

Estandarización de técnicas moleculares basadas en amplificación y análisis de restricción para la identificación de especies de *Aspergillus* spp.

Yury V. Montoya Villa^a, Lizeth A. Montes Correa^a, Angela López^b y Orville Hernández Ruiz^{a, b}.

^a Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Grupo de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones biológicas (CIB), Medellín, Colombia 2020.

Resumen

La implementación de las técnicas moleculares permitió la identificación y clasificación de las especies de *Aspergillus* en secciones, incorporando modificaciones en la taxonomía a partir de los análisis filogenéticos.

Objetivos: Identificar aislamientos de *Aspergillus* spp. pertenecientes al banco de cepas de la escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, mediante el empleo de los métodos moleculares PCR y PCR-RFLP.

Métodos: Se realizó caracterización macroscópica y microscópica inicial de los aislamientos de *Aspergillus* spp., se eligieron 17 cepas de trabajo a las cuales se les realizó extracción de ADN genómico, posteriormente se estandarizaron las condiciones de trabajo de PCR y PCR-RFLP.

Resultados: Se confirmó la morfología de las 17 cepas de *Aspergillus*, utilizando las claves para el género *Aspergillus* de Piontelli E. 2008. Para la amplificación por PCR se realizó inicialmente el proceso de estandarización de las condiciones de trabajo, mediante gradientes de temperatura realizados para cada par de cebadores (ITS1F/ITS4R, V9GF/LS266R, CaM2F/CaM2R y BTUBF/BTUBR), los resultados de la tipificación molecular por PCR para cada uno de los aislamientos presentó amplificación de ADNg para los 3 genes estudiados (β -*tubulina*, *calmodulina* y la región *ITS*), para gen de β -*tubulina* se obtuvieron bandas entre 549 y 574 pb para los aislamientos Afl2, Afl3, Af1, Acl2, At1 y At4, cuyos tamaños eran los esperados de acuerdo con la digestión *in silico* realizada, para *calmodulina* se observaron bandas de tamaños esperados entre 727 y 798 pb para los aislamientos Afl2, Afl3, Af1, And1, An2, At1 y At4, para el gen *ITS1* los aislamientos Afl2, Afl3, Afl4, Af1, At4 y An2 presentan bandas de tamaños esperados entre 602 y 945 pb, finalmente la región *ITS2* mostró amplificación en todos los aislamientos con tamaños de bandas esperados entre 965 y 1243 pb. La PCR-RFLP se utilizó como técnica complementaria a la PCR, con la finalidad de llevar la identificación hasta nivel de especie, la digestión de β -*tubulina* con *TaqI* genera bandas específicas para *A. flavus* (Afl3), *A. fumigatus* (Af1), *A. terreus*

(At1), cuyos números de cortes coinciden con los esperados según la digestión *in silico*, en el caso de la digestión con *calmodulina*, se observó que una sola cepa presentó corte (Af1), generando tres perfiles con tamaños de banda de ~ 200, 280 y 290 pb, por último, la región *ITS* mostró patrones de diferenciación en las cepas *A. fumigatus* (Af1), *A. versicolor* (Av2) y *A. hollandicus* (Ah1).

Conclusiones: Al complementarse la identificación molecular con la RFLP, de los tres genes estudiados, se concluye que los mejores resultados se obtuvieron con los genes β -*tubulina* digerido con la enzima *Taq1*, que discrimino un total de 3 especies: *A. flavus* (Afl3), *A. fumigatus* (Af1) y *A. terreus* (At1), e *ITS1* con la enzima *Avall* con las especies *A. fumigatus*, *A. versicolor* y *A. hollandicus*.

Palabras clave: *Aspergillus* spp., extracción, ADNg, RFLP, PCR, electroforesis.

Abstract

The implementation of molecular techniques allowed the identification and classification of *Aspergillus* species into sections, incorporating taxonomy modifications based on phylogenetic analyzes.

Objectives: To identify isolates of *Aspergillus* spp. belonging to the strain bank of the School of Microbiology of the University of Antioquia, using the molecular methods PCR and PCR-RFLP.

Methods: Initial macroscopic and microscopic characterization of the *Aspergillus* spp isolates was performed, 16 working strains were chosen to which genomic DNA extraction was performed, subsequently the working conditions of PCR and PCR-RFLP were standardized.

Results: The morphology of the 17 strains of *Aspergillus* was confirmed, using the keys for the *Aspergillus* genus of Piontelli E. 2008. For PCR amplification, the process of standardization of working conditions was initially carried out, using temperature gradients performed for each pair of primers (ITS1F / ITS4R, V9GF / LS266R, CaM2F / CaM2R and BTUBF / BTUBR), the results of the PCR molecular typing for each of the isolates presented amplification of gDNA for the 3 genes

studied (*β-tubulin*, *calmodulin* and *ITS* region), for bands of *β-tubulin*, bands between 549 and 574 bp were obtained for the Afl2, Afl3, Af1, Acl2, At1 and At4 isolates, the sizes of which were expected according to the *in silico* digestion performed, for *calmodulin* bands of expected sizes between 727 and 798 bp were observed for the Afl2, Afl3, Af1, An1, An2, At1 and At4 isolates, for the ITS1 gene the Afl2, Afl3, Afl4, Af1, At4 and An2 isolates have bands of expected sizes between 602 and 945 bp, finally the *ITS2* region showed amplification in all isolates with expected band sizes between 965 and 1243 bp. The PCR-RFLP was used as a complementary technique to the PCR, in order to take the identification to species level, the digestion of *β-tubulin* with *TaqI* generates specific bands for *A. flavus* (Afl3), *A. fumigatus* (Af1), *A. terreus* (At1), whose cutoff numbers coincide with those expected according to *in silico* digestion, in the case of *calmodulin* digestion, it was observed that a single strain presented a cut (Af1), generating three profiles with band sizes of ~ 200, 280 and 290 bp, finally, the ITS region showed differentiation patterns in strains *A. fumigatus* (Af1), *A. versicolor* (Av2) and *A. hollandicus* (Ah1).

