



Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN

Maldonado Bonilla, Luis David; Sánchez Espinosa, Ana Claudia; Villarruel Ordaz, José Luis

Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN

CIENCIA *ergo-sum*, vol. 31, 2024 | e225

Espacio del Divulgador

Universidad Autónoma del Estado de México, México

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.



Maldonado Bonilla, L. D., Sánchez Espinosa, A. C. y Villarruel Ordaz, J. L. (2024). Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN. *CIENCIA ergo-sum*, 31. <http://doi.org/10.30878/ces.v31n1a10>

Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN

Fungi Identification by DNA barcodes

Luis David Maldonado Bonilla*

Universidad del Mar campus Puerto Escondido, México

maldonado@zicatela.umar.mx

 <http://orcid.org/0000-0001-6515-1983>

Recepción: 14 de marzo de 2022

Aprobación: 9 de junio de 2022

Ana Claudia Sánchez Espinosa

Universidad del Mar campus Puerto Escondido, México

anaclaudia@zicatela.umar.mx

 <http://orcid.org/0000-0002-8192-5472>

José Luis Villarruel Ordaz

Universidad del Mar campus Puerto Escondido, México

jlvo@zicatela.umar.mx

 <http://orcid.org/0000-0001-8725-7535>

RESUMEN

La clasificación de hongos es un paso crucial para conocer su diversidad. Este proceso se realiza con el análisis de sus formas macroscópicas y microscópicas, lo cual requiere de mucha paciencia y entrenamiento. Hoy en día es posible usar la información del ADN con el objetivo de clasificar hongos. En tal sentido, se obtiene todo el ADN del hongo y de ahí se sustrae un pequeño fragmento, conocido como *código de barras genético*. Al igual que los productos del supermercado, este código de barras es único para cada hongo; de este modo, es fácil compartir estos datos por Internet, lo cual ha facilitado los estudios de biodiversidad el intercambio de información entre científicos.

PALABRAS CLAVE: hongos, ADN, biodiversidad, códigos de barras genéticos.

ABSTRACT

Classification of fungi is a crucial step to understanding their diversity. This process has been performed by analyzing its macroscopic and microscopic form, which requires a lot of patience and training. Today it is possible to use DNA information to classify fungi. First, we obtain all the DNA of the fungus and then, we subtract a small fragment of it. This fragment is known as DNA barcode. Like supermarket products, this DNA barcode is unique for each fungus, and it is easy to share these data online, which has facilitated studies in biodiversity and the exchange of information among scientists.

KEYWORDS: Fungi, DNA, biodiversity, DNA barcodes.

1. BIOLOGÍA Y DIVERSIDAD DE HONGOS

Los hongos son un grupo de organismos diverso no solo por las formas, colores y tamaños que presentan, sino también por la amplia gama de ecosistemas y climas que pueden poblar, en la variedad de sustratos en los que crecen y, por lo tanto, en sus fuentes de alimento. Por estas razones, es posible encontrarlos en casi cualquier parte, ya sea en el suelo de la selva, en el tronco de un árbol caído de un bosque, en el interior de una planta viva o de una hormiga, en el fondo del mar, en el jardín de tu casa o en una pared húmeda (Webster y Weber, 2007).

El “cuerpo” de los hongos se compone de delgados hilos llamados *hifas*. El crecimiento del hongo se basa en que las puntas de esas hifas se extienden, lo cual se conoce como *crecimiento apical* (Webster y Weber, 2007). Las hifas están envueltas de quitina, que es la encargada de brindar protección; coincidentemente, es el mismo material del exoesqueleto de los insectos y los camarones. Los hongos tienen la opción de propagarse asexualmente

*AUTOR PARA CORRESPONDENCIA

maldonado@zicatela.umar.mx

y reproducirse sexualmente; de hecho, los cuerpos fructíferos, que son esas estructuras tipo sombrilla típicas de los hongos, se desarrollan para que la reproducción de manera sexual. Estas estructuras son las que los micólogos utilizan para clasificarlos, así que para efectuar estudios de diversidad de hongos es indispensable recolectar estas estructuras, que suelen emerger en época de lluvia. También, se hace uso de la microscopía, la cual permite visualizar sus estructuras de propagación y detalles de sus hifas.

Se calcula que en México hay 200 000 especies de hongos, pero solo se conoce el 5% (Mata *et al.*, 2018) y el estimado para el planeta es muy variable. En este sentido, se considera que puede llegar hasta 3.8 millones, aunque nada más hay registro de 120 000 especies (Vu *et al.*, 2018). Muchas de estas especies aún no se han descrito. Sin embargo, estas estimaciones nos sugieren lo mucho que nos queda por descubrir.

