



**Facultad de ciencias
Grado en Biología
Departamento de Biología
Área de genética**

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Desarrollo de métodos para la extracción de ADNmt de carpóforos de basidiomicetes

Desenvolvimento de métodos para a extracción de carpóforos de basidiomicetes

Development of methods for the extraction of mtDNA from basidiomycete carpophores



Sandra Ramos Pandiella
julio, 2018

Director Académico: Antón Vila Sanjurjo

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Palabras clave	1
3. Introducción.....	1
3.1. Diversidad genética	1
3.2. Diversidad genética en hongos	2
3.3. Russula sardonia	3
3.4. ADNmt	4
4. Objetivos	5
5. Material y métodos.....	5
5.1. Recolección de ejemplares	5
5.2. Aislamiento de ADNmt	8
5.3. Extracción de ADNmt	9
5.4. Extracción de ADN total	9
5.5. Cuantificación ADN	9
5.6. PCR.....	9
5.7. Electroforesis	11
5.8. Secuenciación	11
5.9. Estudio filogenético	11
6. Resultados y discusión.....	13
6.1. Extracción de ADNmt y ADN total	13
6.2. Amplificación por medio de PCR y secuenciación	13
7. Conclusiones.....	17
8. Bibliografía.....	18
9. Anexos.....	22

1. Resumen

Las poblaciones de diferentes especies varían en las cantidades de diversidad genética que poseen. En los hongos se ha encontrado una enorme diversidad biológica que los ha llevado a distinguir entre cuatro grupos principales de organismos fúngicos, ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos y chytridiomycota. A pesar de la importancia y la utilidad de los hongos, hasta hace bastante poco, eran pocos los genomas secuenciados. El objetivo final de este proyecto es el estudio de la variabilidad genética en basidiomicetos, utilizando la *R. sardonia* como organismo modelo.

R. sardonia, forma parte de los basidiomicetos, siendo un hongo micorrizal localmente común. Para poder avanzar en dicha dirección se hace necesario el desarrollo de métodos para la extracción de ADN mitocondrial de dichas setas. El presente TFG se centrará específicamente en el desarrollo y evaluación de dichos métodos.

1. Abstract

The populations of the different species vary among the different amount of genetic diversity that they possess. A huge biological diversity has been found in the fungus, which has led to distinguish four main groups of fungic organisms: ascomycetes, basidiomycetes, zygomycetes and chytridiomycota. Despite the relevance and usefulness of the fungus, until recently, few genomes were sequenced. The final target of this project is the study of the genetic variability in basidiomycetes, using the *R. sardonia* as a model organism.

R. sardonia, belongs to the basidiomycetes, being a locally common mycorrhizal fungus. In order to make progress in this way it required the development of the DNA mitochondrial extraction methods of these mushrooms. The present TFG will be focused specifically on the development and assessment of these methods.

2. Palabras clave

Variación, genoma, ADN mitocondrial, *Russula Sardonia*

3. Introducción

3.1. Diversidad genética

La variación genética es la materia de la evolución: si no hay variación, no puede haber evolución (Taylor *et al.*, 2016). Las poblaciones de diferentes especies varían en función de la cantidad de la diversidad genética que poseen siendo la diversidad genética de una población un factor y un resultado de una amplia gama de procesos evolutivos. Una de las maneras de detectar esta variación genética es el estudio de la diversidad de nucleótidos π . Estos se pueden definir como el número de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias elegidas al azar en una población N (Yu *et al.*, 2004). En la mayoría de las especies, la diversidad de nucleótidos π , está por debajo de 0,03; entre las 167 especies de eucariotas distribuidas en 14 phyla revisados recientemente (Leffler *et al.*, 2012) el valor más alto observado hasta ahora es 0,16 en el nematodo *Caenorhabditis brenneri* (Dey *et al.*, 2013).

Las especies hipervariables son de particular interés para la genética de poblaciones. Dicha ciencia se ocupa de estudiar las diferencias entre los genotipos, y cuantas más diferencias haya, más se puede aprender sobre los factores que afectan a la población. La hiperdiversidad podría ser causada por un tamaño de población efectivo inusualmente alto (N_e), una tasa de mutación muy alta (m) o ambas (Baranova *et al.*, 2015).

El estudio de la variabilidad genética de un cultivo puede realizarse por varios métodos. Entre ellos podemos diferenciar entre los métodos basados en técnicas moleculares, más

avanzados, o métodos basados en rasgos morfológicos (Taba ,1991). En los primeros no se considera la interacción entre genotipo y ambiente, siendo ambas complementarias (Fairbanks *et al.*, 1992) por otra parte, califican la influencia del medio ambiente como una desventaja en las caracterizaciones morfológicas, ya que no permite representar verdaderas similitudes o diferencias genéticas.

Cabe mencionar que las variaciones genéticas pueden ser producidas por mutación, que es cualquier cambio brusco en los genes capaz de ser transmitido a la descendencia, o bien cualquier cambio en la estructura molecular del material genético que provoca una nueva expresión del fenotipo (Franco y Hidalgo, 2003).

3.2. Diversidad genética en hongos

En los 900 millones de años (Myr) de la historia evolutiva de los hongos se ha encontrado una enorme diversidad biológica.

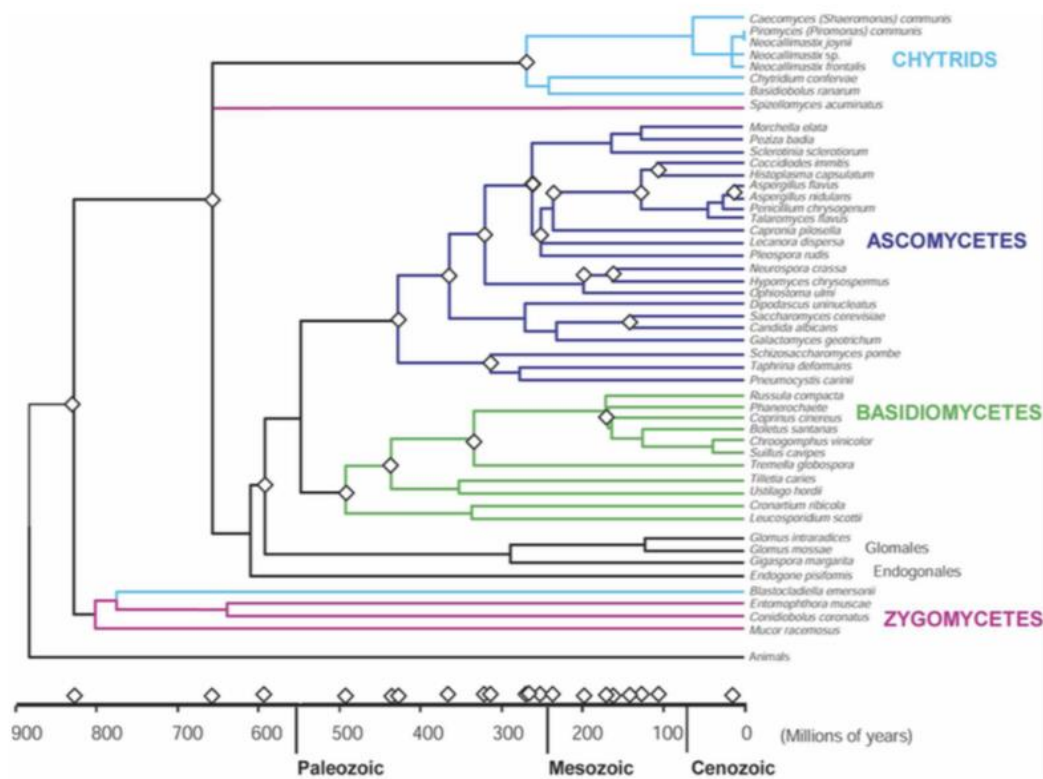


Figura 1: Filogenia del reino de los hongos Grupos fúngicos principales, coloreados según lo indicado por el texto a la derecha. Los diamantes indican puntos de ramificación evolutiva, y su fecha aproximada (abajo), capturada por genomas de hongos secuenciados en o en progreso (Galagan *et al.*, 2003).

Esta diversidad abarca cuatro grupos principales de organismos fúngicos, ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos y chytridiomycota (Figura 1).

A pesar de la importancia y la utilidad de los hongos, hasta hace bastante poco, lo que se sabía sobre sus genomas derivaba principalmente de la secuencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, siendo el primer hongo eucariota secuenciado. La era de la genómica fúngica, y de hecho de la genómica eucariota, se introdujo mediante la secuenciación del genoma completo de la levadura *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996). Este hito revolucionó el trabajo en levaduras y permitió los primeros estudios globales de la función y expresión del gen eucariótico (Galagan *et al.*, 2005). Poco después, a la secuenciación de la levadura se unió la secuencia de un *Ascomycota* filamentoso llamado *Neurospora* (Galagan *et al.*, 2003) y la del *Basidiomycota* *Phanerochaete* (Martinez *et*

al.,2004). No mucho después, tres especies de *Aspergillus* fueron secuenciadas: *Aspergillus oryzae* (Machida *et al.*, 2005) *Aspergillus fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005) y *Aspergillus nidulans*, y las comparaciones de sus genomas (Galagan *et al.*,2005) junto con las de las levaduras estrechamente relacionadas con *S. cerevisiae* (Kellis *et al.*,2003) representan hitos en el campo de la genómica fúngica comparativa (Taylor *et al.*,2016).En los últimos años ha habido una explosión en la genómica fúngica que ha ampliado en gran medida nuestra visión de la diversidad genética y fisiológica de estos organismos. A pesar de la necesidad evidente, el progreso en la secuenciación de genes fúngicos fue inicialmente lento. Para acelerar el ritmo de la genómica fúngica, en 2000, un consorcio de micólogos en colaboración con científicos del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (ahora el Broad Institute) lanzó la Iniciativa Fungal Genome. El objetivo de la FGI es secuenciar los genomas de hongos de todo el reino (Galagan *et al.*,2005). El creciente número de genomas fúngicos completos proporciona una oportunidad sin precedentes para estudiar la biología y la evolución de un reino eucariótico completo. Sin embargo, la secuencia es solo la punta del iceberg para entender la genómica fúngica (Galagan *et al.*,2005).

3.3. *Russula sardonia*

En este trabajo se han utilizado ejemplares del hongo *R. sardonia*. Este es un hongo perteneciente al grupo de los Basidiomicetes. Los basidiomicetos constituyen un grupo de hongos que reúne más de treinta mil especies (Kirk *et al.*, 2001) consideradas superiores por su complejidad morfológica y la presencia de basidios, característica principal que define su identificación y clasificación taxonómica (Rojas, 2013). La mayoría se caracterizan por un tipo de meiosporas llamadas basidiosporas, producidas en el exterior de meiosporangios llamados basidios.

Las basidiosporas contienen un solo núcleo haploide y su germinación origina un micelio haploide monocariótico, el cual va adquiriendo septos que forman células uninucleadas. Esta fase del ciclo es de corta duración, pues los micelios monocarióticos se buscan y fusionan sus citoplasmas (plasmogamia). Cuando esto ocurre los núcleos de cada hifa fluyen a la otra, lográndose un intercambio nuclear. Las hifas que resultan de este fenómeno poseen ahora núcleos de dos tipos genéticos, por lo que son dicarióticas. Este micelio prolifera manteniendo esta situación genética por bastante tiempo (Sarasola, 2014).

El micelio dicariótico, al darse las condiciones ambientales apropiadas sufre una serie de cambios morfogenéticos dando lugar a la formación del basidioma. El basidioma posee tanto células estériles como fértiles dicarióticas. En las células fértiles, llamadas basidios, los dos núcleos haploides experimentan cariogamia y producen un nuevo núcleo diploide (2n), el cual entra rápidamente en meiosis originando así cuatro núcleos hijos haploides. En la superficie del basidio usualmente se desarrollan cuatro prolongaciones citoplasmáticas externas denominadas esterigmas, en cuyos respectivos ápices se formarán las basidiosporas. Las basidiosporas haploides germinan produciendo micelios haploides y reiniciando el ciclo de vida (Sarasola, 2014).

Se puede dar también la reproducción asexual, pero ésta es mas frecuente entre los ascomicetes que entre los basidiomicetes. La gemación y la producción de conidias, clamidosporas y oidios, son los principales mecanismos conocidos de reproducción asexual. Tanto los órganos reproductivos como el micelio somático pueden producir estas estructuras de reproducción asexual (Sarasola, 2014).

La *R. sardonia* Presenta un diámetro de 6 a 12 cm en los individuos desarrollados. Podemos observar en él un color entre violeta y púrpura, pero también hay ejemplares de color rojo sangre o marrón-rojizo. Cutícula adherente que no se separa de la carne salvo de forma

leve en la zona marginal, lisa con aspecto brillante y cuando está seca presenta un aspecto mate. Las son láminas adnatas, prietas en ocasiones bifurcadas, adheridas al pie. Estas presentan un color claro al principio con un matiz amarillento y en la madurez de color crema amarillento vistoso. La longitud del pie es proporcionada al diámetro del sombrero, cilíndrico, central y consistente en los ejemplares jóvenes, solo de viejo se vuelve más permeable, pero nunca es hueco. Carne espesa y consistente, pero a la vez quebradiza, de color blanco al principio, luego entre amarilla y ocre bajo la cutícula, también rosa o ligeramente púrpura, de sabor picante (Kothe, 2006).

Existen formas en las que el sombrero es verdoso como en el caso de *Viridis* (<https://www.asturnatura.com/especie/russula-sardonia.html>). Su olor es débil, poco apreciable, fúngico y un sabor picante (<http://fungichile.blogspot.com/2009/08/russula-sardonia.html>).