Conclusions: Upon complementing the molecular identification with the RFLP, of the three genes studied, it is concluded that the best results were obtained with the *β-tubulin* genes digested with the enzyme *TaqI*, which discriminated a total of 3 species: *A. flavus* (Afl3), *A. fumigatus* (Af1) and *A. terreus* (At1), and ITS1 with the enzyme *AvaI* with the species *A. fumigatus*, *A. versicolor* and *A. hollandicus*.

Keywords: *Aspergillus* spp., extraction, DNAg, RFLP, PCR, electrophoresis.

Introducción

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran en la naturaleza como saprofitos de material orgánico, se adaptan a un amplio rango de temperaturas que van desde los 6°C a los 55°C, se reproducen tanto sexual como asexual y tienen alto niveles de producción enzimática [6]. Actualmente se han descrito alrededor de 344 especies de *Aspergillus* organizadas en 4 subgéneros y 19 secciones, incluyendo especies patógenas oportunistas de humanos y animales, y especies importantes explotadas industrialmente [5].

Años atrás la clasificación de hongos se basaba en las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, lo que implicaba que grupos de microorganismos de distintos linajes fuesen agrupados como de la misma especie. En adición, estas clasificaciones eran dependientes del uso de cultivos axénicos, lo que ocasionaba una susceptibilidad a variaciones en las características propias de cada cepa, dando como resultado una identificación inexacta del microorganismo. A nivel de género la identificación de *Aspergillus* es simple, algunas de sus características morfológicas son similares entre secciones, lo que limita su utilidad para la identificación hasta nivel de especie. La implementación de los métodos de tipificación molecular, tales como PCR y PCR-RFLP, en los últimos años ha permitido discriminar las diferentes especies de *Aspergillus* [10].

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de genes, se utilizan con frecuencia para la identificación de especies. La región *ITS* (Espaciadores internos transcritos) situada entre la subunidad 18S y 28S del ADNr ha sido aceptada como el cebador código de barras de los hongos [10]. A pesar de ello, se ha demostrado que esta región no presenta suficiente variabilidad para identificar especies de *Aspergillus* [10]. Debido a esto, se ha estudiado considerablemente y propuesto la identificación de especies de *Aspergillus* mediante marcadores secundarios como el gen de la *β-tubulina*, *calmodulina* y la *RNA pol II*, estas zonas variables permiten diseñar cebadores que hibriden y revelen secuencias conservadas, específicas e inespecíficas dependiendo del objetivo del estudio [3].

Estas técnicas moleculares se han convertido en el método de elección de investigadores debido a su eficiencia en la identificación de especies de *Aspergillus*.

En estudios realizados por Nazarí et al (2015), se desarrolló una prueba de PCR-RFLP basada en el gen de la β -tubulina, con la finalidad de diferenciar 273 especies de *Aspergillus* clínicas y ambientales. El gen fue amplificado utilizando el par de cebadores universales (Bt2a y Bt2b), y la enzima de restricción *AlwI* (*BspPI*) para la digestión de los amplicones. Los resultados mostraron que el gen fue exitosamente amplificado y los productos digeridos generan diferencias en los perfiles de restricción [10]. No obstante, otras investigaciones demuestran que trabajar con una sola región como la *ITS* no es suficiente para discriminar incluso con secuenciación, por lo que concluyen que se requiere una batería de más de un gen para discriminar entre especies [17].

Diba et al, (2014) ha descrito mediante la modificación de la técnica PCR-RFLP otra metodología para la identificación de aislados de *Aspergillus*; se basaron en la amplificación de las regiones *ITS1* e *ITS2* del gen rDNA de 205 aislamientos ambientales y clínicos de *Aspergillus*, en sus resultados se obtuvo suficiente variabilidad en las secuencias que revelan patrones discriminatorios entre las especies lo que permite la identificación de las especies aisladas [3].

Es así como los métodos moleculares han proporcionado la eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad para identificar especies de *Aspergillus*. La clave del éxito en la identificación de las especies está en la complementación de las técnicas puesto que la caracterización morfológica da un primer acercamiento; la PCR, amplifica el gen de interés, aunque se pueden obtener bandas del mismo tamaño en diferentes organismos lo cual no permite concluir una identificación, pero, como se ha mencionado anteriormente, la técnica de RFLP permite ser complementaria a las demás técnicas para lograr una discriminación hasta nivel de especie

[14]. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar aislamientos ambientales y clínicos de *Aspergillus* spp., obtenidos en el cepario de la escuela de microbiología de la Universidad de Antioquia, mediante el empleo de las técnicas moleculares PCR y PCR-RFLP, que permitirán contar con métodos estandarizados y secuencias definidas de cada especie para ser empleadas en futuras investigaciones.

Materiales y métodos

Aislamientos fúngicos y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron 17 aislamientos clínicos y ambientales obtenidos del cepario de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, almacenados en glicerol al 10%. Estás fueron cultivadas en Agar Sabouraud (Difco TM), para su recuperación, cultivados a 25 °C en agitación constante. Para realizar la extracción de ADN los aislamientos, fueron cultivados en medio líquido BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con glucosa al 1% e incubados a 25 °C. Los aislamientos fueron conservados en tubos eppendorf de 1.5 ml con agua tipo 1, a una temperatura de -20°C.

Clasificación morfológica de los aislamientos

Todos los aislamientos fueron identificados por sus características macro y microscópicas utilizando las claves para el género *Aspergillus* de Piontelli E. 2008 [8].

Extracción de ADN.

