

DESCRIBIENDO LA BIODIVERSIDAD: TRABAJO DE LABORATORIO EN BIOLOGÍA MOLECULAR A TRAVÉS DE INVESTIGACIÓN GUIADA EN UN PROYECTO DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA*

Alma Rosa Villalobos-Arámbula & Dolores Marina Barragán Reynaga**

Departamento de Biología Celular y Molecular (CA-UdeG-44),
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México.

**Autor de correspondencia correo E: avillal@cucba.udg.mx

RESUMEN

La documentación de la biodiversidad depende cada vez más de secuencias de DNA, un método conocido como código de barras de DNA (DNA Barcoding). Se analizan los resultados de las etapas del flujo de trabajo del laboratorio semi portátil del proyecto *Barcode BioMol UDEG (BBG)*, que constan de: extracción de DNA, amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa, purificación de amplicones, secuenciación de DNA y comparación con una base de datos. La participación del alumno requería formular preguntas, diseñar experimentos, recopilar y analizar datos para preparar un informe científico. Participaron 62 estudiantes, quienes además de iniciar el entrenamiento en técnicas de biología molecular, contribuyeron con 21 secuencias ITS del DNA ribosomal nuclear de hongos, dos de COI del DNA mitocondrial de hormigas y tres del DNA de cloroplasto, *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* de una planta, lo que permitió la determinación taxonómica de 24 ejemplares (11 a nivel de especie, dos cercanos a especie, 9 hasta género y un ejemplar a familia) y evidenció la obtención de habilidades científicas de los estudiantes.

ABSTRACT

Documentation of biodiversity is increasingly dependent of DNA sequences, a method known as DNA barcoding. The results of the workflow stages of the semi-portable of the Barcode BioMol UDEG (BBG) project are presented, which consist of: DNA extraction, amplification by polymerase chain reaction, purification of PCR products, DNA sequencing, and comparison with a database. Furthermore, they participated in the formulation of questions, experimental design, data collections, and analysis to prepare a scientific report. 62 students to get involved, who in addition to their training in molecular biology techniques, they contributed to 21 to ITS sequences from fungi, two COI from ants and three from a plant chloroplast DNA (*rbcl*, *matK*, and *trnH-psbA*), which allowed the taxonomic determination of 24 specimens (11 at the species level, two close to the species, 9 to the genus and one specimen to the family) and evidenced the achievement of scientific skills from the students.

PALABRAS

CLAVE:

Investigación
estudiantes
licenciatura,
código de barras,
biología
molecular.

KEY WORDS:

Undergraduate
research,
DNA-
Barcoding,
molecular
biology.

INTRODUCCIÓN

El trabajo de laboratorio de tipo expositivo, donde se siguen protocolos establecidos, involucra a los estudiantes en los tres procesos cognitivos inferiores (conocimiento, comprensión y aplicación) y pone poco énfasis en el pensamiento, la planificación, la interpretación de resultados, la discusión y la obtención de conclusiones. Mientras que en el trabajo de laboratorio a través de investigación guiada se permite la participación de los estudiantes a través de la formulación de problemas, el diseño experimental, la recopilación y el análisis de datos; ya que los estudiantes siguen un procedimiento proporcionado por el profesor que les dice qué hacer y qué datos recopilar, y luego el profesor los guía hacia el desarrollo de una comprensión general de los conceptos a través del análisis, evaluación e interpretación de datos y las discusiones posteriores al laboratorio (1, 2).

El uso de códigos de barras de DNA para documentar la biodiversidad es un tema de investigación adecuado para el trabajo de laboratorio de la asignatura de Biología Molecular por dos razones. 1) La mayoría de las especies de eucariotas permanecen sin identificarse, a pesar de 250 años de taxonomía (3), por lo que con el empleo de códigos de barras de DNA, los estudiantes pueden contribuir al conocimiento de la biodiversidad. 2) El flujo de trabajo se divide en etapas independientes (recolección de muestras, extracción de DNA, secuenciación de DNA y comparación con una base de datos), por lo que los alumnos pueden involucrarse en una etapa, en varias o en todo el proceso (3, 4). Además de que sirve para la comprensión de varios conceptos y técnicas que aborda la biología molecular.

La idea de los Códigos de Barras de la Vida surgió en 2003, donde se propuso el uso del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) como marcador molecular para la identificación de los animales (5, 6). Actualmente se puede decir que es una pequeña secuencia estandarizada de un gen para la determinación taxonómica de toda la biodiversidad animal del planeta. Esta iniciativa promueve la elaboración de bases de datos con códigos de barras de DNA de todos los organismos (7). La base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD) tiene hasta la fecha más de 11 millones (11 974 585, enero 2021) de registros de plantas, animales, hongos y protistas (https://www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Home). En relación con los códigos de barras de DNA (DNA-Barcode) utilizados en plantas, las bajas tasas de sustitución del DNA mitocondrial (mtDNA) han llevado a la búsqueda de regiones alternativas para usarlas como códigos de barras. El Plant Working Group del Consortium

for the Barcode of Life (CBOL) en 2009 recomienda la combinación de dos *loci* de DNA de cloroplasto, *rbcl* (RuBisCo - Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa - subunidad grande) y *matK* (maturasa K) como código de barras para identificar especímenes y contribuir al descubrimiento de especies de plantas. RuBisCo, la proteína más abundante en la tierra, cataliza el primer paso de la fijación de carbono, mientras que la maturasa K codifica una proteína que ayuda a la edición del RNA (8). En hongos, la región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) es el marcador principal propuesto como código de barras (9).

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados del flujo de trabajo del laboratorio semi portátil con investigación guiada a través del proyecto *Barcode BioMol UDEG (BBG)*, obtenidos por estudiantes de la asignatura de Biología Molecular de la Licenciatura en Biología de la Universidad de Guadalajara (UdeG).