Se trata de hongo micorrizal, forma micorrizas con las coníferas, sobre todo con los pinos (<https://www.fungipedia.org/hongos/russula-sardonia.html>). Esta especie es localmente común, prefiere los bosques de pinos con suelos muy arenosos. Es absolutamente acidófila y no suele aparecer en pinares básicos. En nuestro radio de acción es muy abundante bajo *Pinus radiata*, donde llega a alfombrar el suelo en otoños lluviosos, entre septiembre y noviembre. Fructifica en grupos numerosos.

Cabe mencionar que presenta peligro de confusión con la *Rúsula de Quélet*, muy similar, tanto por el color del sombrero como del pie, como por la carne picante, pero se diferencian en el hábitat y sobre todo por el color de las laminillas que son más claras, no amarillentas (<https://rednaturaleza.com/setas/russula-sardonia>). En cuanto a la comestibilidad de *R. sardonia* se sospecha de toxicidad (Kothe, 2006).

3.4. ADNmt

Para este estudio pretendemos utilizar el genoma mitocondrial de *R. sardonia*. La mitocondria es un orgánulo encontrado en la mayoría de las células eucariotas (Henze, 2003) que, además de suministrar energía celular, se halla implicada en mayor o menor grado en otras tareas, como la traducción de la señal, la diferenciación celular, la muerte celular, ciclo celular y el control del crecimiento celular (McBride, 2006).

El ADN mitocondrial (ADNmt) es atractivo para estudios sistémicos porque es una molécula pequeña, fácilmente aislable y bien estudiada. Por ello se ha usado ampliamente como un marcador genético para estimar la divergencia genética y las relaciones entre poblaciones naturales de eucariotas, incluidos los hongos (Wilson *et al.* 1985; Taylor, 1986; Avise *et al.* 1987). Sin embargo, un obstáculo importante para usar ADN mitocondrial para estudios filogenéticos es la alta frecuencia y el gran tamaño de las mutaciones de longitud (Sanders *et al.*, 1977; Taylor *et al.*, 1986; Bruns *et al.*, 1988).

El genoma mitocondrial es una molécula de ADN circular típico de 60630 pb con un contenido de GC de 26,67%. Un genoma mitocondrial fúngico típico contiene 14 genes codificadores de proteínas conservadas y un número variable de tRNAcoding genes (Gray, 1999; Burguer, 2003). Las mitocondrias de hongos filamentosos tienen la herencia uniparental y sus genomas evolucionan más rápidamente que el ADN nuclear correspondiente, lo que las hace más adecuadas para diferenciar organismos estrechamente relacionados (Hamburguesa, 2003; Bullerwell, 2005; Ghikas, 2010).

Con el tiempo se han ido desarrollando nuevos métodos de secuenciación, por lo que se ha ido incrementando el número de genomas mitocondriales de hongos. En diciembre de 2012, 113 genomas mitocondriales de hongos se enumeraron en el Centro Nacional de Información Biotecnológica Orgánulo. La mayor parte de ellos pertenecían a ascomicetos, siendo solo 13 miembros de basidiomicetes (Li *et al.*, 2013).

4. Objetivos

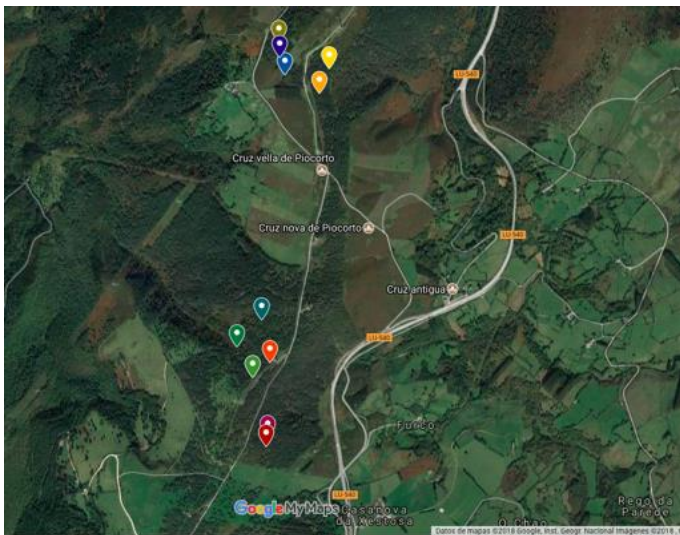
Para empezar a abordar el problema de la diversidad genética en basidiomicetes, decidimos fijarnos en la especie *R. sardonia*. Dicha especie ha sido seleccionada no solo por su gran abundancia, sino también porque sus especímenes son muy fácilmente localizables, ya que crecen siempre en la misma zona, son fáciles de reconocer e identificar, a pesar de ofrecer a simple vista un grado importante de variabilidad, cuyo posible componente genético es desconocido. Por otro lado, su inexistente interés comercial provoca una baja recolección y una gran abundancia de dicha especie. En este trabajo los principales objetivos han sido:

1. Desarrollo de un método de extracción del ADN mitocondrial de dichos ejemplares.
2. Aislamiento de ADN total de esos ejemplares
3. Secuenciación del ADN mitocondrial y nuclear
4. Estudio filogenético preliminar

5. Material y métodos

5.1. Recolección de ejemplares (realizada por Antón Vila Sanjurjo, AVS)

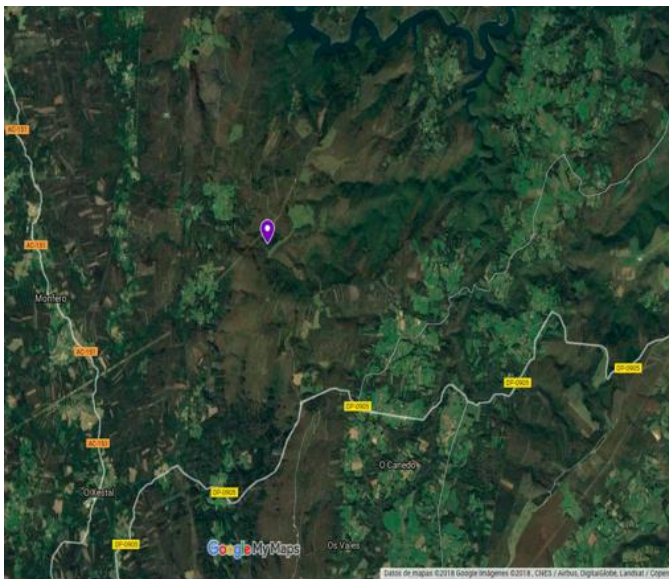
Fueron escogidas tres zonas para la recolección, Alto de A Gañidoira (Muras, Lugo), Pila da Leña (Monfero, A Coruña), O Freixo (As Pontes, A Coruña), Goente (As Pontes, A Coruña). Estos lugares se caracterizan por ser zonas con abundante ganado y con una amplia población de pinos y gran variedad de setas. De todas las setas ubicadas en esta zona, *R. sardonia* está entre las más abundantes y la podemos encontrar fácilmente en pequeños grupos dispersos no muy distanciados entre sí.



Localización	Nombre imagen	Fecha	Hora
📍	IMG_20170915_135348.jpg	15 septiembre 2017	(13:53)
	IMG_20170915_135408.jpg	15 septiembre 2017	(13:54)
📍	IMG_20170915_140645.jpg	15 septiembre 2017	(14:06)
	IMG_20170915_140648.jpg	15 septiembre 2017	(14:06)
	IMG_20170915_140651.jpg	15 septiembre 2017	(14:06)
📍	IMG_20170915_144617.jpg	15 septiembre 2017	(14:46)
	IMG_20170915_144623.jpg	15 septiembre 2017	(14:46)
📍	IMG_20170915_174317.jpg	15 septiembre 2017	(17:43)
	IMG_20170915_174319.jpg	15 septiembre 2017	(17:43)
📍	IMG_20170915_174331.jpg	15 septiembre 2017	(17:43)
	IMG_20170915_175301.jpg	15 septiembre 2017	(17:53)
📍	IMG_20170915_182152.jpg	15 septiembre 2017	(18:21)
	IMG_20170915_182155.jpg	15 septiembre 2017	(18:21)
📍	IMG_20171006_141126.jpg	6 septiembre 2017	(14:11)
	IMG_20171006_141159.jpg	6 septiembre 2017	(14:12)
📍	IMG_20171006_143226.jpg	6 septiembre 2017	(14:32)
	IMG_20171006_143245.jpg	6 septiembre 2017	(14:32)
📍	IMG_20171006_143815.jpg	6 septiembre 2017	(14:38)
	IMG_20171006_143820.jpg	6 septiembre 2017	(14:38)
	IMG_20171006_143839.jpg	6 septiembre 2017	(14:38)
	IMG_20171006_143920.jpg	6 septiembre 2017	(14:39)

Localización	Nombre imagen	Fecha	Hora
📍	IMG_20171006_181545.jpg	6 septiembre 2017	(18:15)
	IMG_20171006_181558.jpg	6 septiembre 2017	(18:15)
	IMG_20171006_181631.jpg	6 septiembre 2017	(18:16)
📍	IMG_20171006_182850.jpg	6 septiembre 2017	(18:28)
	IMG_20171006_182904.jpg	6 septiembre 2017	(18:29)
	IMG_20171006_182930.jpg	6 septiembre 2017	(18:29)

Figura 2: Mapa A Gañidoira



Localización	Nombre Imagen	Fecha	Hora
📍	IMG_20171020_141849.jpg	20 octubre 2017	(14:18)
	IMG_20171020_141844.jpg	20 octubre 2017	(14:18)

Figura 3: Mapa Pila da Leña

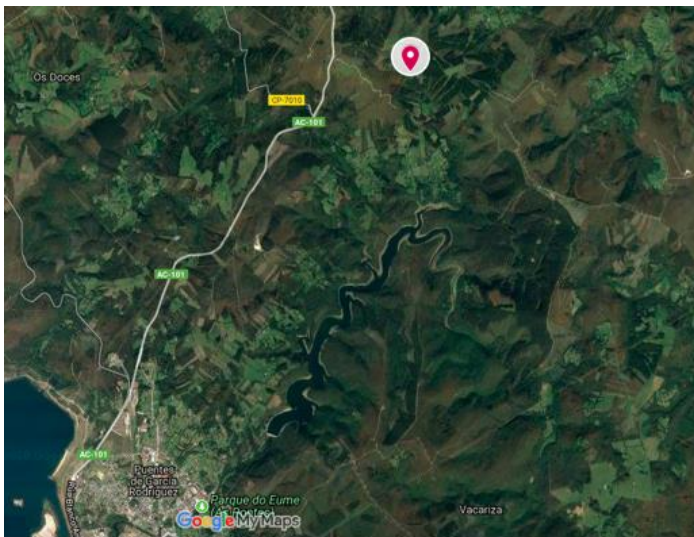


Figura 4: Mapa O Freixo

Localización	Nombre Imagen	Fecha	Hora
📍	IMG_20171021_184153.jpg	21 octubre 2017	(18:41)
	IMG_20171021_184144.jpg	21 octubre 2017	(18:41)

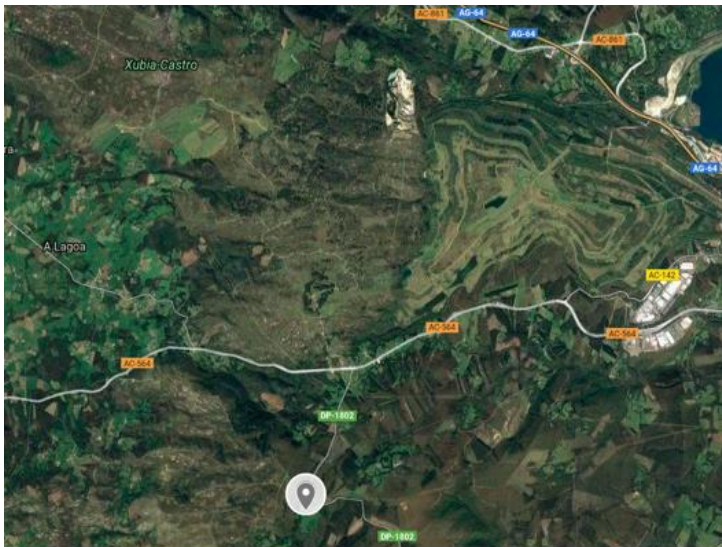


Figura 5: Mapa Goente

Localización	Nombre imagen	Fecha	Hora
📍	IMG_20171021_152038.jpg	21 octubre 2017	(15:20)
	IMG_20171021_152003.jpg	21 octubre 2017	(15:20)
	IMG_20171021_151945.jpg	21 octubre 2017	(15:19)

Para la recogida de ejemplares se ha llevado acabo el mismo protocolo en cada una de las zonas de recolección. Se han buscado al menos 3 carpóforos jóvenes provenientes de un mismo micelio (suponemos esto por la proximidad de los ejemplares). Se extrajeron los carpóforos enteros. Tras separar el pie del sombrero se dividió el sombrero en 2 partes comprobando la ausencia de parásitos. Los tres carpóforos se fotografiaron in situ, por medio del teléfono móvil. La foto se etiquetó de la siguiente manera.

-DPE_ER_dmmmaaaa

Medio sombrero y los pies se introdujeron en una bolsa “ziplock” para el aislamiento de ADN mitocondrial (Fracción biol-mol). El otro medio sombrero se utilizó para los análisis macroscópicos y microscópicos (Fracción macro-micro) (no mostrado). La Fracción biol-mol se congeló a -20°C para su procesamiento posterior.

