

# *Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el género Encalypta (Encalyptaceae, Bryophyta)*

María Paz MARTÍN\* & Isabel ALVARO\*\*

\* Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid, España.  
E-mail: maripaz@ma-rjb.csic.es

\*\* Departamento Biología Vegetal (Botánica) Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.  
Av. Diagonal 645,08028 Barcelona. España. E-mail: malvaro@bio.ub.es

## Resumen

MARTÍN M. P. & ÁLVARO I. 2001. Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) en el género *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Bot. Complutensis* 25: 233-239.

Se presentan las primeras aportaciones sobre el estudio molecular de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*), basado en la técnica de la PCR, para las especies del género *Encalypta* presentes en la Península Ibérica. El aislamiento del ADN se realizó a partir de fragmentos del gametófito y del esporófito procedentes tanto de material fresco como de herbario. También se ha utilizado protonema obtenido en cultivo *in vitro*, a partir de esporas. Los amplímeros obtenidos corresponden a las dos regiones espaciadoras (ITS-1 e ITS-2), además de la subunidad 5.8S, del ADNr nuclear. Se utilizaron dos protocolos de amplificación y las parejas de iniciadores ITS5/ITS4, ITS1/ITS4, ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4. Con ITS5/ITS4 e ITS1/ITS4 se obtuvieron amplificaciones de la región ITS por completo, a partir del ADN extraído de material fresco. Sin embargo, a partir del material de herbario sólo se pudieron amplificar las regiones ITS-1 e ITS-2 por separado, utilizando los iniciadores ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4.

**Palabras clave:** Encalyptaceae, Musgos, Península Ibérica, Amplificación ADN, ITS

## Abstract

MARTÍN M. P. & ÁLVARO I. 2001. Preliminary notes about the amplification techniques and the variation of the ITS region in the genus *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Bot. Complutensis* 25: 233-239.

Results on DNA amplifications are presented for the *Encalypta* species present in the Iberian Peninsula. DNA was isolated from the gametophyte and sporophyte, from both fresh and herbarium materials. DNA was also isolated from protonema obtained from cultures *in vitro* of spores. The internal transcribed spacers 1 and 2, including the 5.8S nrDNA

have been amplified. Pair primers ITS5/ITS4, ITS1/ITS4, ITS1/ITS2 and ITS3/ITS4 were tested by using two different amplification protocols. ITS5/ITS4 and ITS1/ITS4 yielded amplicon only from fresh samples, not from herbarium collections, from which only primers ITS1/ITS2 and ITS3/ITS4 amplified successfully each of the ITS regions separately.

**Keywords:** Encalyptaceae, Musci, Iberian Peninsula, DNA Amplification, ITS

## INTRODUCCIÓN

Los musgos de la familia *Encalyptaceae*, incluida dentro del orden Encalyptales, se encuentran mayoritariamente representados en el Hemisferio Norte, y están caracterizados por la presencia de una larga y cilíndrica caliptra que cubre por completo la cápsula. La familia incluye dos géneros: *Bryobrittonia* Williams y *Encalypta* Hedw., el primero monoespecífico y el segundo con 19 especies repartidas en 5 secciones (Horton, 1983).

En la Península Ibérica únicamente está presente el género *Encalypta*, con 8 especies: *E. affinis* Hedw. f., *E. alpina* Sm., *E. ciliata* Hedw., *E. microstoma* Bals. & De Not., *E. rhaptocarpa* Schwaegr., *E. spathulata* C. Müll., *E. streptocarpa* Hedw. y *E. vulgaris* Hedw. En nuestro estudio sobre la distribución del género *Encalypta* en España se han analizado algunos de los caracteres tradicionales que han utilizado diversos autores (Horton, 1983; Nyholm, 1981) para reconocer los diferentes taxones: presencia-ausencia de peristoma, morfología del peristoma, morfología esporal, base de la caliptra, ápice del filidio, lámina basal, etc. Pero éstos, no siempre proporcionan un criterio claro para delimitar las especies y las categorías infraespecíficas. Además, en el estudio de las numerosas poblaciones peninsulares de *E. vulgaris* se ha observado una importante variabilidad infraespecífica y, para ciertos caracteres, una ausencia de discontinuidad con poblaciones de otros taxones de la misma sección: *E. spathulata* y *E. rhaptocarpa*. El hecho de que muchas poblaciones presentan una mezcla de caracteres cuestiona la validez de algunos de ellos. ¿Cuándo la variabilidad morfológica es una respuesta a condiciones ambientales y cuándo se trata de caracteres discriminatorios fijados genéticamente?

