

ISBN: 970-27-0770-6

EXTRACCIÓN DE DNA Y AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL ITS DEL DNAr DE *Ganoderma* (FUNGI, BASIDIOMYCETES) PARA SU USO EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

**Laura Izascum Pérez Valencia, Anne Santerre, Alma Rosa Villalobos Arámbula.
Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular y Molecular.**

**Adrián Galván Corona, Mabel Gisela Torres-Torres, Aarón Rodríguez Contreras,
Laura Guzmán Dávalos. Departamento de Botánica y Zoología.**

Introducción

El estudio de la biodiversidad es de gran importancia para entender la estructura y función de la vida en nuestro planeta; lamentablemente en las últimas décadas la diversidad biológica se ha visto afectada profundamente, principalmente a través de la pérdida acelerada de las especies, que se traduce en el deterioro de los ciclos biológicos. En cuanto a hongos se refiere la pérdida de diversidad también es muy grande, pero no evidente, debido al bajo número de especies descritas en relación con las que se calcula que existen (Hawksworth, 1991; Rossmann, 1994). Esta pérdida tan grande, está estimulando a muchos científicos de diferentes áreas a investigar más sobre las especies. Ciencias como la sistemática y la genética aportan técnicas que son útiles para la obtención de los datos necesarios para el conocimiento de la biodiversidad.

El género *Ganoderma* P. Karst. pertenece a la familia Ganodermataceae (Basidiomycetes, Fungi), que está constituida por un pequeño número de géneros que presentan distribución cosmopolita y que se desarrollan sobre el suelo o madera muerta (Ryvarden y Johansen, 1980). Ryvarden y Moncalvo (1997) reconocen para la familia un total de 220 especies.

Ganoderma se caracteriza por tener basidiomas bi o perianuales, pileados, sésiles o estipitados central o lateralmente, con la superficie del píleo lisa, opaca o brillante con una cutícula distintiva de color café claro a púrpura oscuro. Presenta poros pequeños a medianos, los tubos generalmente son estratificados, ocráceos a veces blanquecinos, y el contexto es blanco a color café. Su sistema hifal es di o trimítico, generalmente no presenta cistidios, y sus basidiosporas son ovoides a elipsoides, truncadas, de grandes a muy grandes (7-25 μ m de longitud), amarillentas o de color café, con doble pared muy distintiva, la externa hialina con un exosporio cubierto de ornamentaciones y un endosporio de color café (Furtado, 1965; Bazzalo y Wright, 1982; Corner, 1983; Nuñez y Ryvarden, 2000).

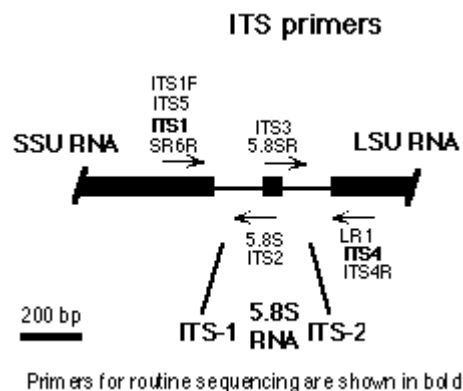
Son hongos saprobios o parásitos facultativos de diversas plantas, incluyendo cultivos perennes, como el caucho, té, palmas aceiteras, café y árboles de madera dura, en donde causan pudrición blanca. Tienen una distribución amplia, en climas templados y tropicales (Bazzalo y Wright, 1982; Miller *et al.*, 1995). De acuerdo con la estructura de la superficie

del píleo, Steyaert (1980) estableció cuatro subgéneros (*Ganoderma*, *Elfvigia*, *Plecoderma*, *Anamixoderma*) y dividió el subgénero *Ganoderma* en dos secciones (*Ganoderma* y *Characoderma*). Otros autores, como Corner (1983) y Ryvarde (1991), han referido a las especies laqueadas como del complejo *G. lucidum* y las especies opacas como del complejo *G. applanatum*; los cuales han sido denominados como los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvigia*, respectivamente.