5.2. Aislamiento de ADNmt

Ante la escasez de métodos para la obtención y secuenciación de ADNmt de carpóforos se ha confeccionado un protocolo basado en los procedimientos de Feize *et al.*, Robert *et al.*, Li *et al.* (Feize *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013).

Se cortó un trozo del pie de la seta congelada, alrededor de 2 cm, en trozos muy pequeños mediante un bisturí. Posteriormente este trozo se homogenizó en 30 mls de tampón de extracción a temperatura ambiente con un homogeneizador Potter-Elvehjem de 50 ml de capacidad. Durante el homogenizado se observó la aparición de un color amarillento en el líquido (Figura 6). La intensidad de este color fue claramente mayor tras previo desmenuzamiento de las muestras con un bisturí.

Dicho tampón se ha preparado con anterioridad [10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1 ml de solución 1M), 0.2 mM EDTA (40 μ l de solución 0.5M) y 15% sacarosa (15g, Añadir sólido)]. Para evitar calentamiento excesivo de la muestra, el recipiente se enfriaba en hielo después de cada intervalo de homogenización (~15 segundos). Una vez homogenizada la muestra se filtró a través de 4 capas de gasa estéril.

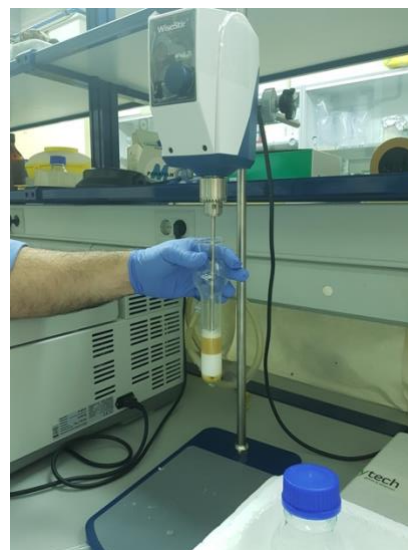


Figura 6: Homogenización del material

La solución recogida se centrifugó a baja velocidad (2500 g, 10 min, 4°C) para eliminar núcleos, membranas y paredes celulares (figura 7). Una vez centrifugada se trató con DNasa I (SIGMA Aldrich, DN-25) (100 μ g. ml⁻¹, 70 μ l del stock a 10 mg/ml), y RNasa A (SIGMA Aldrich, R6513) (100 μ g. ml⁻¹, 70 μ l del stock a 10 mg/ml) durante treinta minutos a 37°.

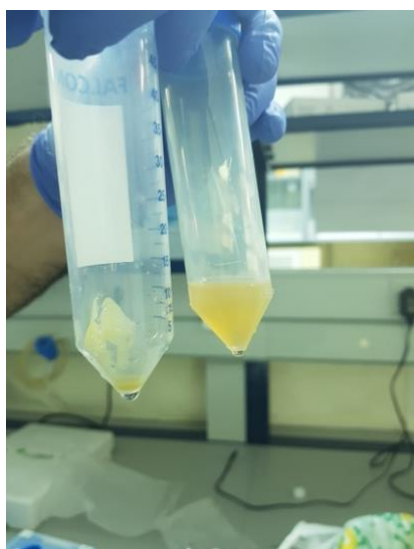


Figura 7: Pellet después de la 1ª centrifugación y el sobrenadante.

Una vez añadidas se centrifugó de nuevo a baja velocidad (2500 g, 10 min, 4°C). Se pasó el contenido a tubos eppendorf y se centrifugó otros 30 min a 12000xg para sedimentar mitocondrias. Tras retirar el tampón se lavó el sedimento por medio de su resuspensión cuidadosa con la pipeta en 1000 μ l de tampón. Finalmente se centrifugó de nuevo durante 30 min a 12000xg para sedimentar las mitocondrias. Tras retirar el líquido nos quedamos con el sedimento que posteriormente congelamos bien etiquetado.

En esta parte del proceso se jugó sobre todo con la cantidad de las enzimas DNasa I y RNasa A. Finalmente se utilizó únicamente RNasa A en un volumen de 10 µl por muestra.

5.3. Extracción de ADNmt

Una vez descongelada la muestra se resuspendieron las mitocondrias en 100 µl de tampón de lisis sin sacarosa y con SDS a una concentración final del 2% (20 µl de 10% (w:v) en 80 µl de tampón de lisis) y se incubaron durante 120 min a 56°C. Se añadieron 350 µl de ddH₂O y 50 µl de acetato amónico y se procedió a la extracción.

Primero se extrajo con un volumen de fenol, se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad y a temperatura ambiente. Tras recobrar la fase acuosa, se extrajo con 1 volumen de fenol/cloroformo y se centrifugó de nuevo. Finalmente se extrajo con 1 volumen de cloroformo y tras una nueva centrifugación se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de volumen de 0.3 M acetato amónico durante 120 min a -20°C.

Se centrifugó para recuperar los ácidos nucleicos (10 min a máxima velocidad, 4°C). Posteriormente se eliminó el etanol con una pipeta con cuidado de no tocar el sedimento. Tras lavar con 1 mL de 70% Etanol a -20°C sin alterar el sedimento, se centrifugó durante 2 min a máx velocidad a 4°C. Finalmente se eliminaron los restos de alcohol con una punta de pipeta muy fina y se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente durante media hora.

5.4. Extracción de ADN total

Protocolo desarrollado a partir del manual de E.Z.N.A Fungal DNA Mini kit Protocol- short Protocol, (E.Z.N.A Fungal DNA Mini kit, OMEGA,).

5.5. Cuantificación ADN

Se sacaron los tubos con las muestras congeladas, se centrifugaron para asegurarse de que el pellet estaba en el fondo y se resuspendió éste en 20 µl de agua a 37° durante 20 min. Mediante un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) medimos la cantidad de ADN presente en nuestras muestras.

5.6. PCR

Se han utilizado dos tipos de cebadores, mitocondriales y nucleares. Todas las secuencias de los cebadores fueron obtenidas a través de Pablo Alvarado (PA) (ALVALAB, <http://www.alvalab.es/inicio.html>).

Los cebadores mitocondriales fueron MS1 (forward) y MS2 (reverse) que amplifican un producto de una longitud aproximada de entre 550-600 nts del RNAr de la subunidad pequeña mitoribosoma (datos obtenidos de PA).

MS1: 5' CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG 3'

MS2: 5' GCGGATTATCGAATTAATAAC 3'

Estos cebadores están dirigidos a regiones conservadas del gen, mientras que los siguientes se dirigen a zonas más variables. Desconocemos la zona de hibridación de estos cebadores, así como el tamaño del producto que amplifican.

V6U TTAGTCGGTCTCGGAGCA;

V6R 5'TGACGACAGCCATGCAAC 3'

V9U 5 'CCGTGATGAACTAACCGT 3';

V9R 5'TTCCAGTACAAGCTACCT 3'

Por otro lado, tenemos los cebadores nucleares:

LROR: 5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3', hibrida desde la posición 26 hasta la 42 del gen que codifica el RNAr de la subunidad grande del ribosoma.

LR3: 5' CCGTGTTTCAAGACGGG c, hibrida desde la posición 651 hasta la 635 del gen que codifica el RNAr de la subunidad grande del ribosoma. Amplificación con LROR y LR3 da lugar a un producto de PCR de 625 nts.

LR7: 5' TACTACCACCAAGATCT 3', hibrida desde la posición 1418 hasta la 1432 del gen que codifica el RNAr de la subunidad grande del ribosoma. Amplificación con LROR y LR3 da lugar a un producto de PCR de 1406 nts.

En primer lugar, se ha calculado la temperatura de fusión seleccionado aquella más baja de los cebadores utilizados en una misma sesión de PCR. Se ha calculado con Oligoanalyzer tool de IdtDNA (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Para la reacción de la PCR se han mezclado; 12.5 µl 2X RealStart ADN Pol. Premix (Yeastern Biotech Co. Ltd.), 0.75 µl cebador Forward, 0.75 µl cebador Reverse, 1 µl ADN molde, 10 ddH₂O.

El programa utilizado para la PCR ha sido el siguiente:

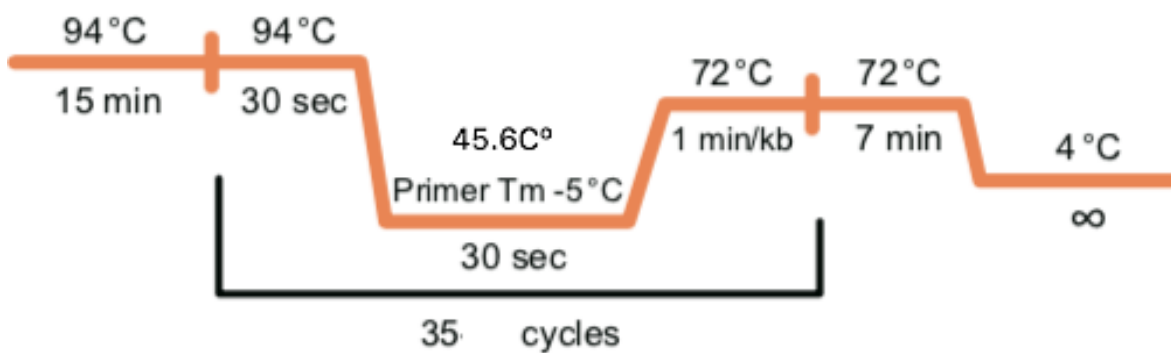
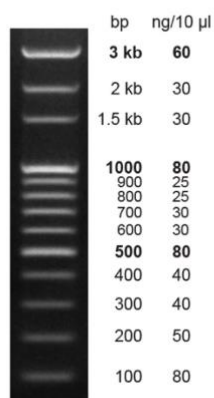


Figura 8: Programa utilizado en la PCR

5.7. Electroforesis

Cat. No. FYD009-1ML
100 bp YEA Ladder
DNA Marker II
 Ready-to-use DNA ladder



Loading volume: 10 µl/well

Figura 9: Marcador de 100bp (FYD009-1ML, Yeastern Biotech Co. Ltd.) utilizado en las PCR.

Se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa (1%) para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados en la PCR.

Para ello se necesita tampón TAE (Tris-acetato-EDTA).

El tampón TAE se prepara comúnmente como una solución madre 50X para uso en laboratorio. Se puede preparar una solución madre 50X disolviendo 242 g de base Tris en agua, agregando 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de solución EDTA 500 mM (pH 8,0) y elevando el volumen final a 1 litro. Esta solución madre se puede diluir 49: 1 con agua para hacer una solución de trabajo 1X. Esta solución 1X contendrá Tris 40mM, ácido acético 20mM y EDTA 1mM.

Las muestras fueron teñidas con EtB "Out" Nucleic acid Staining Solution (Yeastern Biotech Co. Ltd.). Se usó un marcador de 100bp (FYD009-1ML, Yeastern Biotech Co. Ltd.).

5.8. Secuenciación

Realizada por la unidad de biología molecular del SAI de la UDC.

5.9. Estudio filogenético

Tras la obtención de las secuencias a través de la unidad de biología molecular del SAI de la UDC, se alinearon las secuencias obtenidas a partir de los dos primers utilizados en la reacción de PCR con Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) y se extrajo la secuencia coincidente sin fallos. Con esta secuencia se lanzaron búsquedas en BLAST para identificar las 10 secuencias más cercanas a la de búsqueda presentes en GenBank y se procedió a la realización de árboles filogenéticos por el método de máxima parsimonia y máxima verosimilitud con el programa Mega v.7 (<https://www.megasoftware.net/>). Las secuencias fueron guardadas en un único documento en formato fasta para poder ser utilizada en el programa Mega v.7 (<https://www.megasoftware.net/>). Una vez hecho esto, las secuencias en formato fasta fueron abiertas y alineadas mediante el algoritmo Muscle contenido en el programa Mega v.7. Dicho alineamiento fue utilizado para generar árboles filogenéticos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud en Mega v.7 (Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Mark Holder & Paul O. Lewis. Nature Reviews Genetics volume 4, pages 275–284 (2003).

Para el alineamiento con Muscle fueron utilizados los siguientes parámetros:

Gap Open: -100

Gap Extend: -0.01

Max Memory in MB: 21592

Max Iterations: 8

Clustering Method (iteration 1,2): UPGMB

Clustering Method (Other iterations): UPGMB

Min Diag Length (lambda): 24

El mejor modelo evolutivo para la secuencia generada por el cebador LR3 y por los cebadores MS1 y MS2 fue el siguiente:

Tree to use: Automatic (Neighbor-joining-tree)
Gaps/Missing Data Treatment: Use all Sites
Branch Swap Filter: None

Los parámetros utilizados para el árbol consenso de máxima verosimilitud obtenido con la secuencia generada por el cebador LR3 fueron los siguientes:

Test of Phylogeny: Bootstrap Method
No. of Bootstrap Replications: 100
Substitutions Type: Nucleotide
Model/Method: Kimura 2-parameter model
Rates among Sites: Gamma distributed (G)
No of Discrete Gamma Categories: 5
Gaps/Missing Data Treatment: Use all sites
ML Heuristic Method: Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive (SPR level 5)
Initial Tree for ML: Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Branch Swap Filter: None

Los parámetros utilizados para el árbol consenso de máxima verosimilitud obtenido con la secuencia generada por los cebadores MS1 y MS2 fueron los siguientes:

Test of Phylogeny: Bootstrap Method
No. of Bootstrap Replications: 100
Substitutions Type: Nucleotide
Model/Method: Tamura 3-parameter model
Rates among Sites: Gamma distributed with invariant sites (G+I)
No of Discrete Gamma Categories: 5
Gaps/Missing Data Treatment: Use all sites
ML Heuristic Method: Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive (SPR level 5)
Initial Tree for ML: Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Branch Swap Filter: None

Los parámetros utilizados para el árbol consenso de máxima parsimonia obtenido con la secuencia generada por los cebadores LR7 y LROR fueron los siguientes:

Test of Phylogeny: None
Substitutions Type: Nucleotide
Gaps/Missing Data Treatment: Use all sites
MP Search Method: Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)
No. of Initial Trees (random addition): 10
MP Search level: 1
Max No. of Trees to Retain: 100

6. Resultados y discusión

6.1. Extracción de ADNmt y ADN total

Una vez recolectadas las muestras de *R. sardonía*, estas fueron congeladas hasta su posterior uso.