METODOLOGÍA

Grupo de trabajo

Se trabajó con estudiantes de los grupos de la clase de Biología Molecular en 2019B y 2020A a quienes al inicio del curso se les invitó a participar en el proyecto BBG a través de una charla explicativa, los alumnos se comprometieron a trabajar con muestras de hongos, hormigas y plantas como parte del trabajo de laboratorio de la clase y contribuir con datos para el proyecto BBG.

Con el fin de aprovechar los recursos y la experiencia de profesores de tres laboratorios: Laboratorio de Docencia de la Academia de Biología Molecular y Genética (LABMyG), Laboratorio de Genética y Ecosistemática Molecular y Funcional (LGEMoF) y Laboratorio de Micología (LM), todos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Ambientales (CUCBA), se implementó un programa de laboratorio semi portátil para llevar a cabo el trabajo de laboratorio a través de investigación guiada, en el proyecto BBG. Esto permitió efectuar el trabajo sin interrupciones, ya que cuando el LABMyG no estaba disponible, los experimentos se llevaron a cabo en el aula de clase.

Descripción del flujo de trabajo de laboratorio

Materiales estudiados

Para llevar a cabo este trabajo, se incluyeron 30 especímenes de hongos de los herbarios Luz María Villareal de Puga, Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara (IBUG) e Instituto de Ecología, Xa-

lapa (XAL). Los ejemplares de hongos depositados en IBUG estaban determinados únicamente hasta género o en algunos casos hasta orden (Boletales), con excepción de dos que fueron determinados morfológicamente hasta especie (BF6 y BF14 en la Tabla 1); mientras que los ejemplares de XAL

estaban determinados hasta género (Tabla 1). Se trabajaron también, cuatro muestras de hormigas parasitadas por *Ophiocordyceps* spp. con ejemplares de respaldo depositados en la Colección Entomológica del Centro de Estudios en Zoología de CUCBA y una planta del género *Toona* tomada del herbario

TABLA 1

Datos de colectas, resultados de la comparación entre las secuencias obtenidas y las existentes en la base de datos de GenBank y determinación taxonómica (de acuerdo al % de diferencia con alguna secuencia de GenBank y el % de cobertura). BF1–12 y BI1–2 material trabajado en 2019B y BF 8a, BF13–19 y My37–47 en 2020A. Resultados con ITS rDNA en BF y My; y COI en BI. V. Ramírez-Cruz (VRC), O. Castro-Jáuregui (OCJ), M. Santos-García (MSG), A. Cortés-Pérez (ACP), C. Ballesteros-Aguirre (CBA).

Muestra	Especie	Phylum	Orden	Colector, Estado, Año Colecta	Mejor Resultado Blast en GenBank	Identidad (%)	Determinación Taxonómica	Coertura %	Diferencia %
BF 1	<i>Entoloma</i> sp.	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3523 Jal 2019	<i>Entoloma lampropus</i>	94.37	Género	96	5.63
BF 2	<i>Entoloma</i> sp.	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3525 Jal 2019	<i>Pluteus</i> sp.	93.29	Género	98	6.71
BF 3	<i>Mycena</i> sp.	Basidiomycota	Agaricales	VCR 3524 Jal 2019	<i>Mycena chloroxhanta</i>	93.88	Género	96	6.12
BF 4	<i>Polyporus</i> sp.	Basidiomycota	Polyporales	VRC 3526 Jal 2019	<i>Polyporus udus</i>	98.36	Especie < 3.1 %	53	1.64
BF 5	<i>Micropsalliota</i> sp.	Basidiomycota	Agaricales	OCJ 638 Jal 2019	<i>Micropsalliota subalba</i>	95.47	Género	98	4.53
BF 6	<i>Oudemansiella canarii</i>	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3651 Oax 2019	<i>Oudemansiella canarii</i>	97.81	Especie < 3.1 %	97	2.19
BF 7	—	Basidiomycota	Boletales	VRC 3655 Oax 2019	Boletales sp.	97.67	Especie < 3.1 %	96	2.33
BF 10	<i>Oligoporus</i> sp.	Basidiomycota	Polyporales	VRC 3656 Oax 2019	<i>Abortiporus biennis</i>	99.68	Especie < 3.1 %	88	0.32
BF 11	<i>Suillus</i> sp.	Basidiomycota	Boletales	VRC 3642 Oax 2019	<i>Boletus quercophilus</i>	98.78	Especie < 3.1 %	94	1.22
BF 12	—	Basidiomycota	Boletales	VRC 3636 Oax 2019	Boletaceae	93.44	Familia	97	7.18
BF 13	<i>Omphalina</i>	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3633 Oax 2019	<i>Gerronema</i> sp.	97.23	Especie < 3.1 %	95	2.77
BF 14	<i>Laccaria laccata</i> var. <i>trichodermophora</i>	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3585 Oax 2019	<i>Laccaria laccata</i>	96.02	Cercano a especie	98	3.98
BF 15	<i>Hygrocybe</i>	Basidiomycota	Agaricales	VRC 3596 Oax 2019	<i>Hygrocybe miniata</i>	92.97	Género	95	7.03
BF 17	<i>Callistosporium</i>	Basidiomycota	Agaricales	MSG 482 Oax 2018	<i>Tricholoma equestre</i>	96.25	Cercano a especie	94	3.75
BF 18	<i>Entoloma</i>	Basidiomycota	Agaricales	MSG 91 Oax 2018	<i>Entoloma subsinuatum</i>	94.99	Género	99	5.01
BF 19	<i>Phylloporus</i>	Basidiomycota	Boletales	MSG 60 Oax 2018	<i>Phylloporus alborufus</i>	98.10	Especie < 3.1 %	97	1.9
My 39	<i>Mutinus</i>	Basidiomycota	Phallales	ACP 1951 Ver 2018	<i>Mutinus</i> sp.	99.06	Especie < 3.1 %	86	0.94
My 42	<i>Phytocordyceps</i> sp.	Ascomycota	Hypocreales	ACP 2033 Ver 2019	<i>Claviceps cinodontis</i>	90.50	Género	87	9.5
My 43	<i>Lepidostroma</i> sp.	Basidiomycota	Lepidostromatales	ACP 1994 Ver 2019	<i>Lepidostroma winklerianum</i>	99.82	Especie < 3.1 %	84	0.18
My 46	<i>Pseudocolus</i>	Basidiomycota	Phallales	ACP 1916 Ver 2018	<i>Clathrus arqueri</i>	91.39	Género	99	8.61
My 47	<i>Pseudocolus</i>	Basidiomycota	Phallales	ACP 1692 Ver 2016	<i>Clathrus arqueri</i>	93.08	Género	100	6.92
BI 1	<i>Camponotus atriceps</i>	Arthropoda	Hymenoptera	CBA sn Jal 2018	<i>Camponotus</i> sp.	93.89	Especie	98	6.11
BI 2	<i>Camponotus striatus</i>	Arthropoda	Hymenoptera	CBA sn Jal 2018	<i>Camponotus</i> sp.	95.33	Especie	95	4.67