Aunque el género ha sido estudiado por diversos autores (e.g. Furtado, 1965; Steyaert, 1980; Bazzalo y Wright, 1982; Gilbertson y Ryvarde, 1986; Adaskaveg y Gilbertson, 1988; Ryvarde, 1991, 2000), incluso con datos moleculares y de otro tipo (Adaskaveg y Gilbertson, 1986; Moncalvo *et al.*; 1995; Gottlieb *et al.*, 1998, 2000; Moncalvo, 2000; Smith y Sivasithamparam, 2000; Hong y Jung, 2004), su taxonomía sigue siendo controversial.

Hasta hace algunos años, en los estudios en sistemática se utilizaban casi siempre caracteres morfológicos. Sin embargo, existen caracteres que pueden estar sometidos a la subjetividad de quien los analiza o bien no todos los caracteres relevantes son apreciables a simple vista, o no tenemos la capacidad para definir inequívocamente las homologías. En la actualidad las herramientas que se utilizan en la sistemática se han extendido; ahora no sólo se toman en cuenta los caracteres morfológicos, sino también los caracteres moleculares.

La región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNA ribosomal (DNAr) nuclear, contiene dos regiones variables no codificadoras, que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del DNAr a, entre la subunidad pequeña, la región 5.8S y los genes que codifican para RNAr de la subunidad grande (Gardes y Bruns, 1993). La funcionalidad del ITS está relacionada con la división específica dentro del transcrito primario ITS-1 e ITS-2 durante la maduración de las subunidades pequeñas (SSU), 5.8S, y la subunidad ribosomal grande (LSU).



Entre las características convenientes para el análisis de secuencias ITS en hongos, se encuentran: la región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales; la naturaleza multicopia de las repeticiones del DNAr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar, aun cuando se utilicen muestras de DNA pequeñas o muy diluidas, o altamente degradadas (DNA obtenido de material viejo y especímenes de

herbarios). Finalmente, diversos estudios han demostrado su utilidad en el análisis filogenético (Gardes y Bruns, 1993; Álvarez y Wendel, 2003).

Este trabajo es parte de un proyecto más amplio, que tiene como objetivo el de establecer las relaciones filogenéticas (historia evolutiva y parentesco entre las especies), en la mayoría de los casos a nivel infragenérico de un grupo selecto de macromicetos, empleando caracteres morfológicos, moleculares y químicos. En ese proyecto para el género *Ganoderma* en particular, se pretende: comprobar su monofilia, estudiar con caracteres morfológicos, moleculares y químicos las relaciones filogenéticas de las especies, y definir si la presencia o ausencia de laca en el píleo de los basidiomas de *Ganoderma* es la sinapomorfia a nivel infragenérico. Así, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos de una de las fases iniciales del proyecto, referente a la obtención de datos moleculares. En particular se presentan los resultados sobre la extracción de DNA y amplificación de ITS de especímenes de *Ganoderma*.

Material y Métodos

Material

Hasta ahora se han seleccionado 93 especímenes de 19 especies del género *Ganoderma* de acuerdo a la clasificación tradicional del grupo. Los especímenes se recolectaron entre 1904 y 2004; la mayoría de las muestras se obtuvieron a partir de ejemplares de herbario, y muy pocas de materiales recién recolectados. De los 93 especímenes se realizaron 170 extracciones de distintos tejidos del basidioma: 73 corresponden a contexto, mientras que 84 corresponden a tubos. En trece muestras no se indica el tipo de tejido.

Extracción de DNA

Experimentos de optimización para el género Ganoderma

Para la extracción de DNA a partir de muestras de herbario o frescas se ensayaron dos protocolos, uno con SDS y proteinasa K para la eliminación de proteínas (Aljanabi *et al.* 1997), ya utilizado en el Laboratorio de Genética para la extracción de DNA de insectos y plantas (Palomera, 2005); y otro con CTAB y cloroformo-isoamílico para la eliminación de proteínas (Doyle y Doyle, 1987), optimizado para extraer DNA de diversos tejidos de pinos (Palomera, 2002). En ambos protocolos se incluyó en el buffer de lisis PVP al 1%, además se adaptaron los protocolos a la cantidad de tejido de las muestras de herbario de *Ganoderma*.

