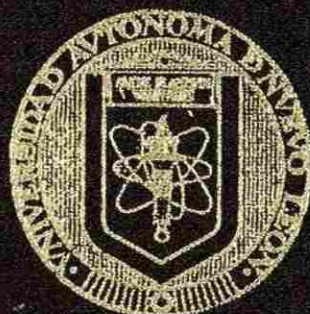


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



ESTUDIOS MOLECULARES DEL HONGO
COMESTIBLE Y ECTOMICORRIZOGENO
Cantharellus spp. DE ALGUNAS LOCALIDADES
DE MEXICO

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE
RECURSOS NATURALES

PRESENTA

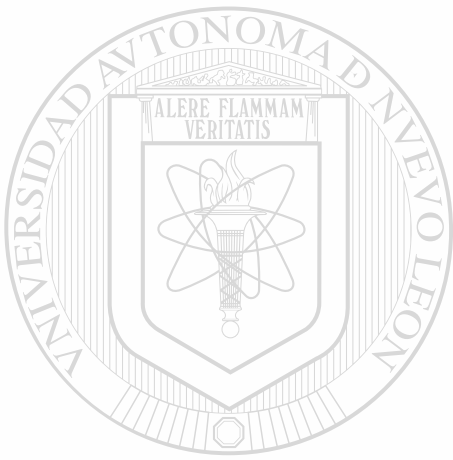
M.Sc. GONZALO GUEVARA GUERRERO

LINARES, N. L.

NOVIEMBRE 2003

TD
Z5991
FCF
2003
. G8

M.Sc. GONZALO GUEVARA GUERRERO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**



**ESTUDIOS MOLECULARES DEL HONGO COMESTIBLE Y
ECTOMICORRIZÓGENO *Cantharellus* spp. DE ALGUNAS
LOCALIDADES DE MÉXICO**

TESIS DOCTORAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

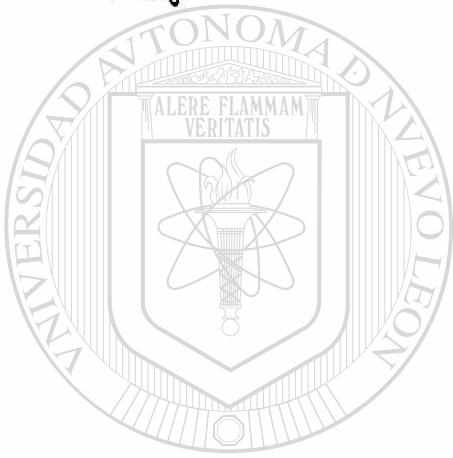
M.Sc. GONZALO GUEVARA GUERRERO

Linares, N.L.

Noviembre del 2003

990334

TD
Z5991
FCF
2003
.G8



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS

Estudios moleculares del hongo comestible y ectomicorrizógeno *Cantharellus* spp. de algunas localidades de México

Aprobación de tesis:




Dr. Fortunato Garza Ocañas
Presidente



Dr. José Guadalupe Marmolejo Moncivais
Secretario



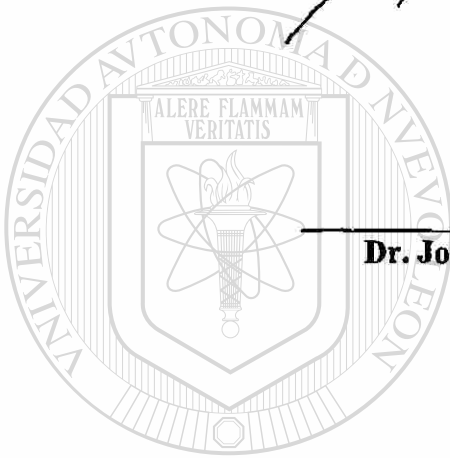
Dr. César M. Cantú Ayala
Vocal



Dr. Andrés Eduardo Estrada Castellón
Suplente



Dr. Efrén Cázarez González
Asesor externo
Oregon State University



UANL

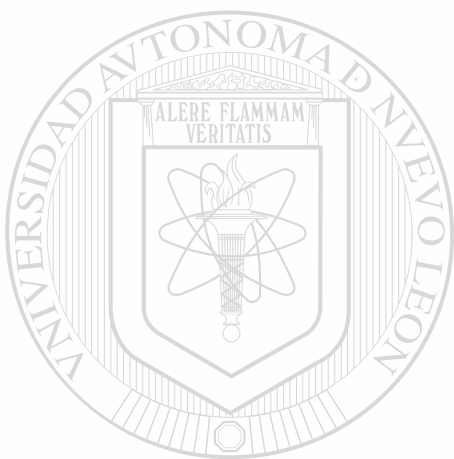
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dedicatoria

A la memoria de mi padre, Félix Guevara Martínez, a mi madre Filadelfa Guerrero Aguilar, a mi hijo Félix Alberto, a mis hermanos y hermanas Francisco, Félix, Daniel, Josefina y Maria.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

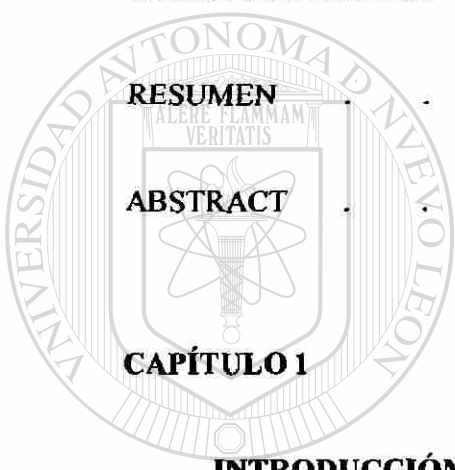
Agradecimientos

El autor desea agradecer al Dr. Fortunato Garza Ocañas por asesorar y dirigir esta tesis. Así mismo se agradece al Dr. José Guadalupe Marmolejo Moncivais, Dr. César Cantú Ayala, y Dr. Eduardo Estrada Castellón por asesorar y compartir su experiencia para fortalecer esta investigación. Al Dr. Efrén Cázares González se le agradece por su apoyo y hospitalidad en mi estancia en la Universidad del Estado de Oregon en los E.U.A. Al Dr. Jorge Horta Vega por su apoyo incondicional para concluir esta investigación. Al Dr. Joseph Spatafora, Dr. Randy Molina, Dr. James Trappe, y Dr. Mike Castellano Ms. Doni McKey por la asesoría, apoyo técnico y por las facilidades para utilizar sus Laboratorios de Biología Molecular en la Universidad del Estado de Oregon y del Forest Service de los E.U.A. Al M.C. Juan Flores Gracia, por su ayuda en Biología Molecular. A la Bióloga Ana Gabriela Zúñiga Medina por sus consejos, comentarios y quien sin su ayuda esta investigación no hubiera sido posible. Al M.C. José Castillo Tovar, incansable estudioso de los hongos, por sus observaciones y comentarios siempre certeros. Al M.C. Jorge Verduzco y Dra. Ursel Kües se les agradece por su apoyo en el análisis de las secuencias génicas. Al M.C. Jesús García Jiménez, Raúl Díaz Moreno, colegas, amigos, profesores y demás personas cuyos nombres escapan a mi memoria, que directa o indirectamente apoyaron mi programa doctoral, gracias.

De igual manera se agradece al COSNET y al CONACYT el apoyo económico brindado para llevar a cabo esta investigación. Además, se le da créditos a la DGIT por otorgar el permiso (comisión) para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	I
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS.	IV
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	I
<hr/>	
1.1 Taxonomía del género <i>Cantharellus</i>	1
1.2 Importancia ecológica, económica y nutricional del género <i>Cantharellus</i>	4
1.3 Estudio del ITS (espaciador transcrito interno) nuclear en <i>Cantharellus</i> spp.	8
1.4 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear del hongo ectomicorrizógeno <i>Cantharellus</i>	10
1.5 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura (síntesis de ectomicorrizas de <i>Cantharellus cibarius</i> con <i>Quercus</i> sp.)	12
1.6 Justificación	15
1.7 Objetivo general	16
1.8 Objetivos particulares	16



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.9 Hipótesis	16
----------------------	----

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Diagrama general de la investigación	17
2.2 Taxonomía morfológica de <i>Cantharellus</i> spp.	18
2.2.1 Micogeografía de <i>Cantharellus</i> spp.	18
2.2.1.1 Trabajo de campo	18
2.2.1.2 Trabajo de laboratorio.	18
2.2.2 Descripción de <i>Cantharellus</i> spp.	19
2.3 Taxonomía molecular	19
2.3.1 Estudio del ITS nuclear en el género <i>Cantharellus</i>	21
2.3.1.1 Protocolo para la extracción de ADN	22
2.3.1.2 Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
2.3.1.3 Protocolo para el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	24
2.3.2 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear.	25
2.3.2.1 Protocolo para la extracción de ADN	25
2.3.2.2 Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.3.2.3 Protocolo para PCR para secuenciación de nucleótidos	27
2.3.2.3.1 Preparación de gel para secuenciar	27
2.3.2.3.2 Condiciones de PCR para secuenciar	28
2.3.2.3.3 Precipitación de acetato de sodio/etanol	29
2.4 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura	30
2.4.1 Aislamiento y propagación asexual de <i>Cantharellus cibarius</i>	30
2.4.2 Germinación de semillas de <i>Quercus</i> sp.	31
2.4.3 Identificación molecular (PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos) de los cultivos puros de <i>Cantharellus cibarius</i> .	31
2.4.4 Síntesis de ectomicorizas <i>in vitro</i> de <i>Cantharellus cibarius</i> y <i>Quercus</i> sp..	31

2.4.5 Método de Phillips y Hayman para la determinación de estatus micorrícico en la síntesis de ectomicorrizas	32
---	----

CAPÍTULO 3

RESULTADOS	34
3.1 Taxonomía morfológica	34
3.1.1 Micogeografía de las especies del género <i>Cantharellus</i>	35
3.1.2 Descripción de las especies	36
3.1.2.1 <i>Cantharellus cibarius</i>	36
3.1.2.2 <i>C. lateritius</i>	39
3.1.2.3 <i>C. cinnabarinus</i>	41
3.1.2.4 <i>C. minor</i>	43
3.1.2.5 <i>C. formosus</i>	45
3.1.2.6 <i>Cantharellus</i> sp.	47
3.2 Taxonomía molecular	49
3.2.1 Estudios del ITS en el género <i>Cantharellus</i>	49
3.2.2 Estudios de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear	67
3.3 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura	84
3.3.1 Aislamiento y propagación asexual de <i>Cantharellus cibarius</i>	84
3.3.2 Identificación molecular (PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos) de un cultivo puro de <i>Cantharellus cibarius</i>	84
3.3.3 Descripción de la colonia de <i>Cantharellus cibarius in vitro</i>	85
3.3.4 Síntesis de ectomicorrizas <i>in vitro</i> de <i>Cantharellus cibarius</i> y <i>Quercus</i> sp.	86
3.3.5 Método Phillips y Hayman para la determinación del estatus micorrícico en la síntesis de ectomicorrizas	87