IBUG. Antes de la extracción de DNA, las muestras (trozos pequeños de entre 10-50 mg del píleo de basidiomas deshidratados o de hoja deshidratada; hormiga completa) se colocaron en microtubos de 2.0 mL (tipo Eppendorf) y se trituraron con una esfera de acero en el TissueLyser LT Marca QIAGEN.

Secuencias de DNA

El DNA genómico de todas las muestras se aisló mediante el método de extracción con sales (10), con las siguientes modificaciones: PVP (MW 10,000, Sigma) al 1 % en amortiguador salino, incubación a 65°C por 20-30 min y precipitación en isopropanol a - 20°C toda la noche. Para determinar la integridad, cantidad y pureza del DNA aislado se utilizó un gel de agarosa al 0.8 o 1 %, donde se cargaron y corrieron 5 μ L de la muestra de DNA genómico con 2 μ L de la mezcla amortiguador de carga 6 X y GelRed marca Biotum (98 μ L y 2 μ L, respectivamente). A partir de los resultados del corrimiento electrofo-

rético (Fig. 1), que permitió en algunas muestras la determinación aproximada de la concentración de DNA en ng/ μ L, se prepararon diluciones (10-50 ng/ μ L) o alícuotas de las muestras de DNA para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descritas en la Tabla 2.

En el caso de los hongos se amplificaron por PCR las regiones ITS y la subunidad ribosomal grande (LSU), aunque la primera es la que se utiliza como código de barras oficial en muchos casos el LSU del nrDNA es útil en la identificación fúngica si se usa en combinación con ITS (11). En el caso de las hormigas la región amplificada fue COI y en la planta las regiones amplificadas fueron rbcL, matK, trnH-psbA e ITS (por cuestiones de extensión, no se presenta el trabajo de laboratorio de la muestra BP1). Para la amplificación por PCR de las tres regiones de DNA se utilizaron tanto cebadores universales como específicos para hongos e insectos. La región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) se amplificó con los pares de cebadores ITS1F/ITS4S (12, 13); la región 5' de