Se llevaron a cabo dos experimentos, cada uno con ocho muestras (100-306 mg) que se trabajaron con los dos métodos de extracción de DNA). En el primer experimento se utilizaron 8 ml de buffer de extracción en el protocolo de Doyle & Doyle y 4 ml de buffer de extracción para el protocolo con Proteinasa K. En el segundo experimento se utilizaron 4 ml de buffer de extracción para los dos protocolos. La calidad del DNA extraído se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook *et al.*, 1989).

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA con el protocolo basado en proteinasa K el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se agregaron 4 ml de buffer salino (NaCl 0.4M, Tris-HCl 10mM, EDTA 2mM) con PVP al 1%. Se mezcló suavemente por inversión y se añadieron 400 µl de SDS al 20% y 20µl de Proteinasa K (10 mg/ml). Se mezcló por inversión y se incubó por una hora a 65°C. Se añadieron 3 ml de NaCl 6M y se mezcló lentamente por 30 seg. Se centrifugó a 4000 rpm por 45 min a 24°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó la misma cantidad de isopropanol frío. Se mezcló suavemente por inversión, se incubó toda la noche a -20°C, se centrifugó a 4°C por 30 min a 4000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 20 min y se agregaron 2.5 ml de etanol al 70% frío. Se mezcló por inversión cada 5 min al menos 3 veces. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se decantó el etanol. La pastilla de DNA se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml con 1 ml de etanol al 70% frío, repitiendo el lavado dos veces más. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se decantó el etanol. La pastilla se diluyó en 100µl-500µl de TE (Tris 10mM pH 7.4, EDTA 0.2mM), disolviendo a temperatura ambiente toda la noche. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Con el método de extracción de Doyle & Doyle el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se transfirió la muestra a un tubo de 15 ml con 4 ml de buffer CTAB 2X (CTAB 2%, Tris 100mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4M) con PVP al 1 % previamente calentado a 65°C. Se incubó por 60 min. a 65°C. Una vez fría la muestra se añadió 4 ml de cloroformo (alcohol isoamílico 24:1). Se centrifugó a 4000 rpm. por 45 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregó el mismo volumen de isopropanol frío. Se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 4000 rpm. por 20 min. Se decantó el sobrenadante. Se añadió 4ml de buffer de lavado(etanol absoluto, acetato de amonio 7.5M). Se centrifugó a 2000 rpm. por 2 min. Se decantó y seco. Se añadió 800µl de buffer TE (Tris 1M pH 7.4, EDTA 0.5 M) y 280µl de agua destilada para disolver la pastilla. Se añadió 520µl de acetato de amonio 7.5M. Se agregó 3.5ml. de etanol absoluto frío. Se incubó por una hora a -20°C. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se decantó y seco la pastilla. Se añadió 3 ml. de etanol al 70 %. Se centrifugó a 2000rpm por 5. Se decantó. Se añadió 1 ml de etanol al 70% frío. Se transfirió la pastilla de DNA a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se repitió el lavado con 1ml de etanol al 70% frío. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se decantó. Se disolvió la pastilla de DNA en 300-500 µl de TE . Se dejó a temperatura ambiente toda la noche.

Amplificación de ITS

Para la amplificación por PCR de la secuencia completa del ITS se utilizó el par de cebadores (ITS1F e ITS4) de acuerdo con las condiciones descritas en Guzmán-Dávalos *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

El volumen total de la reacción para la PCR fue de 25 µl por muestra. Con 23 µl de mezcla PCR (buffer PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 5 mM, BSA 1 mg/ml), 1 µl de mezcla primer-Taq (primer 5 y 3 10 µM y 0.2 µl de TaqPol 5U/µl) y 1 µl de DNA (que se diluye 1:1 en caso de presentarse una alta concentración de pigmentos). 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 (2 %) con amortiguador TBE 1X, las muestras se corrieron en promedio a 80 voltios por dos horas y los geles se tiñeron con bromuro de etidio para visualizar la banda de aproximadamente 500 pb en un transiluminador de luz UV (UVP-TS20E). Se tomaron fotografías de los geles con una cámara polaroid y con el sistema de fotodocumentación EDAS (Kodak Digital Science 1D v.3.0.2), posteriormente se procedió a su análisis.