Con el objeto de aportar nuevos datos que nos ayuden a delimitar mejor la posición de los diferentes taxones y clarificar la filogenia del género, iniciamos el estudio molecular, basado en la técnica de la PCR (*Polimerasa Chain Reaction*), de las especies de *Encalypta* presentes en la Península. En esta primera aportación damos a conocer la metodología utilizada y los primeros resultados obtenidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Inicialmente hemos analizado las 6 especies de *Encalypta* más representadas: *E. alpina*, *E. ciliata*, *E. rhaptocarpa*, *E. spathulata*, *E. streptocarpa* y *E. vulgaris*; además hemos incluido en el estudio, a la potiócea *Tortula muralis* Hedw. para considerarla como grupo externo en los posteriores análisis filogenéticos (ver tabla 1).

**Tabla 1**  
**Taxones estudiados. Material y fecha de aislamiento del ADN**

Taxones/N.º Herbario	Fecha recolección	Fecha ADN	Aislamiento ADN (fragmento utilizado)*
<i>Encalypta alpina</i> BCC 1756	09/07/83	24/04/98	G + E
<i>E. ciliata</i> BCC 1228	22/07/87	24/04/98	G + E
<i>E. rhaptocarpa</i> BCC 1195	07/07/84	24/04/98	G + E
<i>E. spathulata</i> JMF 1488	04/02/90	24/04/98	G + E
<i>E. streptocarpa</i> BCC 1250	06/10/98	07/12/98	G+ propágulos
<i>E. vulgaris</i> BCC 1242	28/04/97	24/04/98	G + E
<i>E. vulgaris</i> (cultivo <i>in vitro</i> )	05/04/98	08/06/98	Protonema
<i>Tortula muralis</i> BCC 1300	10/06/98	07/12/98	G + E

\* G: gametófito, E: esporófito.

Cada extracción del ADN se realizó a partir de 2-2,5 mg de material deshidratado, secado al aire y procedente de una única población. Todas las muestras utilizadas en las extracciones proceden de localidades de la Península Ibérica, y en el caso de *E. vulgaris* también se realizaron extracciones a partir de pequeños fragmentos de protonema obtenidos de cultivo *in vitro*, a partir de esporas.

El ADN se aisló utilizando los dos protocolos mencionados en Martín & García -Figueres (1999): 1) método estándar, basado en Whiting *et al.* (1997), y 2) kit comercial (EZNA Plant ADN miniprep kit, Omega Biotek). El método estándar presenta tres fases: a) extracción con tampón de lisis que contiene 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl y 3% SDS, durante una incubación de toda la noche a 55 °C, b) purificación con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) un mínimo de 3 veces, c) precipitación con etanol absoluto frío durante 2h 30 min a -20 °C.

Para las amplificaciones de la región ITS (ITS-1 + 5.8S + ITS-2), completa o parcial, se ensayaron distintas parejas de iniciadores: ITS5/ITS4, ITS1/ITS4, ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4 (White *et al.*, 1990) y dos métodos de amplificación distintos: 1) amplificaciones estándar mediante un cóctel según se indica más abajo y 2) amplificaciones individuales con Ready-To-Go ®PCR Beads (Amershan-Pharmacia Biotech).