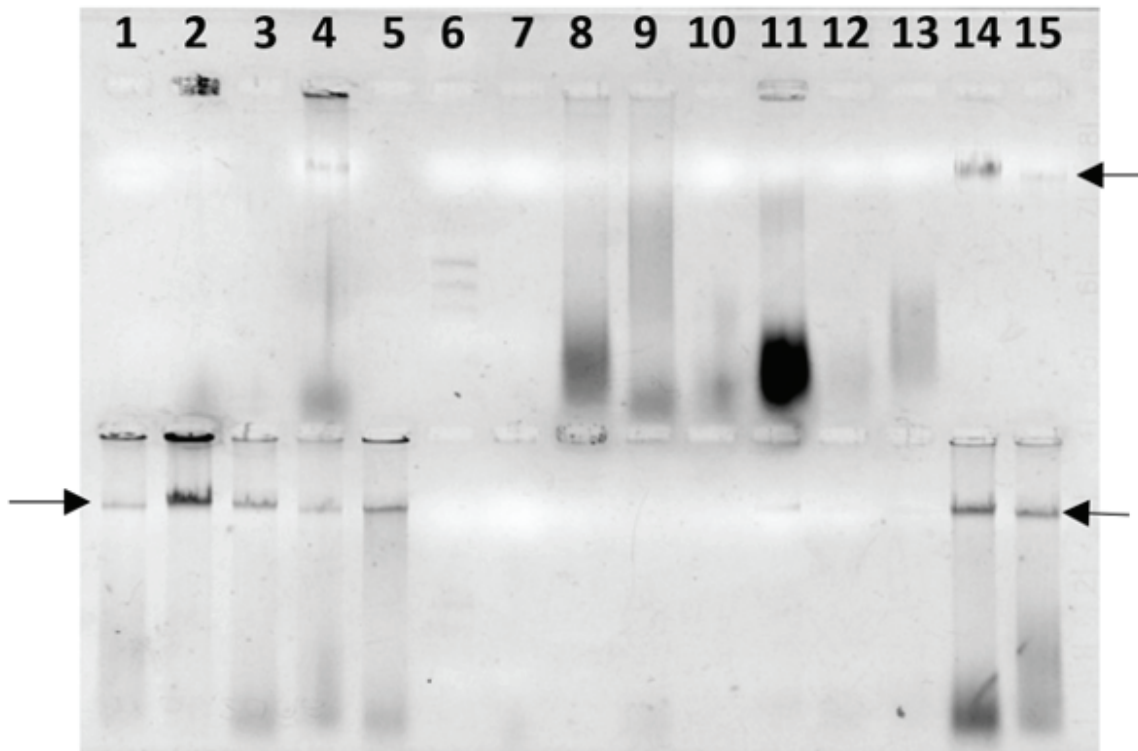


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para observar integridad, cantidad y pureza del DNA genómico aislado por estudiantes del Calendario 2020A. La flecha indica las bandas de DNA íntegro (pozos 14 y 15 en el carril 1 y pozo 11 en el carril 2 con una banda muy débil de DNA íntegro o de alto peso molecular), también se indican aquellas muestras de DNA que además de tener la banda de DNA íntegro o DNA no degradado (señalado por la flecha) tienen un camino luminoso lo que indica DNA altamente degradado (pozos 1-5 y 14-15 del carril 2). Los números en el carril 1 se refieren a los pozos y corresponden a las muestras de DNA cargadas según la Tabla 2. En los pozos 6 de cada carril se cargó el marcador de DNA (Marcador EZ Load Precision Molecular Mass Ruler - Biorad) solo se observan las primeras tres bandas de 1 kb/100 ng, 700 pb/70 ng y 500 pb/50 ng en el primer carril (las bandas de 200 pb/20 ng y de 100 pb/10 ng no se observan).

TABLA 2

Resultados de integridad, cantidad y pureza del DNA genómico de las muestras trabajadas en 2020A. ND = Banda de DNA íntegro No-Degradado, MD = Banda gruesa de DNA Medianamente-Degradado, AD = Camino luminoso de DNA Altamente Degradado, SB = Sin rastros de DNA en el carril del gel. Se incluyen los datos para la preparación de alícuotas o de diluciones de DNA para la PCR.

Carril 1				Dilución DNA	
Pozo	# Diario	DNA	Resultado	dH ₂ O	DNA
1	1	BI 3	ND _{25ng/μL}	—	10 μL
2	2	BF 8c	SB – Banda RNA débil al fondo del pozo	—	10 μL
3	2a		SB (se salió la muestra del pozo durante la carga)		
4	3	BF 13	Por error se cargaron en el mismo pozo las muestras 3 y 4	—	10 μL
5	4	BF 14	—	—	10 μL
6	M		Tres bandas: 1000pb/100ng, 700pb/70ng, 500pb/50ng		
7	5	BF 15	SB	—	10 μL
8	6	BF 16	ND–MD/AD – Banda RNA intensa al fondo del pozo	5 μL	5 μL
9	7	BF 17	ND–MD/AD – Banda RNA intensa (se cargó poca muestra)	5 μL	5 μL
10	8	BI 4	AD–Banda RNA al fondo del pozo	—	10 μL
11	9	BF 18	ND–MD/AD – Banda RNA intensa al fondo	5 μL	5 μL
12	10	BF 19	ND–MD/AD – Banda RNA intensa al fondo	5 μL	5 μL
13	10a		ND–MD/AD – Banda RNA intensa al fondo		
14	Control		ND _{350ng/μL}		
15	Control		ND _{100ng/μL}		

Carril 2				Dilución DNA	
Pozo	# Diario	DNA	Resultado	dH ₂ O	DNA
1	11	My 37	ND _{100ng/μL} –MD/AD – Banda RNA	5 μL	5 μL
2	12	My 38	ND _{400ng/μL} –MD/AD – Banda RNA	8.5 μL	1.5 μL
3	12 ^a		ND _{150ng/μL} –MD/AD – Banda RNA		
4	13	My 39	ND _{100ng/μL} –MD/AD – Banda RNA (se cargó poca muestra)	5 μL	5 μL
5	14	My 40	ND _{200ng/μL} –MD/AD – Banda RNA	7.5 μL	2.5 μL
6	M		Error al cargar el marcador		
7	15	My 41	SB – Banda RNA	—	10 μL
8	16	My 42	SB	—	10 μL
9	17	My 43	ND _{25ng/μL} – RNA (se cargó poca muestra)	—	10 μL
10	18	My 44	SB (se cargó poca muestra)	—	10 μL
11	19	My 44a	ND _{100ng/μL}		
12	19 ^a		ND _{25ng/μL}	5 μL	5 μL
13	20	My 45	ND _{25ng/μL}	—	10 μL
14	21	My 46	ND _{350ng/μL} –MD/AD – Banda RNA	8.5 μL	1.5 μL
15	22	My 47	ND _{250ng/μL} –MD/AD – Banda RNA	8.5 μL	1.5 μL

LSU con los pares LROR/ LR5 y LRO/LR7 (14) y COI con el par LCO1490/ HCO2198 (15). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 52 o 54 μL con: 50 μL de mezcla PCR (6 μL amortiguador 10 X [1.1 X final], 3 μL MgCl₂ 50 mM [2.7 mM final], 3 μL dNTP's 5 mM [0.3 mM final], 3 μL BSA 2 μg/μL [0.1

final] y 35 μL dH₂O), 1 o 2 μL de mezcla cebadores-Taq (0.5 o 1 μL de cada cebador 10 μM y 0.15 μL de TaqPol Platinum [5 U/μL]) y 1 o 2 μL del DNA molde (10-50 ng/μL). Las condiciones de amplificación para ITS incluyeron: desnaturalización inicial 95°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturalización 95°C por