Resultados y Discusión

Optimización de los protocolos de Extracción de DNA

Con base en los resultados de la electroforesis del primer experimento para las muestras de *Ganoderma* con los dos protocolos de extracción, se encontró que de los dos métodos probados, el más adecuado para la extracción de DNA de especímenes de *Ganoderma* es el de proteinasa K, ya que el producto final contiene menos pigmentos que aquellas muestras procesadas con el método de Doyle & Doyle, además de que el protocolo es más sencillo. Sin embargo, el segundo experimento, nos revela que en el caso de *Ganoderma* no siempre se eliminan los pigmentos, aún con el método de proteinasa K. Así, la cantidad de pigmentos en la muestra dependerá del tejido utilizado. Es importante señalar que con estos dos experimentos se logró establecer tanto la cantidad de reactivos óptima, como la cantidad de muestra en mg a utilizar.

Extracción de DNA

En cuanto a los resultados obtenidos de las 130 extracciones de DNA de las muestras de *Ganodermas*, 115 se efectuaron con el protocolo con Proteinasa K, mientras que sólo 15 fueron procesadas con el método de Doyle & Doyle. El análisis del DNA obtenido en el gel de agarosa al 2% mostró que la mayoría de las muestras (67%) obtenidas con el método con proteinasa K, no presentan ninguna banda de DNA de alto peso molecular o degradado, el 9% de las muestras procesadas mostraron un barrido que indica DNA altamente degradado, y solo el 24% mostró una banda de DNA de alto peso molecular. Como puede observarse en el Cuadro I, el análisis de los resultados obtenidos en la extracción de DNA a partir de los dos tipos de tejidos: contexto y tubo, no muestran diferencias. Con respecto a las muestras obtenidas con el protocolo Doyle & Doyle, el análisis mostró que en el 53% de las muestras no se observó ninguna banda en el gel, mientras que en el 47% de las muestras se registró una banda de DNA de alto peso molecular. La mayoría de los especímenes de *Ganodermas*, fueron colectados hace siete a cincuenta años atrás, lo que explica la ausencia de banda en el gel.

De cualquier manera, sabemos que ambos protocolos de extracción de DNA son adecuados para muestras frescas o colectados en los últimos cinco años ya que en muestras con estas características se observan bandas de DNA de alto peso molecular en el gel de agarosa. Es

importante señalar que en el gel también se observaron pigmentos co-extraídos con el DNA, como un barrido intenso en el fondo del gel, lo que impide la cuantificación del DNA por espectrofotometría.

Cuadro I. Resultados del análisis del DNA obtenido de muestras de *Ganodermas*.

Análisis de la Electroforesis	Proteinasa K		Doyle & Doyle	
	Tubo	Contexto	Tubo	Contexto
Sin banda en el gel	40	37	5	3
Banda de DNA de alto peso molecular	16	12		
Banda de DNA altamente degradado	5	5	4	3

Amplificación con PCR de secuencias ITS

Los productos de PCR obtenidos con el par de cebadores ITS1-F e ITS4 se observaron en la mayoría de los casos como una banda en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos de PCR, para el ITS completo es las muestras de *Ganoderma* fue de 700 pb. Algunas muestras de DNA también amplificaron una banda inespecífica de 500 pb (Fig. 1A). Hasta ahora se cuenta con los resultados de 253 reacciones de PCR, en donde sólo el 30% mostró amplificación en la banda de interés. Finalmente es importante señalar que una vez que se prueba que las muestras de DNA no amplifican para el ITS completo, se probará una reamplificación con 1µl del producto de PCR y aumentando en el programa de alineación 1°C. En donde como se puede observar en la Fig. 1B, ya se ha logrado la amplificación de algunas muestras de *Ganoderma*.

