ISBN: 978-607-00-2083-4

Obtención de secuencias ITS del DNAr en la sección *Celulloderma* del género *Pluteus* Fr. (Fungi, Agaricales) para su uso en análisis filogenéticos

Carlos Vladimir Muro Medina[1], Olivia Rodríguez Alcántar[1*], Adrián Galván-Corona[1], Laura Guzmán-Dávalos[1], Georgina Vargas Amado[1], Alma Rosa Villalobos Arámbula[2]

[1]Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, Apdo. postal 1-139, Zapopan, Jal., 45101, México
Correo-e: oliviaro@cucba.udg.mx
[2] Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara

Introducción

El género *Pluteus* Fr., incluido en la familia *Pluteaceae,* es caracterizado por presentar basidiomas con láminas libres y sin volva y anillo (Singer, 1986). Desde el punto de vista ecológico se trata de especies saprobias, en su mayoría lignícolas no conociéndose representantes micorrizógenos ni parásitos. (Rodríguez et al., 2004). La taxonomía tradicional de *Pluteus* se basa en características microscópicas, principalmente el tipo de pileipellis y cistidios, que de acuerdo a estos caracteres se reconocen tres secciones: *Pluteus* Fr., *Hispidoderma* Fayod y *Celluloderma* Fayod (Banerjee & Sundberg, 1995; Horak, 1964; Orton, 1986, Singer, 1958).

La sección *Celluloderma*, presenta una palizada de células globosas a esferopedunculadas en la pileipellis, en tanto que la sección *Pluteus* se caracteriza por los pleurocistidios de pared gruesa (metuloides) y la pileipellis generalmente de tipo tricodermio al igual que la sección *Hispidoderma* solo que esta última tiene pleurocistidios de pared delgada. En cuanto la sección Celluloderma es subdividida en dos subcciones de acuerdo al tipo de pileipellis: *Mixtini* Singer ex Singer y Singer ex Singer. La primera de ellas agrupa especies con pileocistidios mezclados con estructuras globosas, subglobosas, elipsoides a anchamente claviformes; estos últimos tipos de elementos sólo presentes en la subsección *Eu-Cellodermini* (Singer, 1958). El género *Pluteus* se relaciona con los géneros *Chaemaeota* y *Volvariella* incluidos en la misma familia *Pluteaceae,* estos se diferencian por presentar anillo y volva respectivamente. (O. Rodríguez, 1998).

Pluteus ha sido estudiado por diversos autores con base en caracteres morfológicos (Kühner and Romagnesi 1953, Singer 1956, 1958; Horak 1964, Horak & Heinemann 1978, Orton 1986, Vellinga 1990, Banerjee & Sundberg 1993, 1995, Rodríguez and Guzmán-Dávalos 1997, 1999, 2001, 2004) y con datos moleculares (Moncalvo et al., 2000, 2002; Minnis et. al., 2006); sin embargo, su taxonomía sigue siendo controversial.

El estudio de las secuencias de DNAr ha proporcionado información útil para algunos grupos de basidiomicetos, (Guzman-Dávalos 2003) con datos para inferir relaciones filogenéticas. Dentro del *locus* DNAr la región ITS ha sido particularmente útil en el análisis de especies muy cercanas en muchos géneros.

La región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNAr nuclear contiene dos regiones variables no codificadoras ITS-1 e ITS-2 que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del DNAr entre la subunidad pequeña (5.8S) y los genes que codifican para RNAr la subunidad grande (LSU) y la subunidad pequeña(SSU).

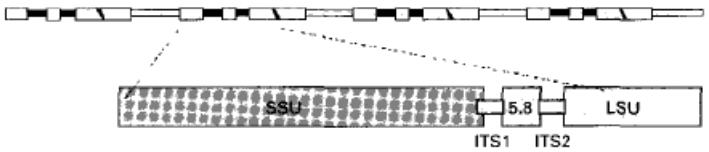

Figura 1. —Estructura del rDNA nuclear. Se observa aumentadas las subunidades (subunidad corta (SSU), subunidad 5.8 (5.8S) y subunidad larga (LSU) y los espaciadores internos (ITS). Tomada de Crespo et. al., Departamento de Biología Vegetal II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. E-28040, Madrid.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es presentar los avances en la obtención de secuencias de ITS para su uso en estudios filogenéticos, que permitan esclarecer la ubicación taxonómica de las especies de la sección *Celluloderma*.