Se recuperaron 17 cepas en agar Sabouraud, se incubaron a 25°C durante 7 días, una vez confirmada la presencia de esporas y la pureza de los cultivos, se adicionó a cada caja de Petri 1 ml de solución salina. Posteriormente, se realizó

raspado con asa microbiológica sobre la colonia y se transfirió 0.001 ml de la solución de esporas a un tubo cónico con 10 ml de BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con glucosa al 1%. Estos cultivos, fueron incubados a 25°C en agitación constante, hasta observar fase micelial (~96h). El ADNg fue extraído por disrupción mecánica adicionando, 0.5 ml de biomasa, ~0.5 ml de perlas de vidrio de 0.4 - 0.5 mm y 300 µl de buffer de lisis (Tris-HCL, Buffer 1M, pH 8) (Jena Bioscience) en un tubo eppendorf de 1.5 ml en 5 ciclos de vortex por 30 segundos seguido por incubación en hielo por 2 minutos. Después de romper el micelio, se continuó con las indicaciones descritas en el protocolo de Hoffman y Winston, 1987 [5] y Ros-Chumillas et al., 2007 [1]. La concentración de ADN fue cuantificada por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000c (ThermoScientific) manteniendo como criterios de aceptación una concentración de ADN de 100 ng/µl, la pureza con la relación 260/280 entre 1.7 a 2 y la integridad en electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa

La identidad de los aislamientos de *Aspergillus* spp. fue confirmada mediante PCR siguiendo las recomendaciones del inserto del kit de PCR de SMOBIO ([TP1000] ExcelTaq™ Taq DNA Polymerase, (5 U / µl, 500 U)), con las siguientes modificaciones: la mezcla de reacción (20 µl) contenía 1 ng/µl de ADN, 0.3 µl de dNTPs, 0.3µl de cada cebador (Macrogen,Inc.) secuencias descritas en la **Tabla 1**, 0.25 µl de Taq DNA polimerasa, 2 µl de Taq Buffer 10x con un contenido de 20 mM de MgSO₄ y 1.85 de agua de PCR. El control positivo utilizado fue ADN de *Aspergillus fumigatus*, perteneciente al Grupo de Biología Celular y Molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), cuya identidad fue confirmada utilizando

secuenciación de última generación. El programa de amplificación fue: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 6 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 35 ciclos de alineación entre 53-68.7°C (dependiendo del gen a amplificar) por 30 segundos, 35 ciclos de elongación a 72°C por un minuto, un ciclo de elongación final a 72°C por 5 minutos y un ciclo de incubación a 12°C durante toda la noche.

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 1 h a 80 V, adicionando 10µl de cada amplicón y 2µl de *GelRed*, se utilizó tampón TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Para determinar las longitudes de los amplicones se utilizó el marcador de peso de ADN de 100 pb (*GeneRuler, Fermentas*), Los geles se analizaron utilizando el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ de BIO RAD.

Digestión In silico

Las secuencias de los genes *calmodulina (CaM)*, *β-tubulina (BTUB)* y el *espaciador transcrito interno (ITS1 e ITS2)* (regiones ITS corresponden a la misma secuencia de bases con par de cebadores distintos) de las especies de *Aspergillus* fueron obtenidas a partir de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y de la base de datos de la Corporación de Investigación de Biología (CIB) y analizadas en el software Geneious R11 (<https://www.geneious.com>). Estas fueron alineadas con los cebadores correspondientes para cada gen (**Tabla 1**), seguido de una simulación de digestión con las enzimas de restricción incluidas en el software. Finalmente se seleccionaron las enzimas con mayor potencial discriminatorio entre especies.

Tabla 1. Secuencias de cebadores y temperaturas de alineamiento empleados en la amplificación de cada gen.

Gen	Tm (°C) [*]	Primer	Dirección	Secuencia primer (5'-3')	T° de alineación (°C) ^{**}
Espaciador transcrito interno(ITS)	61.7	ITS 1	Foward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	56
	56.4	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
	58.4	V9G	Foward	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	59
	62.1	LS266	Reverse	GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT	
Calmodulina (CaM)	59.4	CF1	Foward	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR	58,7
	53.5	CF4	Reverse	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC	
β -tubulina (BTUB)	65.3	BTUB	Foward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT	62,6
	68.7	BTUB	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT	

*Temperatura de alineación teórica.

**Temperatura de alineación estandarizada en condiciones de laboratorio.

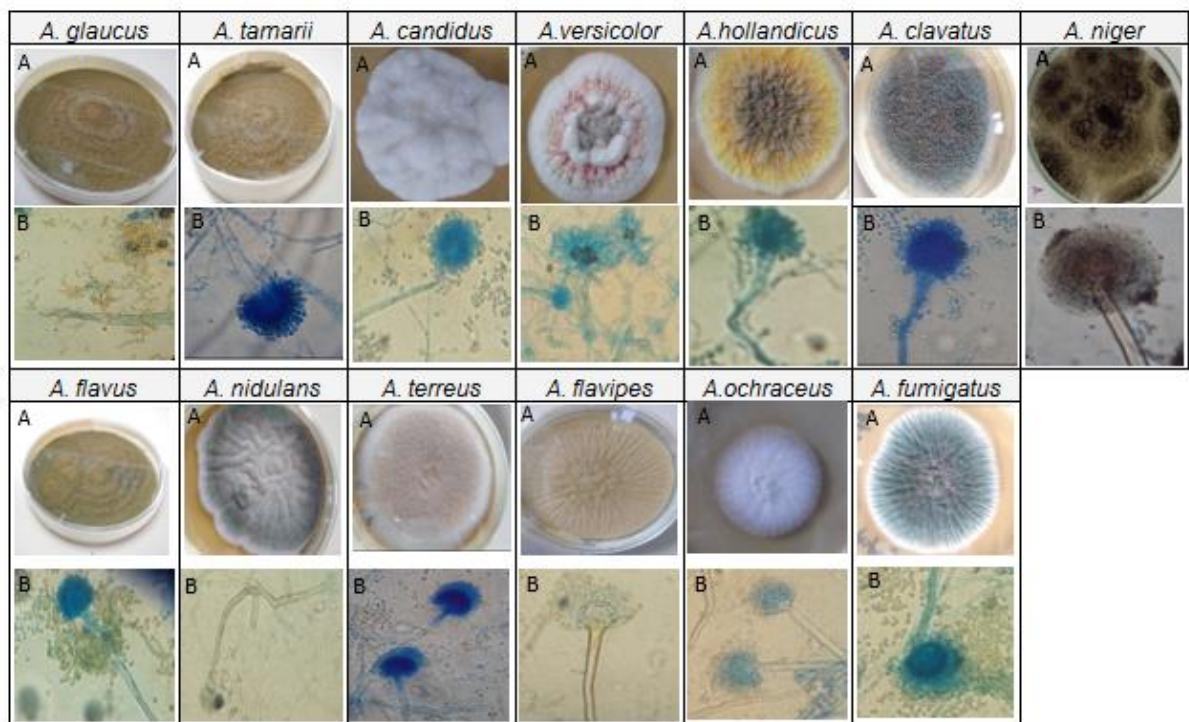
Digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción.