En las amplificaciones estándar, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 1.5 µl de agua Milli-Q, 2 µl 10 × PCR Buffer II (Perkin Elmer), 200 mM deoxinucleótidos (dNTP) (Perkin Elmer), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada iniciador, 0.5 unidades de AmpliTaq® Gold ADN Polymerase (Perkin Elmer) y 10 µl de ADN. En las amplificaciones con PCR Beads, a un volumen final de 25 µl, se realizaron dos ensayos con distintas cantidades de iniciadores: 1) 1,0 µl de ADN, 0,5 µl de cada iniciador (10 µM) y 23,0 µl de agua Milli-Q y 2) 1,0 µl de ADN, 1,0 µl de cada iniciador (10 µM) y 22,0 µl de agua Milli-Q.

Los amplímeros obtenidos se visualizaron con un transiluminador de electroforesis con luz u.v. y tinción con bromuro de etidio incluido en el gel de agarosa.

## RESULTADOS

A partir de las extracciones con material fresco o recolectado en un plazo de tiempo inferior a 1 año, sólo se visualizaron las amplificaciones realizadas con PCR Beads (Fig. 1.1). Con las mismas condiciones de extracción y amplificación, los amplímeros obtenidos con el par de iniciadores ITS1/ITS4 fueron de mejor calidad, es decir se visualizaron bandas únicas y nítidas, que los obtenidos con el par ITS5/ITS4 (Fig. 1.4). Las longitudes en pares de bases (bp) de los segmentos amplificados con ITS1/ITS4, que incluye un fragmento final 18S ADNr + ITS-1 + 5.8S ADNr + ITS-2 + fragmento inicial 28S ADNr, se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2**  
**Longitudes en pares de bases (bp) de los segmentos amplificados con las diferentes parejas de iniciadores. Las amplificaciones que han dado más de una banda se indican entre paréntesis**

Taxones	REGIÓN DIANA		
	ITS (ITS1/ITS4)	ITS-1 (ITS1/ITS2)	ITS-2 (ITS3/ITS4)
<i>Encalypta alpina</i>	—	nd	nd
<i>E. ciliata</i>	—	(550,298, 220)	(510, 344)
<i>E. rhaptocarpa</i>	—	(396, 220)	(550, 344)
<i>E. spathulata</i>	—	(396, 220)	(550, 344)
<i>E. streptocarpa</i>	1018	nd	nd
<i>E. vulgaris</i>	900	*(396, 220)	(450, 314)
<i>Tortula muralis</i>	800	nd	nd

nd: no hay datos; —: no se ha visualizado banda; \*: bandas débiles en los geles.

No se visualizaron amplímeros tras la reacción en cadena de la polimerasa con PCR Beads y los iniciadores ITS1/ITS4, a partir de las extracciones con material de herbario de 8 a 10 años de antigüedad (Fig. 1.3). Sin embargo, para algunas de las muestras de herbario analizadas (*E. ciliata*, *E. spathulata*, *E. rhaptocarpa*), se obtuvieron amplímeros con las parejas de iniciadores ITS1/ITS2 (final 18S ADNr + región ITS-1 + inicio 5.8S ADNr) e ITS3/ITS4 (final 5.8S ADNr + región ITS-2 + inicio 28S ADNr) por separado. En ambos casos se visualizaron bandas dobles en los geles (Fig. 1.5). Las longitudes en pares de bases de estos amplímeros se muestra en la Tabla 2.

Las extracciones de fragmentos de protonema de *E. vulgaris*, amplificadas con PCR Beads, no dieron en ningún caso bandas únicas y definidas. La muestra amplificada con los iniciadores ITS1/ITS4 originó dos bandas (Fig. 1.3, columna 5, PCR Beads) y la banda superior estaba situada por debajo de las 900 bp obtenidas en las amplificaciones de *E. vulgaris* realizadas a partir de gametófito más espo-

