

ISBN: 970-27-0770-6

**EXTRACCIÓN DE DNA Y AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ITS  
EN  
*Psilocybe* (AGARICALES, FUNGI)**

**Alma Rosa Villalobos Arámbula, Mariana Escobar Ibañez, Anne  
Santerre  
Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular y  
Molecular**

**Gastón Guzmán Huerta, Etelvina Gándara Zamorano  
Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz**

**Laura Guzmán Dávalos, Departamento de Botánica y Zoología**

### **Introducción**

La sistemática es el estudio de las relaciones y clasificación de los organismos y los procesos por los cuales han evolucionado y por los cuales se mantienen (Hawksworth *et al.* 1995). Los trabajos de sistemática en hongos que consideran reconstrucciones filogenéticas involucran, cada vez más, datos moleculares y morfológicos que permitan generar mejores hipótesis. Por lo que es sumamente importante contar con el conocimiento previo y profundo del género *Psilocybe*, dada la necesidad primordial de elegir adecuadamente las unidades que serán sometidas a análisis (tanto del grupo interno, como externo) de acuerdo a la variación detectada en ellas.

El género *Psilocybe* es muy importante, ya que en él se encuentran las especies de hongos alucinógenas más conocidas en el mundo. Se conocen más de 80 especies con propiedades enteogénicas. Se caracteriza por tener basidiomas de color café o amarillento con láminas del mismo color o con tonos violeta o púrpura. Las esporas son de color café en solución de KOH, elipsoidales, romboidales o subhexagonales en vista lateral, lisas, con un ancho poro germinal que las hace ver truncadas. Los queilocistidios son hialinos o de color café. El pileipellis es un cutis o un ixocutis y presentan además un subpellis.

Guzmán (1983) en su monografía del género, lo dividió en 18 secciones, con base en la forma, color y grosor de la pared de las esporas, color de los pleurocistidios y queilocistidios, presencia o ausencia de anillo, y si se manchan de azul. Posteriormente, Guzmán (1995) publicó un suplemento a la monografía, en donde revisa la clasificación. Más tarde, Noordeloos (e.g. 1998, 1999, 2001) revisó las especies europeas y consideró al género en un sentido más amplio, incluyendo *Hypholoma*, *Stropharia* y *Melanotus*. Boekhout *et al.* (2002) re-estructuraron la

sección *Psilocybe*, con datos morfológicos, apareamientos de cepas y de marcadores RAPD's. Finalmente, Moncalvo *et al.* (2002) encontró las especies no alucinógenas del género en un clado distinto al de las alucinógenas, al cual tentativamente llamó "psychedelia".

De las tres etapas básicas que involucra el análisis filogenético: análisis de caracteres, búsqueda de árboles y pruebas de robustez; el análisis de caracteres representa sin lugar a dudas el elemento crucial, ya que éste constituye la base para la reestructuración de hipótesis, lo que representa el análisis de una gran cantidad ejemplares, cuidadosamente seleccionados; así como de caracteres moleculares confiables.

El estudio de las secuencias de DNAr ha proporcionan información útil para algunos grupos de basidiomycete, en particular datos de relaciones evolutivas y especiación junto con biogeografía. Dentro del *locus* DNAr la región ITS ha sido particularmente útil en el análisis de especies muy cercanas en muchos géneros (Zervakis *et al.* 2004).

La región espaciadora interna transcrita (ITS) contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del DNAr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes para RNAr de la subunidad grande (Gardes & Bruns 1993).

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 aún cuando se utilicen muestras de DNA pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (DNA obtenido de material viejo y especímenes de herbarios). Finalmente, diversos estudios demuestran su utilidad en análisis filogenético (Álvarez & Wendel, 2003; Gardes & Bruns 1993).

Hasta ahora, son todavía confusos los límites del género *Psilocybe*, así como su clasificación infragenérica. Por lo que es necesario definir si el género *Psilocybe* (Basidiomycetes, Agaricales, Strophariaceae) es un grupo monofilético, además de analizar la validez de las clasificaciones tradicionales infragenéricas de *Psilocybe* con caracteres morfológicos y moleculares. Así, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos de extracción de DNA y amplificación de ITS de 214 muestras del género *Psilocybe* y seis muestras de grupos internos y externos.