Los amplicones obtenidos en la PCR descrita anteriormente, fueron digeridos con enzimas de restricción de la siguiente manera: región ITS con *BanI* (*Nebcutter*) y *AvaII* (*Nebcutter*), gen β -tubulina con *TaqI* (*Promega*) y *KpnI* (*Promega*), finalmente gen calmodulina con *HinfI* (*Promega*). La composición de la reacción consistió en 10 μ l de amplicones de PCR, 1 μ l de enzima, 2.5 μ l de Buffer y 11.5 μ l de agua libre de nucleasas, para un volumen final de reacción de 25 μ l. El programa de restricción consistió en 2 horas de activación, 20 min de inactivación; las temperaturas utilizadas en cada paso fueron dependientes de las indicaciones de la casa comercial de cada enzima. Los fragmentos digeridos de la reacción RFLP (10 μ l de cada muestra) se separaron en un gel de agarosa al 2% durante 2 h a 100 V. Para determinar los tamaños de los fragmentos de restricción, se utilizó el marcador de ADN de 100 pb (GeneRuler, Fermentas) como estándar. Los geles se analizaron utilizando el fotodocumentador Gel DocTM XR+ de BIO-RAD y finalmente se compararon con los patrones de restricción obtenidos mediante el diseño *in silico*.

Resultados

Identificación por características morfológicas.

Se realizó la identificación morfológica de las 17 cepas de *Aspergillus* spp. codificadas así: Ag1, Agc2, Ata2, Ac1, Av2, Ah1, Acl2, Afl2, Afl3, Afl4, And1, At1, At4, Afp1, An2, Ao1 y Af1 (**Tabla 2**), de las cuales 10 fueron previamente secuenciadas en el trabajo de investigación titulado “*Draft Genome Sequence of 11 clinical and environmental Colombian isolates of genus Aspergillus*” perteneciente al Grupo de investigación de Biología celular y molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) [17]. Todos los aislamientos mencionados presentaron la macro y micromorfología representativa descrita para cada especie según las claves taxonómicas de Piontelli E. 2008 [8] (**Figura 1**). Para la clasificación se tuvo en cuenta las cuatro características principales en la identificación de *Aspergillus* spp., estas son: presencia o ausencia de mótulas, disposición de las mótulas o fiálides sobre la vesícula, presencia de teleomorfo y coloración de las colonias. Entre las cepas evaluadas se tiene que, *A. flavus* presenta colonias de micelio verde amarillo y aspecto granular (A), cabezuelas radiadas biseriadas, conidióforos largos y anchos, pared gruesa hialina y vesículas globosas completamente fértiles (B); a su vez, *A. niger* presenta colonias de micelio algodonoso blanco con superficie de color negro a café oscuro, de aspecto granular grueso (A), cabezuelas radiadas biseriadas, conidióforos largos de pared gruesa y lisa de color amarillo, vesículas globosas completamente fértiles, fiálides cortas y conidias globosas pigmentadas de café. Todas las demás cepas cumplieron con las cuatro características propias del género.



A. Identificación Macroscópica de las especies de *Aspergillus*.

B. Identificación Microscópica de las especies de *Aspergillus*.

Figura 1. Caracterización Macroscópica (A) y Microscópica (B) de las 17 cepas de *Aspergillus* incluidas en este estudio.

Amplificación de genes ITS, β -tubulina y Calmodulina.

En investigaciones anteriores se ha demostrado que los genes a los cuales se hibridan los cebadores descritos en Tabla 1, utilizados en este estudio, están presentes en todas las especies de *Aspergillus* [7] [3] [2]. Inicialmente se realizó el proceso de estandarización de las condiciones de trabajo utilizando el ADN de *A. fumigatus* como molde y realizando gradientes de temperatura realizados para cada par de cebadores (ITS1F/ITS4R, V9GF/LS266R, CaM2F/CaM2R y BTUBF/BTUBR) (**dato no mostrado**), haciendo uso del termociclador T100™ de BIO-RAD. Las temperaturas óptimas de alineamiento obtenidas se presentan en la **Tabla 1**.

Posteriormente se amplificaron las 17 cepas, con el fin de comprobar si esta técnica por sí sola permitía discriminar entre los aislamientos. Es así como los

resultados de la tipificación molecular por PCR para cada uno de los aislamientos presentó amplificación de ADNg para los 3 genes estudiados, como se muestra en la **Figura 2**. Se observaron bandas del tamaño esperado de acuerdo al gen a amplificar de cada cepa, en la **Figura 2a** gen de β -tubulina se obtuvieron bandas entre 549 y 574 pb para los aislamientos Afl2, Afl3, Af1, Acl2, At1 y At4, cuyos tamaños eran los esperados de acuerdo con la PCR *in silico* realizada (**Tabla 2**). Igualmente, en la **Figura 2b**, se observan bandas de tamaños esperados para el gen calmodulina entre 727 y 798 pb para los aislamientos Afl2, Afl3, Af1, And1, An2, At1 y At4. La **Figura 2c**, región ITS1 los aislamientos Afl2, Afl3, Afl4, Af1, At4 y An2 presentan bandas de tamaños esperados entre 602 y 945 pb. Finalmente, la **Figura 2d** región ITS2, mostró amplificación en todos los aislamientos con tamaños de bandas esperados entre 965 y 1243 pb. Los últimos tamaños, eran esperados

Tabla 2. Resultados *In silico* del tamaño (pb) de los amplicones y los perfiles de restricción de los genes β -tubulina, calmodulina, ITS1 e ITS2 después de la digestión con las enzimas *TaqI*, *HinI*, *Avall* y *BanI* respectivamente, para cada una de las especies estudiadas.