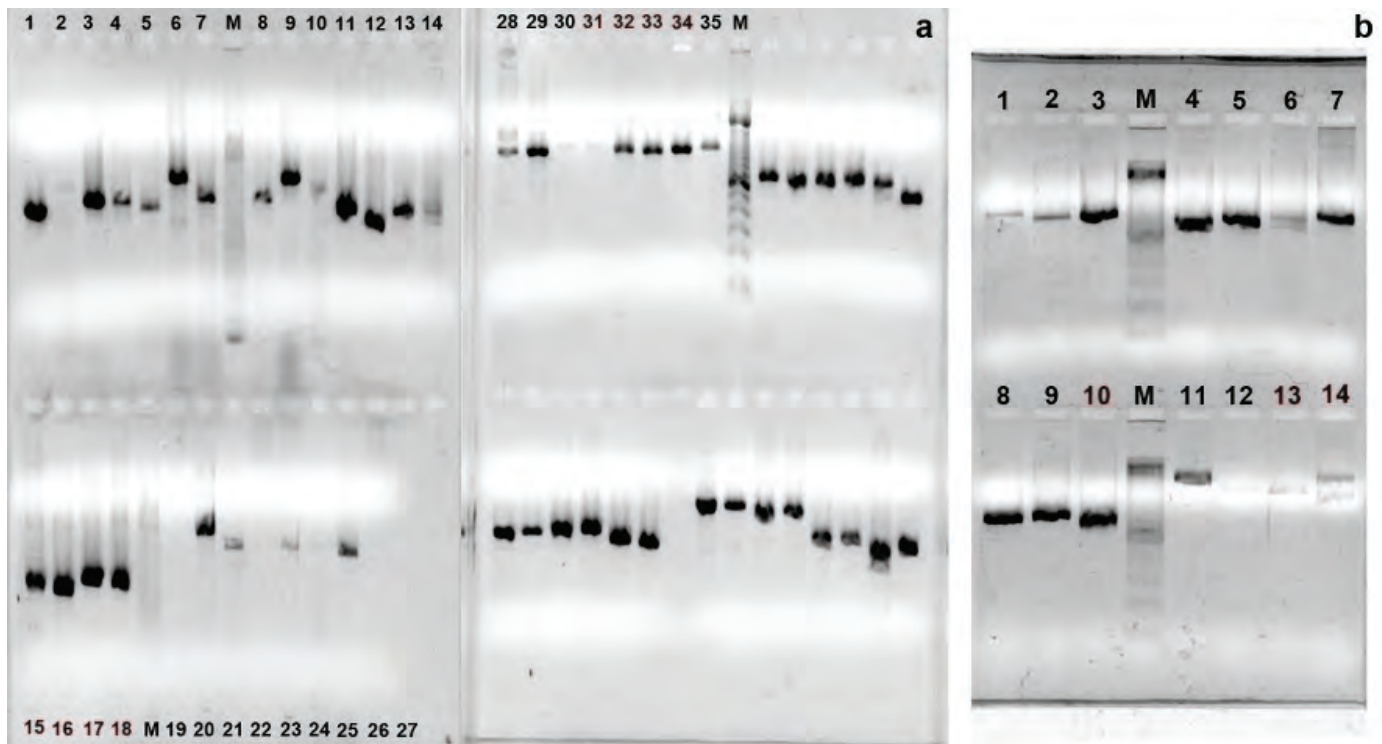


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR (34 muestras – Tabla 2) y amplicones purificados con Columnas GFX (14 muestras – Tabla 3). a) Corrimiento electroforético de productos de PCR. b) Corrimiento electroforético de productos de PCR purificados con columnas GFX. M = Marcador de 100 pb. Nota: Fotografía editada, contribución del Equipo 5.

1 min, alineación 50°C por 45 seg, extensión 72°C por 2 min; 15 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 45 seg, 72°C por 2 min y un incremento de 5 seg cada ciclo; extensión final 72°C por 10 min. Para LSU y COI: 94°C por 4 min, 34 ciclos de 95°C por 1 min, 52°C por 90 seg, 72°C por 2 min, 72°C por 10 min. Para la observación y análisis de los productos amplificados, se cargaron 5 μ L de producto de PCR con 2 μ L de la mezcla del amortiguador de carga 6 X y GelRed en un gel de agarosa al 1.5 % (Fig. 2). Como marcador de DNA se utilizó la escalera de 100 pb (Invitrogen).

De acuerdo con los resultados de los amplicones obtenidos (Fig. 2 y Tabla 3), se purificaron los productos de PCR con dos protocolos (siguiendo las instrucciones del fabricante): columnas GFXs (GE) y enzima ExoSAP-IT (Applied Biosystems). Los productos purificados con columnas GFXs (4 μ L producto GFX con 2 μ L de la mezcla de amortiguador 6 X y GelRed) se corrieron en un gel de agarosa al 2 % (Fig. 2 y Tabla 3). Los productos de PCR purificados se mantuvieron congelados hasta el momento en que se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Arizona EUA. La calidad de las secuencias recibidas se determinó con el programa Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/>

chromas/). Las secuencias de DNA de buena calidad (Fig. 3a) se compararon con las existentes en la base de datos de GenBank® (16), a través de BLAST® [(Basic Local Alignment Search Tool (17)].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante este primer año los alumnos trabajaron en parejas, cada par procesó una muestra para extracción de DNA, y el flujo de trabajo se llevó a cabo en siete sesiones de laboratorio de 90 min en 5 equipos de tres o cuatro parejas. Los alumnos efectuaron actividades antes y después del laboratorio, al diseñar sus experimentos, registrarlos en las bitácoras y consultar los fundamentos de las técnicas de biología molecular y los protocolos en el Curso de Biología Molecular de ARVA en la plataforma Moodle de CUCBA. Durante 2019B y 2020A, 27 y 35 alumnos, respectivamente, participaron en el proyecto *BBG* bajo la dirección de ARVA. En este primer año de prueba del proyecto *BBG*, los alumnos no recolectaron las muestras, sino que fueron proporcionadas por el LM en los microtubos para evitar problemas de contaminación. En total se procesaron 35 especímenes; 30 hongos (*BF* y *My*), cuatro hormigas (*BI*) y una planta (*BP*) en los dos

semestres (Tabla 1). En este artículo presentamos solo los resultados de extracción de DNA, PCR y purificación de los productos de PCR del semestre 2020A (Tablas 2 y 3, Fig. 1 y 2).

