

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIAL DE HERBARIO DE *GANODERMA* (FUNGI, BASIDIOMYCETES)

METHODOLOGY FOR DNA EXTRACTION FROM HERBARIUM SPECIMENS OF *GANODERMA* (FUNGI, BASIDIOMYCETES)

MABEL GISELA TORRES-TORRES^{1,2}, LAURA GUZMÁN-DÁVALOS², ALMA ROSA VILLALOBOS-ARÁMBULA³

RESUMEN

Ganoderma es un género que presenta una distribución cosmopolita. Debido su importancia en el área de la salud (obtención de medicamentos novedosos) y a su carácter fitopatogénico en árboles de importancia económica, en la última década se han realizado esfuerzos para la comprensión de sus relaciones filogenéticas, variabilidad morfológica, genética y diagnóstico temprano en el caso de especies fitopatogénicas. Sin embargo, en estudios moleculares ha sido complicado incluir muestras representativas de diferentes grupos, porque es difícil disponer de material fresco o recién recolectado. Por esta razón, es de gran importancia buscar alternativas para la obtención de ADN a partir de material de herbario. Se probaron dos métodos de extracción de ADN, los cuales fueron modificados para optimizarlos, y se logró obtener ADN de materiales de más de 100 años de antigüedad.

Palabras clave: Basidioma; Material viejo; Sistemática.

ABSTRACT

Ganoderma genus presents a cosmopolitan distribution, has human's health uses and economic value as phytopathogen for forestry industry, in the last decade many efforts have been done in order to understand its phylogenetic relationships, morphology, genetic variability and early diagnosis as phytopathogen species. Nevertheless, for molecular studies has been complicated to include samples of different groups, due to difficulties to get fresh materials. For this reason, we inquired for alternatives to extract DNA from available herbarium's materials. In this paper we proved two methods of DNA's extraction, which were modified in order to improve its efficiency and to get samples as older as one hundred years.

Keywords: Basidiomata; Old material; Systematics.

INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia que tienen los hongos del género *Ganoderma* en el área de la salud (obtención de medicamentos novedosos) y a su carácter fitopatogénico en distintos tipos de árboles de importancia económica, en la última década se han realizado esfuerzos para la comprensión de sus relaciones filogenéticas (Moncalvo *et al.*, 1995; Gottlieb *et al.*, 2000), variabilidad morfológica y genética

(Bazzalo y Wright, 1982; Ryvardeen, 2000), y diagnóstico temprano en el caso de especies fitopatogénicas (Idris *et al.*, 2003). Sin embargo, en general los análisis moleculares se han realizado con ADN genómico obtenido a partir de cultivo miceliar. Esto representa una ventaja por la menor dificultad en el proceso de extracción, por la naturaleza de la muestra, pero también limita el número de especímenes que pueden ser estudiados, porque muchas veces es difícil obtener cultivos puros en el labora-

1. Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Chocó, Colombia. e-mail: magitoto@yahoo.com

2. Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México. e-mail: lguzman@cucba.udg.mx

3. Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México. e-mail: avillal@cucba.udg.mx