Clasificación	Especie	Código	β -tubulina		calmodulina		ITS1		ITS2	
			Amplicon	Perfiles <i>TaqI</i>	Amplicon	Perfiles <i>HinI</i>	Amplicon	Perfiles <i>Avall</i>	Amplicon	Perfiles <i>BanI</i>
A	<i>A. tamarii</i>	Ata2	-	-	-	-	598	-	990	608,382
	<i>A. candidus</i>	Ac1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. flavus</i>	*Afl2, 3 y 4	549	343,161,45	795	349,272,90,77,7	945	864,81	-	-
	<i>A. nidulans</i>	And1	380	124,19,120,109,8	727	-	572	301,143,128	965	364,322,214,65
	<i>A. ochraceus</i>	Ao1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. fumigatus</i>	Af1	565	244,189,124,8	798	222,169,142,137,121,7	603	412,139,52	993	609,321,63
B	<i>A. glaucus</i>	*Ag1 y 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. versicolor</i>	Av2	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. hollandicus</i>	Ah1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. clavatus</i>	Acl2	561	216,124,94,72,55	-	-	1037	416,378,220,23	1243	1078,152,13
	<i>A. terreus</i>	*At1 y 4	574	292,181,82,19	791	259,139,111,98,88,79,10,7	612	465,147	1005	613,329,63
	<i>A. flavipes</i>	Afp1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. niger</i>	An2	-	-	775	-	602	559,43	978	330,301,284,63

*Mismo tamaño de banda para las cepas.

A: Cepas secuenciadas.

B: Cepas no secuenciadas.

teniendo presente que este gen es universal el cual es utilizado en múltiples estudios para la identificación de especies de organismos eucariotas, debido a que son genes hiperconservados entre género e hipervariables entre especies, lo cual es un requisito indispensable a la hora de elegir los genes sobre los cuales se hará el diseño de cebadores para su posterior amplificación e identificación [14].

De las 17 cepas estudiadas, Afl4 no amplifico para el gen β -tubulina y calmodulina y las cepas Acl2, Ata2, And1, At1 y Afp1 no amplificaron para la región ITS. Para las demás cepas el tamaño de banda fue el esperado, sin embargo, los tamaños de las cepas And1, Af1, Ata2, At1 y An2 difieren entre 1 y 44 pb, por lo cual al revelarlas en gel de electroforesis no se diferenció entre una especie u otra, lo que implica que la sola identificación por PCR, no es concluyente para la diferenciación de las especies de *Aspergillus* spp.

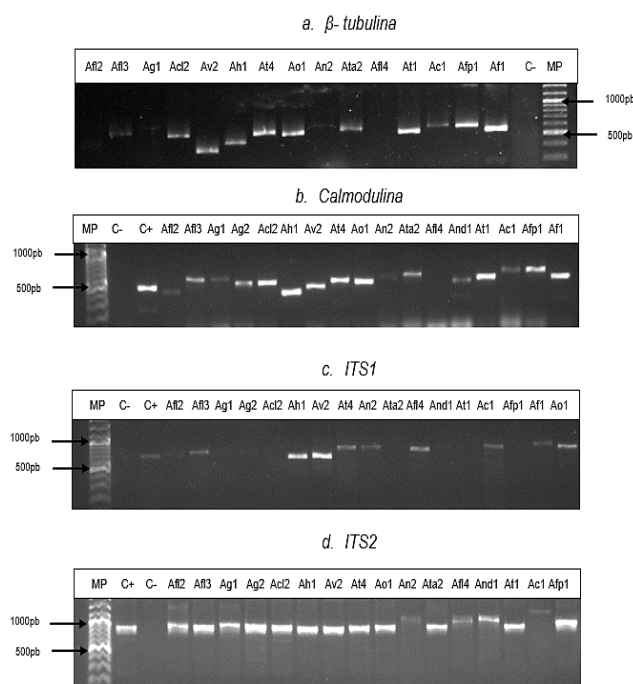


Figura 2. Amplificación por PCR para cada uno de los genes de los aislamientos identificados fenotípicamente. a. Amplificación de gen β -tubulina (BTUBF/BTUBR), Af1 corresponde al control positivo. b. Amplificación de gen calmodulina (CF1F/CF4R). c. Amplificación de región ITS1 (ITS1F/ITS4R). d. Amplificación de región ITS2 (V9GF/LS266R). MP: marcador de peso molecular ADN GeneRuler 100pb; C+: control positivo *Aspergillus fumigatus* (Af1) cepa secuenciada. C-: control negativo ausencia de ADN.

Digestión de amplicones con las enzimas de restricción TaqI, HinfI, BlnI y AclI.

La PCR-RFLP se utilizó como técnica complementaria a la PCR, con la finalidad de llevar la identificación hasta nivel de especie, para esto se realizó inicialmente digestión *in silico* con las enzimas de restricción presentes en el software y se eligieron *TaqI*, *HinfI*, *BlnI* y *AclI*, para los genes β -*tubulina*, *calmodulina* e *ITS* respectivamente, ya que presentaron el mayor poder discriminatorio entre las especies estudiadas, este número de enzimas se eligió teniendo en cuenta que una sola enzima al hacer la restricción, generaba los mismos perfiles en diferentes especies. Los perfiles de restricción obtenidos *in silico* se muestran en la **Tabla 2**.

En la **Figura 3** se presenta el gel de electroforesis con los resultados obtenidos mediante la implementación de esta técnica, la cual muestra los perfiles de restricción después de la digestión con las enzimas de restricción utilizadas para cada gen, en donde la digestión de β -*tubulina* con *TaqI* genera bandas específicas para *A. flavus* (Afl3), *A. fumigatus* (Af1), *A. terreus* (At1), cuyos números de cortes coinciden con los esperados según la digestión *in silico* (**Tabla 2**), las bandas de menor tamaño no se evidencian en el gel debido a los pocos pares de bases (Figura 2). Otras de las cepas que presentan perfiles de restricción son *A. oryzae* (Ao1), *A. niger* (An2), *A. versicolor* (Av2), *A. hollandicus* (Ah1) y *A. glaucus* (Ag2), de estas no se registran datos de secuencias en las bases de datos disponibles, a pesar de ello los patrones de restricción son diferentes en número y tamaño (pb), lo que indica una gran posibilidad de que la cepa digerida con *TaqI* sea la especie de *Aspergillus* identificada fenotípicamente. Por otro lado en el gel se observó que *A. terreus* (At4) y *A. glaucus* (Ag2) presentan el mismo número de bandas de tamaños

idénticos por lo cual no se logra hacer una identificación de las mismas. Finalmente las cepas que no se lograron identificar por RFLP fueron *A. tamaritii* (Ata2), *A. flavus* (Afl2 y 4), *A. flavipes* (Afp1), *A. nidulans* (And1), *A. glaucus* (Ag1), debido a la baja concentración de ADN en el amplicón, a la ausencia de amplicón en el caso de Afl4 como se observa en la **Figura 2**, o a que la enzima de restricción no reconoce secuencias blanco o un patrón de secuencia específico en el ADN de estas cepas [17].