Como se expuso en Materiales y Métodos, ante la falta de un método claro para la extracción del ADNmt a partir de carpóforos, se confeccionó un protocolo partiendo de información encontrada en la literatura (Feize *et al*, 2009; Robert *et al*, 2004; Li *et al*, 2013). Tras probar diversas variaciones del protocolo, sobre todo relacionadas con la cantidad de las nucleasas utilizadas, elegimos el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

En primer lugar, se trató de optimizar el protocolo de homogenizado. Se observó que la desmenuzación del material congelado por medio de un bisturí aumentaba considerablemente la cantidad de material resuspendido en el tampón de lisis, juzgado en base a la intensidad del color amarillento obtenido en la fase acuosa (Figuras 6 y 7).

Se realizaron extracciones tanto de ADN total como de ADNm de un solo carpóforo.

Las concentraciones de ADN fueron estimadas por medio de un Nanodrop 100 (Thermo Scientific).

Muestra cod: 26/3/18 M=Mitocondrial; T:Total	Muestra cod: 12/4/18 M=Mitocondrial
30,9 ng/microl ADN mitocondrial	3,26 ng/microl ADN mitocondrial
23,6 ng/microl ADN mitocondrial	1,22 ng/microl ADN mitocondrial
20,3 ng/microl ADN mitocondrial	7,57 ng/microl ADN mitocondrial
18,1 ng/microl ADN total	24,5 ng/microl ADN mitocondrial
13,2 ng/microl ADN total	
16,1 ng/microl ADN total	

Tabla 1: Resultados de la cuantificación de ADN total y ADN mitocondrial mediante Nanodrop 100

En las muestras cod: 26/3/18. M la extracción del ADN se realizó con el protocolo descrito en dicho trabajo (Material y Métodos) mientras que en las muestras de cod: 12/4/18. M en protocolo de la extracción del ADN se añadió DNasa I. Se puede observar una clara diferencia en la cantidad de ADN cuantificado, siendo mayor la cantidad de ADN en las muestras cod: 26/3/18. M, siendo este uno de los motivos por los cuales fue elegido el protocolo descrito en este trabajo (Materiales y métodos).

Solo una muestra de ADN total (cod: 26/3/18. T), obtenida por medio del kit, fue utilizada en estos estudios. Esta muestra será utilizada como control en las PCRs para evaluar la calidad de las preparaciones de ADNmt.

6.2. Amplificación por medio de PCR y secuenciación

Para evaluar la calidad de nuestras preparaciones utilizamos la técnica de PCR. Estábamos sobre todo interesados en comprobar el grado de contaminación con ADN nuclear de las mismas. Como control positivo utilizamos la muestra de ADN total (cod: 26/3/18. T) descrita anteriormente. Dicha muestra contiene tanto ADN nuclear como mitocondrial. Ha de tenerse en cuenta de que las PCRs se realizaron con materiales muy limitados y, por ello, no pudieron repetirse ni todos los controles pudieron incluirse. Aún así nos fiamos de que partíamos de cebadores muy conocidos en este campo y de la claridad de los resultados

mostrados tras la electroforesis para obtener una primera visión de la calidad de nuestras preparaciones.

En un primer lugar se realizó la PCR utilizando para ello dos muestras de ADN mitocondrial (cod: 26/3/18.M; cod: 12/4/18.M) y una de ADN total (cod: 12/4/18. T) Para ello se utilizaron los cebadores mitocondriales (MS1, MS2) y los cebadores nucleares (LROR, LR3), sin control ni marcador.

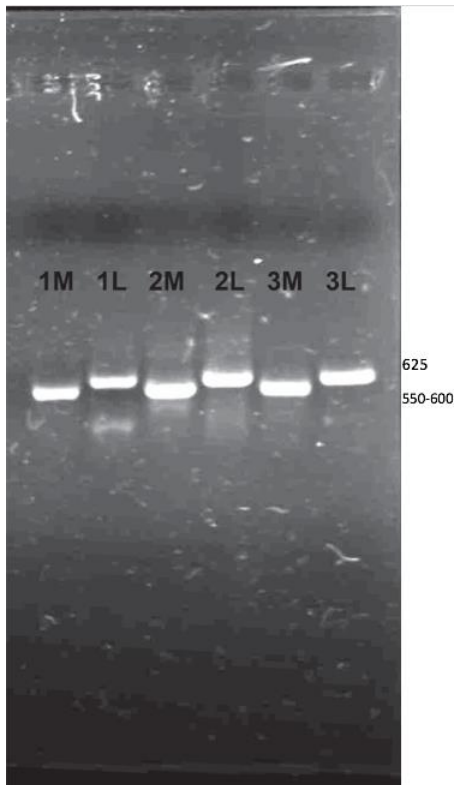


Figura 10: PCR con los cebadores mitocondriales MS1 y MS2 y nucleares LROR/LR3. M: cebadores MS1/MS2. L: cebadores LROR/LR3. 1: ADNmt (cod:26/3/18. M) 2: ADNtotal (cod:26/3/18. T) 3: ADNmt (cod:12/4/18. M)

Basado en los datos de hibridación de los cebadores esperamos un producto de alrededor de 550-600 para la amplificación mitocondrial y de 625 nt para la amplificación nuclear.

Aparecen amplificadas las bandas de ADNmt (M) y ADN total (L), con los tamaños esperados en todas las muestras. Podemos concluir que hay contaminación de ADN nuclear, ya que en su ausencia los primers nucleares no hubiesen amplificado nada, y ese no es el resultado obtenido. Cabe decir, que la cantidad de dicha contaminación no se puede determinar a partir de dicho gel, para ello es necesario realizar una PCR cuantitativa.

Se hizo una segunda PCR para probar el resto de los cebadores mitocondriales (V6U, V6R, V9U y V9R), así como la combinación de cebadores nucleares (LROR y LR7). Aparte de obtener más secuencias a partir del espécimen analizado, tratábamos también de estimar el tamaño de los productos V6U/V6R y V9U/V9R. Para eso se incluye un marcador de peso molecular en el gel (FYD009-1ML, Yeastern biotech Co., Ltd). En este caso solo se utilizó ADN total.

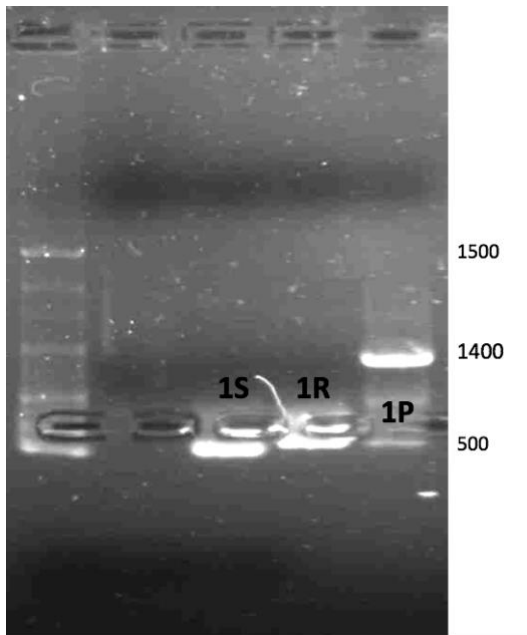


Figura 11: PCR con los cebadores mitocondriales V6U/V6R Y V9U/V9R y nucleares LROR/LR7. S: cebadores V6U/V6R. R: cebadores V9U/V9R. P: cebadores LROR/LR7. 1: ADNtotal (cod:26/3/18).

Aparentemente, todos los conjuntos de cebadores amplificaron correctamente. En este gel, el marcador no se resolvió óptimamente, dificultando así la asignación de tamaños a los productos de PCR. Sin embargo, sabemos que el producto 1P debería tener un tamaño de 1406 nts (ver Materiales y Métodos), ayudándonos así a identificar tentativamente la banda de 1500 nts del marcador (comparar con figura 9 De Materiales y Métodos). Basados en este dato estimamos un tamaño de alrededor de 500 nts para el producto 1S (V6U/V6R) y algo mayor para el 1R (V9U/V9R).

Una vez amplificado el ADN por medio de PCR, fueron secuenciadas los siguientes productos utilizando los mismos cebadores usados para su amplificación.

- 1R a secuenciar con cebadores V6U y V6R, dando lugar a las secuencias 1R-V6U y 1R-V6R.
- 1S a secuenciar con cebadores V9U y V9R, dando lugar a las secuencias 1S-V9U y 1S-V9R
- 1P a secuenciar con cebadores LROR y LR7, dando lugar a las secuencias 1P-LROR y 1P-LR7
- 3M a secuenciar con cebadores MS1 y MS2, dando lugar a las secuencias 3M-MS1 y 3M-MS2
- 2L a secuenciar con cebadores LROR y LR3, dando lugar a las secuencias 2L-LROR y 2L-LR3

Tras una purificación inicial de los fragmentos amplificados, se procedió a la secuenciación (ambos procesos llevados a cabo por la unidad de biología molecular del SAI de la UDC,). En dicha secuenciación no se obtuvo lectura en las reacciones: 2L-LROR, 1R-V6U, 1R-V6R, 1S-V9U y 1S-V9R. El resto de las secuencias se presenta en Anexo 2; 3; 4.

Posteriormente se realizó un estudio filogenético preliminar mediante la aplicación Mega v.7. Tras alinear las diez secuencias más próximas a las diferentes secuencias problema mediante el algoritmo Muscle de Mega v.7, se generaron árboles de máxima parsimonia (Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Mark Holder & Paul O. Lewis. Nature Reviews Genetics volume 4, pages 275–284 (2003).

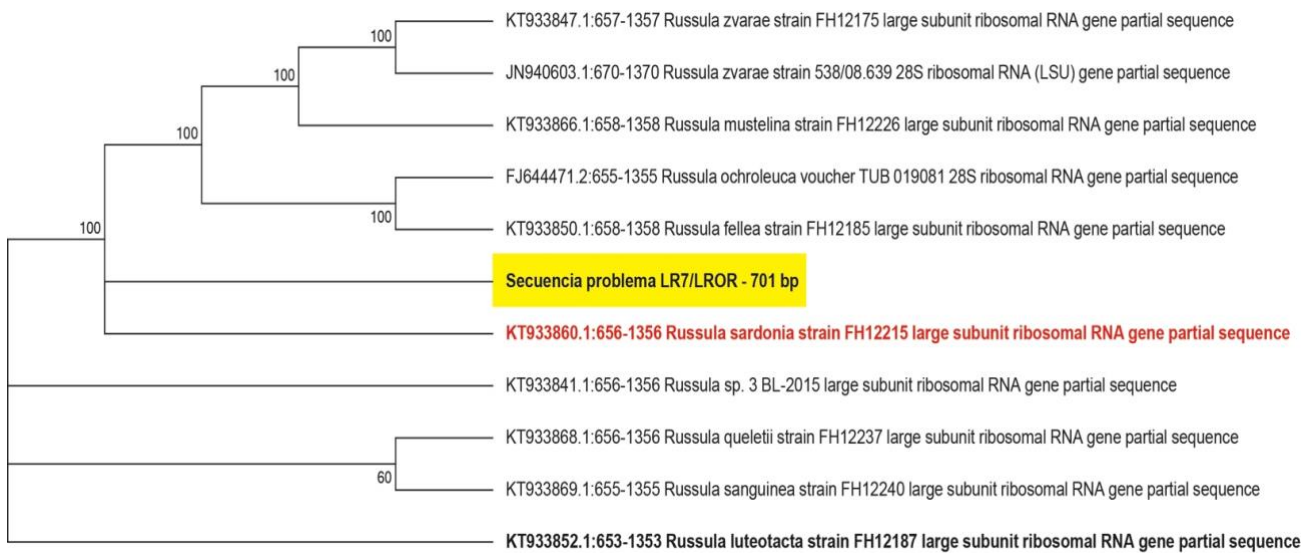


Figura 12: Árbol consenso de máxima parsimonia obtenido con la secuencia generada por los cebadores LR7 y LROR. La secuencia problema fue obtenida tras el alineamiento de las secuencias 1P-LROR y 1P-LR7 por medio de Serial Cloner (ver Materiales y Métodos). Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia KT933852.1 *Russula luteotacta* strain por presentar la rama más larga. El árbol consenso se generó a partir de 5 árboles de máx. parsimonia.

En dicho árbol localizamos a nuestra secuencia problema LR7/LROR – 701 bp más cercana evolutivamente a *R. Sardonias strain* FH12215 por lo que podemos concluir que es el ejemplar más cercano genéticamente a nuestra secuencia. Realizamos el árbol con bootstrap pero no funcionó por la similitud de las secuencias por lo que se optó por el árbol de máx. parsimonia.