Materiales y Métodos

Extracción de ADN

Se trabajó con muestras de ADN previamente extraídas con el método modificado de Aljanabi & Martínez (1997), tomando 4mg de material seco de herbario (peleipellis y láminas) agregando sales con PVP al 1% y bajo el método descrito por Nickrent (1994), para ejemplares de herbario muy viejo o con poco tejido disponible. En ambos casos la pastilla de ADN fue resuspendida en 30 µl, 50 µl y 80 µl de EDTA y almacenada a 4°C hasta que sea requerida. Las muestras se obtuvieron a partir de ejemplares de herbarios nacionales y extranjeros, incluyendo especímenes del género *Pluteus*, principalmente de la sección *Celluloderma*, así como representantes de los grupos más cercanos al género como *Volvariella* y *Chamaeota*.

Amplificación del ITS

Para la amplificación por PCR del ITS completo, se utilizó el par de cebadores (ITS1F-ITS4 e ITS5-ITS4) de acuerdo con las condiciones descritas en Guzmán-Dávalos *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Cada 25 µl de volumen del tubo de PCR consta de 23 µl de PCR mix, 1 µl de Primer Taq y 1 µl de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 de MJ Research, INC. Las muestras se amplificaron con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 24 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación 50°C por 45 seg y elongación a 72°C por 2 min; 14 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación 50°C por 45 seg, (aumentar 5 seg por ciclo) y elongación a 72°C por 2 min. Elongación prolongada final a 72°C por 10 min. El fragmento amplificado se separó en geles de agarosa al 2%, con

un voltaje de entre 80 y 90 voltios. El gel de agarosa con las muestras se tiño en bromuro de etidio y fue visualizado en un transiluminador de rayos UV.

Secuenciación

Los productos amplificados fueron sometidos a una reacción de secuenciación con BigDye™ y se purificaron utilizando columnas AutoSeq™ G-50 siguiendo el método descrito por el proveedor. Las secuencias se obtuvieron por electroforesis capilar en un ABI-Prism 310 Genetic Analyzer. La calidad de las secuencias fueron evaluadas utilizando el programa Chromas 1.45 (McCarthy 1996-1998).

Resultados y Discusión

Se procesaron 80 ejemplares que representan 28 especies de la sección *Celulloderma*. El método de Aljanabi se utilizó en la extracción de ADN para 47 ejemplares que representan a 11 especies, mientras que el descrito por Nickrent fue aplicado para procesar 33 muestras de 17 especies. Un total de 47 secuencias de la región completa del ITS han sido generadas, siendo los primers ITS1F-ITS4, los que mejores resultados mostraron. Todas las secuencias fueron generadas a partir de muestras de ADN extraído con el método descrito por Aljanabi.

Los métodos de amplificación y secuenciación para el ADN extraído con el protocolo de Nickrent, se encuentran en etapa de optimización, por tratarse de muestras recientemente obtenidas.

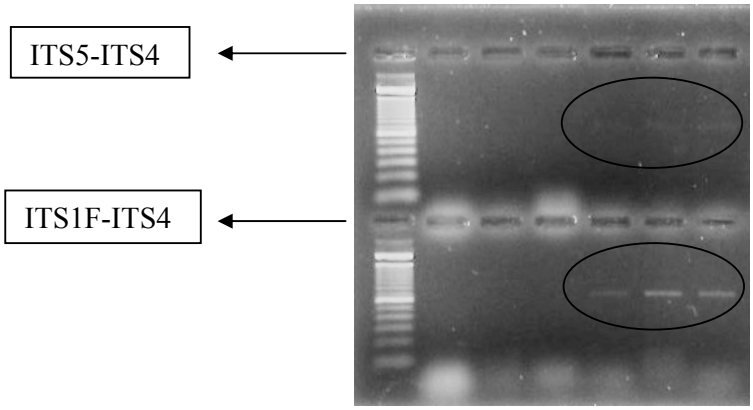

Figura 2. Comparación de 3 muestras de ADN genómico y diluido, amplificadas con dos pares de primer del ITS completo. Pozos1 y 8, marcador 100 pb; 2-4 y 10-12, ADN genómico; 5-7 y 13-15, dilución 1:10 del ADN.

Las pruebas de amplificación realizadas para ADN obtenido por el protocolo de Nickrent , muestran que las diluciones 1:10 del ADN genómico, realizadas con el propósito de disminuir la concentración de pigmentos, presentan bandas mas nítidas en los corrimientos de electroforesis (Figura 2).

La amplificación de la región completa del ITS, ha presentado mejores resultados cuando se utilizan los primer ITS1F e ITS4, en muestras de ADN extraídas con cualquiera de los dos protocolos.