Fecha de recibido: Febrero 13, 2008

Fecha de aprobación: Mayo 28, 2009

torio, sobre todo cuando se trata de material de herbario muy viejo o en mal estado, a partir del cual la obtención de la cepa es poco probable. Por ejemplo, en muchos casos es importante trabajar con materiales tipo (especímenes de herbario en los que se basaron para describir una especie nueva), a fin de asegurar la identidad de las muestras. El problema radica en que muchos materiales tipo son colecciones únicas y muy antiguas, de las que es imposible realizar un aislamiento para su cultivo. Por otro lado, en muchos casos no se cuenta con material fresco para su cultivo. Este trabajo tiene como objetivo probar y estandarizar metodologías para la extracción de ADN a partir de basidiomas de material de herbario recolectados en diferentes fechas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la extracción de ADN total usando los métodos de Aljanabi & Martínez (1997) y Doyle & Doyle (1987), a partir de 25 mg de basidioma seco. El material se trituró previamente con nitrógeno líquido en mortero manual de 50 ml. Ambos métodos probados se modificaron para lograr obtener un mejor rendimiento. El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 0.8%. Se procesaron 44 muestras, entre las que se incluyó de manera independiente, fragmentos de contexto y tubos de los basidiomas. Se incluyeron especies de contexto claro y oscuro. Estas muestras corresponden a 10 especies: *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *G. argillaceum* Murrill, *G. curtisii* (Berk.) Murrill, *G. fornicatum* (Fr.) Pat., *G. lobatum* (Schwein.) G.F. Atk., *G. orbiforme* (Fr.) Ryvardeen, *G. oregonense* Murrill, *G. pfeifferi* Bres., *G. perzonatum* Murrill y una muestra de *Amauroderma* sp. Los especímenes se recolectaron entre los años 1904 y 2003.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el método de Doyle & Doyle (1987) se realizaron pruebas usando fenol/cloroformo y sólo cloroformo para la precipitación del ADN. Con el método de Aljanabi & Martínez (1997) se usaron va-

rias modificaciones: agregar PVP al 1%, usar RNasa, mantener la proteína K a 37°C durante toda la noche, o a 65°C por una hora, o disminuir su cantidad a la mitad. Para ambos métodos se aumentó el número de lavados (hasta 3) y el tiempo de lavado (hasta 15 min) con etanol. La opción de 3 lavados de 15 min fue la que mejores resultados presentó y por eso se decidió continuar realizando modificaciones con base en estos resultados.

Con los cambios realizados con el etanol se obtuvieron resultados satisfactorios con los dos métodos para especímenes recolectados recientemente (desde 1990 a la fecha). Sin embargo, el ADN de especímenes viejos o muy viejos (desde 1900 a 1980), no se pudo visualizar en el gel de agarosa, a pesar de que se observó una pastilla y las lecturas en el espectrofotómetro fueron adecuadas. La calidad del ADN se determinó por el promedio A260/A280, el cual fue >1.009 para todas las muestras.

En la mayoría de los casos, el ADN aislado con el método de Aljanabi & Martínez (1997) tuvo problemas de altas concentraciones de sal y contaminación con ARN y pigmentos, visualizados en el gel de agarosa como una banda superior o un barrido, respectivamente (Figura 1). La sal fue eliminada reprecipitando el ADN y aumentando el número de lavados a tres con etanol al 70%. Para el problema del ARN al principio se usó ARNasa, pero debido a que el ARN suele degradarse con el tiempo (15-20 días en este caso), se decidió no usarla (Figura 2). El ADN presentó una coloración oscura, que también fue disminuida con lavados con etanol, aunque en algunos casos no se logró eliminar el pigmento completamente. La coloración de la pastilla de ADN no parece estar asociada con el color del contexto ni de los tubos, más bien se podría deber a sustancias cromógenas o fenoles, que quizá en algunos casos hacen que se registre lectura en el espectrofotómetro en la longitud de onda que corresponde al ADN. Tanto los tubos como el contexto son materiales adecuados para la extracción del ADN, pero los tubos son de más fácil procesamiento.