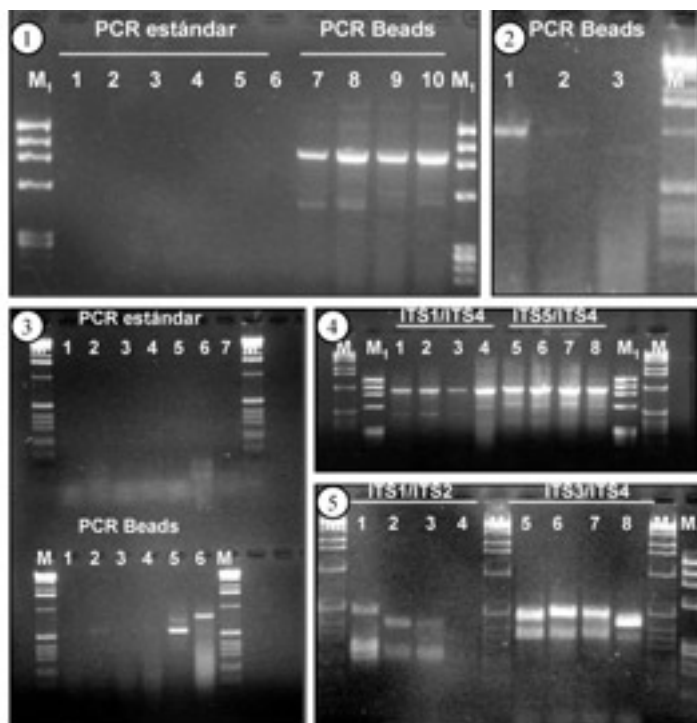


Figura 1.—1: Amplificación estándar frente a PCR Beads con los iniciadores ITS1/ITS4 para material fresco de *E. vulgaris*. Columnas 1-5: *E. vulgaris*, protocolo de amplificación estándar; 6: control negativo; 7-10: *E. vulgaris*, PCR Beads; M<sub>1</sub>: marcador de peso molecular X 174 RF DNA/ Hae III Fragments (Gibco BRL, USA). 2: Amplificación con PCR Beads e iniciadores ITS1/ITS4 de material fresco de *E. streptocarpa* (columnas: 1, gametófito; 2, propágulos) y *Tortula muralis* (columna: 3). M: Marcador de peso molecular 1Kb Ladder. 3: Amplificación estándar (parte superior) frente a PCR Beads (parte inferior), con iniciadores ITS1/ITS4 para material con 8-11 años de antigüedad (columnas 1-4) y material fresco (columnas 5-6). Las muestras en la parte superior e inferior corresponden a: 1, *E. ciliata*; 2, *E. alpina*; 3, *E. spathulata*; 4, *E. rhamnoides*; 5, *E. vulgaris* (protonema); 6, *Tortula muralis*; 7, Control negativo; M, marcador de peso molecular 1Kb Ladder. 4: Amplificaciones con iniciadores ITS1/ITS4 frente a ITS5/ITS4, PCR Beads y material fresco de *E. vulgaris*. Columnas 1-2, 5-6: concentración de iniciadores 5 pmol/μl; columnas 3-4, 7-8: concentración de iniciadores 10 pmol/μl; M: marcador de peso molecular 1KB Ladder; M<sub>1</sub>: X 174 RF DNA/ Hae III Fragments. 5: Amplificaciones iniciadores ITS1/ITS2 frente a ITS3/ITS4, con PCR Beads de material de herbario (columnas: 1-3, 5-7) y protonema (columnas: 4-8). 1,5: *E. ciliata*; 2,6: *E. spathulata*; 3,7: *E. rhamnoides*; 4,8: *E. vulgaris*; M: marcador de peso molecular 1Kb Ladder; M<sub>1</sub>: X 174 RF DNA/ Hae III Fragments.

rófito. Las amplificaciones que se obtuvieron a partir de fragmentos de protonema de *E. vulgaris*, con los iniciadores ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4 también dieron dobles bandas pero, en este caso, la suma de las bandas de mayor longitud (en general, más intensas) era del orden de las 900 bp.