Es necesario continuar con los trabajos para la obtención de secuencias, principalmente de especies que aun no han sido secuenciadas, para tener una mejor representación de la sección Celulloderma que permita realizar inferencias filogenéticas más confiables.

Bibliografía

Aljanabi, S.M. & I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. Nucleic Acid research 25: 4692-4693.

Banerjee, P. & W. Sundberg. 1993. Reexamination of *Pluteus* type specimens: Types housed at the New York Botanical Garden. *Mycotaxon 49*: 413-435.

Banerjee, P. & W. Sundberg. 1995. The genus *Pluteus* (Pluteaceae, Agaricales) in the Midwestern United States. *Mycotaxon 53*: 189-246.

Guzmán-Dávalos, L., Mueller, G.M., Cifuentes, J., Miller, A.N. & A. Santerre. 2003. Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data. Mycologia 95(6): 1204-1214.

Horak, E. 1964. Fungi Austroamericani II. *Pluteus* Fr. *Nova Hedwigia 8*: 163-199 + 19 láms.

Horak, E. & P. Heinemann. 1978. *Flore illustrée des champignons d'Afrique centrale. Fasc. 6 Pluteus & Volvariella (Pluteaceae)*. Minist. Agric. J. Bot. Nat. Bel., Meise.

Kühner, R. & H. Romagnesi. 1953. *Flore analytique des champignons supérieurs (Agarics, Bolets, Chanterelles)*. Masson, París.

Minnis A.M.*, Walter J. Sundberg1, Andrew S. Methven2, Sedonia D. Sipes1, & Daniel L. Nickrent1. 2006. Annulate *Pluteus* species, a study of the genus *Chamaeota* in the United States. *Mycotaxon* 96: 31-39.

Moncalvo, J. M., F. M. Lutzoni, S. A. Rehner, J. Johnson & R. Vilgalys. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol. 49 (2)*: 278-305.

Moncalvo, J. M., R. Vilgalys, S. A. Redhead, J. E. Johnson, T. Y. James, M. C. Aime, V. Hofstetter, S. J. W. Verduin, E. Larsson, T. J. Baroni, R. G. Thorn, S. Jacobsson, H. Clémençon & O. K. Miller Jr. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol. Phylog. Evol. 23*: 357-400.

Nickrent D.L. 1994. From field to film: Rapid sequencing methods for field collected plant species. BioTechniques 16: 470-475.

Orton, P. D. 1986. *Pluteaceae: Pluteus* & *Volvariella*. *In*: Henderson, D. M., P. D. Orton & R. Watling (eds.). *British fungus flora: Agarics and boleti*, vol. 4. Royal Botanic Garden, Edinburg.

Rodríguez, O. 1998. Avances en el conocimiento del género *Pluteus* (Fungi, Agaricales) en Nueva Galicia, México. *Bol. Inst. Bot. 5* (1-3): 87-93.

Rodríguez, O. & L. Guzmán-Dávalos. 1997. New additions to the genus *Pluteus* (Pluteaceae, Agaricales) for Mexico. *Micol. Neotrop. Apl. 10*: 83-91.

Rodríguez, O. & L. Guzmán-Dávalos. 1999. Nuevos registros del género *Pluteus* (Pluteaceae) en México. *Documents Mycologiques 29* (114): 67-78.

Rodríguez, O. & L. Guzmán-Dávalos. (1999) 2000. Algunas especies del género *Pluteus* (Pluteaceae, Agaricales) citadas en Nueva Galicia, México. *Bol. IBUG* (Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara*) 7* (1-3): 61-77.

Rodríguez, O. & L. Guzmán-Dávalos. 2001. Clave dicotómica de las especies del género *Pluteus* Fr. (Pluteaceae) conocidas de la región de Nueva Galicia y algunas áreas aledañas, México. *Acta Bot. Mex. 57*: 23-36.

Rodríguez, O., G. Moreno & M. Heykoop. 2004. El género *Pluteus* en México, diagnosis latinas y comentarios taxonómicos, corológicos y ecológicos. *Bol. Soc. Mic. Madrid 28*: 291-314.

Singer, R. 1956. Contribution toward a monograph of the genus *Pluteus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc. 39*: 145-232.

Singer, R. 1958. Monographs of South American Basidiomycetes, especially those of the east slope of the Andes and Brazil.1. The genus *Pluteus* in South America. *Lloydia 21*: 195-299.

Singer, R. 1986. *Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz, Koenigstein.

Vellinga, E. C. 1990. Pluteaceae, *In*: Bas, C., T. H. Kuyper, M. E. Noordeloos & E. C. Vellinga (eds.). *Flora Agaricina Neerlandica*. Balkema, Rotterdam.