2. CÓDIGOS DE BARRAS GENÉTICOS

Desde el punto de vista histórico, la identificación de especies de hongos se ha basado en la forma de los cuerpos fructíferos y de sus esporas, que son sus estructuras de propagación, similares a las semillas de las plantas. Dada la alta variedad de especies fúngicas, es necesaria una estrategia para que la identificación de especies sea rápida, precisa, escalable, y que además genere información de fácil acceso a la comunidad científica. La información genética en forma de ácido desoxirribonucleico o ADN la poseemos todos los seres vivos. El ADN se compone de dos cadenas que se mantienen físicamente cerca. La información genética la podemos visualizar como un manual de usuario en donde están todas las instrucciones (llamados *genes*) para que un ser vivo sea como es, ya sea su forma, su color, su tipo de alimentación, etc. Dicho manual de usuario tiene solo cuatro letras: A (adenina), T (timina), G (guanina) y C (citosina). Estas letras –que químicamente conocemos como bases nitrogenadas– se han acomodado a través de la evolución de tal modo que forman secuencias lógicas, leíbles e interpretables por las células; por ello, mencionamos que son las instrucciones que definen al ser vivo (Alberts *et al.*, 2015).

Cuando una instrucción en forma de ADN está presente en un grupo importante de organismos decimos que está conservada. Cuanto más esencial sea una instrucción, más conservada estará y la encontraremos en diversos organismos sin importar que sean hongos, peces o plantas, aunque habrá instrucciones específicas para cada grupo. Mientras más esencial sea una secuencia de ADN (entiéndase una instrucción), será menos propensa a cambiar a través de la evolución, ya que hay una presión para mantenerla tal como es. Sin embargo, los científicos expertos en sistemática molecular han detectado secuencias de ADN conservadas, pero los ligeros cambios que muestran se relacionan con eventos de especiación, es decir, secuencias que son únicas para cada especie. Este tipo de secuencias se conocen como códigos de barras genéticos y su descifrado es una herramienta esencial en la clasificación de especies en el siglo XXI, ya que cumple con las características descritas al inicio de esta sección.

El código de barras genético de los hongos es la región ITS (Internal Transcribed Spacer). Al respecto, quienes trabajan con diversidad de hongos obtienen las secuencias de ADN de esta región permitiendo de una forma muy fácil, y casi automática, definir la especie de un hongo y efectuar estudios de diversidad de estos organismos en un nicho particular e incluso es el primer paso del descubrimiento de nuevas especies (recordemos que quedan muchas especies de hongos por reportar).

3. EL RIBOSOMA Y LA REGIÓN ITS DE LOS HONGOS

Reiteramos que mientras más fundamental sea una secuencia de ADN, presentará menos cambios al compararla con dos o más organismos. Una de estas instrucciones es la síntesis de proteínas. Las proteínas son las moléculas que realizan las funciones de un organismo, las cuales se forman por la actividad de los ribosomas, que están hechos en su mayoría de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), químicamente parecido al ADN, pero es una sola cadena compuesta por las letras A (adenina), U (uracilo), G (guanina) y C (citosina). Es posible darse cuenta de que la “T” se sustituye por “U” en el ARN (Alberts *et al.*, 2015).

Ya sea en hongos o en cualquier otro ser vivo, los ribosomas se pueden visualizar como máquinas productoras de proteínas, compuestas de dos partes o subunidades, una grande y otra pequeña.. En hongos, la subunidad pequeña tiene una ARN llamado SSU (Small subunit ribosomal ribonucleic acid) y la subunidad grande tiene tres cadenas de ARN que son el LSU (Large subunit ribosomal ribonucleic acid) y los ARNr 5S y el 5.8S.^[1] Las instrucciones en el ADN para producir estas moléculas de ARNr son secuencias de nucleótidos que producen las secuencias de ARNr, pero con el cambio “T” por “U” mencionado. En la figura 1 se muestra una representación del ribosoma.