Los protocolos de extracción y purificación de DNA, efectuados en dos sesiones permitieron extraer DNA genómico en cantidad y calidad suficiente para la reacción de PCR. Como puede observarse en la figura 1, la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % permitió evaluar el estado físico del DNA, esto es, determinar si estaba degradado y si contenía sales, proteínas o RNA. Además, al incluir una muestra control y un marcador de DNA con bandas de DNA de tamaño y concentración conocida, fue posible determinar la cantidad de DNA (Tabla 2). Los estudiantes llevaron a cabo actividades de entrenamiento de análisis de bandas de diferentes corrimientos electroforéticos de muestras de DNA genómicos, lo que les permitió describir los resultados de integridad, cantidad y pureza obtenidos de sus propias muestras de DNA y preparar las diluciones del DNA para la reacción de PCR en la cuarta sesión (Tabla 2). La PCR se llevó a cabo en dos sesiones; en una amplificaron las diferentes regiones de códigos de barra y al día siguiente comprobaron la amplificación (Fig. 2a). En la séptima y última sesión purificaron los productos de PCR (Fig. 2b). El análisis de la calidad de las secuencias y la comparación en Blast se llevó a cabo de manera demostrativa.

A pesar de que en 2019B se modificó el tiempo de incubación en el amortiguador salino de extracción de 60 a 30 min y en 2020A se bajó a 20 min, no hay tiempo suficiente para la transferencia del sobrenadante y precipitación de DNA con isopropanol en una sesión de laboratorio de 90 min, considerando además que es la primera sesión y a los estudiantes les toma más tiempo organizar y efectuar su trabajo. Por lo que se recomienda incubar en amortiguador de lisis salino toda la noche, lo que permitirá contar con una sesión extra para discutir los conocimientos detrás de cada etapa de la extracción de DNA y revisar las bitácoras individuales.

En todas las muestras se consiguió amplificar al menos una región de DNA (Tabla 3 y Fig. 2 para 2020A), lo que nos permite confirmar que el protocolo de extracción de DNA utilizado es el adecuado y que los alumnos han adquirido las habilidades en las técnicas de laboratorio y en el diseño de sus experimentos. El resultado de amplificación podría haberse mejorado al probarse diferentes combinaciones de cebadores, temperaturas de hibridación en la PCR y diferentes concentraciones de DNA. Sin embargo, el objetivo para el primer año del proyecto era llevar a cabo todo el flujo de trabajo de laboratorio para comprobar si era factible efectuarlo

con los medios existentes en el LABMyG, o con los del LGEMoF portátiles que se trasladaron al aula de clases y de la manera más simple posible.

Se enviaron a secuenciar 31 muestras (28 de hongos, 2 de hormigas y una de planta), ya que como se observa en la Tabla 3 la muestra BF16 resultó con amplificación inespecífica para ITS y My 45 no amplificó. Así en la Tabla 1 solo se describen las 23 muestras de las 24 que fue posible comparar las secuencias con las existentes en las bases de datos de GenBank® (20 Basidiomycota, 1 Ascomycota y 2 Arthropoda). Ya que al analizar los electroferogramas de las secuencias ITS, en tres muestras (BF8a, My37 y My40) no se obtuvieron secuencias de calidad para someter al análisis con Blast (Fig. 3b), y en cuatro (BF9, My38, My41 y My44) se observó duplicidad de la señal (Fig. 3c), debido quizás a la amplificación simultánea de otros fragmentos de DNA existentes en la muestra, procedentes de parásitos, contaminación o por ser las muestras heterocigotas.

En el caso de la identificación con la región ITS de los hongos, en particular de Basidiomycetes, se ha generalizado que si dos secuencias difieren en menos del 3 %, normalmente se consideran de la misma especie (18). Cabe señalar que en algunos casos este 3 % no aplica, ya que puede ser muy alto o muy bajo, de acuerdo con el grupo de hongos del que se trate. Por ello, la determinación basada únicamente en la similitud de las secuencias debe tomarse con cautela y acudir a una corroboración taxonómica que incluya caracteres morfológicos, además de los datos moleculares (19). Se sabe también que hay variación intraespecífica e intra-individual (entre basidiomas de un mismo ejemplar) y ello complica los intentos automatizados de determinación de especies (20, 21). En el caso de los Ascomycota se ha establecido un porcentaje de variabilidad promedio en la región ITS de 1.96% (11). En relación con las muestras secuenciadas, como se observa en la Tabla 1, nueve ejemplares (BF4, BF6-7, BF10-11, BF13, BF19 My39 y 43) pueden ser asignados a una especie a través de ITS, ya que difieren en menos del 3.1 % con alguna secuencia de GenBank. Sin embargo, uno de ellos, My39 coincidió con una secuencia que solo está determinada como *Mutinus* sp. en GenBank. Dos ejemplares (BF14 y BF17) se consideran cercanos a una especie, ya que tienen diferencias de poco más del 3 % (3.75–3.98). Nueve especímenes, con una similitud entre 4.2–11.75%, se pueden asignar a algún género (BF1-3, BF5, BF15, BF18, My42, 46 y 47) y uno (BF12) permite asignar la familia. Es importante señalar que a pesar de los esfuerzos mundiales para secuenciar todos los hongos las bases de datos aún están muy incompletas (19,

TABLA 3

Resultados de la amplificación de las muestras trabajadas en 2020A. Se incluye el método de purificación de los productos de PCR. *Tamaño esperado de la región amplificada. A = Amplicón con tamaño esperado. AD = Fragmento amplificado débil. AMD = Fragmento amplificado muy débil. NA = No amplificó. A/I = amplificación inespecífica [AD] = Concentrar, por evaporación. E = ExoSAP-IT. GFX = Columna de purificación. Sec = Enviado a servicio de secuenciación. 2B = Purificado con doble banda.