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN	90
4.1 Taxonomía morfológica de las especies de <i>Cantharellus</i>	90
4.2 Micogeografía de las especies de <i>Cantharellus</i> estudiadas de México	91
4.3 Estudio del ITS de las especies de <i>Cantharellus</i>.	91
4.4 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en las especies de <i>Cantharellus</i>	93
4.5 Síntesis de ectomicorrizas de <i>Cantharellus cibarius</i> con <i>Quercus</i> sp.	95

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES	100
-------------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	101
-------------------------------	-----

ANEXOS	111
-------------------------	-----

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla	
1.- Especie, hábitat, localidad, número y año de colecta de <i>Cantharellus cibarius</i> estudiadas molecularmente de México	50
2.- Especie, hábitat, localidad, número y año de colecta de las especies de <i>Cantharellus</i> estudiadas molecularmente de México	51
3.- Número de pares de bases del ITS nuclear completo de <i>Cantharellus cibarius</i> de diferentes localidades y hábitat de México	59
4.- Número de pares de bases del ITS nuclear completo de las especies de <i>Cantharellus</i> de México	62
5.- Número de pares de bases del ITS nuclear completo de algunas especies de <i>Cantharellus</i> de diferentes localidades de México	65
6.- Especies de <i>Cantharellus</i> spp. secuenciadas	68

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

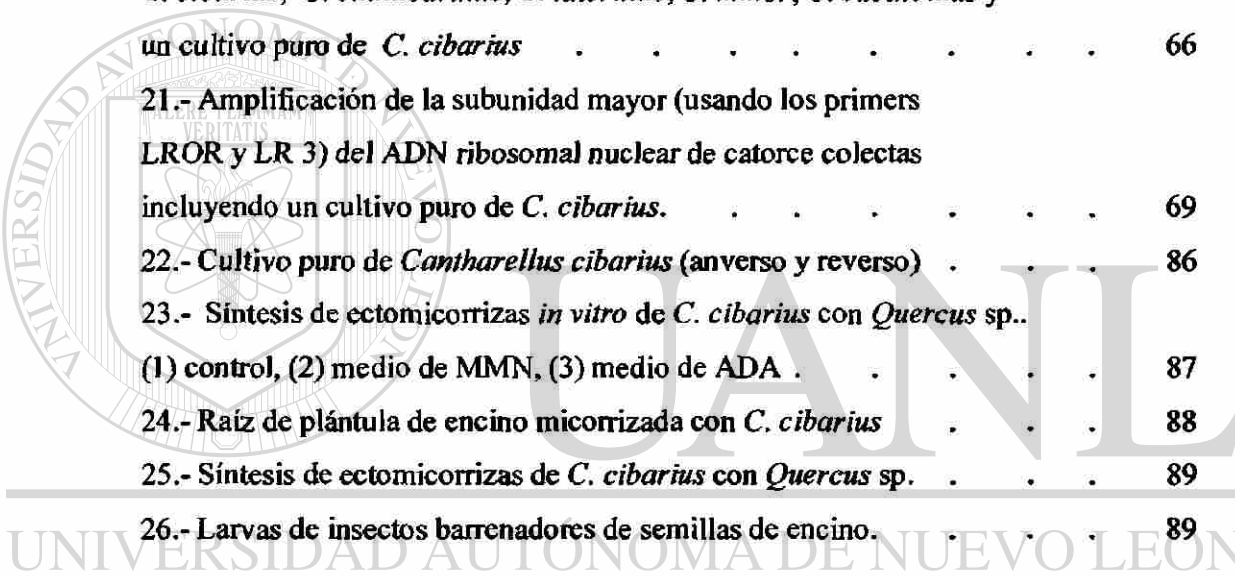
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Esquema del protocolo para PCR y análisis de RFLP	20
2.- Regiones estudiadas y primers utilizados	21
3.- Micogeografía de las especies de <i>Cantharellus</i>	35
4.- Basidiomas de <i>Cantharellus cibarius</i> de la localidad El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas.	38
5.- Basidiomas herborizados de <i>Cantharellus lateritius</i> en la localidad del Cañón del Novillo, Municipio de Victoria, Tamaulipas.	41
6.- Basidiomas de <i>Cantharellus cinnabarinus</i> de la localidad del Ejido San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas	43
7.- Basidiomas de <i>Cantharellus minor</i> de la localidad del Ejido San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas.	45
8.- Basidiomas de <i>Cantharellus formosus</i> de la localidad El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas.	46
9.- Comparación de basidiomas de <i>Cantharellus cibarius</i> y <i>C. formosus</i>	47
10.- Basidioma de <i>Cantharellus</i> sp. (píleo escamoso) de la localidad San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas	49
11.- Amplificación del ITS nuclear (usando los primer ITS1F e ITS4) de 35 colectas de basidiocarpos de <i>Cantharellus</i> spp. y 1 cultivo puro de México	53
12.- Amplificación del ITS nuclear (usando los primers ITS1f e ITS4) de cuatro cultivos puros aislados de basidiocarpos provenientes de los estados de Nuevo León y Tamaulipas	54
13.- Amplificación del ITS nuclear con BSA (usando los primers ITS1f e ITS4)	55
14.- Amplificación del ITS nuclear con MgCl (usando los primers ITS1f e ITS4)	56
15.- Amplificación del ITS con y sin MgCl de <i>Cantharellus</i> spp. de diferentes localidades y hábitat	57
16.- Análisis del RFLP (<i>Hinf</i> I) de los ITS amplificados de las 17 colectas	

de <i>C. cibarius</i> de diferentes estados y un cultivo puro.	60
17.- Análisis del RFLP (<i>Dpn II</i>) de los ITS amplificados de las 17 colectas de <i>C. cibarius</i> de diferentes estados y un cultivo puro	61
18.- Análisis del RFLP (<i>Hinf I</i>) de los ITS amplificados de varias especies de <i>Cantharellus</i> de distintos estados del país y 4 cultivos puros	63
19.- Análisis del RFLP (<i>Dpn II</i>) de los ITS amplificados de varias especies de <i>Cantharellus</i> de distintas partes del país y 4 cultivos puros	64
20.- Análisis del RFLP (<i>Hae III</i>) de los ITS completos amplificados de <i>C. cibarius</i> , <i>C. cinnabarinus</i> , <i>C. lateritius</i> , <i>C. minor</i> , <i>C. subalbidus</i> y un cultivo puro de <i>C. cibarius</i>	66
21.- Amplificación de la subunidad mayor (usando los primers LROR y LR 3) del ADN ribosomal nuclear de catorce colectas incluyendo un cultivo puro de <i>C. cibarius</i>	69
22.- Cultivo puro de <i>Cantharellus cibarius</i> (anverso y reverso)	86
23.- Síntesis de ectomicorrizas <i>in vitro</i> de <i>C. cibarius</i> con <i>Quercus</i> sp.. (1) control, (2) medio de MMN, (3) medio de ADA	87
24.- Raíz de plántula de encino micorrizada con <i>C. cibarius</i>	88
25.- Síntesis de ectomicorrizas de <i>C. cibarius</i> con <i>Quercus</i> sp.	89
26.- Larvas de insectos barrenadores de semillas de encino.	89



RESUMEN

Las especies del género *Cantharellus* son de gran importancia para el mantenimiento y equilibrio de los ecosistemas forestales. La variación morfológica inter e intra específica de este género ha dificultado la ubicación taxonómica de algunas de sus especies principalmente en la especie tipo. Por lo anterior, se llevó a cabo un estudio con técnicas moleculares para determinar la variación genética del Espaciador Transcrito Interno (ITS) y el gen de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en las especies *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, *C. lateritius* y varios *Cantharellus* spp. El material estudiado procede de los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Durango, Querétaro, Chiapas, Guanajuato, Coahuila, Veracruz y Chihuahua. *C. lateritius* y *C. formosus* son reportados por primera vez para México. La variación genética del ITS se estudió mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión con enzimas de restricción para la observación de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Así mismo, la subunidad mayor del rADN nuclear se analizó mediante el uso de PCR, y secuenciación de nucleótidos. La identificación molecular de un cultivo puro previa a la síntesis ectomicorrízica de *C. cibarius* con *Quercus* sp. se llevó a cabo. Los resultados indican que el RFLP no presentó suficiente resolución para separar las diferentes especies estudiadas. Sin embargo, la secuenciación parcial del gen 28S de la subunidad mayor del rADN nuclear en *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y otros *Cantharellus* spp. concuerdan con las reportadas por NCBI (National Center for Biotechnology Information) para las mismas especies en un 96%, 95% y 94% respectivamente y para *Cantharellus* sp. varió de 96-97%. La síntesis ectomicorrízica de *C. cibarius* con *Quercus* sp. se llevó a cabo exitosamente con un promedio de 66% de micorrización.

ABSTRACT

The species of *Cantharellus* are of great economical (food) and forestry importance. However, inter and intra specific morphological variation exist into this genus making it difficult to identify some of its species. Due to this, a preliminary taxonomic study supported by molecular tools was performed. The variation of the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the large subunit of nuclear ribosomal DNA (LSUrDNA) genes were analyzed among *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, and several *Cantharellus* spp. and into the type species *C. cibarius*. The material of study comes from the states of Tamaulipas, Nuevo León, Durango, Querétaro, Chiapas, Guanajuato, Coahuila, Veracruz, and Chihuahua. *C. lateritius* and *C. formosus* are hereby reported as new records for México. The ITS was studied by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) and the nuclear large subunit of the ribosomal DNA by PCR and sequencing. A molecularly studied strain of *Cantharellus cibarius* was used to performed mycorrhizal synthesis with oak seedlings *in vitro*. The RFLP of the ITS did not show enough resolution to observe inter and intra specific variation on the studied species. Nucleotide sequencing of the LSUrDNA gene is presented for *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* and several *Cantharellus* sp. The sequences match well with those reported by the NCBI (National Center for Biotechnology Information) for these species in about 96%, 95%, and 94% respectively and for *Cantharellus* spp. between 96-97%. Ectomycorrhizal synthesis of *C. cibarius* with *Quercus* sp. was made with a 66% mean of ectomycorrhizal roots in seedlings.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Cantharellus*

Se considera que la conquista de la tierra por las plantas verdes fue facilitada por hongos simbióticos parecidos a los Zygomycetes en el periodo Silúrico tardío. El ancestro de los Basidiomycetes pudo haber sido un Zygomyceto ya que existen pocos fósiles de Ascomycetes del precretácico. Esta hipótesis está fortalecida también por la comparación citológica y porque la secuenciación del gen del RNA ribosomal 18S que demuestra que el linaje de los Ascomycetes se separó de los Basidiomycetes en el Devónico tardío. Los registros fósiles de Basidiomycetes indican que una evolución rápida se llevó a cabo durante el periodo Carbonífero. Los hongos Basidiomycetes ectomicorrízicos probablemente coevolucionaron con la familia Pinaceae en el Jurásico. Sin embargo, solamente se conocen hongos ectomicorrízicos del Cenozoico (Danell, 1994; Morain, 1984). En otros estudios, el análisis de proteínas indicó que los Basidiomycetes se ramificaron de otros hongos hace 1200 millones de años durante la era Precámbrica. Sin embargo, el primer fósil de planta y hongo no aparece sino hasta el periodo Ordovícico hace 480 ó 460 millones de años. Los fósiles de micorrizas de 400 millones de antigüedad apoyan la teoría de que las micorrizas facilitaron la colonización de la tierra por las plantas verdes. Algunos investigadores especulan que los hongos cantharelloides son más primitivos que los hongos laminados y han tenido tiempo suficiente para colonizar todos los continentes excepto el Antártico (Pilz *et al.*, 2003).