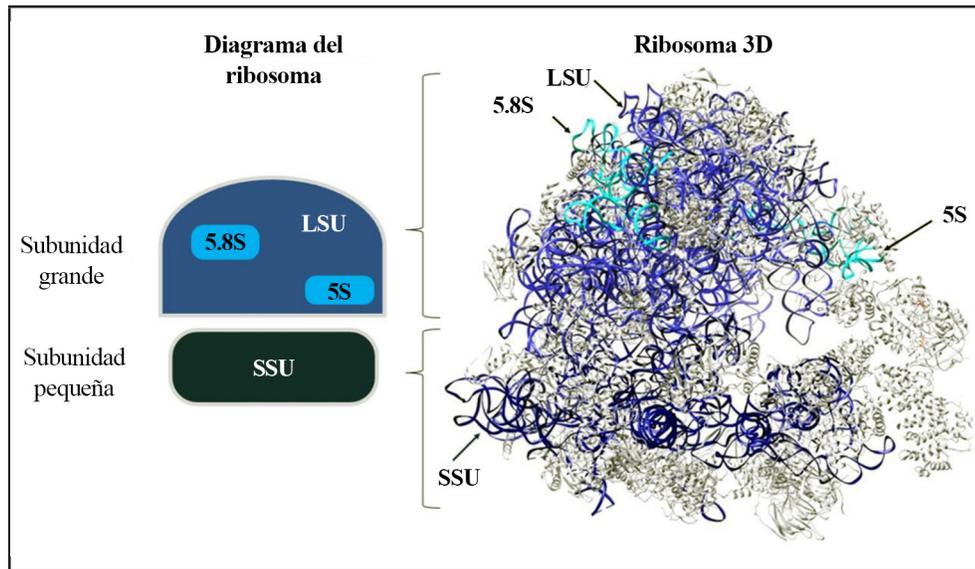


FIGURA 1

Estructura del ribosoma

Fuente: PDB (2010).

Nota: la subunidad pequeña se compone de proteínas y del rRNA SSU. La subunidad grande se compone de proteínas y de los ARNr LSU, 5.8S y 5S. A la derecha observamos el modelo tridimensional del ribosoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* resuelta por rayos X.

Dada la importancia de los ribosomas para la vida, los genes no deben de variar de modo notable para producir estas moléculas; por lo tanto, la secuencia de ADN y de ARN están conservadas en los hongos, aunque hay pedazos de los ARNr que no son parte del ribosoma funcional. A continuación, se describe la estructura del operón ribosomal para luego entender cómo se eliminan los pedazos que sobran.

El operón ribosomal se define como una secuencia continua de ADN que codifica para el SSU, el 5.8S y el LSU (Henras *et al.*, 2015). Es decir, a partir del ADN se produce una sola molécula de ARN muy grande, que tiene pedazos de más en ambos extremos y en medio. Esta molécula grande sufre cortes tanto en los extremos como en medio a través de la acción de enzimas o proteínas con capacidad de llevar a cabo reacciones. Los recortes en los extremos son necesarios para obtener el SSU y LSU del tamaño exacto y los cortes de en medio se requieren para liberar al 5.8S. Los fragmentos que flanquean al 5.8S se conocen como *ITS1* e *ITS2* y llamamos *región ITS* al segmento constituido por *ITS1*-5.8S-*ITS2*. El término ITS denota justamente que es una región espaciadora entre los ARNr y que se transcribe, es decir, que se sintetiza a partir del ADN. Este es un proceso que ocurre en el núcleo de las células (figura 2). Es necesario señalar que el ARNr 5S que también constituye el ribosoma funcional no es parte de este operón.

A diferencia de las secuencias de los ARN que formarán el ribosoma, los pedazos que se eliminan previamente no están sujetos a una alta presión de selección y son propensos a variar a través de la evolución; no hay necesidad de mantener las secuencias de los *ITS1* e *ITS2*, ya que están destinados a eliminarse antes de la formación del ribosoma.