# Diario	ITS, cebadores ITS1F/ITS				LSU, cebadores LROR+LR5				COI, cebadores LCO1490+HCO2198		
	~600-800 pb*				~1.1 kb				~700 pb		
DNA molde	# PCR	Resultado PCR	# Purificado	Resultado purificación	# PCR	Resultado PCR	# Purificado	Resultado purificación	# PCR	Resultado PCR	# Purificado
1 BI 3									1	A	GFX 1
2 BF 8c	2	[AD]	E 1	Sec	19	NA	-				
3 BF 13	3	A	GFX 2	Sec	20	A	E 2	Sec			
4 BF 14	4	A	GFX 3	Sec	21	A	E 3	Sec			
5 BF 15	5	A	GFX 4	Sec	22	NA					
6 BF 16	6	A/I	—		23	A	E 4	Sec			
7 BF 17	7	A	GFX 5	2B	24	[AD]	E 5	Sec			
8 BI 4									8	A	GFX 6
9 BF 18	9	A	GFX 7	Sec	25	A	E 7	Sec			
10 BF19	10	[AD]	E 6	Sec	26	NA	—				
11 My 37	11	A	GFX 8	Sec	27	NA	—				
12 My 38	12	A	GFX 9	Sec	28	A/I	—				
13 My 39	13	A	E 8	Sec	29	A	GFX 11	Sec			
14 My 40	14	A	E 9	Sec	30	AMD	—				
15 My 41	15	A	GFX 10	Sec	31	A	GFX 12	Sec			
16 My 42	16	A	E 10	Sec	32	A	GFX 13	Sec			
17 My 43	17	A	E 11	Sec	33	A	GFX 14	2B			
18 My 44	18	A	E 12	Sec	34	A	E 13	Sec			

22). Las muestras cuya secuencia difiere en más de 3 o 4 % a las existentes en GenBank hablan de que probablemente se traten de taxones no descritos, que es lo que se sospechaba con datos morfológicos en varios casos (My39, 42, 43, 46 y 47). Por otro lado, se pudieron detectar errores en la determinación macromorfológica mediante el uso de las secuencias, ya que algunos taxones estaban asignados a otros géneros, como sucedió con BF2, BF10 y BF13 previamente asignados únicamente con caracteres macromorfológicos. En otros materiales fue muy útil la secuencia, ya que únicamente se sabía el orden al que pertenecían (BF7). En cuanto al porcentaje de cobertura (% de nuestra secuencia que se comparó con la base de datos) indicado en la Tabla 1, es importante considerar, que por ejemplo en BF1, el 96% de la secuencia se alineó con la secuencia de GenBank y mostró una similitud de 94.37 que nos permite

asignar a un género; mientras que BF4, tiene muy poca cobertura, sólo la mitad (53%) de la secuencia se alineó con la secuencia de GenBank pero esa mitad tiene una similitud alta (94.37), lo que quiere decir que no hay otras secuencias en GenBank semejante a esta, por eso solo se alinea lo que es semejante y solo se compara con esa mitad, por lo que en este caso no podemos afirmar que se trate de la especie. En el caso de los dos ejemplares de hormigas (BI1 y BI2) se corroboró su determinación morfológica hasta especie con el uso de COI. La búsqueda Blast de las secuencias rbcL, matK y trnH-psbA del ejemplar de la planta (BP1), etiquetado inicialmente como *Toona*, mostró similitud con los géneros *Entandrophragma*, *Toona*, *Cedrela* y *Swietenia* (todos de la familia Meliaceae), por lo que se procedió al estudio morfológico y se hicieron análisis filogenéticos con las secuencias de DNA. Con base en lo anterior



Figura 3. Tipos de electroferogramas de las muestras de DNA secuenciadas. El electroferograma o cromatograma se refiere al gráfico de una secuencia de DNA obtenido por electroforesis capilar y registran los picos de fluorescencia. Los resultados de las secuencias obtenidas pueden ser: a) Secuencia de buena calidad, con picos de fluorescencia bien definidos en la parte inferior y en la parte superior la secuencia de DNA, BF 14 con sólo una N en toda la secuencia. b) Secuencia con mala señal (ruido) no hay picos de fluorescencia definidos, y por lo tanto en la parte superior solo se leen Ns hay muy pocos C, T, G o A, que causa poca legibilidad por lo que no puede utilizarse en BLAST, BF 13. c) Secuencia con doble señal, a pesar de que hay algunos picos de fluorescencia definidos, estos se interrumpen de manera constante por Ns, que causa poca legibilidad por lo tanto tampoco puede utilizarse en BLAST, BF 17.

se concluyó que se trata de una nueva especie del género *Cedrela*. Finalmente, es importante dejar claro que estos resultados de DNA barcoding nos proporcionan una aproximación para la identificación taxonómica que consideramos suficientes para una clase de licenciatura de biología molecular, pero que definitivamente es necesario un estudio completo que incluya morfología y filogenia, ya que aunque exista 100 % de cobertura y 100% de similitud es indispensable corroborar la identificación taxonómica con análisis filogenéticos.

Entre las recomendaciones para la siguiente etapa del proyecto, se puede considerar la comparación de las secuencias obtenidas en otras bases de datos, por ejemplo BOLD, Fungal Barcoding,

UNITE, entre otras con el propósito de que los alumnos practiquen las búsquedas BLAST (11, 23). Además, la información de estas bases está curada en comparación con la de GenBank, lo cual puede dar información más precisa sobre nuestras muestras. También se pretende secuenciar la región del factor de elongación de la traducción 1- α (TEF1 α) debido a que en hongos se considera un código de barras secundario (24). A pesar de que se incluyeron lecturas y guías para la preparación del informe científico, sólo en el segundo semestre fue posible obtener un poco de avances en la presentación de los resultados (Fig. 1 y 2), por lo que se recomienda incluir actividades que les permita a los alumnos identificar las características de un

informe e incorporarlas en su propia escritura. En semestres avanzados, los alumnos podrían utilizar más herramientas de bioinformática para analizar los datos generados en el proyecto *BBG*, desde la edición y alineación de secuencias, como análisis filogenéticos que permitan encontrar las homologías moleculares para determinar las relaciones evolutivas. Esto permitiría a los alumnos participantes contribuir con datos de alta calidad a nivel internacional.