En el caso de la digestión con *calmodulina*, se observa en la **Figura 3** que una sola cepa presentó corte (Af1), generando tres perfiles con tamaños de banda de ~ 200, 280 y 290 pb; dichos tamaños no corresponden exactamente con lo reportado en la digestión *in silico*, puesto que teóricamente después de la restricción se generan 6 bandas (**Tabla 2**). En este punto hay que tener en cuenta que el gel de electroforesis no discrimina entre menos de 100 pb, por lo que las bandas de 142,137 y 121 pb se visualizan en una sola y la banda de 7 pb no es visible en este gel, obteniendo así las bandas generadas experimentalmente. Ahora bien, analizando el resto de las cepas en las cuales no hubo digestión, se deducen varias hipótesis, como que la enzima se inactivó o no hubo reconocimiento de la secuencia blanco; por otro lado, también hay que tener en cuenta la resolución de la electroforesis (tipo de gel, porcentaje de polímero y afinidad del buffer de corrido) y las condiciones en que se trabaja (voltaje y tiempo de corrido), todo esto teniendo en cuenta que en la PCR realizada para las 17 cepas con este gen se obtuvo amplicón.

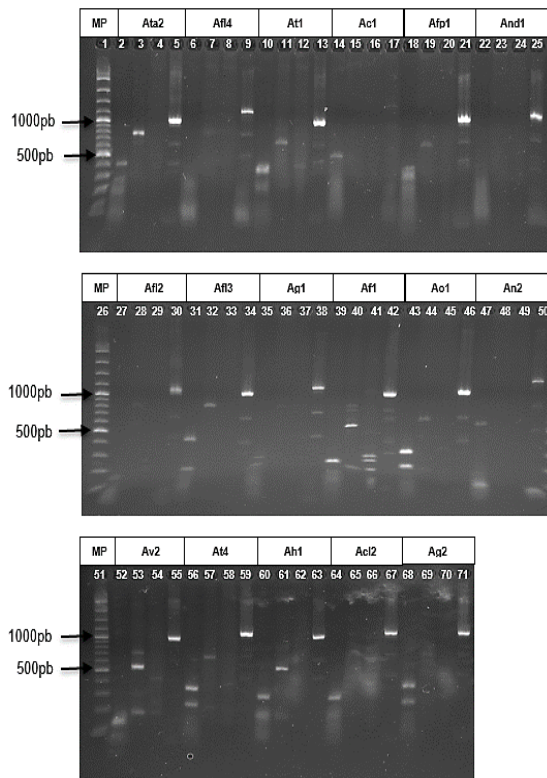


Figura 3. Perfiles de restricción de los genes β -tubulina por *TaqI*, calmodulina por *HinfI*, *ITS1* por *Avall* e *ITS2* por *BanI*. El nombre de las cepas está indicado en la parte superior y las restricciones para cada uno de los aislamientos siguen el orden: β -tubulina, *ITS1*, calmodulina, *ITS2* de cada aislamiento. Marcador de peso molecular (MP) GeneRuler 100 pb. Las flechas indican las bandas de 500 y 1000pb.

Finalmente los perfiles de restricción obtenidos en la región *ITS* amplificada con el par de cebadores *ITS1F* e *ITS4R* y digerida con la enzima de restricción *Avall*, muestra patrones de diferenciación en las cepas *A. fumigatus* (Af1), *A. versicolor* (Av2) y *A. hollandicus* (Ah1) y, con número de bandas 4, 3 y 2 respectivamente de tamaños diferentes, lo cual permite la discriminación de las mismas en nivel de especie. Por otro lado las demás cepas no pueden ser diferenciadas por la ausencia de perfiles de restricción. En cuanto a la digestión de la misma región *ITS* amplificada con el par de cebadores V9GF y LS266R con la enzima *BanI*, se evidenció en el gel que para todas las cepas analizadas excepto para *A. candidus* (Ac1), se presenta un patrón de banda en 1000 pb cuyo tamaño

excede el del amplicón de cada cepa, estas banda sin caracterizar en los gels indican digestión incompleta en el análisis de RFLP, dificultando la diferenciación de especies de *Aspergillus*.

Primrose y Twyman (2007) en su libro exponen que en las últimas décadas las técnicas moleculares basadas en el ADN genómico han logrado importantes resultados en la identificación y clasificación de una gran diversidad de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran las especies de *Aspergillus*; la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) es una de estas técnicas, la secuenciación parcial o total del genoma, entre otras; hacen parte de las mismas [14].

La morfología forma parte fundamental para la identificación de especies de *Aspergillus* spp.. En la caracterización morfológica realizada en el presente estudio se estableció que todos los aislamientos estudiados fueron identificados como *Aspergillus* spp., en base a sus características fenotípicas. Autores han caracterizado especies de *Aspergillus* en base a la tasa de crecimiento de colonia, el grado de esporulación, color del micelio, producción de exudados, presencia de cleistotecio, entre otras características [15]. En este estudio la clasificación de las especies de *Aspergillus* se fundamentó en las cuatro características principales reportadas por Diba K.: presencia o ausencia de mótulas, disposición de las mótulas o fiálides sobre la vesícula, presencia de teleomorfo y coloración de las colonias [7]. En la **Figura 1** se muestra la macro y micromorfología de las 17 cepas estudiadas, donde se aprecian las características propias de cada especie, que pueden ser comparadas con los aportes morfotaxonómico en el género *Aspergillus* de Piontelli E. [8].

En los últimos 10 años, se han desarrollado técnicas para la detección de ADN de *Aspergillus* spp., ya que por sí sola la caracterización a nivel morfológico no permite la identificación de las especies. Mediante la implementación de la PCR, inicialmente las investigaciones se centraban en la detección de ADN para definir género, sin embargo, la identificación a nivel de especie se hizo necesaria debido a la resistencia presentada por algunas de estas especies a antimicóticos, por lo cual fue preciso realizar modificaciones en la técnica que permitieran hacer un análisis más minucioso para la identificación de especies de este género. Además era un género que se encontraba muy bien documentado, lo que facilitaba en gran medida su identificación al comparar las secuencias con las reportadas en las bases de datos [13]. No obstante, se han venido diseñando cebadores universales para la identificación de mohos y demás hongos filamentosos [13].