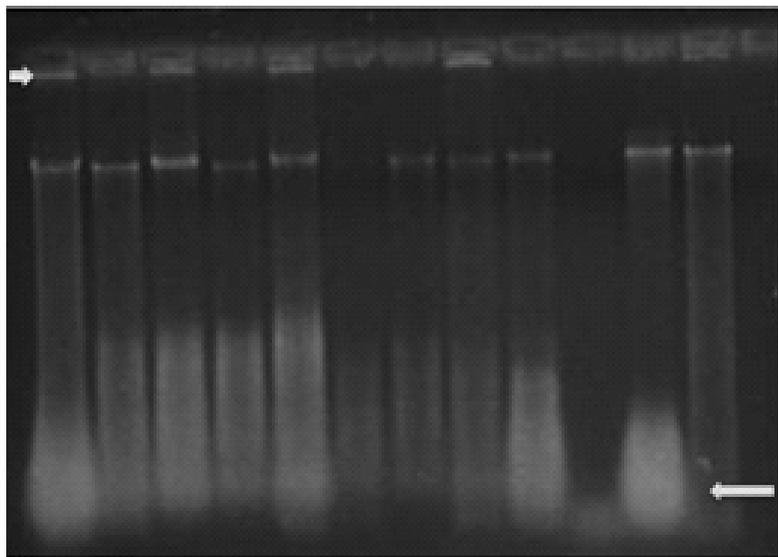


Figura 1. ADN usando protocolo de Aljanabi & Martínez (1997). Se observa la banda superior de sal (flecha corta) y el barrido inferior debido al ARN (flecha larga)



Figura 2. ADN después de re-precipitación y lavado con etanol sin banda superior ni barrido. Para las otras no se observaron bandas

No se encontraron diferencias importantes en el ADN aislado a partir de tubos y contexto; sin embargo, es relevante mencionar que el material proveniente de tubos es más fácil de triturar y manipular, que el material de contexto. Al contrario de lo que se esperaba, *G. oregonense*, especie de contexto claro, presentó una pastilla muy coloreada, mientras que el ADN de *G. orbiforme*, de contexto oscuro, no presentó pigmentación. Las otras muestras se comportaron de acuerdo con la coloración del contexto. Sin em-

bargo, se presentó un barrido muy intenso de ARN en el gel de agarosa en casi todas las muestras, independientemente de que fueran de contexto claro u oscuro.

Es importante la re-precipitación cuidadosa para lograr un ADN más limpio. También es necesario realizar modificaciones a los protocolos de extracción que permitan una mayor optimización del proceso y obtención de ADN de material viejo o muy viejo. Los dos métodos con modificaciones presentan una alternativa para la extracción de ADN del material de herbario; el de Aljanabi & Martínez (1997) es un método más sencillo que requiere menos tiempo de preparación y procesamiento de las muestras.

CONCLUSIONES

El aumentar el número de lavados del ADN con etanol, mejora la calidad de éste y disminuye la coloración. No existen diferencias significativas en cuanto a calidad del ADN en los dos métodos utilizados. Tanto los tubos como el contexto son propicios para la extracción del ADN, aunque los tubos presentan una ventaja en relación con la facilidad para procesar la muestra.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los curadores de los herbarios ENCB, HAJB, INBIO, ENCB y XAL, quienes proporcionaron los materiales para el estudio. Los fondos para el desarrollo del proyecto fueron otorgados por

CONACYT (proyecto CONACYT-SEP-2003-C02-42957), Universidad de Wageningen-Proyecto NUFFIC y la Universidad de Guadalajara (proyectos 50052, 62935, 88583 y PFI 3.3 CA-UDG-44). Se reconoce a la Universidad Tecnológica del Chocó por los fondos para los estudios de doctorado de MG Torres-Torres.

LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S.M.**, I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4692-3.
- Bazzalo, M.E.**, J.E. Wright, 1982. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon.* **16**: 293-325.
- Doyle, J.J.**, J.L. Doyle, 1987. A rapid isolate procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* **19**: 11-5.
- Gottlieb, A.M.**, E. Ferrer, J.E. Wright, 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycol Res.* **104**: 1003-45.
- Idris, A.S.**, M. Yamaoka, S. Hayakawa, M.W. Basri, I. Noorhasimah, D. Ariffin, 2003. *PCR technique for detection of Ganoderma*. MPOB Information, Series 188.
- Moncalvo, J.M.**, H.H. Wang, R.S. Hseu, 1995. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol Res.* **99**: 1489-99.
- Ryvarden, L.** 2000. Studies in neotropical polypores 2: A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with laccate pileus. *Mycologia.* **92**: 180-91.