Finalmente, los datos generados por los estudiantes en el proyecto *BBG* podrán incorporarse a proyectos de investigación del LGEMoF y del LM, así como a tesis de pregrado y posgrado. Además, a través de este trabajo se satisfacen las necesidades del nuevo plan de estudios de la Licenciatura de Biología del CUCBA, iniciado en 2019A; es decir permitir que los estudiantes se involucren en la construcción del conocimiento a través del aprendizaje basado en la investigación, sin restricciones de espacio y recursos de laboratorio y técnicos, que impidan la experimentación avanzada en biología molecular y bioinformática. Más aún, los resultados de las etapas del flujo de trabajo del laboratorio semi portátil del proyecto código de barras de DNA nos permitirá completar un laboratorio portátil para responder al aislamiento impuesto por la pandemia del SARS-CoV2 (COVID-19), ya que los alumnos podrán llevar a cabo el flujo de trabajo de laboratorio desde casa, desde un aula o un despacho en el campus de la universidad con la sana distancia. También es importante señalar la optimización de los recursos institucionales ya que las muestras de DNA y los productos de PCR no se desechan, sino que se ha formado un banco de DNA; y los productos de PCR son aprovechados para obtener datos sólidos y confiables.


CONCLUSIONES E IMPLICACIONES EDUCATIVAS

Con los resultados observados podemos concluir que la implementación de la obtención de códigos de barras de DNA implica un flujo de trabajo sencillo para documentar la biodiversidad, ya que este primer año de trabajo permitió la identificación molecular del 77.41 % del material estudiado,

con la determinación hasta el nivel de especie de 11 ejemplares (ocho hongos, dos hormigas y una planta), dos cercanos a una especie, 10 hasta género y uno hasta familia. Además, fue posible que los estudiantes llevaran a cabo la mayoría de las etapas del código de barras en la clase de Biología Molecular de la Licenciatura de Biología del CUCBA, ya que se dispone de material y equipo necesario, y se ha demostrado que el aula de clases puede utilizarse para sesiones de trabajo cuando el laboratorio de docencia no está disponible. Las etapas de recolecta y de bioinformática, son viables si se recurre a efectuarlos como parte de otros cursos de la Licenciatura en Biología.

La experiencia del proceso de la ciencia a través de la participación en una investigación original como parte del trabajo del laboratorio de la clase de biología molecular es una buena propuesta didáctica porque generan el aprendizaje significativo en el alumno, ya que necesariamente se requiere que se involucren en formular preguntas, diseñar experimentos, recopilar y analizar datos para preparar un informe científico, en la lectura y actividades para aprender técnicas y conceptos, así como en el trabajo en equipo para llevar a cabo el proceso de la investigación científica. Además, el hecho de que los alumnos se involucren en el trabajo con muestras "reales" y participen en un "proyecto original", les permite generar emociones positivas relacionadas con la comprensión del proceso de la construcción del conocimiento y los motiva para trabajar de manera responsable.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa Fortalecimiento de la Investigación y Posgrado 2019 y 2020 (P3E 249797 y 255382) y a los proyectos DBCyM P3Es 2019 y 2020. En particular, se agradece a la Becaria Aimeé Cervantes Gómez (Programa PEEEs UdeG 2021) y a todos los estudiantes que participaron y se reconocen sus comentarios en esta etapa inicial del proyecto del Laboratorio semi portátil *Barcode BioMol UDEG*; y a las Dra. Virginia Ramírez Cruz y Laura Guzmán Dávalos por la revisión y discusión del trabajo. 

REFERENCIAS

1. Wei CA, Woodin T (2011) Undergraduate research experiences in biology: alternatives to the apprenticeship model. *CBE-Life Sci Educ* 10:123-131.
2. Murthy PP, Thompson M, Hungwem K (2014) Development of a semester-long, inquiry-based laboratory course in upper-level biochemistry and molecular biology. *J Chem Educ* 91:1909-1917.
3. Henter HJ, Imondi R, James K, Spencer D, Steinke D (2016) DNA barcoding in diverse educational settings: five case studies. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150340.
4. Marizzi C, Florio A, Lee M, Khalfan M, Ghiban C, Nash B, et al. (2018) DNA barcoding Brooklyn (New York): A first assessment of biodiversity in Marine Park by citizen scientists. *Plos One* 13: e0199015.
5. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B (Suppl.)* 270:S96-S99
6. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313-321.
7. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 99-108.
8. Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, et al. (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12794-12797.
9. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6241-6246.
10. Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693.
11. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH (2017) Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 80:756-770.
12. Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113-118.
13. Kretzer A, Li Y, Szaro T, Bruns TD (1996) Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus sensu lato*: phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* 88:776-785.
14. Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172:4239-4246.
15. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299.
16. Benson DA, Karsch-mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2005) GenBank. *Nucleic Acids Res* 33:D34-D38.
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
18. Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB (2009) Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytol* 182:795-798.
19. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, et al. (2020) Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus*11:14.
20. Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM (2007) Intra-specific and intra- sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza* 18:15-22.
21. Simon UK, Weiß M (2008) Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Mol Biol Evo*25:2251-2254.
22. Badotti F, Silva de Oliveira F, Garcia CF, Martins Vaz,AB, Camargos Fonseca PL, Alves Nahum L, et al. (2017) Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiol* 17:42.
23. Ratnasingham S, Hebert PD (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System ([http://www. barcodinglife. org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol Ecol Notes* 7:355-364.
24. Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, et al. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 35: 242-263.