Las especies del género *Cantharellus* han sido de gran interés para muchos taxónomos y han sido ampliamente estudiadas desde el siglo XV. Linneo en 1755, describió *Agaricus cantharellus* en "Flora Suecica". Sin embargo, Fries en 1874 le dio el nombre de *Cantharellus cibarius* (Danell, 1994a). Algunos de los trabajos clásicos de taxonomía son el de Corner (1966), quien realizó una monografía sobre el grupo de hongos cantharelloides citando 65 especies y 16 variedades para este género; Bigelow (1978), describió e ilustró diferentes especies de *Cantharellus*, citando 13 especies para Norteamérica. Además, separó el grupo *Craterellus* como género independiente de *Cantharellus* principalmente por la consistencia del basidioma (membranoso o carnoso, presencia de fibulas en las hifas, etc.) Por otra parte, Petersen (1976), describió 5 variedades de *C. cibarius*. En Europa, Kuhner y Romagnesi (1953), dividieron al género *Cantharellus* en el subgénero *Craterellus* (hongos con hifas sin fibulas) y subgénero *Cantharellus* (hongos con hifas con fibulas). En el segundo caso reconocen 4 variedades dentro de la especie tipo: *C. cibarius* var. *bicolor*, *C. cibarius* var. *albidus*, *C. cibarius* var. *neglectus* y *C. cibarius* var. *amethysteus*. Bessette *et al.*, (1997) presentaron claves para hongos cantharelloides incluyendo descripciones y fotografías de *C. cibarius*, *C. cinnabarinus*, *C. ignicolor*, *C. lateritius*; considerando a *Craterellus infundibuliformis* como *Cantharellus infundibuliformis*. Pegler (1983), solamente describió dos especies dentro del género *Cantharellus*, *C. cinnabarinus* y *C. guyanensis*. Pitz *et al.*, (2003) y Persson, (1997), citaron que *C. cibarius* se encuentra distribuido por todo el mundo, incluyendo Norteamérica, África, Europa y Asia; señalando los países donde se han citado. Así mismo, señalaron que, solamente para Norteamérica, se encuentran 40 especies incluidas en los cuatro diferentes géneros de hongos cantharelloides conocidos (*i.e.* *Cantharellus*, *Craterellus*, *Gomphus* y *Polyozellus*). Dos nuevos taxa dentro del

género *Cantharellus* fueron descubiertos para Madagascar: *C. decolorans* es pequeña y está bien caracterizada por su color rosa el cual cambia a amarillo paja cuando maduro y *C. platyphyllus* subsp. *bojeriensis* difiere del tipo por su localización geográfica, por su asociación micorrícica con un árbol endémico y por ser más pálido (Eyssartier y Buyck, 1999). De acuerdo a Redhead *et al.*, (1997), el nombre correcto para la especie de *Cantharellus* más común recolectada en el oeste de Norteamérica (oeste de Columbia Británica, Canadá, Washington, noroeste de California y Oregon) es *C. formosus* y no *C. cibarius*. La localidad de la especie tipo *C. formosus* es Long Beach, Pacific Rim National Park, Vancouver Island, Columbia Británica, Canadá y no Barley Sound. Material fresco topotípico fue obtenido para su caracterización molecular y morfológica usando RFLPs. Un *Cantharellus* menos común es *C. cibarius* var. *roseocamus* (Redhead *et al.*, 1997). Una nueva especie, *Cantharellus taberniencis*, fue descrita de los bosques mixtos de pinos y deciduos del sur de Mississippi en E.U.A. Las características que distinguen esta especie son un píleo café amarillento con un centro oscuro, un himenóforo y estípote naranja brillante. Esta nueva especie tiene una región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosomal nuclear larga. El análisis del RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) de la terminal 5' del gen de la subunidad mayor ribosomal nuclear apoyan el estatus de *C. taberniencis* como una especie distinta (Feibelman *et al.*, 1996).

En México, Guzmán (1985) describió por primera vez para la micoflora mexicana: *Cantharellus concinnus*, *Gomphus subclavaeformis* y *Pseudocraterellus sinuosus*. Además redescubre *C. cibarius* y presenta una nueva distribución para *C. odoratus*. Así mismo, *C. cibarius*, *C. odoratus*, *C. tubaeformis* y *Craterellus cornucopioides* han sido citados para diferentes estados del país (Villarreal y Pérez-

Moreno, 1989). Por otra parte, el uso de marcadores genéticos junto con características morfológicas y ecológicas están facilitando la identificación de muchos hongos a partir de propágulos sin necesidad de reconocer el esporocarpio (Bruns *et al.*, 1990.).

1.2 IMPORTANCIA ECOLÓGICA, ECONÓMICA Y NUTRICIONAL DEL GÉNERO *Cantharellus*

Las especies de *Cantharellus* crecen en asociación simbiótica mutualista con diferentes árboles de importancia forestal a través de sus raíces *e.g.* *Pinus* spp., *Picea* spp., *Pseudotsuga* spp., *Abies* spp., *Betula* spp., *Castanea* spp., *Fagus* spp., *Eucalyptus* spp., *Populus* spp., *Tsuga* spp. y *Quercus* spp., entre otros (Garza, 1991; Danell, 1994; Danell y Fries, 1990; Trappe, 1962; Molina *et al.*, 1992) y son los responsables indirectos del mantenimiento y equilibrio de estos ecosistemas. Entre el 20 y 30% del carbón asimilado por las plantas hospederas de hongos ectomicorrízicos puede ser consumido por el hongo, de ahí su importancia en los ecosistemas forestales (Soderstrom, 2002). El clima, química del suelo y microflora predominante, juegan un papel importante en el establecimiento de hongos micorrizógenos. Sin embargo, muchas especies de hongos micorrizógenos y otros organismos de la cadena alimenticia de Europa (*e.g.* *Cantharellus cibarius*) están desapareciendo de forma drástica en cantidad y diversidad debido a los efectos combinados de lluvia ácida, contaminantes industriales y, aparentemente por la radiación ocasionada por el desastre del Chernobyl (Arnolds, 1991, Jansen y Van Dobben, 1987; Nohrstedt, 1994). Este último es considerado uno de los peores desastres ecológicos para las comunidades fúngicas, pues hasta un 50% de la micodiversidad desapareció en algunas localidades. Esto ocasionó que algunas especies del género *Cantharellus* desaparecieran de algunas regiones en Holanda donde antes

eran abundantes (Amaranthus y Pilz, 1996). La translocación de sustancias radioactivas por *C. cibarius* y otros hongos comestibles silvestres fue mayor al compararlas con otras especies (Haselwandter y Berreck, 1989).

La presencia o ausencia de hongos micorrizógenos puede ser indicadora del inicio de un problema en el equilibrio de los ecosistemas forestales (Arnolds, 1991; Pilz *et al.*, 1998a y b). Sin embargo, en un estudio reciente sobre el efecto del cambio climático global en las micorrizas, se concluyó que no hay evidencias directas de que los altos niveles de CO₂ afecten los hongos micorrícicos (Söderström, 2002).

El impacto sobre la diversidad de macromicetos en un bosque de *Betula* sp. en una región de Moscú que ha sido expuesta a uso excesivo de recreación durante 10-12 años, fue evaluado contra otra área similar sin tanto impacto. En la comparación se observó que en los caminos pisoteados y en áreas de juego la única especie que se observó fue *C. cibarius* (Burova y Trapido, 1975). En otro estudio similar en Rusia, se observó la disminución particularmente de *Cantharellus cibarius*, *Paxillus involutus*, *Boletus edulis* (Velikanov y Sidorova, 1998). Algunas especies del género *Cantharellus*, *Tricholoma*, *Cortinarius* y *Sarcodon* han sido reportados creciendo en suelos pobres en nitrógeno (Boujon, 1997; Rasmussen, 1998).

La translocación de Cesio (Cs 137) y residuos químicos (piretroides) en los cuerpos fructíferos de *C. cibarius* fue estimada. La actividad de Cs 137 varió, encontrando que cuando hay mayor producción de este hongo se presentó la más baja concentración de Cs 137 (Nohrstedt, 1994; Dabrowska y Gayny, 1988; Grabowski *et al.*, 1994).

Referente al aspecto económico, en temporadas de lluvia *C. cibarius* es recolectado con fines de alimentación y comercialización principalmente en los estados

del centro de México y representa una importante fuente de ingresos para los habitantes de esa región (Villarreal y Gómez, 1997). El aprovechamiento irracional de éste y otros tipos de hongos está ocasionando severos daños a los ecosistemas forestales y a los ecosistemas que interactúan con éstos. Para evitar esto, el gobierno federal está protegiendo este recurso mediante la Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-009-SARH3-1994; Gaceta Ecológica, 1995; NOM-059-Ecol-2001).

Desde el punto de vista nutricional *Cantharellus* presenta 21% de proteína, 66% de carbohidratos, 5% de grasa y un valor energético de 35 Kcal (Crisan y Sands, 1978; Singer y Harris, 1987; Pilz *et al.*, 2003). Además Danell y Eaker, (1992) y Degreef *et al.*, (1997) realizaron un estudio para determinar el contenido de aminoácidos y proteína total del hongo comestible *C. cibarius* utilizando varios métodos, encontrando 99 gr de proteína por kilogramo de peso seco, mientras que la composición de todos los aminoácidos fue detectada, excepto el triptofano.

En un análisis comparativo de proteína y ceniza cruda, contenido de calcio, potasio y fósforo de 57 muestras de 8 especies comunes se encontró que los hongos que presentan mayor concentración de proteínas fueron *Marasmius oreades* y *Lepista nebularis* con un valor promedio de 52.82 y 39.02% de peso seco, respectivamente. *Cantharellus cibarius* presentó el contenido más bajo de proteína cruda (Vetter, 1993).

En otro estudio, un análisis de los pigmentos presentes en *C. cibarius*, *C. lateritius*, *C. cibarius* var. *amethysteus* y *C. tabernensis* indicó que están formados por beta-carotenos en las cuatro especies (Mui *et al.*, 1998).