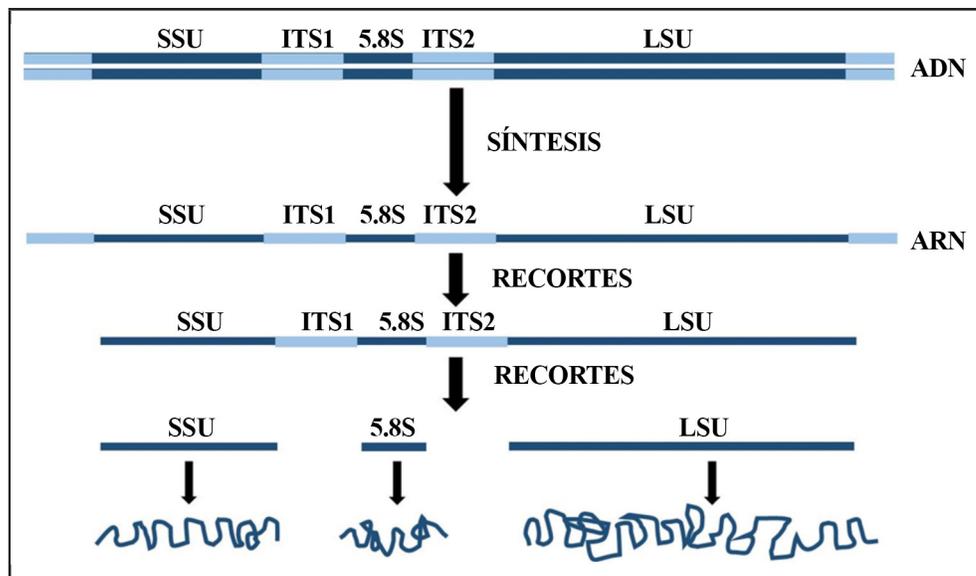


FIGURA 2

Procesamiento de los ARNr

Fuente: Henras *et al.* (2015).

Nota: en el ADN de doble cadena están codificados los genes para ARNr que formarán el ribosoma.[2]

4. LA REGIÓN ITS COMO CÓDIGO DE BARRAS DE LOS HONGOS

Cada especie de hongos tiene una región ITS particular y, mientras exista más cercanía entre dos hongos, la secuencia que constituye dicha región será más parecida, sobre todo en la secuencia correspondiente al 5.8S y más variable en ITS1 e ITS2 (Schoch *et al.*, 2012). Las secuencias de la región ITS de dos especies de un mismo género son más parecidas entre sí que las secuencias de dos especies de géneros distintos, pero las secuencias de dos especies de géneros distintos de una familia se parecen más entre sí que las secuencias de dos especies que son de familias distintas. La diferencia se acentúa mientras exista menos relación entre las especies debido a que ha ocurrido más tiempo a partir del ancestro común hasta la emergencia de las especies, es decir, su tiempo de divergencia. Entonces, es menor el tiempo de divergencia que ha transcurrido entre dos especies de un mismo género que entre especies de familias distintas, lo cual se refleja en la similitud que hay entre las regiones ITS, lo que ha permitido el establecimiento de las regiones ITS como el código de barras genético por excelencia de los hongos. Su tamaño varía de 500 a 800 nucleótidos (DeSalle y Goldstein, 2019). En la figura 3 se presenta la comparación de las secuencias de la región ITS de los hongos *Agaricus campestris* (el que usamos en las pizzas), *Agaricus porphyropos* (mismo género) y *Pleurotus djamor* (género distinto, misma familia), que también es un hongo comestible. Para comparar las secuencias de manera más fácil, se "alinean" de tal modo que obtengamos el mayor número de coincidencias entre ellas. Entre las tres hay diferencias, sobre todo en los ITS, pero resalta que el mayor número de coincidencias las encontramos entre las secuencias de *Agaricus* y obviamente la secuencia de *Pleurotus djamor* es menos similar; en este caso encontramos nucleótidos distintos y otros que faltan o sobran respecto a las secuencias de *Agaricus*.

Si observamos debajo de las líneas verdes podemos apreciar que *Pleurotus djamor* es el menos parecido de los tres.

El procedimiento técnico detallado para obtener la secuencia de la región ITS queda fuera del propósito de este artículo. Solo se enfatiza que se obtiene a partir del ADN total del espécimen, dado que la secuencia del ADN y del ARN tienen como diferencia importante la sustitución de "T" por "U"; no es necesario obtener ARN. El ADN total será sometido a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) y secuenciación de ADN que puede ser a pequeña escala por el método capilar o a gran escala por medio de tecnologías de secuenciación masiva.

Las secuencias que se obtienen por el trabajo de los diferentes laboratorios se comparten entre la comunidad científica en plataformas en línea y, a su vez, nuevas secuencias se someten ahí para hacer la identificación mediante algoritmos computacionales, ya sea el GeneBank de NCBI^[3] o el Barcode of Life Data System.^[4]