En esta investigación la realización de la técnica molecular PCR reveló resultados que por sí solos no permiten la diferenciación a nivel de especie de las cepas, puesto que las variaciones en tamaño de fragmentos son mínimas. Si bien el espaciador transcrito interno ha sido definido como el código de barras oficial para hongos, debido a que tiene cebadores universales y es el marcador genético más secuenciado en hongos, no contiene suficiente variación para distinguir entre todas las especies [16]. También se ha reconocido como una región extremadamente conservada para *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces* [12]. Esta teoría coincide con lo encontrado en nuestra investigación, al observar la **Figura 2d** para la región *ITS 2*, se evidencia la falta de variabilidad entre las especies por lo cual no se puede realizar una identificación hasta nivel de especie,

observando que la mayoría de las cepas presentaron tamaños de banda similares. Samson RA. et al. 2014 propone como marcador secundario a *calmodulina* (CaM), en su investigación demostró que es fácil de amplificar y distingue entre todos los *Aspergillus* con excepción de *A. elegans* y *A. steynii*, en concordancia con estos resultados en nuestra investigación se obtuvo amplificación de todas la cepas analizadas excepto *A. flavus* (Afl4) un aislado ambiental, sin embargo los otros dos aislados de esta especie (Afl2 y Afl3) amplificaron, confirmando que el gen de CaM es un marcador genético preciso para la identificación de especies de *Aspergillus* como lo plantea Samson RA. et al. 2014 [15].

Por otro lado *β -tubulina* y *calmodulina* se han propuesto como marcadores genéticos de identificación secundarios para las especies *Penicillium* y *Aspergillus* [4], respectivamente, puesto que Los exones de estos genes están altamente conservados por lo tanto, son buenos lugares para la unión del cebador, mientras que los intrones entre los exones actúan como la principal fuente de variación de la secuencia [4]. Por tanto se ha encontrado que es *BTUB* es fácil de amplificar, para nuestra investigación se obtuvo amplificación en todas las especies de *Aspergillus*, sin embargo carece de variabilidad en tamaño para definir la especie como en los demás genes analizados.

Los motivos por los cuales algunas de las cepas no amplificaron en los diferentes genes, puede deberse a varias razones, como la baja concentración de ADN; previo a la PCR se realizó la cuantificación de ADN, para la cual se fijó una concentración de trabajo de 100 ng/ μ l, sin embargo el transporte y manipulación constante del ADN puede conllevar a una disminución de la concentración o incluso la degradación del material genético, además puede presentarse

contaminación [18], que el cebador no encuentre el sitio de hibridación o esté mal diseñado, de estas razones puede deducirse que el problema no fue de los cebadores puesto que ya se habían utilizado en otras investigaciones y es de conocimiento en la comunidad científica que amplifican las mismas regiones, por lo cual se concluye que la causa de la no amplificación fue directamente del ADN [2].

Las cepas identificadas con **B** en la **Tabla 2**, no registran datos de la secuencia del gen ni del genoma completo en las bases de datos consultadas, por lo cual no hay un referente sobre el tamaño esperado de las bandas; pese a ello, se tiene previo conocimiento de que los cebadores utilizados para cada gen eran específicos y cumplían los parámetros esenciales para el correcto funcionamiento en la reacción: presentaban un tamaño de ~ 20-25 nt , contenido de G-C entre 40 y 60% y base G o C en el extremo 3' [2]. En las bandas observadas, las cepas se encuentran en pares de base muy cercanos a los aislamientos analizados *in silico*, lo que sugiere que también son especies del género *Aspergillus*, esto es claramente observado en la **Figura 2d** de la región *ITS2* donde la mayoría de las bandas amplificaron al mismo nivel en el gel de electroforesis, teniendo en cuenta, además, que la identificación fenotípica de los mismos es acorde con las características propias del género.

Teniendo en cuenta que las amplificaciones por sí solas no generan resultados concluyentes para la identificación de especies de *Aspergillus*, en esta investigación decidimos implementar la técnica de diferenciación PCR-RFLP. Autores han reportado la diferenciación de especies de *Aspergillus* mediante la utilización de esta técnica, en las cuales han utilizado cebadores específicos para la amplificación de genes en cada especie de *Aspergillus* spp., y se

ha encontrado que los marcadores genéticos más estudiados han sido β -*tubulina*, *calmodulina* e *ITS* [12]. Es por ello que en nuestra investigación decidimos realizar en análisis en conjunto de estos tres marcadores genéticos con las mismas cepas con el fin de encontrar diferencias significativas que contribuyan a la rápida y precisa identificación de especies de *Aspergillus* spp.

Diba K. et al. 2014, desarrolló un método para la identificación de especies de *Aspergillus* médicamente importantes utilizando la enzima de restricción *MwoI* en las regiones *ITS* del gen de ADNr, incluyeron 11 especies de *Aspergillus* de las cuales se diferenciaron ocho: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. amstelodami*; además, los perfiles de restricción de las otras tres especies presentaron tamaños similares lo que dificultó su identificación [2]. En nuestro estudio la digestión de la región *ITS1* con la enzima *Avall*, no generó patrones de restricción concluyentes, puesto que solo se logró identificar 3 cepas *A. fumigatus*, *A. versicolor* y *A. hollandicus*, de las cuales solo *A. fumigatus* tiene un patrón de referencia para verificar su identificación puesto que es una de las cepas secuenciadas.

Como se ha mencionado anteriormente, Samson et al. (2014), recomiendan como estándar en la identificación de *Aspergillus*, *calmodulina* (CaM), como un marcador secundario de identificación, no obstante, la utilización de este marcador en este trabajo, no aportó información valiosa que sirviera como base en la identificación de las especies, puesto que de 17 cepas sólo se obtuvo perfiles de restricción en una (Af1).