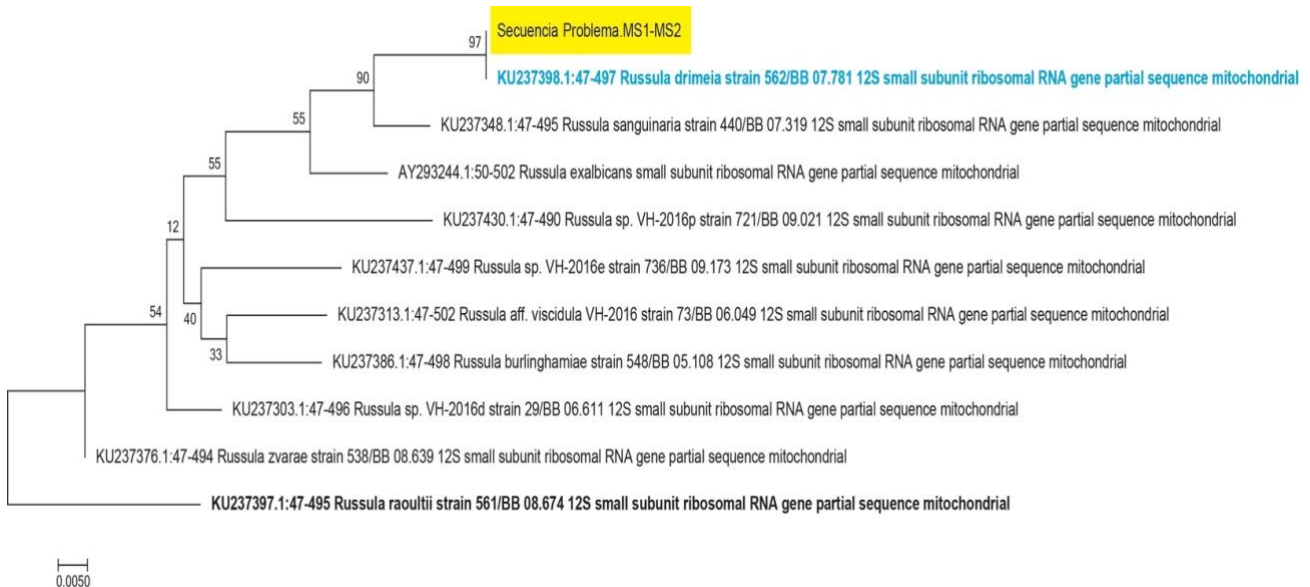


Figura 13: Árbol de Máxima Verosimilitud obtenido con la secuencia generada por los cebadores MS1-MS2. La secuencia problema fue obtenida tras el alineamiento de las secuencias D05_3M-MS1 e E05_3M-MS2 por medio de Serial Cloner (ver Materiales y Métodos). Tras un análisis inicial en Mega v.7 de ajuste de los datos por medio de máxima verosimilitud y utilizando el criterio BIC, se escogió el modelo Tamura 3 parámetros, utilizando una distribución Gamma discreta con 5 categorías de tasa. Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia KU237397.1 *Russula raoultii* strain 561/BB 08.674 por presentar la rama más larga. Se utilizaron 100 réplicas de bootstrap para confirmar la filogenia.

Para este árbol se pudo realizar el método de Máxima Verosimilitud (ver Materiales y Métodos). Observamos que nuestra secuencia problema MS1-MS2 aparece más emparentada con *R. drimeia* y que entre los 100 resultados de BLAST no está la *R. sardonía*. Por lo tanto, podemos concluir que nos encontramos con una nueva secuencia, que no está en la base de datos de BLAST. Uno de los motivos es la escasez de secuencias de setas.

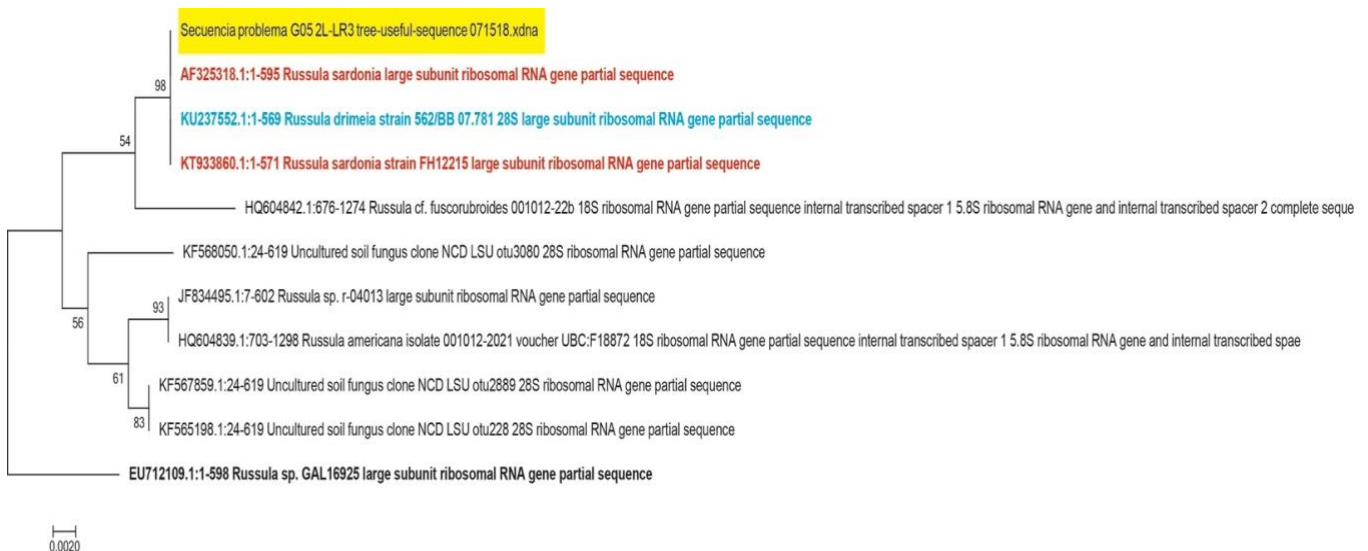


Figura 14: Árbol de Máxima Verosimilitud obtenido con la secuencia generada por el cebador LR3. La secuencia problema fue obtenida tras el alineamiento de la secuencia G05_2L-LR3 por medio de Serial Cloner (ver Materiales y Métodos). Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia EU712109.1 *Russula* sp. GAL16925 por presentar la rama más larga. Se utilizaron 100 réplicas de bootstrap para confirmar la filogenia.

Observamos que nuestra secuencia problema G05_2L-LR3 con un 98% de bootstrap, aparece emparentado genéticamente con *R. drimeia* y *R. sardonía strain*.

7. Conclusiones

1. Se ha conseguido desarrollar protocolo para la extracción del ADNmt, ya que tras su cuantificación mediante Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y posterior PCR, se ha obtenido una cantidad de ADN considerable y necesaria para su posterior secuenciación.
2. A pesar del desarrollo de un método de extracción del ADNmt, hubo una contaminación de ADN nuclear que ante la ausencia de una PCR cuantitativa no se pudo saber cuantificar. Un objetivo para posteriores trabajos sería cuantificar dicha contaminación.
3. Tras el estudio filogenético se concluye la correcta identificación de nuestro ejemplar como una *R. sardonía* por el parentesco genético observado en los árboles filogenéticos con *R. sardonía strain*, en dos de los tres árboles. Cabe destacar el descubrimiento de una nueva secuencia de nuestro ejemplar, no presente en la base de datos de BLAST.

7. Conclusions

1. It has been developed a protocol for the ADNmt extraction, after its quantifying through Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) and later PCR, an appreciable amount of ADN has been obtained, necessary for its later sequencing.
2. In spite of the extraction method development of the ADNmt, there was some contamination of the nuclear ADN which in absence of a quantitative PCR made it impossible to know how to quantify.
3. After the phylogenetic study, the correct identification of our specimen was concluded as a *R. sardonía* due to the genetic kinship observed in the phylogenetic trees with *R. sardonía strain*, in two of the three trees. Note the discovery of a new sequence of our sample, not present in the BLAST database.

8. Bibliografía

Referencias bibliográficas

- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
- Baranova M.A., Logacheva M.D., Penin A.A., Seplyarskiy V.B., Safonova Y.Y., Naumenko S.A., Klepikova A.V., Gerasimov E.S., Bazykin G.A., James T.Y., Kondrashov A. 2015. Extraordinary Genetic Diversity in a Wood Decay Mushroom. *Molecular Biology and Evolution*. 32: 2775–2783. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv153>
- Burger G., Gray M.W., Lang B.F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19: 709–716.
- Bruns T.D., Palmer J.D., Shumard D.S., Grossman G.I., Hudspeth M.E.S. 1988. Mitochondrial DNA of *Suillus*: three-fold size change in molecules that share a common gene order. *Curt Genet.* 13: 49-56.
- Bruns T.D., Palmer, J.D. 1989. Evolution of mushroom mitochondrial DNA: *Suillus* and related genera. *Mol Evol.* 28: 349. <https://doi.org/10.1007/BF02103431>
- Bullerwell C.E., Lang B.F. 2005. Hongos evolución: el caso de la mitocondria de fuga. *Curr Opin Microbiol.* 8: 362-369.
- Dey A., Chan C.K., Thomas C.G., Cutter A.D. 2013. Molecular hyperdiversity defines populations of the nematode *Caenorhabditis brenneri*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 11056-11060.
- Fairbanks D., Robinson L., Burgener K., Andersen W., López D., Ballon E., Bernal R., Peña R., Sánchez J., Pimentel A. 1992. Caracterización de material genético disponible de quinua. En: Morales, D y Vacher J (eds). *Actas del VII Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos*. La Paz, Bolivia.

- Franco T.L., Hidalgo R. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. *Boletín Técnico* no. 8, Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- Feize L., Minai-Tehrani D., Behboudi B., Keyhani E. 2009. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: 64-68.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L.J., Wortman J.R., Batzoglou S., Lee S.I., Baştürkmen M., Spevak C.C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Jurka J., Scacciocchio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S., Braus G.H., Draht O., Busch S., D'Enfert C., Bouchier C., Goldman G.H., Bell-Pedersen D., Griffiths-Jones S., Doonan J.H., Yu J., Vienken K., Pain A., Freitag M., Selker E.U., Archer D.B., Peñalva M.A., Oakley B.R., Momany M., Tanaka T., Kumagai T., Asai K., Machida M., Nierman W.C., Denning D.W., Caddick M., Hynes M., Paoletti M., Fischer R., Miller B., Dyer P., Sachs M.S., Osmani S.A., Birren B.W. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105–1115. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04341>.
- Galagan J.E., et al. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422: 859–868. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01554>
- Galagan J.E., Henn M.R., Ma L.J., Cuomo C.A., Birren B. 2015. *Genome Res.* 15: 1620-1631. Access the most recent version at [doi:10.1101/gr.3767105](https://doi.org/10.1101/gr.3767105)
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston, M., et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274: 546, 563–567.
- Ghikas D.V., Kouvelis V.N., Typas M.A. 2010. Implicaciones filogenéticas y biogeográficas inferidas por región intergénica mitocondrial análisis y ITS1-5.8S-ITS2 del entomopatógeno *Beauveria* y *B. brongniartii*. *BMC Microbiology* .10: 174.
- Gray M.W., Burger G., Lang B.F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*. 283: 1476–1481.
- Hamburguesa G, Gris M.W., Lang B.F. 2003. Genomas mitocondriales: todo vale. *Trends Genet.* 19: 709-716.
- Henze K., Martin W. 2003. La biología evolutiva: la esencia de las mitocondrias. *Naturaleza*. 426: 127-128.
- Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., Birren B. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*. 423: 241–254 <http://dx.doi.org/10.1038/nature01644>.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. 2001. Dictionary of the Fungi. 9.a ed. *Cabi*. 1-655.
- Kothe H. 2006. Guía de setas. *Colonia: komet*.

- Li L., Hu X., Xia Y., Xiao G., Zheng P., Wang C. 2014. Linkage of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunctions to Spontaneous Culture Degeneration in *Aspergillus nidulans*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 13: 449-461.
- Li J., Zhang J., Chen H., Chen X., Lan J., et al. 2013. Complete Mitochondrial Genome of the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *PLoS ONE* 8(8): e72038. doi: 10.1371/journal.pone.0072038
- Leffler E.M., Bullaughey K., Matute D.R., Meyer W.K., Segurel L., Venkat A., Andolfatto P., Przeworski M. 2012. Revisiting an old riddle: what determines genetic diversity levels within species? *PLoS Biol.* 10: e1001388.
- Martinez D., Larrondo L.F., Putnam N., Gelpke M.D.S., Huang K., Chapman J., Helfenbein K.G., Ramaiya P., Detter J.C., Larimer F., Coutinho P.M., Henrissat B., Berka R., Cullen D., Rokhsar D. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol.* 22: 695–700 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt967>.
- Machida M., et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438:1157–1161 <http://dx.doi.org/10.1038/nature04300>.
- Matsumoto T., Fukumasa-Nakai Y., *Curr Genet.* 1996. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. 30: 549. <https://doi.org/10.1007/s002940050168>
- McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. 2006. Las mitocondrias: algo más que una central eléctrica. *Curr Biol.* 16: R551-560.
- Nierman W.C., et al. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 438: 1151–1156 <http://dx.doi.org/10.1038/nature04332>.
- Rojas L. 2013. Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209128776009>> ISSN 1562-3009
- Robert C., Garber, Yoder C. 1983. Isolation of DNA from Filamentous Fungi and Separation into Nuclear, Mitochondrial, Ribosomal, and Plasmid Components. *Analytical biochemistry.* 135: 416-422.
- Sarasola V. 2013-2014. Dual-histidin kinasas en hongos basidiomicetos. *Trabajo fin de máster*.
- Sanders J.P.M., Heyting C., Verbeet M.P., Meijlink C.P.W., Borst P. 1977. The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type *Saccharomyces* strains. *Mol Gen Genet.* 157: 239-261
- Taylor J.W., Branco S., Gao C., Hann-Soden C., Montoya L., Sylvain I., Gladieux P. 2017. Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *Microbiol Spectrum* 5(5): FUNK-0057-2016.