## DISCUSIÓN

Los métodos de extracción utilizados en este estudio, no parecen ser limitantes para la posterior amplificación, pero sí el método utilizado para la PCR, ya que en las muestras analizadas sólo se visualizaron bandas en los geles tras su amplificación con PCR Beads. Aunque el método de extracción estándar dio un ADN de concentración y calidad suficiente para su posterior amplificación, aconsejamos el kit comercial (el aquí ensayado u otros) para evitar el uso de sustancias nocivas como el fenol y el cloroformo y rentabilizar el tiempo de extracción (12 horas con el método estándar, frente a 30 minutos con el kit).

Los aislamientos de ADN a partir de material recolectado recientemente (en los doce meses anteriores a la extracción) han amplificado bien con los iniciadores ITS1/ITS4, no así el material conservado varios años en herbario. Sin embargo, las extracciones de este material antiguo se amplificaron al utilizar las parejas de iniciadores que permiten obtener los dos espaciadores (ITS-1 e ITS-2) por separado. El deterioro y fraccionamiento que puede haber sufrido el ADN de estos ejemplares de herbario podría estar relacionado con la mayor eficacia de los iniciadores ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4. Estos primeros resultados sugieren que es aconsejable el uso de material recién recolectado en estudios preliminares como el aquí propuesto.

La aparición de dobles bandas en las amplificaciones siempre que se han utilizado las parejas de iniciadores ITS5/ITS4, ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4, puede deberse a dos razones principales. A) Que alguno de los iniciadores utilizados tenga más de una región de hibridación en el ADN genómico de las muestras estudiadas. Así pues, uno de los objetivos a conseguir a corto plazo es, a partir de las secuencias obtenidas (datos no incluidos), diseñar iniciadores específicos para musgos y en particular para el género *Encalypta*. Esto nos permitirá ser más eficaces en las amplificaciones con el material de herbario. B) La existencia de intrones en las subunidades del ADNr.

La doble banda que se observa en las amplificaciones obtenidas a partir de pronema, con los iniciadores ITS1/ITS4, pueden ser debidas a la amplificación de ADN procedente de alguna contaminación.

Las bandas obtenidas en las amplificaciones de cada una de las regiones ITS-1 e ITS-2 correspondientes a las especies *E. spathulata* y *E. rhaptocarpa* muestran un número de pares de bases similar para ambas, mientras que para *E. ciliata* las bandas fueron distintas.

Los primeros resultados obtenidos en este trabajo, básicamente técnico, apuntan una prometedora variabilidad molecular del ADN ribosómico nuclear para estudios sistemáticos en briófitos, aunque su valor desde el punto de vista filogenético debe ser confirmado. Sin embargo, es necesaria una mayor adecuación de las técnicas y de los iniciadores para optimizar los resultados con material antiguo y deteriorado. Éste es un reto importante, ya que el material de herbario siempre es una referencia importante en los trabajos de revisión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HORTON, D. (1983). A revision of the Encalyptaceae (Musci) with particular reference to the North America (II). *Journ. Hattori Bot. Lab.* 54: 353-532.
- JOHANNESSON, H. & M. P. MARTÍN (1999). Cladistic analysis of European species of *Rhizopogon* (Basidiomycotina) based on morphological and molecular characters. *Mycotaxon.* 61: 267-283.
- MARTÍN M. P. & F. GARCÍA-FIGUERES (1999). *Colletotrichum acuminatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology.* 105 (8): 733-741.
- MARTÍN, M. P. & K. WINKA (1999). Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *Lichenologist.* (en prensa).
- NYHOLM, E. (1981). *Illustrated Moss Flora of Fenoscandia Fasc. 1.* The botanical Society of Lund. Kungälv.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & J. TAYLOR (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. En M. Innis, D. Gelfand, J. Snisky & T. White (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press.

*Original recibido: 29 de Marzo de 2001*

*Versión final recibida: 26 de Julio de 2001*