No existe información sobre la comercialización de *Cantharellus* spp. en México. Sin embargo, estimaciones de la comercialización global de este hongo ha sido calculada en aproximadamente 200,000 toneladas métricas, que equivalen a 220

millones de kilogramos con un valor aproximado de entre 1250–1400 millones de dólares anuales (Pilz *et al.*, 2003). En un trabajo sobre manejo de los ecosistemas forestales para la producción de hongos micorrizógenos silvestres, Danell y Camacho (1997), reportaron la producción de cuerpos fructíferos en plántulas de pinos inoculadas con cultivos puros de *C. cibarius* después de un año de inoculadas. Las plántulas tenían 16 meses de edad y demostraron que *C. cibarius* no es dependiente de árboles viejos para su reproducción. Por su parte, Molina *et al.*, (1993), Iwase, (1997), Pilz *et al.*, (1998), Hosford *et al.*, (1997), Liegel *et al.*, (1998a,b), Dyke y Newton (1999), Kalinowski y Korhonen, (1998), Adhikary *et al.*, (1999) y Love *et al.*, (1998), propusieron técnicas para el manejo sustentable y producción de hongos comestibles micorrizógenos, incluyendo *C. cibarius* y *Tricholoma matsutake*.

En la producción de hongos, la inducción a la fructificación de *C. cibarius* con un sistema de irrigación por aspersión se llevó a cabo en un bosque pobre de *Pinus sylvestris*. El efecto de irrigación fue registrado en las propiedades del suelo, microclima, producción de hongos comestibles, crecimiento de vegetación, regeneración natural e incremento de volumen. De los resultados observados se concluyó que el sistema de riego en las áreas donde crecían hongos dio resultados favorables en periodos secos y no debe hacerse por más de 3 años (Grochowski y Ostalski, 1993).

Finalmente, el uso de hongos micorrizógenos para dar protección contra algunas enfermedades ha sido estudiado en el castaño contra *Phytophthora cinnamomi*, el cual infecta las puntas de la raíz. Algunos hongos asociados con el castaño fueron bioensayados *in vitro*, los hongos que presentaron antagonismo contra este patógeno fueron cepas de *Boletus bovinoides*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Amanita caesarea*, *Clitocybe* sp., *Laccaria laccata* y *Cantharellus* sp. (Vrot y Grente, 1985).

1.3 ESTUDIO DEL ITS (ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO) NUCLEAR EN *Cantharellus* spp.

Los estudios taxonómicos (que involucran 2 procedimientos, clasificación e identificación) realizados por micólogos clásicos (apoyados en el concepto de especie morfológica) están fortaleciendo sus investigaciones con aspectos ecológicos, biogeográficos (aceptando o rechazando sus hipótesis) y con nuevas técnicas moleculares. Estas últimas, varían en su “poder de resolución” aunque no son iguales en diferentes grupos taxonómicos. El estudio de la región del ITS es ampliamente usado por su variación en sus secuencias y se recomienda para la identificación a nivel de especie usando enzimas de restricción para el análisis del polimorfismo de la longitud de sus fragmentos (RFLP). En contraste, las regiones que se expresan del ADN ribosomal (genes 18 S, 28 S y 5.8 S) tienen relativamente poca variación en sus secuencias. Para identificar cualquier hongo a nivel de especie la técnica molecular más usada es el PCR-RFLP del ADN ribosomal nuclear de la región ITS (Horton y Bruns, 2001; Dowling *et al.*, 1996; Brayford *et al.*, 1995; Kocher y White, 1989). Cuando esta técnica falla (*i.e.* no ofrece suficiente resolución) la secuenciación de nucleótidos de la región ofrece otra opción. El análisis de estas regiones puede ser a partir del aislamiento del ADN de una sola espora o fragmento de micelio (Lee y Taylor, 1990).

Son muchos los estudios que se han realizado sobre el género *Cantharellus* en el mundo. Sin embargo, no se encontró ninguno relacionado sobre análisis de la variación del ITS en el género *Cantharellus* en México. No obstante, se pueden citar algunos estudios moleculares realizados en otros países *e.g.* Feibelman *et al.*, (1994) reportaron que la longitud del ITS completo de *C. tubaeformis*, *C. infundibuliformis*, *Cr. odoratus*, *C. cinnabariumus*, *C. minor*, *C. subalbidus*, *C. lateritius* y *C. cibarius* varía de 720 pares

de bases (pb) hasta más de 1600 bp. Así mismo, señalaron que la variación de la longitud de la región del ITS ocurre inter e intra específicamente.

En otros estudios realizados en hongos Basidiomycetes, Hibbett y Vigalys, (1991) usaron enzimas de restricción del ADN ribosomal y reportaron que *Lentinus tigrinus* está más relacionado con la familia Polyporaceae que con la familia Tricholomataceae. Chiu *et al.*, (1993) realizaron estudios moleculares en *Lentinus edodes* utilizando la técnica de PCR y encontraron que el polimorfismo entre diferentes cepas de la misma especie no podría ser revelado por electroforesis. Royse y May, (1993) realizaron estudios moleculares en hongos comestibles usando análisis de alozimas para estimar la divergencia y diversidad genética, confirmación de cruza e identificación de clases genotípicas varios hongos comestibles. De igual manera, Anderson (1993), realizó estudios moleculares en *Agaricus bisporus* Lange (Imbach) (= *A. brunnescens* Peck) incluyendo marcadores de alozimas y marcadores basados en ADN [RFLP, RAPDs (modificación de PCR)]. Pine *et al.*, (1999) estudiaron el ADN de la subunidad pequeña nuclear y mitocondrial para estudios filogenéticos entre los hongos cantarelloides y clavarioides encontrando que la familia Cantharellaceae está muy relacionada con el género *Hydnum*, el cual es del tipo dentado, *Clavulina* es un hongo tipo coraloide y *Stichoclavaria*, tiene forma de clava. Finalmente, existen especies dentro del género *Cantharellus* en la región noreste de México con gran potencial alimenticio y ecológico que no son aprovechados en una forma sustentable como se lleva a cabo en otros países; debido a la falta de conocimiento de este recurso natural. Desafortunadamente algunas especies están condenadas a desaparecer de nuestros bosques sin haberlas conocido.

1.4 ESTUDIO DE LA SUBUNIDAD MAYOR DEL ADN RIBOSOMAL NUCLEAR DEL HONGO ECTOMICORRIZÓGENO *Cantharellus*

Para la identificación a nivel de especie, la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear ha sido citada que presenta variación en sus secuencias (Horton y Bruns, 2001). Una característica para estudios moleculares a nivel de especie requiere que la región amplificada exhiba la máxima variabilidad entre especies y la mínima dentro de la especie. El ADN ribosomal nuclear el cual codifica el ARN para la formación de los ribosomas, satisface este criterio. Además, las regiones dentro de este gen presentan diferentes porcentajes de evolución, así que se pueden obtener diferentes niveles de variación dependiendo de la porción amplificada. La región del ITS del ADN ribosomal es suficientemente variable debido a que patrones de RFLP específicos de especies pueden distinguirse usando solamente dos o tres enzimas. Esto es debido, en parte, a las inserciones/sustituciones y a las bajas restricciones de selección (Egger, 1995; Egger *et al.*, 1996; Bridge, 2002; Horton y Bruns, 2001; Hillis *et al.*, 1996; Baldwin y Egger, 1996). Pine *et al.*, (1999) estudiaron la subunidad menor nuclear y mitocondrial del ADN ribosomal para estudios filogenéticos entre hongos *Cantharellus* y clavarioides encontrando que la familia Cantharellaceae está cercanamente relacionada con el género *Hydnum* el cual es dentado, *Clavulina* un hongo coraloide y *Stichoclavaria* el cual tiene forma de clava y presentan esticobasidias. *Clavariadelphus* está emparentado a *Gomphus* y *Ramaria* y esto se relaciona con la reacción verde del esporocarpo tratadas con sales de hierro. Los parientes más cercanos de los hongos cantharelloides y clavarioides son los Gasteromycetes incluyendo a *Geastrum*, *Pseudocolus* y *Sphaerobolus*. Los hongos clavarioides *Clavaria*, *Clavulinopsis*, *Pterula* y *Typhula* parecen ser derivados del linaje que contienen la mayoría de los hongos laminados. Por

otro lado, *Clavicornia* parece estar cercanamente relacionado con *Auriscalpium* el cual es dentado y *Lentinellus* que es laminado. Este linaje está unido por la ornamentación de la espora amiloide. Dahlman *et al.*, (2000) realizaron estudios de sistemática molecular en *Cantharellus* proponiendo la reclasificación de *C. tubaeformis*, *C. lutescens* y *C. ignicolor* dentro del género *Craterellus* y no reconocen a *Cr. fallax* y *Cr. konradii* como especies únicas sino sinónimos de *Cr. cornucopioides*. Gardes *et al.*, (1991), realizaron estudios del ITS nuclear y secuenciación de *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* y *L. amethystina* encontrando que en tres especies de *Laccaria* la variación en la secuenciación de nucleótidos varió de 3-5% y de 1 a 2% dentro de *L. bicolor*. Hibbett y Vigalys, (1991) concluyeron que *Lentinus tigrinus* está más cercanamente relacionado con la familia Polyporaceae que con la familia Tricholomataceae. Chiu *et al.*, (1993) realizaron estudios similares en *Lentinula edodes* utilizando PCR y encontraron que el polimorfismo entre diferentes cepas de la misma especie puede ser revelado mediante secuenciación de ADN. Bruns *et al.*, (1990) secuenciaron la subunidad mayor del ADN mitocondrial en algunas especies del género *Suillus* y *Rhizopogon* y no encontraron diferencias entre las especies. Vigalys y Sun, (1994) realizaron estudios moleculares filogenéticos para examinar la relación entre aislamiento reproductivo, divergencia genética y biogeografía de las especies del hongo comestible *Pleurotus* sp. Una de sus conclusiones fue que existen al menos 8 grupos inter estériles en el mundo. Mientras que González y Labarere, (2000) realizaron estudios moleculares de la subunidad menor del ARN ribosomal mitocondrial concluyendo entre otras cosas que *Pleurotus sajor-caju*, *P. pulmonarius* y *P. florida* son la misma especie que *P. ostreatus*. El uso de herramientas moleculares junto con los caracteres de especie morfológica y biológica

son prometedores para la identificación de los hongos ectomicorrizógenos a nivel de especie.

1.5 APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA SILVICULTURA (SÍNTESIS DE ECTOMICORRIZAS DE *Cantharellus cibarius* CON *Quercus* sp.)

Cantharellus cibarius es uno de los hongos comestibles silvestres más conocidos en Norteamérica y Europa. Es un hongo de amplio rango micorrizógeno por lo que es considerado de gran valor ecológico. Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre hongos benéficos y raíces de plantas, siendo de gran importancia para la fisiología, crecimiento y desarrollo de muchos árboles forestales, frutales y plantas herbáceas de importancia económica.

