de las cepas.

9. Competencias desarrolladas

Durante la estancia que tuve en el laboratorio de biología molecular del Polo numero 4 del instituto tecnológico de México campus Tuxtla Gutiérrez logre adquirir nuevos conocimientos acerca del estudio de la biología molecular, así como logre aprender las técnicas de algunos de sus métodos para el estudio a nivel molecular.

Me gustó mucho aprender métodos de estudio a nivel molecular como lo fueron; la extracción de ADN genómico, la realización de una PCR, la cuantificación del ADN extraído, así como la de comprobar la presencia de este ADN mediante una electroforesis, la preparación de geles de agarosa a una concentración definida, así como realizar la preparación y el conocimiento de otras soluciones y reactivos importantes para el estudio molecular.

Fue de gran importancia cada materia que mis docentes me impartieron a lo largo de la carrera ya que gracias a estas fue más sencillo acoplarse a los diferentes métodos e información que se emplearon en este proyecto como por ejemplo el tener conocimiento sobre los medios de cultivo de microorganismos así como la cinética de crecimiento de cada uno, su identificación macroscópica y microscópica así como los diferentes métodos de análisis cuantitativo y cualitativo de muestras, sin faltar el estudio de la estructura de compuestos orgánicos e inorgánicos, todos estos conocimientos y mas fueron y siguen siendo de gran importancia no solo en la aplicación de la biología molecular sino que son hincapié para muchos otros estudios, estoy satisfecho con todo lo aprendido a lo largo de esta carrera y sobre todo porque logre aplicar todos los conocimientos adquiridos de esta, además me gustaría seguir adelante conociendo más sobre el área de la ingeniería bioquímica y genética, es por eso que me encanto el haber estudiado esta carrera porque con ella nunca se deja de aprender siempre hay una innovación, estoy muy satisfecho con todo lo aprendido hasta este momento.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica and Biophysica*, 192-200.

Agency, U. E. (2015). *Environmental Protection Agency*. Obtenido de http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm.

Agrios-GN. (1998). Fitopatología. *3ra edición*, 833.Alejandra Serrato D., L. F. (20 de DICIEMBRE de 2018). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. Obtenido de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf

Aoyaki, K. (2001). PCR. *A. S. Gerstein (ed.). Molecular biology problems solver: A laboratory guide*, 292-328.

Becerra V, P. M. (2007). RAPD and ITS reveal molecular variation of Chilean populations of Beauveria bassiana. *Agricultura Tecnica*, 115-125.

Bindslev, L., & Oliver, R. &. (2002). *In situ PCR for detection and identification of fungal species.* Mycol. Res. 106 (3): 277–279. DOI: 10.1017150953756202005646.

Bohinski. (1991). *Bioquímica.* MEXICO: Pearson Education.

Cann, J. R. (1989). Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 17032-17040.

Carey, J. (1988). Gel retardation at low pH resolves trp-repressorDNA complexes for quantitative study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 975-979.

D. Shibata, W. J. (1988). Analysis of DNA Sequences in Forty-Year-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. *Cancer Research*, 4564-4566.

de la Rosa, W. L. (2002). Beauveria bassiana as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. J. *Econ. Entomol*.

Destéfano, R. H. (2004). *Detection of Metarhizium anisopliae var. anisopliae within infected sugarcane borer Diatraea saccharalis (Lepidoptera, Pyralidae) using specific oligonucleóticos.* Gen. Mol. Biol. 27(2): 245-252. DOI:10.1590/S1599-69842011000100014.

Destéfano, R. H. (2004). Detection of Metarhizium anisopliae var. anisopliae within infected sugarcane borer Diatraea saccharalis (Lepidoptera, Pyralidae) using specific oligonucleóticos. *Gen. Mol. Biol*, 245-252.

DRIESCHE, V. (2008). *Control of pests and weeds by natural enemies.* Oxford: Blackwell Publishing P: 473.

E. T Lagally ., I. M. (2001). Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 565-570.

Erlich, H. A. (1989). *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification.* Nueva York: Stockton Press.

Faloona, M. K. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 335-350.

FAO. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina.* Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO. p. 33-35.

Fernandes, E. É. (2009). *Genetic diversity among Brazilian isolates of Beauveria bassiana: comparisons with non-Brazilian isolates and other Beauveria species.* J. Appl. Microbiol. 107(3): 760-774.

Fierro, F. F. (20 de DICIEMBRE de 2019). *Electroforesis de ADN*. Obtenido de www.publicaciones.inecc.gob.mx › libros › electroforesis

Fierro, F., Gutiérrez, S., & Martín, B. D. (1993). Resolution of four large chromosomes in penicillin producing filamentous fungi: The penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in Penicillium notatum and chromosome I (10.4 Mb) in Penicillium chrysogenum. *Molecular and General Genetics*, 573-578.