## **Material y métodos**

### **Ejemplares de hongos**

Para la selección de las 214 muestras del género *Psilocybe* se consideró la clasificación tradicional del grupo. Así se incluyeron 156 especies, colectadas entre 1916 y 2005. Es importante señalar que se cuenta con 72 muestras de tipos

(ejemplares en los que se basa la descripción de una especie nueva) de herbarios de todo el mundo; estas muestras datan de 1950 al 2005. Además se incluyeron como grupos externos los siguientes materiales: *Panaeolus sphinctrinus*, *Copelandia cyanescens*, *Stropharia semiglobata*, *Hypholoma aurantiaca*, *Melanotus alpinae* y *Pholiota carbonaria*.

### **Extracción de DNA**

Es importante trabajar con materiales tipo, a fin de asegurar la identidad de las muestras. Sin embargo, esto acarrea numerosas dificultades. Muchos materiales tipo son colectas únicas y muy antiguas, con material escaso y en malas condiciones, de las que no es nada fácil extraer el DNA. Así, para la optimización del método de extracción de DNA a partir de pequeñas muestras de herbario (1 a 5 mg), se procesaron cinco muestras con dos métodos previamente utilizados en el laboratorio de Genética: un método con proteinasa K (Aljanabi *et al.* 1997, Palomera 2005) y el método de Doyle & Doyle (1987) (Palomera 2002). La calidad del DNA extraído se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook *et al.* 1989).

#### *Protocolo de Extracción de DNA*

Para la extracción de DNA a partir de pequeñas muestras de herbario de *Psilocybe* (0.1 a 6 mg), se utilizó el método con proteinasa K, ya que en general se obtuvieron mejores resultados y es más sencillo que el método de Doyle & Doyle. Además fue necesario adaptar el protocolo de extracción a un *micrométodo* con muestras de menos de 1 mg y a un *minimétodo* al trabajar con muestras de entre 1 – 6 mg. La calidad del DNA extraído se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook *et al.* 1989).

La muestra (0.1 o 1 -6 mg) colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se congeló al sumergir el microtubo en nitrógeno líquido; el tejido congelado se trituró con un homogenizador de metal. Para la etapa de lisis celular se agregaron 400 (800)  $\mu$ l de buffer salino de lisis (NaCl 2M, Tris-HCl 0.5M, EDTA 0.5M) con PVP al 1%, se homogeneizó suavemente por inversión y se incubó a 65°C por 45 min. Se adicionaron 40 (80)  $\mu$ l de SDS al 20% y 4  $\mu$ l de proteinasa K (10mg/ml). Se agregaron 300 (600)  $\mu$ l de NaCl 6M y se mezcló con vortex por 30 seg. Se centrifugó a 4°C por 45 min a 14 000 rpm. La fase acuosa se transfirió a uno o dos tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos (en ocasiones es necesario repetir el paso de centrifugación ya que se observan restos de tejidos en el sobrenadante, sobre todo cuando se trabaja con muestras de más de 2.5 mg). Se precipitó el DNA con un volumen igual de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se incubó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 14000 rpm por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó a 4°C por 10 min a 14 000 rpm, dos o tres veces. Se diluyó en 25- 100  $\mu$ l de TE (Tris 1M pH 7.4, EDTA 0.5 M). Se disolvió a temperatura ambiente toda la noche. Se almacenó a - 20°C hasta su uso.

## Amplificación de ITS

Para la amplificación por PCR de la secuencia ITS completa en muestras de hongos se encuentran disponibles cuatro pares de cebadores: ITS1F-ITS4, ITS1-ITS4, ITS1-ITS4S e ITS5-ITS4 (Guzmán-Dávalos *et al.* 2003). Para la amplificación de la región ITS del DNA obtenido de las 214 muestras de hongos del genero *Psilocybe* se utilizó el par ITS1-F + ITS4.

Se inició la estandarización y optimización de la reacción de PCR siguiendo el procedimiento ya descrito en Guzmán-Dávalos *et al.* 2003 con algunas modificaciones. En cada 20  $\mu$ l de la reacción de PCR se utilizaron 16.8  $\mu$ l de mezcla PCR con MgCl<sub>2</sub> 2.5 Mm que contiene: 2  $\mu$ l de Buffer 10X (Tris 100 mM, KCL500 mM), 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 Mm, 1  $\mu$ l dNTPs 5 Mm, 1  $\mu$ l BSA mg/ml y 11.8  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O; 2.2  $\mu$ l de mezcla Primer-Taq (1  $\mu$ l Primer 5' 10<sup>-6</sup> M, 1  $\mu$ l Primer 3' 10<sup>-6</sup> M, 0.2  $\mu$ l TaqPol 5 U/ ) y 1  $\mu$ l de DNA sin diluir.