Entre las funciones atribuidas a las micorrizas destacan el aumento de la disponibilidad de elementos nutritivos (e.g. N, P, F, Zn, Cu, S, Ca, Br); aumenta la resistencia al ataque de patógenos de raíces (hongos y nemátodos); mejora la absorción

de agua; mejora la estructura del suelo y contribuyen también a disminuir los efectos dañinos de la erosión (Trappe, 1962). Un mecanismo a nivel molecular sobre el transporte de elementos minerales de suelo hacia la planta a través de los hongos endo y ectomicorrizos fue propuesto por Chalot *et al.*, (2001). Además, la presencia o ausencia de hongos micorrizógenos pueden ser indicadora del inicio de un problema en el equilibrio del ecosistema (Arnolds, 1991; Pilz *et al.*, 1998a,b). *C. cibarius* crece en asociación ectomicorrizica con *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Pseudotsuga*, *Quercus* etc. de aquí su gran valor forestal y puede ser utilizado en la micorrización de árboles destinados a la reforestación (Trappe, 1962; Molina *et al.*, 1992; Pilz *et al.*, 2003; Chen, 1997). La síntesis de ectomicorrizas entre *Pseudotsuga menziesii* y *C. cibarius* fue demostrada

mediante la comparación morfológica, reacciones bioquímicas y luz ultravioleta, del manto micorrícico con el micelio de la base del estípote (Froidevaux, 1975). Por su parte, Garza *et al.*, (2001) llevaron a cabo síntesis de ectomicorriza de *C. cibarius* con diferentes especies de coníferas *e.g.* *Pinus caribea*, *P. patula* y *P. pseudostrobus* describiendo las fases del desarrollo de la simbiosis.

En el noreste de México, *C. cibarius* crece principalmente en asociación con *Quercus* spp. *Cantharellus cibarius* se ha caracterizado por su complicado aislamiento y cultivo bajo condiciones estériles (Fries, 1979; Schouten y Waandrager, 1978; Chang *et al.*, 1989; Jong, 1978). Los primeros aislamientos de *C. cibarius* se lograron a partir de la germinación de basidiosporas obtenidas de cuerpos fructíferos (Fries, 1979; Straatsma *et al.*, 1985; Straatsma y Bruinsma, 1986; Straatsma *et al.*, 1985, 1986; Itävaara y Willberg, 1988). Mientras que los aislamientos a partir de tejido de cuerpos fructíferos fueron utilizados para realizar una síntesis de ectomicorizas con *C. cibarius* y *Picea abies* (Fries y Danell, 1990; Danell, 1994a,b; Danell, 1997a,b; Danell y Camacho, 1997). Itävaara y Willberg, (1988) aislaron un total de 39 cepas originadas de la germinación de esporas. Posteriormente Fries y Danell, (1990) aislaron 56 cepas de *C. cibarius* y 4 cepas de *C. pallens* obtenidas a partir de tejido de cuerpos fructíferos, realizando una síntesis de ectomicorriza con *C. cibarius* y *Picea abies*. Por su parte, Danell (1994b), realizó investigaciones sobre la formación y crecimiento de la ectomicorriza con *C. cibarius*. Así mismo Straatsma y Van Griensven (1986), estudiaron los requerimientos necesarios para el crecimiento miceliar de los cultivos del mismo hongo micorrizógeno. Danell *et al.*, (1993) y Pachlewski *et al.*, (1996), observaron la influencia de bacterias aerobias aisladas de cuerpos fructíferos de *C. cibarius* en el crecimiento y desarrollo de las micorizas y de las hifas vegetativas, encontrando que la

presencia de *Pseudomonas fluorescens* no estimula el crecimiento de *C. cibarius*. El efecto de las condiciones de crecimiento e.g. aereación, pH, temperatura y luz, medios de cultivo y producción de enzimas sobre la producción de biomasa en cepas de *C. cibarius* (colectados de esporocarpos bajo encinos y pinos) fue estudiado por Dahm *et al.*, (1999) y Pachlewski *et al.*, (1996) encontrando que la producción de la biomasa dependió no solamente de factores nutricionales en el medio, sino también del pH y la temperatura del cultivo. La luz no tuvo efecto en el crecimiento, pero la aereación (en cultivos en agitación) si lo presentó. Con la biomasa fúngica se llevó a cabo micorrización artificial para estudios fisiológicos y bioquímicos.

En un estudio sobre la producción de compuestos con indol en *C. cibarius* una cepa aislada de coníferas produjo más auxina que otra aislada de bosque decíduo. Es de interés que el triptófano inhibió la síntesis de auxinas en la cepa proveniente de bosque decíduo, pero éste la estimuló en la cepa de coníferas. El pH También afectó la producción de auxinas. La presencia de ácido indolacético, ácido indolcarboxílico y ácido nitril indolacético fue confirmado con cromatografía de gases (Strzelczyk *et al.*, 1997a,b).

Plántulas de pino de 16 meses de edad fueron inoculadas con micelio de *C. cibarius* producido *in vitro* y transferidos en macetas en un invernadero. Cuerpos fructíferos de *C. cibarius* fueron detectados en estas macetas entre abril y noviembre de 1996. Este fue el primer reporte de la fructificación de *C. cibarius* en cultivo (Danell y Camacho, 1997). Antibióticos en cultivos líquidos fueron producidos por *C. cibarius* y *Suillus tomentosus*. Estos antibióticos fueron elaborados cuando las plántulas de *Pinus caribaea*, *P. patula* y *P. pseudostrobus* fueron micorrizadas asépticamente con *C. cibarius* (Garza-Ocañas, 1993).

En un experimento de síntesis ectomicorrícica, dos cepas de *C. cibarius* formaron micorrizas con *Pinus sylvestris* y *Betula pubescens*, el reisolamiento del hongo fue idéntico al del inóculo original y su estatus micorrizógeno con estos hospederos fue verificado (Moore *et al.*, 1989). Por otro lado, se estudió el efecto de 6 especies de hongos micorrizógenos, encontrando que la micorriza de *Cantharellus cibarius*, *Russula foetens* y *Suillus bovinus* son poco efectivas (Chen, 1986). En un estudio con hongos micorrizógenos de dos diferentes bosques, uno de 28 años y otro de 55 años de edad. Del bosque de 28 años de edad, los géneros más comunes fueron *Suillus*, *Russula*, *Lactarius*, *Hydnum* y *Amanita*. Mientras que en el bosque de 55 años, los géneros más comunes fueron *Hydnum*, *Tricholoma*, *Laccaria* y *Cantharellus* (Lee *et al.*, 1986). Actualmente antes de llevar a cabo un experimento sobre síntesis micorrizógena, es recomendada la identificación y corroboración molecular del micobionte del cultivo puro. Además, el aislamiento del ADN del micobionte dentro de la raíz y su comparación del RFLP con el del cultivo puro y basidiocarpo de donde se obtuvo el cultivo puro serán necesarios.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.6 JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Cantharellus*, tienen importancia ecológica, económica, y nutricional. Sin embargo, existe en la actualidad confusión con respecto a la identificación de las especies utilizando métodos tradicionales. Además, no existe ningún estudio actualmente en México con respecto a la identificación molecular de las especies y se cree que puedan existir especies no reportadas en México.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de las especies del género *Cantharellus* mediante estudios taxonómicos, morfológicos, ecológicos y biogeográficos apoyado por técnicas moleculares.

1.8 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinación taxonómica (morfológica) de las especies de *Cantharellus*.
2. Estudios taxonómicos moleculares del ITS (*i.e.* espaciador transcrito interno) y de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en el género *Cantharellus*.
3. Aplicación de las técnicas moleculares en la silvicultura.

1.9 HIPÓTESIS

Ho: La taxonomía morfológica no ofrece suficiente resolución para separar las especies del complejo *Cantharellus cibarius*.

Ho: El análisis de la variación del ITS con PCR-RFLP ofrecen suficiente resolución para separar las especies más comunes de *Cantharellus*.

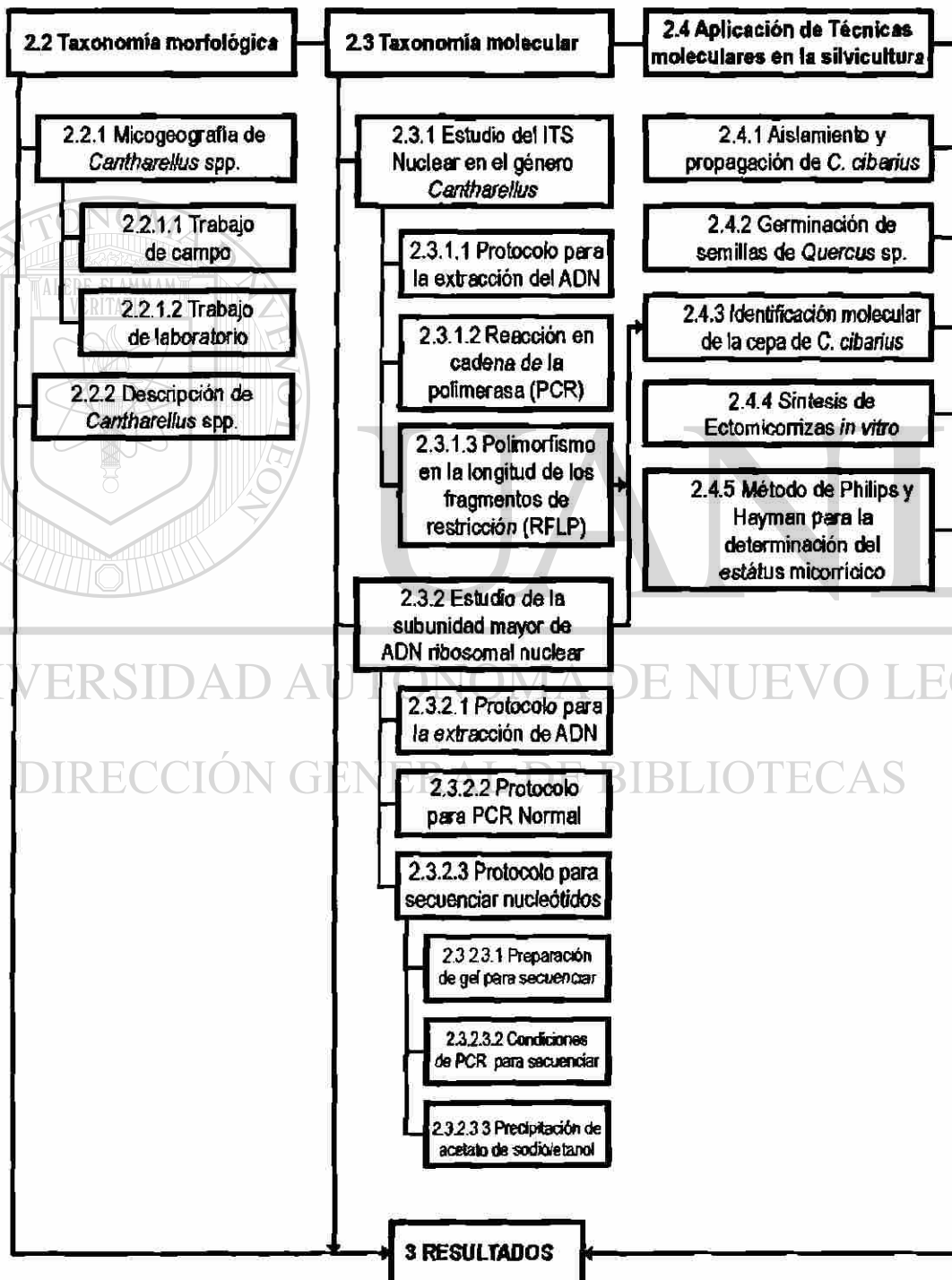
Ho: La secuenciación de nucleótidos de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear ofrecen suficiente resolución para separar especies y descubrir criptoformas.

