Optimización y validación de protocolos de extracción de ADN de hongos filamentosos para PCR

Di Paolo, P [1]; Tubio, G [1,2]; Rodriguez, F [1,2].

[1] Laboratorio de Investigación y Desarrollos Biotecnológicos (LIDEB), FBioyF-UNR, Rosario, Santa Fe, Argentina.
[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CCT- Rosario.

Contacto: mateodipa7@gmail.com

Palabras claves: ADN; Hongos; Enzimas.

INTRODUCCIÓN / HIPÓTESIS

La identificación molecular constituye una herramienta central para la caracterización taxonómica de hongos y la evaluación de su potencial biotecnológico. Los métodos morfológicos clásicos dependen de la expresión de caracteres bajo condiciones de cultivo específicas y requieren experiencia especializada, mientras que los métodos basados en ADN permiten una asignación taxonómica reproducible mediante la amplificación y secuenciación de marcadores moleculares. El desempeño de estas técnicas depende, en gran medida, de la calidad del ADN genómico de partida. Los hongos filamentosos representan un desafío particular debido a la presencia de una pared celular rígida, que dificulta la lisis y la liberación del ADN. En consecuencia, los rendimientos y niveles de pureza obtenidos suelen ser subóptimos. La optimización y estandarización sistemática de los métodos de extracción y purificación de ADN, así como de las condiciones de PCR en hongos filamentosos, constituye un paso necesario para garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

OBJETIVOS/HIPÓTESIS

- Establecer un procedimiento operativo estandarizado y validado para la extracción de ADN genómico y su posterior amplificación mediante PCR a partir de hongos filamentosos.
- Caracterizar el perfil enzimático del hongo y evaluar la calidad, la pureza y la integridad del ADN genómico obtenido.

METODOLOGÍA / MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon dos estrategias de cultivo diferenciadas: fermentación en estado sólido de *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma harzianum* para la producción de enzimas, y cultivo en medio sólido para el aislamiento de conidios y la posterior extracción de ADN. Para la fermentación en estado sólido, se utilizaron el afrechillo de trigo y la cáscara de arveja amarilla como sustratos. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 30 °C en oscuridad. El extracto enzimático obtenido se filtró mediante una malla de tela tafeta. A partir de los extractos obtenidos, se determinaron las actividades de celulasa, xilanasa, α-amilasa y β-1,3-glucosidasa, con el objetivo de evaluar la producción de enzimas hidrolíticas. Los cultivos en medio sólido destinados al aislamiento de conidios se utilizaron para preparar conidios. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAamp Kit50 (QIAGEN). Posteriormente, el ADN obtenido se cuantificó y se evaluó su pureza e integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

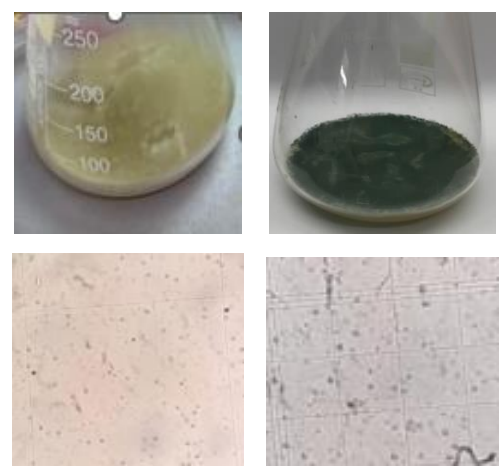
RESULTADOS y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 2,4 × 10^6 (*A. nidulans*) y 1,47 × 10^7 conidios/mL (*T. harzianum*; Figura 1). El ADN (5 ng/µL) mostró una banda tenue de alto peso molecular (flecha, Figura 2), compatible con la presencia de ADN genómico íntegro.

Tabla 1. Conidios y actividades enzimáticas.

	A. nidulans	*T. harzianum*
Concentración [conidios/mL]	2,4 × 10^6	1,47 × 10^7
Actividad celulasa [U/g]	-	2,97
Actividad xilanasa [U/g]	-	37,1
Actividad β-1,3-glucosidasa [U/g]	-	6,7
Actividad α-amilasa [U/g]	-	sin actividad

En *T. harzianum* predominó la actividad xilanasa, seguida de β-1,3-glucosidasa y celulasa, sin α-amilasa detectable: un perfil hemicelulolítico coherente con el sustrato, rico en arabinoxilanos. Media ± DE (n = 3). U: µmol de producto/min; U/g: por g de sustrato.



(a) *A. nidulans* **(b)** *T. harzianum*

Figura 1. Cultivos (arriba) y conidios (abajo; objetivo 40×) de (a) *A. nidulans* y (b) *T. harzianum*.

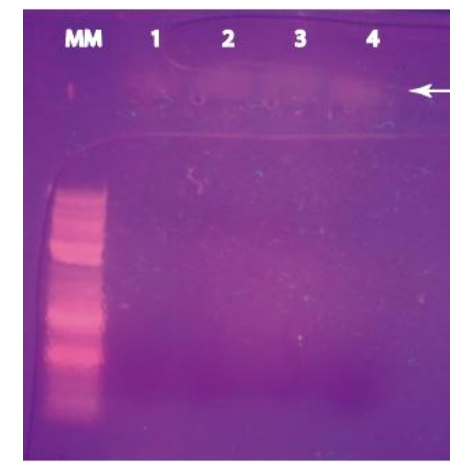


Figura 2. ADN genómico en gel de agarosa. MM: marcador **1 kb**; 1–2: *A. nidulans*; 3–4: *T. harzianum*. Flecha: ADN $_{\text{genómico.}}$

CONCLUSIONES

Se optimizó satisfactoriamente el protocolo de trabajo, logrando obtener suspensiones de conidios dentro del rango requerido para los ensayos posteriores.

Se obtuvo ADN genómico detectable mediante electroforesis en gel de agarosa y se caracterizó el perfil enzimático de una de las cepas estudiadas. En conjunto, los resultados obtenidos indican que las estrategias implementadas fueron adecuadas tanto para la producción y evaluación de enzimas extracelulares como para el aislamiento de conidios y la obtención de ADN genómico.

AGRADECIMIENTOS y FINANCIAMIENTO

Proyecto PID-UNR 2023, código 80020220700067UR, y proyecto de la 10.ª Convocatoria de Vinculación Inclusiva 2025, código 80020250200032UR.