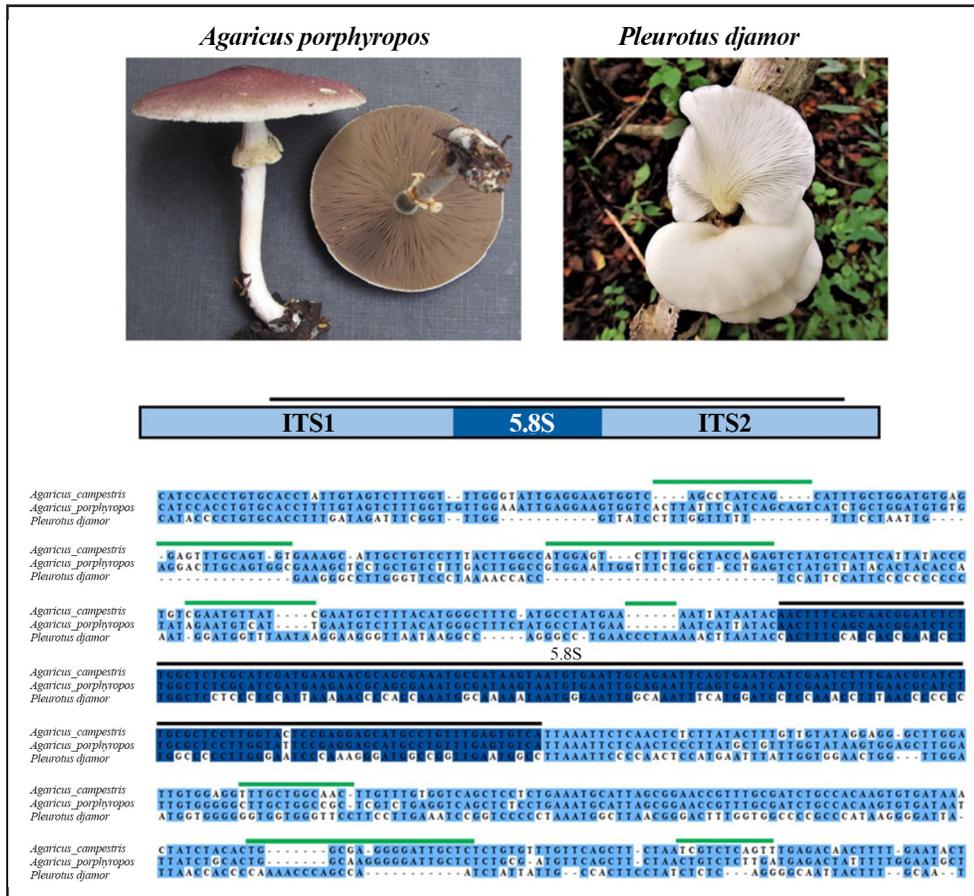


FIGURA 3

Comparación de regiones ITS de 2 especies de hongos del género *Agaricus* y de *Pleurotus*
 Nota: en la parte superior observamos fotos de los hongos *Agaricus porphyropus* y de *Pleurotus djamor*. En medio se presenta un rectángulo que simboliza la región ITS con sus 3 partes (ITS1-5.8S-ITS2). Las secuencias de cada hongo están ordenadas por renglones y las coincidencias entre ellas se marcan con color cian para los ITS y en azul rey para el 5.8S. Las líneas verdes marcan zonas con diferencias notables entre las secuencias. Si observamos debajo de las líneas verdes podemos apreciar que *Pleurotus djamor* es el menor parecido de los tres.

5. USO DE LA REGIÓN ITS PARA IDENTIFICAR HONGOS EN NCBI

Se toma en consideración que se recolecta un hongo del género *Ganoderma*. Estos hongos crecen sobre madera y, más allá de su papel en el flujo de nutrientes en un ecosistema, se caracterizan por sus propiedades medicinales (Deepalakshmi y Mirunalini 2011). Su identificación a nivel especie es un primer paso para aprovecharlo. Una vez que se obtiene la secuencia de la región ITS, buscaremos las secuencias más parecidas en NCBI mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de una forma similar a las frases que se buscan en Google. Después de someter la secuencia en este “buscador” se despliegan los resultados, y el primer resultado corresponde a una secuencia 100% idéntica de la especie *Ganoderma martinicense*, por lo que se considera que la recolecta es esta especie. Cabe destacar que no siempre se obtiene un porcentaje del 100%; dependiendo cual sea este valor y el tipo de hongo con el que trabajemos, se identificará como una nueva secuencia no registrada de una especie conocida, como una secuencia de una especie no registrada o una secuencia inédita de

una posible nueva especie. A partir de aquí, los investigadores deberán tomar decisiones o determinar otras secuencias útiles en la taxonomía. En la figura 4 vemos un esquema de este procedimiento. Esta aseveración debe ser apoyada por un análisis morfológico.