Ho: La identificación molecular de las especies de hongos es una herramienta de utilidad en experimentos de síntesis de ectomicorrizas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama general de la investigación.



2.2 TAXONOMÍA MORFOLÓGICA DE *Cantharellus* spp.

Esta sección está basada en el análisis de las características morfológicas de las diferentes partes del basidioma importantes para la clasificación de las especies dentro del género *Cantharellus*. Las características morfológicas proveen la mayoría de los caracteres usados para la construcción de los sistemas taxonómicos. En el caso de las especies del género *Cantharellus*, incluye la descripción macroscópica y microscópica del píleo, láminas y estípite.

2.2.1 Micogeografía de *Cantharellus* spp.

El análisis de los patrones de distribución de los organismos son esenciales para la clasificación de cualquier taxón de los diferentes rangos (Jones y Luchsinger, 1986). En este estudio se presentan los patrones de distribución de especies de *Cantharellus* estudiadas.

2.2.1.1 Trabajo de campo.

Se llevaron a cabo 25 salidas a campo a diferentes localidades de los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila y Chihuahua para la recolecta del material fúngico.

El material fúngico se determinó siguiendo los métodos estándar para Aphylophorales usando la literatura especializada correspondiente, entre otros: Corner (1966), Bigelow (1978), Kuhner y Romagnesi (1953).

2.2.1.2 Trabajo de laboratorio.

Se describió e ilustró las estructuras microscópicas de las diferentes especies de *Cantharellus* e.g. tamaño de espora y basidios, forma, superficie, grosor de la pared, presencia o ausencia de fibulas entre otras.

2.2.2. Descripción de *Cantharellus* spp.

Para la determinación de las especies se procedió a la descripción macro y microscópica de las diferentes estructuras de los basidiomas en fresco, tales como tamaño, color, superficie, del píleo, pseudoláminas y estípites. Así mismo, los datos de campo de localidad, fecha, colector, hábitat, etc. Todos ellos son necesarios para su comparación con la literatura especializada y determinación taxonómica (Largent, 1986; Largent y Baroni, 1988).

2.3 TAXONOMÍA MOLECULAR

Para la identificación de hongos existen nuevos métodos mediante el uso de PCR (*i.e.* polymerase chain reaction) y RFLP (*i.e.* restriction fragment length polymorphism) y secuenciación de nucleótidos, entre otros. En términos generales consisten en el análisis de un gen o de una región del genoma *e.g.* la subunidad mayor y subunidad menor del ADN ribosomal nuclear o el ITS (*i.e.* espaciador transcrito interno) etc. Estas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de pares de “primers” o iniciadores universales. El producto amplificado puede ser secuenciado directamente o digerido con enzimas de restricción para observar polimorfismo en sus fragmentos mediante electroforesis en agarosa figura 1 y 2. Estas técnicas son útiles para estudios taxonómicos o de filogenia y evolución (Horton y Bruns, 2001; Egger, 1995; Arnheim *et al.*, 1990; Sogin, 1990 y White *et al.*, 1990).

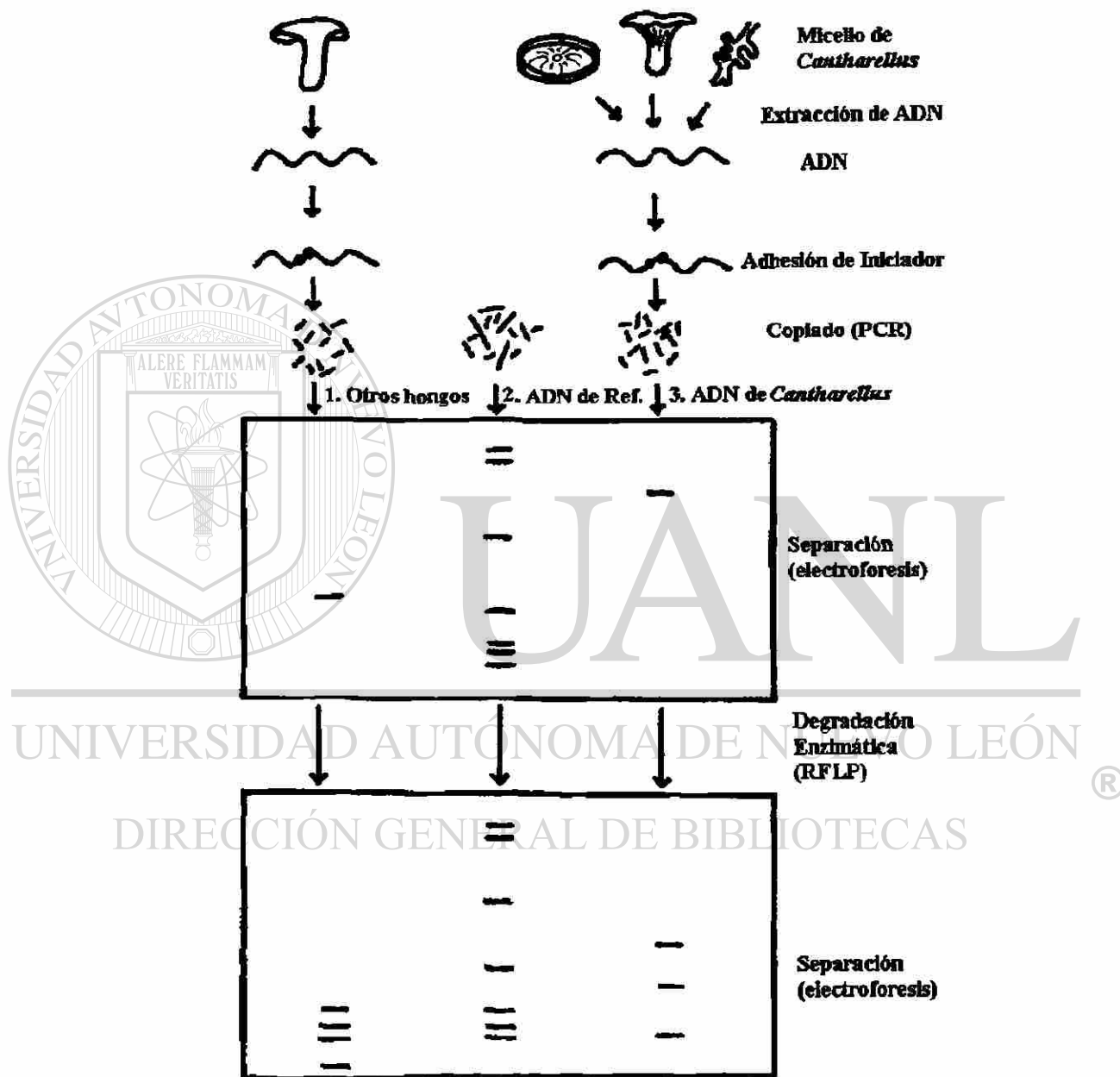


Fig.1. Esquema del protocolo utilizado para estudios de PCR y análisis de RFLP (Danell, 1994a).

2.3.1 Estudio del ITS nuclear en el género *Cantharellus*

Una de las regiones más usadas en trabajos de taxonomía molecular es el ITS utilizando los marcadores PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos. Esta pequeña región se encuentra repetidamente en el genoma de muchos hongos ectomicorrizógenos y se caracteriza por presentar variación en sus secuencias de nucleótidos y es ampliamente usada en estudios a nivel de especie utilizando al menos tres enzimas de restricción, figura 2.