Las condiciones de amplificación en el termociclador MJ PT100 que se utilizaron fueron las siguientes: 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.

Para la optimización se llevaron a cabo ensayos con diferentes concentraciones de algunos de los componentes de la reacción: cantidad de DNA (1-3  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 1.5 a 3.5 mM, dNTPs 100-200 mM, 200 Mm de cada cebador y 0.025 – 1 U de Taq Polimerasa).

Para el análisis de los productos amplificados se aplicaron 5  $\mu$ l de producto de PCR con 2  $\mu$ l de buffer de carga 6X, en un gel de agarosa al 2%. Como marcador de DNA se utilizó la escalera de DNA de 100 pb de Invitrogen. El gel se tiñó con bromuro de etidio (c.c. 10 mg/ml) durante 5-10 min.

## Resultados y discusión

En cuanto a los resultados obtenidos en la extracción de DNA de las 214 muestras de *Psilocybe* con el método con Proteinasa K, el análisis del DNA en geles de agarosa al 2% mostró que la mayoría de las muestras no presenta ningún tipo de banda en el gel (60%); el 20% de las muestras procesadas mostraron un barrido casi desde el punto de aplicación de la muestra, por lo que se clasificaron como banda de DNA altamente degradado; el restante 20% mostró banda de DNA de alto peso molecular acompañado en ocasiones con DNA medianamente degradado.

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 fue de cerca de

700-750 pb. Algunos productos de PCR mostraron dos o más bandas inespecíficas de 500 y/o 1000 pb.

Finalmente es importante señalar que el 43% de las muestras de DNA sin banda en el gel de agarosa, mostraron amplificación de la banda de interés (700-750 pb), mientras que casi la mitad (49%) de las muestras con banda de DNA clasificadas como altamente degradadas amplificaron para el ITS completo, finalmente el 93% de las muestras que mostraron bandas de DNA de alto peso molecular amplificaron la secuencia completa de ITS. Por lo que como puede observarse con estos datos, el protocolo de extracción es el adecuado para muestras de *Psilocybe*, y las modificaciones para el tamaño de nuestras muestras fueron las adecuadas.

**Agradecimientos:** Proyecto CONACYT 42957 con LGD como investigador responsable. Proyecto P3E 32980 (2005) para ARVA como investigador participante. PAY-SNI 1732539 para MEI.

## Bibliografía

Aljanabi SM, Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.

Álvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.

Boekhout T, Stalpes J, Verduin SJW, Rademaker J, Noordeloos ME. 2002. Experimental taxonomic studies in *Psilocybe* sect. *Psilocybe*. *Mycol. Res.* 106: 1251-1261.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.

Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

Guzmán G. 1983. The genus *Psilocybe*. Beith. Nova Hedwigia 74, Cramer, Vaduz.

Guzmán G. 1995. Supplement to the monograph of the genus *Psilocybe*. In: Petrini O, Horak E (eds.). Taxonomic monographs of Agaricales. Bibliotheca Mycologica 159. Cramer, Berlín-Stuttgart.

Guzmán L, Mueller GM, Cifuentes J, Miller AN, Santerre A. 2003. Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 95: 1204-1214.

Hawksworth DL, Kirk PM, Suttonj BC, Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford. 8° ed.

Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hofstetter V, Verduin SJW, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RG, Jacobsson S, Cléménçon H, Miller Jr OK. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.

Noordeloos ME. 1998. Fungi no deliniati 4. *Pholiota*, *Psilocybe* and *Panaeolus*. *Mykoflora* 1, Alassio.

Noordeloos ME. 1999. Notulaea floram agarinam Neerlandica XXXIV. Further notes of *Psilocybe*. *Persoonia* 17: 245-257.

Noordeloos ME. 2001. Studies in *Psilocybe* sect *Psilocybe*. *Osterr. Z. Pilzk* 10: 115-180.

Palomera V. 2002. Comparación de métodos de extracción de DNA de doferentes 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.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.

Zervakis GI, Moncalvo JM, Vilgalys R. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology* 150: 715-726.