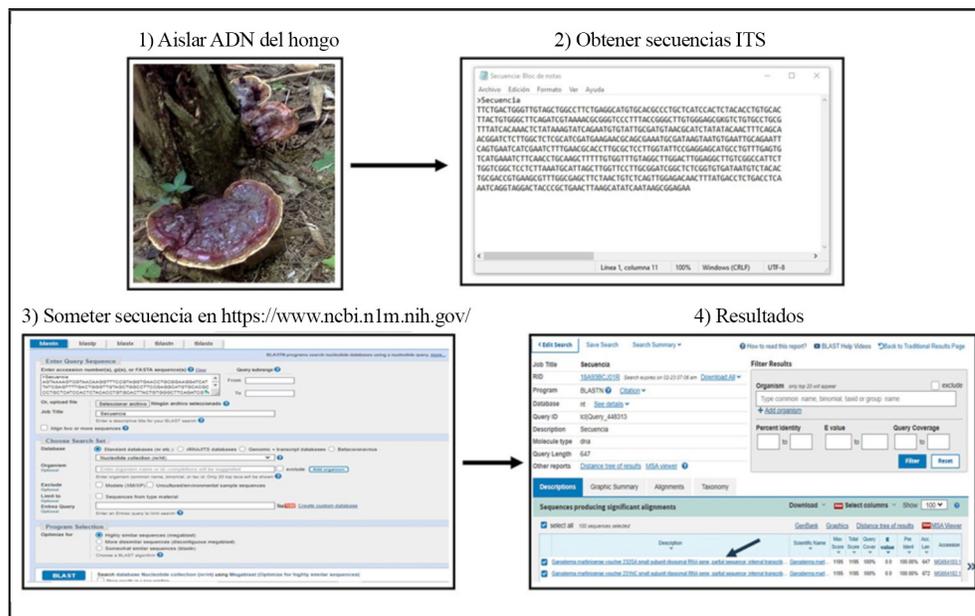


FIGURA 4

Proceso de identificación de un hongo a partir de la secuencia de la región ITS

Nota: la secuencia 1) se someterá a una búsqueda de secuencias similares en el sitio del NCBI usando el algoritmo BLASTN
 2). Los resultados se despliegan segundos después de someter la secuencia 3). El hit más alto es 100% idéntico a la secuencia sometida y corresponde a la especie *Ganoderma martinicense*.

PROSPECTIVA

La secuencia de la región ITS como código de barras genético de hongos permite la clasificación relativamente rápida de estos organismos y es un punto de partida para ubicar potenciales nuevas especies. Además, las secuencias que los investigadores obtienen es posible compartirlas con la comunidad científica de todo el mundo gracias a las bases de datos y a algoritmos de búsqueda que son fáciles de usar. Tomando en cuenta lo mucho que queda por descubrir del reino de los hongos, es deseable que esta estrategia de trabajo sea implementada por todos aquellos interesados en explorar la diversidad de estos organismos, lo cual es necesario para su conservación y aprovechamiento como recurso biótico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los árbitros por sus aportaciones para mejorar la estructura de este artículo.

REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., & Walter, P. (2015). *Essential Cell Biology*. Garland Science.
 Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. (2011). Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8), 1922-1929.

- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 302. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(2), 225-242. <https://doi.org/10.1002/wrna.1269>
- Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., & Macías-Rubalcava, M. L. (2018). Insights in fungal bioprospecting in Mexico. *Planta Medica*, 84(09/10), 594-605. <https://doi.org/10.1055/s-0044-101551>
- PDB (Protein Data Bank). 4V7R. <https://www.rcsb.org/structure/4V7R>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U.,... & Verkley, G. J. M. (2018). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 91(1), 23-36. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Webster, J., & Weber, R.W.S. (2007). *Introduction to fungi* (3th ed.). Cambridge. <http://deskuervis.nic.in/pdf/WEBSTER30521807395.pdf>

NOTAS

- [1] La letra S denota unidades Svedberg, e implica que estos ARN fueron separados e identificados por centrifugación.
- [2] Originalmente se sintetiza una cadena sencilla muy larga de ARN compuesta de SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU. Esta cadena sufre recortes por los extremos y de cortes internos para deshacerse del ITS1 e ITS2, lo cual genera los ARN SSU, 5.8S y LSU que pueden incorporarse en el ribosoma.
- [3] Disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [4] Disponible en <https://www.boldsystems.org/>

CC BY-NC-ND