- Tabas S. 1991. Caracterización y evaluación de germoplasma de maíz. En: Castillo R, Estrella J, Terapia C (eds). Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. *INIAP*. 161-116.
- Taylor J.W., Smolich B.D., May G. 1986. Evolution and mito-chondrial DNA in *Neurospora crassa*. *Evolution*. 40: 716-739.
- Taylor J.W. 1986. Fungal evolution biology and mitochondrial DNA. *Exp Mycol* 10: 259 – 269.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B., Helm- Bychowski K.M., Higuchi R. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26: 375 – 400.
- Yu N., Jensen-Seaman M.I., Chemnick L., Ryder O., Li W-H. 2003. Nucleotide Diversity in Gorillas. *Genetics* vol. 166 no. 3 1375-1383; <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1375>

Referencias electrónicas

- Asociación Micológica Fungipedia: *Russula sardonia* [consultado el: 21/04/2018]. Disponible en <https://www.fungipedia.org/hongos/russula-sardonia.html>.
- Asturnatura.com "*Russula sardonia* Fr.". *Asturnatura.com* [en línea]. Num. 152, 01/11/07 [consultado el: 27/04/2018]. Disponible en <<https://www.asturnatura.com/especie/russula-sardonia.html>>. ISSN 1887-5068.
- Canifrú R. Hongos en Chile: *Russula sardonia*. [Consultado el: 28/04/2018]. Disponible en <http://fungichile.blogspot.com/2009/08/russula-sardonia.html>.
- Red de naturaleza: *Russula sardonia*. [Consultado el: 27/04/2018]. Disponible en <https://rednaturaleza.com/setas/russula-sardonia>.

9. Anexos

Anexo 1. Fotografías *R. sardonía*

6 de octubre



IMG_20171006_141126.jpg



IMG_20171006_141159.jpg



IMG_20171006_143226.jpg



IMG_20171006_143245.jpg



IMG_20171006_143815.jpg



IMG_20171006_143820.jpg



IMG_20171006_143839.jpg



IMG_20171006_143920.jpg



IMG_20171006_181545.jpg



IMG_20171006_181558.jpg



IMG_20171006_181631.jpg



IMG_20171006_182850.jpg



IMG_20171006_182904.jpg



IMG_20171006_182930.jpg

20 de octubre



IMG_20171020_141844.jpg



IMG_20171020_141849.jpg

21 de octubre



IMG_20171021_151945.jpg



IMG_20171021_152003.jpg



IMG_20171021_152038.jpg



IMG_20171021_184144.jpg



IMG_20171021_184153.jpg

15 de septiembre



IMG_20170915_135348.jpg



IMG_20170915_135408.jpg



IMG_20170915_140645.jpg



IMG_20170915_140648.jpg



IMG_20170915_140651.jpg



IMG_20170915_144617.jpg



IMG_20170915_144623.jpg



IMG_20170915_174317.jpg



IMG_20170915_174319.jpg



IMG_20170915_174331.jpg



IMG_20170915_175301.jpg



IMG_20170915_182152.jpg



IMG_20170915_182155.jpg

Annex 2. Extracting useful sequence for phylogenetic analysis from GO5_2L-LR3

1) Sequence G05_2L-LR3

CACTCATAGCACGTATCGTGGGCGACCCCGACGCCCGAAGGCGCGTGCTGAGTTCCTCAATCCCGACCCTCGCATGCGAC
 GAAAGACTATAACACACCCCGTAAAGGTGTCACATTTCCCTCGCCATTATCCGAGGGGCAAAATTGATGCTGACCCGTCGG
 CCGAGAAGTACACCAAGCCGAGGCGAGGCTGAGTCTCGGGCGACGCGACTGACTTCAAGCGTTTTCCCTTTCAACAATTC
 ACGTACTGTTTTCACTCTCTTTCCAAAGTGTCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATA
 TTTAGCTTTAGATGGAGTTCACCAACCCATTTTGCATTCATTCACCAACAACCTCGACTCTTCGAGAGCGCATCACAAAAG
 CCTGGTGCCTCCGTGCCAAAGACGGGATTCTCACCCCTCTATGACGCTCCATTCCAGGAGACTTGTGCACGGTCCAGCGC
 GGAAGACGCTTCTCTAAATTACAACCTCGGATGGCCAAAGGCCACCAGATTTTTAAATTTGAGCTTTTTCCCGCTTCACTCGC
 AGTTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTTCTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTAGT

2) BLAST Analysis:

Russula sardonia large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (first BLAST hit obtained with sequence GO5_2L-LR3)

GenBank: AF325318.1

ORIGIN

1 taagcggaga aaagaaacta acaaggattc ccctagtaac tgcgagtga gcgggaaaag
61 ctcaaatta aatctggtg gccttggcc atccgagtg taattagag aagcgtctc
121 cgcgctggac cgtgcacaag tctcctggaa tggagcgtca tagagggtga gaatcccgtc
181 ttggcacgg acgcaccagg gcttttga tgcgctctcg aagagtcgag ttgtttggga
241 atgcagctca aatgggtgg tgaactccat ctaaagctaa atattggcga gagaccgata
301 gcgaacaagt accgtgaggg aaagatgaaa agcactttgg aaagagagtg aacagtagc
361 tgaattgtt gaaagggaaa cgcttgaagt cagtcgctc gcccgagact cagcctcgcc
421 tcggcttggg gtacttctcg gccgacgggt cagcatcaat ttgcccctc ggataatggc
481 gagggaaatg tgacacctt acgggtgtg tatagtctt cgtcgcagtc gagggtcggg

absent in

KT933860.1

541 attgaggaac tcagcacgcg ccttcgggcg tcggggttcg cccacgatac gtgctakga
601 tgttggcgta atggcttaa acgacccgtc ttgaaacacg gaccaaggag tctaacatgc
661 ccgagagtg tcgggtggaa aaccggtcgc cgcaatgaaa gtaaaagttg ggacctctgt
721 cgtggagggc accaacgccc ggaccagacc ttctgtgacg gatctgcggt agagcgtgta
781 tgttaggacc cgaaagatgg tga

GenBank: KT933860.1 (see sequence below)

GO5_2L-LR3

3) Alignment of GO5_2L-LR3 and KT933860.1

Alignment of Sequence_1: [AF325318_R-sardonia_LSU-rRNA.txt.xdna]
 with Sequence_2: [GO5_2L-LR3_(UBM-SAI)_071118.txt.xdna].
 Performed with Serial Cloner
 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html).

GO5_2L-LR3 useful sequence to be used in a BLAST search aimed at obtaining 10

sequences for a maximum parsimony tree. Included in Serial cloner file G05_2L-LR3_tree-useful-sequence_071518.xdna

Similarity : 599/802 (74.69 %)

Seq_1	1	-----taagcggg-gaaaagaaactaacaaggattcccctagtaactgcgag	46
Seq_2	615	ACTAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATCCCCTAGTAACTGCGAG	556
Seq_1	47	tgaagcgggaaaagctcaaattttaaactctggtggcctttggccatccgagttgtaattt	106
Seq_2	555	TGAAGCGGAAAAGCTCAAATTTAAATCTGGTGGCCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATTT	496
Seq_1	107	agagaagcgtcttccgcgctggaccgtgcacaagtctcctggaatggagcgtcatagagg	166
Seq_2	495	AGAGAAGCGTCTTCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCCTGGAATGGAGCGTCATAGAGG	436
Seq_1	167	gtgagaatcccgtctttggcacggacgcaccagggcttttgtgatgcgctctcgaagagt	226
Seq_2	435	GTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACGCACCAGGGCTTTTGTGATGCGCTCTCGAAGAGT	376
Seq_1	227	cgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtgaactccatctaaagctaaatattg	286
Seq_2	375	CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAACTCCATCTAAAGCTAAATATTG	316
Seq_1	287	gcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagag	346
Seq_2	315	GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCCTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAG	256
Seq_1	347	agtgaacagtacgtgaaattgttgaaagggaaacgcttgaagtcagtcgctcgccccga	406
Seq_2	255	AGTGAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTCGCCCCGA	196
Seq_1	407	gactcagcctcgcctcggcttgggtgtacttctcggccgacgggtcagcatcaattttgcc	466
Seq_2	195	GACTCAGCCTCGCCTCGGCTTGGTGTACTTCTCGGCCGACGGGTGAGCATCAATTTTGCC	136
Seq_1	467	cctcggataatggcgagggaaatgtgacacctttacgggtgtggttatagcttttcgctcgc	526
Seq_2	135	CCTCGGATAATGGCGAGGGAAATGTGACACCTTTACGGGTGTGTTATAGTCTTTTCGTCGC	76
Seq_1	527	atgaggggtcgggattgaggaactcagcacgcgccttcgggctcgggggttcgcccacg	586
Seq_2	75	ATGCGAGGGTTCGGGATTGAGGAACTCAGCACGCCTTCGGGCGTCGGGGT-CGCCCCAGC	17
Seq_1	587	atacgtgcttagatggttggcgtaatggctttaaacgaccctcttgaacacggaccaag	646
Seq_2	16	ATACGTGCT-----	8
Seq_1	647	gagtctaacatgcccgagtggttcgggtggaaaaccctgctcgcgcaatgaaagtaaaag	706
Seq_2	7	-----ATGAGTG-----	1

Seq_1 707 ttgggacctctgtcgtggagggcaccaacgcccggaccagaccttctgtgacggatctgc 766

Seq_2 0 ----- 1

Seq_1 767 ggtagagcgtgtatgtaggacccgaaagatggtga 802

Seq_2 0 ----- 1

Annex 3. Alignment of sequences A06_1P-LR7, H05_1P-LROR, and GO5_2L-LR3 to GenBank ID: KT933860.1

Russula sardonia strain FH12215 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (first BLAST hit obtained with sequences A06_1P-LR7 and H05_1P-LROR, see actual sequences in Annex 3, below)

GenBank: KT933860.1

ORIGIN

1 ggattccct agtaactgcg agtgaagcgg gaaaagctca aatttaaat ctggtggcct
 61 ttggccatcc gagttgtaat ttgagaagc gtcttcgcg ctggaccgtg cacaagtctc
 121 ctggaatgga gcgtcataga gggtgagaat cccgtcttg gcacggacgc accagggcct
 181 ttgtgatgcg ctctcgaaga gtcgagttgt ttgggaatgc agctcaaaat gggtggtgaa
 241 ctccatctaa agctaaatat tggcgagaga ccgatatgca acaagtaccg tgagggaaaag
 301 atgaaaagca ctttgaaaag agagtgaaac agtacgtgaa attgttgaag gggaaacgct

C in AF325318.1 and in GO5_2L-LR3

361 tgaagtcagt cgcgtgccc gagactcagc ctgcctcgg cttggtgtac ttctcggccg
 421 acgggtcagc atcaatttg ccctcggat aatggcagag gaaatgtgac acctttacgg
 481 gtgtgtata gtcttcgct gcatgagagg gtcgggattg aggaactcag cacgcgcctt
 541 cgggcgtcgg gttcgcaca cgatagctgc ttakgatgtt ggcgtaatgg cttaaaca
 601 cccgtcttga aacacggacc aaggagtcta acatgcccgc gagtgttcgg gtggaaaacc
 661 cgtgcgcgca atgaaagtaa aagtgggac ctctgtcgtg gagggcacca acgcccggac
 721 cagaccttct gtgacggatc tgcggtagag cgtgtatgtt aggacccgaa agatggtgaa
 781 ctatgcctga atagggtag gccagaggaa actctggtgg aggctcgtag cgattctgac
 841 gtgcaaatcg atcgtcaaat ttgggtatag gggcgaaaaga ctaatcgaac catctagtag
 901 ctggttctg ccgaagtct cctcaggata gcagaaactc atgtcagatt tatgtgtaa
 961 agcgaatgat tagaggcctt ggggatgaaa catcctaac ctattctcaa actttaaata
 1021 tgaagaacg agccgtcgtc tgattggacc gctcggcgat tgagagttc tagtgggcca
 1081 ttttggttaa gcagaactgg cgatgcggga tgaaccgaac gcgaggtaa ggtgccggaa
 1141 tgcacgctca tcagacacca caaaaggtgt tagttcatct agacagcagg acggtggcca
 1201 tgaagtcgg aatccgctaa ggagtgtgta acaactcacc tgccgaatga actagccctg
 1261 aaaatggatg gcgctcaagc gtgctacca cacctcggcg tcggcgttga agtgacgtgc
 1321 cgacgagtag gcaggcgtgg aggtccgtga agaagccttg gcagcgatgc tgggtgaaac
 1381 ggcccttagt gcagatctg

Useful sequences found in:

1P-LROR

1P-LR7 (antiparallel)

2L-LR3 (antiparallel). See also alignment to AF325318.1, above.