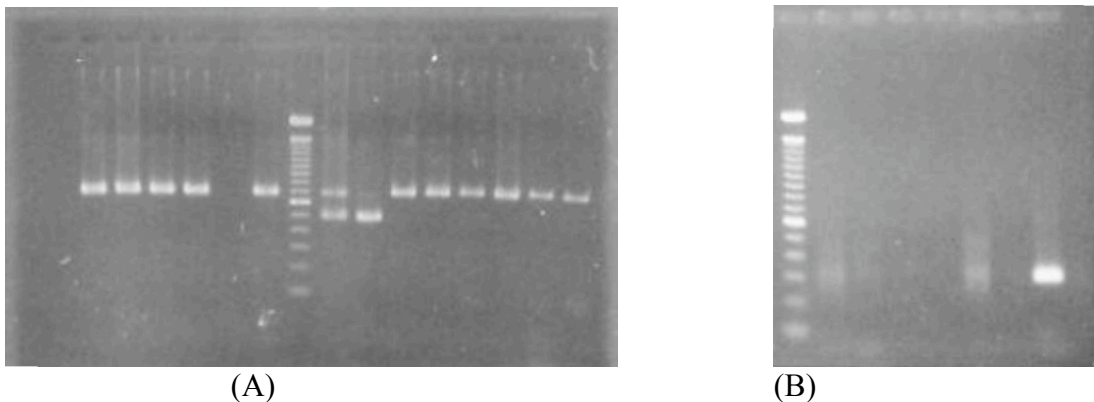


Figura 1. Amplificación por PCR de la secuencia ITS completa (A). Reamplificación de la región ITS2 (B).

Agradecimientos

Proyecto CONACYT 42957 con LGD como investigador responsable. Proyecto U de G P3E 32980 (2005) con ARVA como investigador participante. Beca CONACYT para Laura Izascum Pérez Valencia. PAY-SNI para Adrián Galván Corona.

Bibliografía

- Adaskaveg, J.E. y R.L. Gilbertson. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae* in relation with taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 80: 493-507.
- Adaskaveg, J.E. y R.L. Gilbertson. 1988. Basidiospores, pylocistidia and other basidiocarp characters in several species of *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia* 80: 493-597.
- Aljanabi, S.M. y I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acid research* 25: 4692-4693.
- Alvarez, I. y J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*. 29:417-434.
- Bailey, C.D., T.G Carr, S.A. Harris y C.E. Hughes. 2003. Molecular Phylogenetics and evolution 29:435-455.
- Básalo, M. E. y J.E. Weight. 1982. Survey of the argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16: 293-325.
- Corner, E. J. H. 1983. Ad Polyporaceas I, *Amauroderma* and *Ganoderma*. Beih. Nova Hedw. 75, Cramer, Vaduz.
- Doyle, J.J., J.L. Doyle. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19,11-15.
- Furtado, J. S. 1965. Relation of microstructure of the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Micologia* 57. 588-611.
- Gilbertson, R. L. y L. Ryvardeen. 1986. North American Polypores. Vol. 1 Fungiflora, Oslo.
- Hawksworth, D.L.1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. P. M. Kirk, B.C. Sutton & D. N. Pegler.1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CAB. International, Wallingford. 8 ed.

- Hong, S.G. y H.S. Jung, 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycology* 96: 742-755.
- Miller, R.N., G. M. Holderness, P.D. Bridge, R.R.M. Paterson, M. Sariah, M.Z. Hussin y E. J. Hilsley. 1995. A multidisciplinary approach to the characterization of *Ganoderma* in oil-palm cropping systems. In : Buchanan, P.K., R. S. Hseu y J.M. Moncalvo (eds). Proceedings of contributed symposium 59A, B5th International Mycological Congress, pp 57-66. Taipei.
- Moncalvo, J.M., R. Vilgalys, S.A. Redhead, *et al.* (2002). One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 357-400.
- Palomera, V. 2002. Comparación de métodos de extracción de DNA de diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus spp.*). Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara, México.
- Palomera, V. 2005. Interacción entre *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales, Spiroplasmataceae), su huésped *Dalbulus maidis* (Hemiptera, Cicadellidae) y enemigos naturales. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara, México.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of Polypores Nomenclature and taxonomy synopsis Fungorum 5. Fungiflora. Oslo.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2. A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with laccate pileus. *Mycology* 92:180-191.
- Rossman, A.Y. 1994. A strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity. In: Peng. C. I. & C.H. Chou (eds.). Biodiversity and terrestrial ecosystems Academia Sinica Monographs, series 14, Taipei.
- Steyaert, R. L. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 50: 135-186.
- Zervakis, G. I., J. Moncalvo y R. Vilgalys. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Mycrobiology*. 150: 715-726.