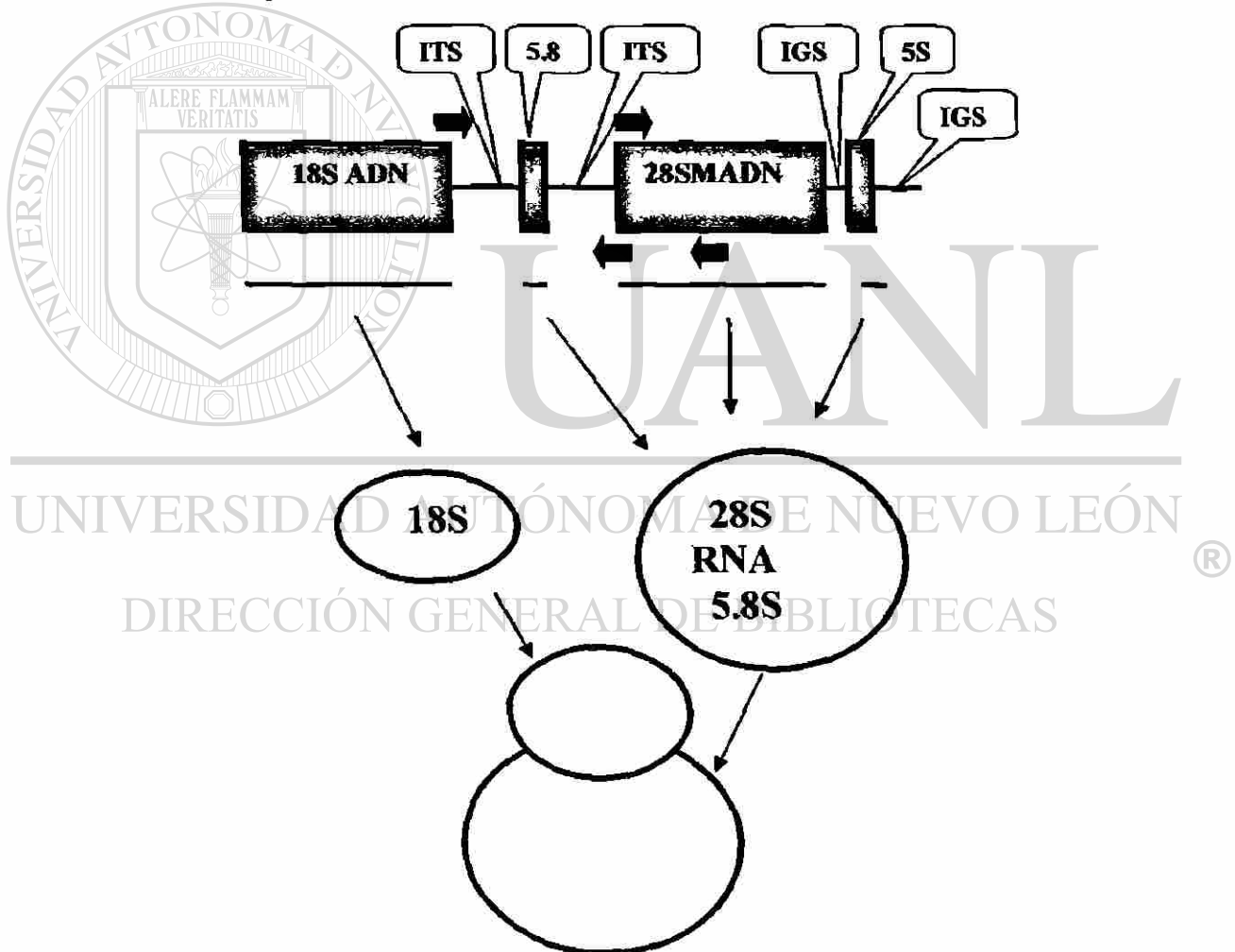


Figura 2. Regiones estudiadas y primers utilizados. Primer ITS1F e ITS 4 de la región ITS, son señalados con flechas negras; Primers LROR y LR3 que amplifican la región de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear, son señalados con flechas rojas.

El secado al aire de los basidiomas que no han sido expuestos a químicos, conservadores ni a secado a altas temperaturas tienen mas probabilidades de producir ADN útil para su uso en estudios moleculares. En este estudio se utilizaron especímenes secados al aire tal como lo recomiendan Taylor y Swann, (1994) así como los especímenes de los herbarios de las escuelas del noreste de México, principalmente el herbario José Castillo Tovar (ITCV), el herbario micológico de la Facultad de Ciencias Forestales (CFNL) y Facultad de Ciencias Biológicas (UNL) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa y RFLP) fue utilizada para los estudios aquí realizados.

2.3.1.1 Protocolo para la extracción de ADN

El procedimiento para la extracción del ADN de *Cantharellus* spp. se basó principalmente en el protocolo que se lleva a cabo en el laboratorio de estudios moleculares de la Universidad del Estado de Oregon (Department of Forestry Science), E.U.A.

Se tomaron muestras del tejido fúngico y se humedecieron dentro de un tubo Eppendorff de 1.5 ml. con 300 µl de 2x CTAB buffer. No se utilizó nitrógeno líquido. Después, el tejido blando se congeló (en hielo seco) y derritió a 65 °C en el calentador este paso se repitió dos veces. El tejido fue macerado con un micromacerador de plástico cambiando de macerador entre muestra y muestra. Después se volvió a congelar y se incubó a 65 °C por 30 a 60 minutos y se le agregaron 300 µl de cloroformo (V:V con una cantidad igual de CTAB) y se agitó brevemente. En seguida se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos con los tubos bien orientados. Se colectó la parte acuosa superior

con una pipeta de 200 μ l y se colocó en tubos nuevos etiquetados. Posteriormente se agregaron 3 volúmenes de NaI (600 μ l) y se agitó suavemente. Se agregó “leche de vidrio” (milk glass) asegurándose de estar este bien mezclado (suavemente con el vórtex) antes de agregarlo. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos agitándolos a la vez suavemente cada dos minutos. Entonces las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 5 segundos y se tiró el sobrenadante, entonces el precipitado se disolvió en 500 μ l de New Wash y se agitó suavemente para luego centrifugar a 13000 rpm por 5 segundos y nuevamente se tiró el sobrenadante este paso se repitió un total de 3 lavados con New Wash. Después del tercer lavado se tiró el sobrenadante, se volvió a centrifugar por 30 segundos y se retiró lo que restaba del sobrenadante con una pipeta de 20 μ l. Las muestras de las 35 colectas y 5 cultivos puros de *Cantharellus* fueron secadas en una cámara de flujo laminar o en una incubadora estéril por 10 minutos. Después se agregaron 50 μ l de TE buffer para eludir el ADN del vidrio y se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante donde se encuentra el extracto del ADN se colocó en un tubo nuevo listo para el PCR y subsecuentemente el RFLP.

2.3.1.2 Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El extracto de ADN obtenido de los cuerpos fructíferos herborizados y de los cultivos puros fue inicialmente probado con y sin diluciones (1:10-1:1000), con MgCl (para especímenes viejos y BSA (Bovine Serum Albumin) esto, para determinar la mejor opción para su amplificación. El porcentaje de primer (iniciador, secuencia ITS 1-F ctt ggt cat tta gag gaa gta a e ITS 4 tcc tcc gct tat tga tat gc)/extracto de ADN fue de 50:50.

Mezclas para PCR fueron elaboradas (10 x dNTP, primers ITS1F y ITS4, buffer para PCR y ADN polimerasa Taq). El número de ciclos de amplificaciones del termociclador (MJ Research Programmable Thermal Controller , (PTC)-100) de 35 (pasos b-d):

- a) 3 min 94 °C (desnaturalización inicial)
- b) 2 min 94 °C (desnaturalización)
- c) 25 s 50 °C (alineamiento)
- d) 2 min 72 °C (síntesis de ADN de regreso al paso b)
- e) 10 min 72 °C (síntesis final de ADN).

Los productos del PCR fueron observados en un gel de agarosa 2% en una electroforesis. Un Ladder de 100 pares de bases fue usado como estándar así como el extracto de ADN de un hongo conocido (*i.e.* como referencia). El gel fue teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta para tomarle una fotografía.

2.3.1.3 Protocolo para el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Se utilizó una cantidad de 10 µl de ADN amplificado, ésta fue digerida con las enzimas de restricción *Dpn II* (5'... ∇ GATC...3') y *Hinf I* (GVANTC) durante 3 horas a 37 °C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa 1% + geles de agarosa 2% (FMC, Rockland, USA) durante 30 minutos a 110 V. El ADN fue teñido en bromuro de etidio (10 mg/l) por 10 min, y lavado en agua otros 10 minutos. Se utilizó luz ultravioleta para visualizar los fragmentos para su fotografía.

2.3.2 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear

Al igual que en el ITS, la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear es una región muy estudiada para investigaciones de sistemática molecular utilizando los marcadores moleculares PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos. Esta región se caracteriza porque sus secuencias se encuentran muy conservadas. Sin embargo, en la parte terminal 5' ha sido citado con variabilidad y por lo tanto más informativo (Horton y Bruns, 2001) (figura 2).

2.3.2.1 Protocolo para la extracción de ADN

Se tomó una muestra de tejido de la parte interna del carpóforo y se humedeció dentro de un tubo Eppendorff de 1.5 ml con 300 μ l de 2x CTAB buffer. Después, el tejido blando se congeló con hielo seco y se derritió en un calentador a 65 °C, este paso se repitió dos veces. El tejido fue macerado con un micromacerador de plástico cambiando de macerador para cada muestra. Después se congeló nuevamente y se incubó a 65 °C por 30 a 60 minutos y se le agregaron 300 μ l de cloroformo (V:V con una cantidad igual de CTAB) y se agitó brevemente. En seguida, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos. Se colectó la parte acuosa superior con una pipeta de 200 μ l y se colocó en tubos nuevos etiquetados. En seguida, se agregaron 3 volúmenes de NaI (600 μ l) y se agitó suavemente. Se agregó "leche de vidrio" (milk glass) asegurándose de que estuviera bien mezclado (suavemente con el vórtex) antes de agregarlo. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos agitándolos a la vez suavemente cada dos minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 5 segundos y se tiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 μ l de New Wash. Se agitó

suavemente para luego centrifugar a 13,000 rpm por 5 segundos y nuevamente se tiró el sobrenadante, este paso se repitió en un total de 3 lavados con New Wash. Después del tercer lavado se tiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar por 30 segundos y se retiró lo que restaba del sobrenadante con una pipeta de 20 µl. Las muestras fueron secadas en una cámara de flujo laminar o en una incubadora estéril por 10 minutos. Después se agregaron 50 µl de TE buffer para eludir el ADN del vidrio y se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante donde se encuentra el extracto del ADN se colocó en un tubo nuevo listo para el PCR.

2.3.2.2 Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para mejorar la amplificación del ADN, éste se preparó con y sin diluciones (1:10-1:1000), con MgCl (para especímenes viejos y BSA (Bovine Serum Albumin). El porcentaje de primer/extracto del ADN fue de 50:50. Mezclas para PCR fueron

elaboradas (10 x dNTP, primers LROR y LR3, buffer para PCR y ADN polimerasa Taq). Para la amplificación se utilizó un termociclador MJ Research Programmable Thermal Controller y ésta consistió en los siguientes pasos:

- 1.- 3 min 94 °C (desnaturalización inicial)
- 2.- 5 ciclos de: (I) 1 min 94 °C
 (II) 1min. 45 °C
 (III) 1min. 72 °C
- 3.- 30 ciclos de: (I) 1 min. 94 °C
 (II) 1 min. 50 °C
 (III) 1 min. 72 °C

- 4.- 5 min. 72 °C
- 5.- mantener a 4 °C

Los productos del PCR fueron observados en un gel de agarosa 1% en electroforesis. Un Ladder (marcador molecular estándar) de 100 pares de bases fue usado como estándar. El gel fue teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta para su fotografía.

2.3.2.3 Protocolo para PCR para secuenciación de nucleótidos

Este paso al igual que los anteriores se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular en el Departamento de Botánica y Fitopatología de la Universidad del Estado de Oregon (EUA). El producto se procesó utilizando un secuenciador de ADN automatizado marca Applied Biosystems 373 A.

2.3.2.3.1 Preparación de gel para secuenciar.

Para llevar a cabo este procedimiento se requieren los siguientes reactivos:

10 X TBE	5 ml
Urea	18 g
Concentrado de Page-Plus 40% Amresco (Acrylamida)	7.5 ml
Agua (hasta)	50 ml
Volumen final	50 ml

Procedimiento

- 1.- Agregue acrylamida, urea, 10 X TBE y 25 ml de agua en un matraz. Se agita a fuego lento hasta que la urea se disuelve en la solución.
- 2.- Después de que la urea se ha disuelto, se agrega agua hasta completar 50 ml.
- 3.- Se filtra a través de una membrana de 0.45 μ para remover impurezas
- 4.- Para filtrar se usa una bomba de vacío o aspirador
- 5.- Se agregan 250 μ l de persulfato de amonio y 28 μ l de TEMED
- 6.- Se agita y se elimina el gas por 5 minutos (eliminar el gas es opcional)
- 7.- Se vacía en la charola o caja para elaboración del gel.