NOTE GO5_2L-LR3: According to the document Primers.pdf, LR3 should anneal in an internal location between LR7 and LROR, but the sequence we got back lays upstream of the sequences obtained with LR7 and LROR (see alignment to KT933860.1 below). So, either we misplaced the primers or the reactions before sequencing or the sequencing facility did.

**Alignment of Sequence_1: [KT933860.1_R-sardonia_LSU-rRNA.xdna]
with Sequence_2: [GO5_2L-LR3_(UBM-SAI)_071118.txt.xdna] -->
antiparallel**

Performed with Serial Cloner

(http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) .

Similarity : 575/1397 (41.16 %)

```

Seq_1  1      -----ggattcccctagtaactgcgag  22
                               |||
Seq_2  615    ACTAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATCCCCTAGTAACTGCGAG  556

Seq_1  23      tgaagcgggaaaagctcaaattttaaactctggtggcctttggccatccgagttgtaattt  82
                               |||
Seq_2  555    TGAAGCGGAAAAGCTCAAATTTAAATCTGGTGGCCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATTT  496

Seq_1  83      agagaagcgtcttccgcgctggaccgtgcacaagtctcctggaatggagcgtcatagagg  142
                               |||
Seq_2  495    AGAGAAGCGTCTTCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCCTGGAATGGAGCGTCATAGAGG  436

Seq_1  143     gtgagaatcccgtctttggcacggacgcaccagggcttttgtgatgcgctctcgaagagt  202
                               |||
Seq_2  435    GTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACGCACCAGGGCTTTTGTGATGCGCTCTCGAAGAGT  376

Seq_1  203     cgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtgaactccatctaaagctaaatattg  262
                               |||
Seq_2  375    CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAACCTCATCTAAAGCTAAATATTG  316

Seq_1  263     gcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagag  322
                               |||
Seq_2  315    GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAG  256

Seq_1  323     agtgaacagtacgtgaaattgttgaaagggaaacgcttgaagtcagtcgctg-gcccga  381
                               |||
Seq_2  255    AGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTCGCCCCG  196

Seq_1  382     gactcagcctcgcctcggcttggtgtacttctcggccgacgggtcagcatcaattttgcc  441
                               |||
Seq_2  195    GACTCAGCCTCGCCTCGGCTTGGTGTACTTCTCGGCCGACGGGTGAGCATCAATTTTGCC  136

Seq_1  442     cctcggataatggcgagggaaatgtgacacctttacgggtgtggttatagtcctttcgctgc  501
                               |||
Seq_2  135    CCTCGGATAATGGCGAGGGAAATGTGACACCTTTACGGGTGTGTTATAGTCTTTCGTCGC  76

Seq_1  502     atgcgagggtcgggattgaggaactcagcacgcgcttcgggctcgggggttcgcccacg  561
                               |||
Seq_2  75      ATGCGAGGGTCGGGATTGAGGAACCTCAGCACGCCTTCGGGCGTCGGGGT-CGCCCCAG  17

Seq_1  562     atacgtgcttagatggtggcgtaatggctttaacgaccttgaacacggaccaag  621
                               |||
Seq_2  16      ATACGTGCT-----  8

```

Seq_1	622	gagtctaacatgccccgagtgttcgggtggaaaacccgtgcgcgcaatgaaagtaaaag	681
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	682	ttgggacctctgtcgtggagggcaccaacgcccggaccagaccttctgtgacggatctgc	741
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	742	ggtagagcgtgtatgttaggacccgaaagatgggtgaactatgcctgaatagggtgaagcc	801
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	802	agaggaaactctggtggaggctcgtagcgattctgacgtgcaaactcgatcgtaaaatttg	861
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	862	ggtatagggcgaaagactaatcgaaccatctagtagctggttcctgccgaagtttccct	921
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	922	caggatagcagaaactcatgtcagatztatgtggtaaagcgaatgattagaggccttggg	981
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	982	gatgaaacatccttaacctattctcaaactttaaatatgtaagaacgagccgtcgcttga	1041
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	1042	ttggaccgctcggcgattgagagtttctagtgggccatTTTTGGTAAGCAGAActGGCGA	1101
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	1102	tgcgggatgaaccgaacgcgaggttaaggtgccggaatgcacgctcatcagacaccacaa	1161
Seq_2	7	-----	8
Seq_1	1162	aaggtgttagttcatctagacagcaggacggtggccatggaagtcggaatccgctaagga	1221
Seq_2	7	-----ATGA	4
Seq_1	1222	gtgtgtaacaactcacctgccgaatgaactagccctgaaaatggatggcgctcaagcgtg	1281
Seq_2	3	GTG-----	1
Seq_1	1282	ctaccacacctcgccgtcggcgttgaagtgacgtgccgacgagtaggcaggcgtggagg	1341
Seq_2	0	-----	1
Seq_1	1342	tccgtgaagaagccttggcagcgatgctgggtgaaacggcctctagtgacagatctg	1397
Seq_2	0	-----	1

**Alignment of Sequence_1: [KT933860.1_R-sardonia_LSU-rRNA.xdna]
with Sequence_2: [A06_1P-LR7_(UBM-SAI).xdna] --> antiparallel
Performed with Serial Cloner
(http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) .**

Similarity : 752/1397 (53.83 %)

```

Seq_1  1      ggattcccctagtaactgcgagtgaagcgggaaaagctcaaatttaaaatctggtggcct  60
      |
Seq_2  753    --A----- 753

Seq_1  61      ttggccatccgagttgtaatttagagaagcgtcttccgcgctggaccgtgcacaagtctc  120
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  121     ctggaatggagcgtcatagagggtgagaatcccgtctttggcacggacgcaccagggctt  180
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  181     ttgtgatgcgctctcgaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtgaa  240
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  241     ctccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgaggggaaag  300
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  301     atgaaaagcactttggaaagagagtgaaacagtacgtgaaattggtgaaaggggaaacgct  360
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  361     tgaagtcagtcgctgcccagactcagcctcgctcggttggtgtacttctcggccga  420
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  421     cgggtcagcatcaattttgccctcggataatggcgaggggaaatgtgacacctttacggg  480
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  481     tgtgttatagtctttcgtcgcacgaggggtcgggattgaggaactcagcacgcgccttc  540
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  541     gggcgtcggggttcgccacgatacgtgcttagatggtggcgtaatggctttaaacgacc  600
Seq_2  752    ----- 753

Seq_1  601     cgtcttgaaacacggaccaaggagtctaacaatgcccgcgagtgttcgggtggaaaacccg  660
      |||
Seq_2  752    -----CAAGGAGTCTAACATGCCCGCGAGTGTTCCGGTGGAAAACCCG  710

```

Seq_1	661	tgcgcgcaatgaaagtaaaagttgggacctctgtcgtggagggcaccaacgcccggacca	720
Seq_2	709	TGCGCGCAATGAAAGTAAAAGTTGGGACCTCTGTTCGTGGAGGGCACCAACGCCCGGACCA	650
Seq_1	721	gaccttctgtgacggatctgcggtagagcgtgtatgtaggacccgaaagatgggtgaact	780
Seq_2	649	GACCTTCTGTGACGGATCTGCGGTAGAGCGTGTATGTTAGGACCCGAAAGATGGTGAAC	590
Seq_1	781	atgcctgaataggggtgaagccagaggaaactctgggtggaggctcgtagcgattctgacgt	840
Seq_2	589	ATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGT	530
Seq_1	841	gcaaatcgatcgtcaaatttgggtatagggcgaaagactaatcgaaccatctagtagct	900
Seq_2	529	GCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCT	470
Seq_1	901	ggttcctgccgaagtttccctcaggatagcagaaactcatgtcagatttatgtggtaaag	960
Seq_2	469	GGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAAACTCATGTGAGATTTATGTGGTAAAG	410
Seq_1	961	cgaatgattagaggccttggggatgaaacatccttaacctattctcaaaactttaaatatg	1020
Seq_2	409	CGAATGATTAGAGGCCTTGGGGATGAAACATCCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATG	350
Seq_1	1021	taagaacgagccgctcgttattggaccgctcggcgattgagagtttctagtgggccatt	1080
Seq_2	349	TAAGAACGAGCCGTCGCTTGATTGGACCGCTCGGCGATTGAGAGTTTCTAGTGGGCCATT	290
Seq_1	1081	tttggttaagcagaactggcgatgcgggatgaaccgaacgcgaggttaaggtgccggaatg	1140
Seq_2	289	TTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAACGCGAGGTTAAGGTGCCGGAATG	230
Seq_1	1141	cacgctcatcagacaccacaaaaggtgttagttcatctagacagcaggacgggtggccatg	1200
Seq_2	229	CACGCTCATCAGACACCACAAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGACGGTGGCCATG	170
Seq_1	1201	gaagtcggaatccgctaaggagtgtgtaacaactcacctgccgaatgaactagccctgaa	1260
Seq_2	169	GAAGTCGGAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAA	110
Seq_1	1261	aatggatggcgctcaagcgtgctaccacacctcgccgctcggcggtgaagtgacgtgccg	1320
Seq_2	109	AATGGATGGCGCTCAAGCGTGCTACCCACACCTCGCCGTCGGCGTTGAAGTGACGTGCCG	50
Seq_1	1321	acgagtaggcaggcgtggaggtccgtgaagaagccttggcagcgatgctgggtgaaacgg	1380
Seq_2	49	ACGAGTAGGCAGGCGTGGAGGTCCGTGAAGAAGC--TGGCAGCGATGCTTG-----	1
Seq_1	1381	cctctagtgcagatctg	1397

Seq_2 0 ----- 1

**Alignment of Sequence_1: [KT933860.1_R-sardonia_LSU-rRNA.xdna]
with Sequence_2: [H05_1P-LROR_(UBM-SAI).xdna]
Performed with Serial Cloner
(http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) .**

Similarity : 753/1397 (53.90 %)

```

Seq_1  1      ggattcccctagtaactgcgagtgaagcgggaaaagctcaaattttaaactctggtggcct  60
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  61      ttggccatccgagttgtaatttagagaagcgtcttccgcgctggaccgtgcacaagtctc  120
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  121     ctggaatggagcgtcatagagggtgagaatcccgtctttggcacggacgcaccagggctt  180
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  181     ttgtgatgcgctctcgaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtgaa  240
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  241     ctccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaag  300
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  301     atgaaaagcactttgaaagagagtgaaacagtacgtgaaattggtgaaagggaaacgct  360
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  361     tgaagtcagtcgctgcccagactcagcctcgctcggcttggtgtacttctcggccga  420
Seq_2  1      -----  0

Seq_1  421     cgggtcagcatcaatTTTgcccctcgataatggcgagggaaatgtgacacctttacggg  480
Seq_2  1      -----GG-TTTCGGG  9
                                     || ||||

Seq_1  481     tgtgttatagtctttcgtcgcacgagggcgggattgaggaactcagcacgcgccttc  540
Seq_2  10     GGTGG-----  14
          |||

Seq_1  541     gggcgtcggggttcgccacgatacgtgcttagatggttggcgtaatggctttaaacgacc  600
Seq_2  15     -----  14

Seq_1  601     cgtcttgaaacacggaccaaggagtctaacatgcccgcgagtggtcgggtggaaaacccg  660
                                     |||||

```


Seq_2	15	-----AAACCCG	21
Seq_1	661	tgcgcgcaatgaaagtaaaagttgggacctctgtcgtggagggcaccaacgccccggacca	720
Seq_2	22	TGCGCGCAATGAAAGTAAAAGTTGGGACCTCTGTCTGGAGGGCACCAACGCCCGGACCA	81
Seq_1	721	gaccttctgtgacggatctgcggtagagcgtgtatgtaggacccgaaagatggtgaact	780
Seq_2	82	GACCTTCTGTGACGGATCTGCGGTAGAGCGTGTATGTTAGGACCCGAAAGATGGTGAAC	141
Seq_1	781	atgcctgaataggggtgaagccagaggaaactctggtggaggctcgtagcgattctgacgt	840
Seq_2	142	ATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGT	201
Seq_1	841	gcaaatcgatcgtcaaatttgggtatagggcgaaagactaatcgaaccatctagtagct	900
Seq_2	202	GCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCT	261
Seq_1	901	ggttcctgccgaagtttccctcaggatagcagaaactcatgtcagatttatgtggtaaag	960
Seq_2	262	GGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAACTCATGTCAGATTTATGTGGTAAAG	321
Seq_1	961	cgaatgattagaggccttggggatgaaacatccttaacctattctcaaacctttaaata	1020
Seq_2	322	CGAATGATTAGAGGCCTTGGGGATGAAACATCCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATG	381
Seq_1	1021	taagaacgagccgctcgttattgacgctcggcgattgagagtttctagtgggccatt	1080
Seq_2	382	TAAGAACGAGCCGTCGCTTGATTGGACCGCTCGGCGATTGAGAGTTTCTAGTGGGCCATT	441
Seq_1	1081	tttggttaagcagaactggcgatgcgggatgaaccgaacgcgaggttaaggtgccggaatg	1140
Seq_2	442	TTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAACGCGAGGTTAAGGTGCCGGAATG	501
Seq_1	1141	cacgctcatcagacaccacaaaaggtgtagttcatctagacagcaggacgggtggccatg	1200
Seq_2	502	CACGCTCATCAGACACCACAAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGACGGTGGCCATG	561
Seq_1	1201	gaagtcggaatccgctaaggagtgtgtaacaactcacctgccgaatgaactagccctgaa	1260
Seq_2	562	GAAGTCGGAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAA	621
Seq_1	1261	aatggatggcgctcaagcgtgctaccacacctcgccgctcggcgttgaagtgaactgacgtg	1320
Seq_2	622	AATGGATGGCGCTCAAGCGTGCTACCCACACCTCGCCGTCGGCGTTGAAGTGACGTGCCG	681
Seq_1	1321	acgagtaggcaggcgtggaggtccgtgaagaagccttggcagcgatgctgggtgaaacgg	1380
Seq_2	682	ACGAGTAGGCAGGCGTGGAGGTCCGTGAAGAAGCCTTGGCAGCGATGCTGGGTGAAACGG	741
Seq_1	1381	cctctagtgcagatctg-----	1397

```

Seq_2 742  |||||
CCTCTAGTGCAGATCTGGGGGGGTGGTAGAGAAC 775