Por otro lado, Nasri T. et al. (2015) en su estudio utilizó el método de PCR-RFLP en el gen β -*tubulina* con la enzima de restricción *AlwI* para la rápida

identificación de especies de *Aspergillus*, del cual concluyeron que el patrón de RFLP producido por la enzima permitió identificar seis especies de *Aspergillus* médicamente importantes, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. clavatus* y *A. nidulans* [7]; en nuestro caso la digestión para este gen se realizó con la enzima *Taq 1*, la cual generó perfiles que permitieron identificar 3 especies, *A. flavus* (Af13), *A. fumigatus* (Af1) y *A. terreus* (At1), sin embargo otras cepas que generaron cortes, no se encontraban reportadas en las bases de datos por lo cual no fue posible comprobar su especie. En síntesis, la enzima *Taq 1* según la digestión *in silico* es una de las mejores enzimas para realizar cortes en las diferentes cepas de *Aspergillus*, generando el mayor número de perfiles diferentes. En este estudio se recomienda trabajar con esta enzima puesto que el hecho de que no se haya presentado digestión en algunas cepas, se puede deber a otros factores externos a la actividad de la enzima como la ausencia del templado o las condiciones de almacenamiento que de no ser las indicadas, puede generar degradación o pérdida de actividad de las enzimas [1].

En base a lo dicho anteriormente, en este estudio se presentó un protocolo de RFLP específico para cada uno de los genes estudiados *β -tubulina*, *calmodulina* y *región ITS*, aplicable a la rápida identificación de especies de *Aspergillus*, la cual es una prueba de bajo costo comparada con la secuenciación que es la utilizada generalmente, la RFLP es una técnica complementaria de la PCR y la caracterización morfológica que puede ser implementada en los laboratorios clínicos y de investigación para la diferenciación de las especies de *Aspergillus* más frecuentes partiendo de la identificación morfológica de las especies, sin embargo para esta investigación no se encontró suficiente variación entre las cepas para

lograr diferenciarlas a nivel de especie [16].

Conclusión

Los resultados del presente estudio demuestran que la caracterización morfológica de *Aspergillus* spp. es de gran importancia puesto que permitió un primer acercamiento, donde se tenía la certeza que las 17 cepas con las que se estaba trabajando pertenecían al género en cuestión, más no es una técnica definitiva para la identificación de especies, por lo que se complementó con la PCR la cual mediante los resultados arrojados, nos permitió concluir que como en los tres genes estudiados se presentaron múltiples bandas con el mismo tamaño o similar, como es el caso de la amplificación del gen *ITS2*, esta técnica por sí sola, no tiene la capacidad de diferenciar entre especies. Al complementarse la identificación molecular con la RFLP, de los tres genes estudiados, se concluye que los mejores resultados se obtuvieron con los genes *β -tubulina* digerido con la enzima *Taq1*, que discrimina un total de 3 especies: *A. flavus* (Af13), *A. fumigatus* (Af1) y *A. terreus* (At1), e *ITS1* con la enzima *AvaI* con las especies *A. fumigatus*, *A. versicolor* y *A. hollandicus*. En general, esta última técnica si permitió la confirmación de varias de las especies estudiadas, no obstante, toda la investigación llevada a cabo se frustró al final debido a que no se cuenta con la información suficiente de las especies de *Aspergillus* en las bases de datos, lo que no permitió llegar a nivel de especie en varias cepas de estudio.

Bibliografía

[1] Bioted. Introducción a los enzimas de restricción. [Consultado 20-09-2019]: Disponible en: <https://www.bioted.es/protocolos/INTRODUCCION-ENZ-RESTRICCION.pdf>

[2] Chumillas R, Cortines E, Lopez A, Weiss J. Evaluation of a rapid DNA extraction method to

detect yeast cells by PCR in orange juice. Food control. 2007; 18: 33-39.

[3] Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P, Rezaie S. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme MwoI. Brazilian Journal of Microbiology. 2014; 45: 503-507.

[4] Geiser DM, Harbinksi FM, Taylor JW. Herramientas moleculares y analíticas para caracterizar especies de *Aspergillus* y *Penicillium* a niveles intra e interespecíficos. En: Samson RAP, editor. Integración de métodos taxonómicos modernos para la clasificación de *Penicillium* y *Aspergillus*. Harwood Academic Publishers; Amsterdam: 2000; 381–394.

[5] González A. Diagnóstico y control de especies de "*Aspergillus*" productoras de ocratoxina A. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. 2010.

[6] Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene. 1987; 57: 2-3, 267-272.

[7] Houbraken J, Vries RP, Samson RA. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. Advances in Applied Microbiology. 2014; 86 (1st ed).

[8] Krijgsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw GL, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. Studies in Mycology. Journal from open-access. 2016; 74: 1-29.

[9] Abarca LM. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 2000; 17: 79-84.

[10] Nasri T, Hedayati MT, Abastabar M, Pasqualotto AC, Armaki MT, Hoseinnejad A, Nabili M. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. Journal of microbiological methods. 2015; 117: 144-147.

[11] Refojo N, Duarte E, Dignani MC, Hevia A, Abrantes R, Davel G, Canteros C, Frías de León MG, Acosta G, Zúñiga G, Reyes MR, Rev Iberoam Micol. 2013; 30: 25–30.

[12] Peterson SW. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia. 2008; 100: 205–226.

[13] Piontelli E. Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* Link: claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. Boletín Micológico. 2008; 23: 49-66.

[14] Primrose SB, Twyman RM. Principles of Gene Manipulation and Genomics. (7th ed.). Blackwell Publishing. 2006; 6-667.

[15] Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Sziget, G, Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012; 109: 6241–6246.

[16] Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. 2014; 78: 141–173.

[17] Torres S, Gómez OM, Freyle C, Rúa A, Tamayo D, McEwen J, Borges C, Hernández O. Draft Genome Sequencing and Phenotypic Characterization of Clinical and Environmental Colombian Isolates of the Genus *Aspergillus*. Manuscrito sometido a Medical Mycology de ISHAM. Manuscrito sometido a Medical Mycology de ISHAM. 2018.

[18] Problemas más frecuentes y posibles soluciones. [Consultado 20-09-2019], disponible en: https://www.eez.csic.es/files/Problemas_mas_frecuentes_y_soluciones.doc.

[19] González A. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. 2010:1.