Fierro, F., Gutiérrez, S., & Martín, J. C. (2001). Karyotyping of fungi by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Recent Research*, 105-125.

GA, L. D. (2015). The endophytic fungal entomopathogens Beauveria bassiana and Purpureocillium lilacinum enhance the growth of cultivated cotton (Gossypium hirsutum) and negatively affect survival of the cotton bollworm (Helicoverpa zea). *Biological Control*, 53–60.

Gao, D. &. (2012). *Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community.* Front. Environ. Sci. Eng. 6: 82-97. DOI:.

Gao, D. &. (2012). Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community. *DOI: 10.10007/s11783-011-0306-6.*, 82-97.

García-Gutiérrez, C. &.-G. (2009). *Manual de técnica para el aislamiento, identificaciónón de Hongos y Nematodos entomopatógenos.* MEXICO.

García-Gutiérrez, C. &.-G. (2009). Manual de técnica para el aislamiento, identificaciónón de Hongos y Nematodos entomopatógenos. *ISBN: 978-607-414128-3*.

Gardes M, B. T. (1998). ITS primers with enhanced specificity for basiodiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 113-118.

H.Kator, & Rhodes, M. (2003). *Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance.* REINO UNIDO: Elsevier.

Horton TR, B. T. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 1855–1871.

http://frodo.wi.mit.edu/primer3/. (s.f.). Obtenido de http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

http://www.invitrogene.com. (s.f.). Obtenido de http://www.invitrogene.com

https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material docente/objeto/244484. (s.f.).

J. G. Viljoen., H. L. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook.* EE.UU: Springer Publishers.

J. P. Herveg, M. B.-M. (2006). *Cinética cuantitativa de la PCR.* BOLIVIA.

Jaronski, S. T. (2014). Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens. *Elsevier*, 763.

Jaronski, S. T. (2014). Mass production of entomopathogenic fungi. *Elsevier*, 357- 414.

L, E., & Aguirre, X. (2007). *Guía práctica sobre la técnica de PCR.* MEXICO: ecretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Lacey LA, G. D. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11,132,.

Leal-Bertioli, S. B. (2000). Genetic exchange in Metarhizium anisopliae strains coinfecting Phaedon cochleariae is revealed by molecular markers. *Mycol. Res. 104*, 409-414.

LÓPEZ-LLORCA, L. V., & HANS-BÖRJE, J. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *CUADERNO DE BIODIVERSIDAD*, 12-15.

M. A .Innis ., D. H. (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications.* New York: Academic Press.

M. J. Orbach, D. V. (1988). An electrophoretic karyotype of Neurospora crassa. *Molecular and Cellular Biology*, 1469-1473.

MARTÍNEZ, A. C., & RINCÓN, E. P. (2004). *MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS.* MEXICO: UNIVERSIDAD NACIONAL.

Meyling, N. V. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in temperate agroecosystems. *Potential for conservation*, 145-155.

Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Água*, 1.

Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 579-582.

Pathan, A. A. (2007). *Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs.* Fungal Gen. Biol.

Pittet, D., Monod, M., Filthuth, I., Frenk, E., & Auckenthaler, P. M. (1991). Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis as a powerful epiepidemiologic tool in yeast infections. *American Journal of Medicine*, 256S–263S.

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2016). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INTERCIENCIA*, 856-860.

Rafikov, M. B. (2008). *Mathematical modeling and control of population systems: applications in biological pest control.*

RINCON, A. M. (2004). *PCR.* MEXICO: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Robb F. T., D. L. (2001). Genomic sequence of hyperthermophile, Pyrococcus furiosus: implications for physiology and enzymology. *Methods in Enzymology*, 134–157.

Rodríguez TA, X. C. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 267–278.

S. Cheng, C. F. (1994 ;1995). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5695-5699.

Saiki R. K., D. H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 487-491.

Sharp, E. A., & Sambrook, B. S. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 3055-3063.

Srivastava CN, M. P. (2009). *Prospective role of insecticides of fungal origin.* review. Entomological Research P: 341–355.

Srivastava CN, M. P. (2009). *Prospective role of insecticides of fungal origin.* Entomological Research p:341–355.

Srivastava CN, M. P. (2009). *Prospective role of insecticides of fungal origin.* Entomological Research P: 341–355.

TÉLLEZ-JURADO. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 73-80.

Thomas, M. &. (2007). *Fungal bioinsecticide with a sting. .* Nature Biotech p:1367-1368.

Thorne, H. Y. (1967). Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *Journal of Molecular Biology*, 203-211.