```

**Alignment of Sequence_1: [KT933860.1_R-sardonia_LSU-rRNA.xdna] with
Sequence_2: [AF325318_R-sardonia_LSU-rRNA.txt.xdna]**

Similarity : 777/1397 (55.62 %)

```

Seq_1 1  -----ggattcccctagtaactgcgagtggaagcgggaaaag 36
Seq_2 1  taagcggagaaaagaaactaacaaggattcccctagtaactgcgagtggaagcgggaaaag 60

Seq_1 37  ctcaaatttaaaatctggtggcctttggccatccgagttgtaatttagagaagcgtcttc 96
Seq_2 61  ctcaaatttaaaatctggtggcctttggccatccgagttgtaatttagagaagcgtcttc 120

Seq_1 97  cgcgctggaccgtgcacaagtctcctggaatggagcgtcatagagggtgagaatcccgtc 156
Seq_2 121 cgcgctggaccgtgcacaagtctcctggaatggagcgtcatagagggtgagaatcccgtc 180

Seq_1 157  ttggcacggacgcaccagggcttttgatgctcgaagagtcgagttgttggga 216
Seq_2 181  ttggcacggacgcaccagggcttttgatgctcgaagagtcgagttgttggga 240

Seq_1 217  atgcagctcaaaatgggtggtgaactccatctaaagctaaatattggcgagagaccgata 276
Seq_2 241  atgcagctcaaaatgggtggtgaactccatctaaagctaaatattggcgagagaccgata 300

Seq_1 277  gcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagtgaaacagtacg 336
Seq_2 301  gcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagtgaaacagtacg 360

Seq_1 337  tgaaattgtttaaagggaaacgcttgaagtcagtcgcgt-gcccgagactcagcctcgcc 395
Seq_2 361  tgaaattgtttaaagggaaacgcttgaagtcagtcgcgtcgcccgagactcagcctcgcc 420

Seq_1 396  tcggcttgggtgacttctcggccgacgggtcagcatcaatttgcccctcggataatggc 455
Seq_2 421  tcggcttgggtgacttctcggccgacgggtcagcatcaatttgcccctcggataatggc 480

Seq_1 456  gagggaaatgtgacacctttacgggtgtgttatagtccttcgctcgcatgaggggtcggg 515
Seq_2 481  gagggaaatgtgacacctttacgggtgtgttatagtccttcgctcgcatgaggggtcggg 540

Seq_1 516  attgaggaactcagcacgccttcgggcgtcgggggttcgcccacgatacgtgcttagat 575
Seq_2 541  attgaggaactcagcacgccttcgggcgtcgggggttcgcccacgatacgtgcttagat 600

Seq_1 576  gttggcgtaatggctttaaacgaccctcgttgaacacggaccaaggagtctaacatgcc 635
Seq_2 601  gttggcgtaatggctttaaacgaccctcgttgaacacggaccaaggagtctaacatgcc 660

```


Annex 4. Useful sequences for phylogenetic analysis in the PCR reactions obtained with primers MS1/MS2 (sequences D05_3M-MS1 and E05_3M-MS2) and LROR/LR7 (sequences A06_1P_LR7).

1) Sequence D05_3M-MS1

ACTAGCTACTGAATCATTATAAAAATTGATAACATAAGGGAAAATAATGATATTACCTTATTATTAGTGTCGTCCAAATC
TGGTGCCAGAAGACTCGGTAAGGCCAGAGACACAAACGTTAATCGTCTTAATCAGGCGTAAAGGGTTTGTAGGCGGCTTT
AAAAATTATTAACACAAATTTTTATTTTATTAATAATTAAGAATAAAAAGCTAGAATCAAAAAGAGGATATATTAAGAA
TGTTTAGAGTAGGTCTGATATCCATAGATACTAAGTAGAATATTAAGGCCGAAAGCTTTTTCCATTAATGATTGACGCT
CAGAAACGAAGGTGAGGATAGGAAATAGGATTAGATACCCAAAATACCCCTCTCTGTCAACGATGAATGGTAGTTATTAA
TAAAATTTGATTAATGACAATGTTAACACGATAACCATTCCGCCTTGTGAGTACAACCTGCAAAGTTGAAAACAAAAAAT
TAGTCGGTTTTCGGAGCAAACGAAGTGAAGCATGTTATTTAATTCGAAAAAATCCCGCACCCGACTAAATTTTTTTTTGG

2) Sequence E05_3M-MS2

TGCTCGACCGACTAATTTTTTTGTTTTCACTTTGCAGTTGTACTIONACAAGGCCGAATGTTTATCGTGTTAACATTGTCAT
TAATCAAATTTTTATTAATAACTACCATTTCATCGTTGACAGAGAGGGGTATTTTTGGGTATCTAATCCTATTTCCATCCTC
ACCTTCGTTTTCTGAGCGTCAATCATTAAATGAAAAAAGCTTTTCGCCTTTAATATTCTACTTAGTATCTATGGATATCAGA
CCTACTCTAAACATTCTTTAATATATCCTCTTTTTGATTCTAGCTTTTTATTCTTTAATTATTAATAAAAATAAAAATTTGT
GTTAATAATTTTTAAAGCCGCCTACAAACCCTTTACGCCTGATTAAGACGATTAACGTTTTGTGTCTCTGGCCTTACCGAG
TCTTCTGGCACCAGATTTGGACGACACTAATAATAAGGTAATATCATTATTTCCCTTATGTTATCAATTTTTATAATTG
ATTTTCAGTTAGCTAGTTCACTCTTTTCGAGCATTGACTAATATTTTGGAACTGCTGAA

3) Alignment of D05_3M-MS1 and E05_3M-MS2 (antiparallel)

Alignment of Sequence_1: [E05_3M-MS1] with Sequence_2: [E05_3M-MS2]

D05_3M-MS1 / E05_3M-MS2 useful sequence (position 16 to 497 of Seq_1, below) to be used in a BLAST search aimed at obtaining 10 sequences for a maximum parsimony tree. Included in Serial cloner file D05_3M-MS1_(UBM-SAI)_071118.xdna and as FASTA in E05_3M-MS2_(UBM-SAI)_071118.xdna

Similarity : 486/558 (87,10 %)

Seq_1	1	-----AC-TAGCTACTGAATC--A	16
Seq_2	537	TTCAGCAGTTCAAAATATTAGTCAATGCTCGAAAGAGTGAACCTAGCTAACTGAAATCAA	478
Seq_1	17	TTATAAAAATTGATAACATAAGGGAAAATAATGATATTACCTTATTATTAGTGTCGTCCA	76

Seq_2	477	TTATAAAAATTGATAACATAAGGGAAAATAATGATATTACCTTATTATTAGTGTCTGCCA	418
Seq_1	77	AATCTGGTGCCAGAAGACTCGGTAAGGCCAGAGACACAAACGTTAATCGTCTTAATCAGG	136
Seq_2	417	AATCTGGTGCCAGAAGACTCGGTAAGGCCAGAGACACAAACGTTAATCGTCTTAATCAGG	358
Seq_1	137	CGTAAAGGGTTTGTAGGCGGCTTTAAAAATTATTAACACAAATTTATTTTATTAATAA	196
Seq_2	357	CGTAAAGGGTTTGTAGGCGGCTTTAAAAATTATTAACACAAATTTATTTTATTAATAA	298
Seq_1	197	TTAAAGAATAAAAGCTAGAATCAAAAAGAGGATATATTAAGAATGTTTAGAGTAGGTCT	256
Seq_2	297	TTAAAGAATAAAAGCTAGAATCAAAAAGAGGATATATTAAGAATGTTTAGAGTAGGTCT	238
Seq_1	257	GATATCCATAGATACTAAGTAGAATATTAAGGCGAAAGCTTTTTCCATTAATGATTGA	316
Seq_2	237	GATATCCATAGATACTAAGTAGAATATTAAGGCGAAAGCTTTTTCCATTAATGATTGA	178
Seq_1	317	CGCTCAGAAACGAAGGTGAGGATAGGAAATAGGATTAGATACCCAAAATACCCCTCTCTG	376
Seq_2	177	CGCTCAGAAACGAAGGTGAGGATAGGAAATAGGATTAGATACCCAAAATACCCCTCTCTG	118
Seq_1	377	TCAACGATGAATGGTAGTTATTAATAAAAATTTGATTAATGACAATGTTAACACGATAACC	436
Seq_2	117	TCAACGATGAATGGTAGTTATTAATAAAAATTTGATTAATGACAATGTTAACACGATAACC	58
Seq_1	437	ATTCCGCCTTGTGAGTACAACGCAAGT	496
Seq_2	57	ATTCCGCCTTGTGAGTACAACGCAAGT-GAAAACAAAAAATTAGTCGGT--C-GAGC	2
Seq_1	497	AAACGAAGTGAAGCATGTTATTTAATTCGAAAAATCCCGCACCCGACTAAATTTTTTTT	556
Seq_2	1	A-----	1

Seq_1 557 GG 558

Seq_2 0 -- 1

4) Sequence H05_1P_LROR

```
GGTTTCGGGGGTGGAAACCCGTGCGCGCAATGAAAGTAAAAGTTGGGACCTCTGTTCGTGGAGGGCACCAACGCCCGGACC
AGACCTTCTGTGACGGATCTGCGGTAGAGCGTGTATGTTAGGACCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGAAG
CCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGAC
TAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAACTCATGTCAGATTTATGTGGTAAA
GCGAATGATTAGAGGCCTTGGGGATGAAACATCCTTAACCTATTCTCAAACCTTAAATATGTAAGAACGAGCCGTCGCTT
GATTGGACCGCTCGGCGATTGAGAGTTTCTAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAACG
CGAGGTTAAGGTGCCGAATGCACGCTCATCAGACACCACAAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGACGGTGGCCAT
GGAAGTCGGAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAAAATGGATGGCGCTCAAGCG
TGCTACCCACACCTCGCCGTCGGCGTTGAAGTGACGTGCCGACGAGTAGGCAGGCGTGGAGGTCCGTGAAGAAGCCTTGG
CAGCGATGCTGGGTGAAACGGCCTCTAGTGCAGATCTGGGGGGGTGGTAGAGAAC
```

5) Sequence A06_1P_LR7

```
CAAGCATCGCTGCCAGCTTCTTACGGACCTCCACGCCTGCCTACTCGTCGGCAGTCACTTCAACGCCGACGGCGAGGT
GTGGGTAGCACGCTTGAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTCATTTCGGCAGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGAT
TCCGACTTCCATGGCCACCGTCCGTGTCTAGATGAACTAACACCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTGCATTCCGGCAC
CTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCGCTTACCAAAAATGGCCACTAGAAACTCTCAATCGCCGAG
CGGTCCAATCAAGCGACGGCTCGTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATAGGTTAAGGATGTTTCATCCCCAAGGCCTCT
AATCATTCGCTTTACCACATAAATCTGACATGAGTTTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCAGGAACCAGCTACTAGAT
GGTTCGATTAGTCTTTTCGCCCCATATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCACGTGAGAATCGCTACGAGCCTCCACCAGAG
TTTCTCTGGCTTACCCTATTCAGGCATAGTTCACCATCTTTCCGGTCCCTAACATACACGCTCTACCCGAGATCCGTCA
CAGAAGTCTGGTCCGGGCGTGGTGGCCTCCACGACAGAGGTCCCAACTTTTACTTTTATTGCGCGCACGGGTTTTCCA
CCGAACTTCGCGGCATGTTAGACTCCTTGT
```

6) Alignment of H05_1P_LROR and A06_1P_LR7 (antiparallel)

Alignment of Sequence_1: [H05_1P-LROR_(UBM-SAI).xdna] with Sequence_2:
[A06_1P-LR7_(UBM-SAI).xdna]

H05_1P_LROR/A06_1P_LR7 useful sequence (position 15 to 715 of Seq_1, below) to be used in a BLAST search aimed at obtaining 10 sequences for a maximum parsimony tree. Included in Serial cloner file LROR_LR7_pcr-1P_useful-sequence-for-BLAST_071718.xdna and as FASTA in LROR_LR7_pcr-1P_useful-sequence-for-BLAST_071718.fasta

Similarity : 723/775 (93.29 %)

```
Seq_1 1 -----GGTTTCGGGGGTGGAAACCCGTGCGCGCAATGAAAG 36
                               | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Seq_2 753 ACAAGGAGTCTAACATGCCCGCGAGTGTTCGGGTGGA-AAACCCGTGCGCGCAATGAAAG 695

Seq_1 37 TAAAAGTTGGGACCTCTGTTCGTGGAGGGCACCAACGCCCGGACCAGACCTTCTGTGACGG 96
                               | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Seq_2 694 TAAAAGTTGGGACCTCTGTTCGTGGAGGGCACCAACGCCCGGACCAGACCTTCTGTGACGG 635
```