Thorne, H. Y. (1996). Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology*, 234-239.

TORRES, M. O. (2015). *EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE BEAUVERIA BASSIANA.* NUEVO LEON: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. PAG: 13.

TORRES, M. O. (2015). *EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE BEAUVERIA BASSIANA.* NUEVO LEON: P. 17.

VAN DRIESCHE, R., HODDLE, M., & CENTER, T. D. (2008). Control of pests and weeds by natural enemies. *an introduction to biological control*, 182-185.

www.biologia. edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif. (s.f.).

Y. G El-Osta., A. J. (2005). Construction of a combined physical and genetic map of the chromosome of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 and characterization of the rRNA operons. *Microbiology*, 875-892.

Zhang LW, Y. J. (2011). Evaluation of Beauveria bassiana (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of Dendroctonus valens. *Insect Science*, 209–216.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo Del Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit

Catalog No. D6005 (www.zymoresearch.com)

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Genomic Lysis Buffer** to a final dilution of 0.5 %(v/v) *i.e.*, 500 µl per 100 ml.

1. Add 50 – 100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells1 that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) to a **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 mm & 0.5 mm)**. Add 750 µl **BashingBead™ Buffer** to the tube2.

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for ≥ 5 minutes.

> ***Note:*** *Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.*
>
> *For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.*

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm) in a microcentrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.

4. Transfer up to 400 µl supernatant to a **Zymo-Spin™ III-F Filter** in a **Collection Tube** and centrifuge at 8,000 x *g* for 1 minute.

5. Add 1,200 µl of **Genomic Lysis Buffer** to the filtrate in the Collection Tube from Step 4.

6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IICR Column3** in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.

7. Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.

8. Add 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the Zymo-Spin™ IICR Column in a new Collection Tube and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.

9. Add 500 µl **g-DNA Wash Buffer** to the Zymo-Spin™ IICR Column and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.

10. Transfer the Zymo-Spin™ IICR Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (35 µl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the column matrix. Centrifuge at 10,000 x *g* for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

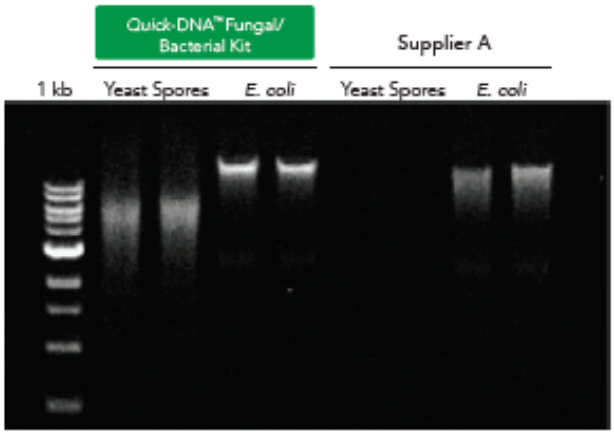
ANEXO 2

Ficha técnica Del Equipo

Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Kits (fungi & bacteria)

- **Boost Detection:** Included BashingBeads™ ensure complete lysis of tough-to-lyse samples.
- **Ultra-Pure:** Ready for qPCR, Next-Gen Sequencing, arrays, etc.
- **Simple Workflow:** Fastest workflow (< 20 minutes).

Highest Yields



DNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (spores) and *E. coli* using the *Quick*-DNA™ Fungal/Bacteria Kit was high-quality and structurally intact. Equivalent amounts of yeast and bacteria were processed using the *Quick*-DNA™ Fungal/Bacterial Kit or the Supplier A kit. Equal volumes of eluted DNA were analyzed on a 0.8% (w/v) agarose gel stained with EtBr.

Simple Workflow

Homogenize sample with ZR BashingBead™ Lysis Tube

Filter Lysate with Zymo-Spin™ III-F

Bind, Wash, Elute DNA with Zymo-Spin™ IIC

PCR Ready, Ultra-Pure DNA

All the Zymo Research environmental kits include BashingBead™ technology for complete recovery of DNA from a wide variety of tough-to-lyse samples.

Product	Cat. No.	Size	Binding Capacity	Minimum Elution	Input
Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Microprep Kit	D6007	50 preps	≤ 5 µg	≥ 10 µl	10 - 20 mg wet weight
Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit	D6005	50 preps	≤ 25 µg	≥ 35 µl	50 - 200 mg wet weight
Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Midiprep Kit	D6105	25 preps	≤ 125 µg	≥ 150 µl	200 - 500 mg wet weight
Quick-DNA™ Fungal/Bacterial 96 Kit	D6006	2 x 96 preps	≤ 5 µg	≥ 25 µl	10 - 20 mg wet weight