Precaución. El acrilamida líquido es neurotóxico y se debe manejar con guantes. No sobrecalentar la acrilamida (si la urea es disuelta a fuego lento) esto dará como resultado una pobre polimerización y resolución subóptima en el gel final. La eliminación del gas remueve algo del oxígeno que inhibe la polimerización.

2.3.2.3.2 Condiciones de PCR para secuenciar

Para llevar a cabo el PCR para secuenciación se requiere las siguientes condiciones:

1.- Cantidad de ADN

Un cuarto de reacción	media reacción	reacción completa
-----------------------	----------------	-------------------

Producto de PCR

500 pb 20 ng	20 ng	10 ng
800 pb 50 ng	50 ng	25 ng
1200 pb 80 ng	80 ng	40 ng

2.- Preparación de mezcla de reacción

(preparación como una mezcla master para PCR normal)

	Un cuarto de reacción	media reacción	reacción completa
Volumen final	10 μ l	10 μ l	20 μ l
Mezcla de rx. ter.	2 μ l	4 μ l	8 μ l
Cantidad de ADN	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Bufer 5 X para secuenciar	1 μ l	0 μ l	0 μ l
Agua desionizada (hasta)	10 μ l	10 μ l	20 μ l
Primers o iniciadores	¿		
Calibración del termociclador.			

	Un cuarto de reacción	media reacción	reacción completa
96 °C	30 seg	30 seg	30 seg
50 °C	15 seg	15 seg	15 seg
60 °C	4 min	4 min	4 min
Repetir este ciclo	60 veces	25 veces	25 veces

2.3.2.3.3 Precipitación de acetato de sodio/etanol

1.- En cada reacción de secuenciación, se agrega 1 μ l de acetato de sodio 3 M (NaOAc), pH 4.6 y 25 μ l de etanol al 95 % para reacciones de un cuarto y completas.

2.- Agite los tubos en el vórtex y déjelos a temperatura ambiente por 15 minutos para precipitar los productos extensión (cuando los tiempos de precipitación son de menos de 15 minutos esto traerá como resultado la pérdida de productos de extensión cortos).

3.- Gire los tubos en una microcentrífuga por 20 minutos a 12000 rpm (cheque y marque la dirección de los tubos de centrifugación. Esto ayudará en el proceso de resuspensión en el paso final).

4.- Con cuidado aspire el sobrenadante con una punta de pipeta y tire (no necesita cambiar punta).

5.- Lave la bolita con 150 μ l de etanol al 70%

6.- Centrifugue 5 minutos a 12000 rpm y con cuidado aspire el sobrenadante y tirelo.

7.- Seque la bolita en centrífuga de vacío o al aire.

8.- Resuspenda con 1 μ l de buffer de carga.

9.- Incube a 90 °C por 2 minutos en el termociclador y directamente transfiera las muestras en hielo.

Buffer de carga- Formamida: Dextran Azul EDTA (5:1).

Dextran Azul EDTA

25 mM EDTA pH 8.0 con Blue Dextran en una concentración final de 50 mg/ml

Formamida Desionizado

Procedimiento. En 1 ml de 25 mM de EDTA ph 8.0 y 0.05 g de Dextran azul disuelva y mezcle con 5 ml de formamida desionizada. Divida en partes iguales a 6 tubos Eppendorf y almacene a 4 °C.

2.4 APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA SILVICULTURA

Síntesis de ectomicorrizas de *C. cibarius* con *Quercus* sp. Esta consiste en unir al hongo simbionte con su hospedero *in vitro*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4.1 Aislamiento y propagación asexual de *Cantharellus cibarius*

Se llevaron a cabo varias salidas a campo al ejido el Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas. Se colectaron 24 basidiomas que fueron usados para su aislamiento siguiendo los métodos estándar para la propagación fúngica de acuerdo con las recomendaciones de Fries, (1979) y Danell, (1995). Este consiste en la transferencia de una pequeña muestra de tejido de la parte interna del contexto del píleo en el medio Melin Norkrans (MMN) bajo condiciones estériles. Una vez aislado y purificado, *C.*

cibarius fue cultivado nuevamente en MMN y ADA (agua desionizada agar) en cajas Petri de plástico, siguiendo las recomendaciones de Garza (1991). Las fórmulas de los medios MMN y ADA se pueden detallar en el anexo no. 1.

2.4.2 Germinación de semillas de *Quercus* sp.

En la región noreste de México, *C. cibarius* crece en asociación micorrícica con diferentes especies de encinos. En este estudio se utilizaron semillas de *Quercus* sp. como hospedero del hongo *C. cibarius*. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con H₂O₂ durante 45 minutos, lavadas con agua estéril y tratadas con Benlate a 100 ppm durante 12 horas. Después de esto, las semillas fueron transferidas a frascos con el medio de cultivo Agua Desionizada Agar (ADA), para su germinación *in vitro*.

2.4.3 Identificación molecular (PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos) de los cultivos puros de *C. cibarius*

Antes de utilizar la cepa de *C. cibarius* en la síntesis ectomicorrícica con *Quercus* sp., su identificación fue corroborada con las técnicas moleculares PCR-RFLP del ITS y secuenciación de nucleótidos de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear. Lo anterior se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular del Departamento de Silvicultura de la Universidad del Estado de Oregon en E.U.A.

2.4.4 Síntesis de ectomicorrizas *in vitro* de *Cantharellus cibarius* y *Quercus* sp.

Una vez colonizado el medio de cultivo de las cajas Petri por *C. cibarius*, en condiciones estériles, los bordes de las tapas y bases fueron cortados en forma triangular, formando un orificio en forma de rombo. Se utilizaron plántulas de encino de cuatro

semanas de edad y se colocó una plántula por cada caja Petri. La raíz de la plántula se colocó entre el agar colonizado por el hongo y la superficie interna de la base de la caja Petri. El tallo se colocó a través de los orificios previamente cortados en la caja Petri exponiendo la parte aérea (foliar) hacia el exterior. Los orificios fueron tapados con vaselina para evitar evaporación del medio de cultivo y entrada de contaminantes.

Posteriormente las cajas fueron sellados con parafilm. Las cajas con plántulas y micobionte fueron incubados durante 6 meses para inducir la micorrización a 20 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz fluorescente. Por cada tratamiento, 15 réplicas (cajas Petri) fueron utilizadas. Seis meses después de la inoculación se tomaron muestras de las raíces para observar su morfología y determinar su estatus micorrícico.

La síntesis micorrícica de *C. cibarius* en las plántulas se comprobó mediante la caracterización de acuerdo con la morfología de las raíces del hospedero y la aplicación del método de tinción (Phillips & Hayman, 1970) para la observación de micorrizas. Lo anterior también se llevó a cabo en las plántulas expuestas al hongo en los medio de cultivo ADA y control.

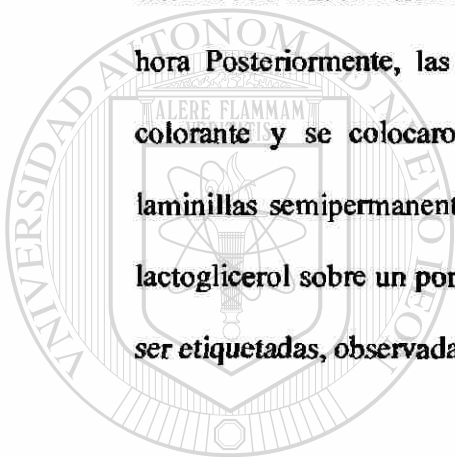
Solamente se evaluó el porcentaje de micorrización en los tres tratamientos (MMN, ADA y control). La base de datos fue analizada y graficada con el procesador de textos Excel.

2.4.5 Método de Phillips y Hayman para la determinación de estatus micorrícico en la síntesis de ectomicorrizas.

Después de 6 meses de la interacción entre hongo-planta, se realizó un análisis bajo el microscopio estereoscópico y compuesto para observación de raíces colonizadas y presencia de manto. Las raíces fueron observadas siguiendo el método de tinción para

la observación de ectomicorrizas (Phillips & Hayman, 1970). Las raíces de encino se lavaron con agua corriente. Las muestras se colocaron en cápsulas de plástico para tinción (Tissue-Tek, Fisher Scientific Co., Pittsburg, PA.) y se aclararon en una solución de KOH 10 % en baño maría durante una hora, después se enjuagaron con agua.

Posteriormente, se neutralizaron en una solución de HCl 1-3% por 30 minutos, para después ser enjuagadas con agua nuevamente. Después de esto, las muestras se tiñeron con una solución de Azul de Tripano 0.05% en lactoglicerol en baño maría por 1 hora. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con agua para quitar el exceso de colorante y se colocaron en solución de lactoglicerol. Finalmente, se prepararon laminillas semipermanentes, donde las raíces colonizadas se colocaron en una gota de lactoglicerol sobre un portaobjetos, se colocó el cubreobjetos y se selló, para finalmente ser etiquetadas, observadas y fotografiadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 TAXONOMÍA MORFOLÓGICA

Taxonomía de las especies del género *Cantharellus*.

Las especies del género *Cantharellus* que fueron determinadas morfológicamente son las siguientes: *Cantharellus cibarius*, *C. lateritius*, *C. cinnabarinus* y *C. minor*.

En este estudio se visitaron 15 localidades de los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Durango, Chihuahua, Veracruz, Querétaro, Guanajuato y Chiapas. Se recolectaron 90 colectas de las diferentes especies. El estado de Nuevo León presentó mayor número de localidades para *Cantharellus cibarius*. Sin embargo, Tamaulipas presentó el mayor número de especies (4) en menos número de localidades.

Las especies de *Cantharellus* fueron recolectadas de bosques de encino (BE), mixto de pino-encino (BPE), matorral xerófilo con encino (MXE) y bosque de coníferas (BC). Un ejemplar *Cantharellus* sp. del complejo *cibarius* fue identificado como *C. formosus* según el análisis de las secuencias de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear. Otros especímenes determinados como *C. cibarius* al alinearlas en el banco de genes coincidieron con especies de *Cantharellus* no descritas aún.

3.1.1 Micogeografía de las especies del género *Cantharellus*

La distribución geográfica de las especies estudiadas fueron trazadas sobre las provincias biogeográficas de México. Éstas se encuentran distribuidas en el Altiplano Norte, Altiplano Sur, Golfo de México, Sierra madre Oriental, S. M. Occidental y Los Altos de Chiapas como se puede apreciar en la figura 3.



Figura 3. Micogeografía de las especies de *Cantharellus*. (●) *C. cibarius*; (■) *C. formosus*; (□) *C. minor*; (*) *C. lateritius*; (▲) *C. cinnabarinus*; (▼) *Cantharellus* sp.

3.1.2 Descripción de las especies

3.1.2.1 *Cantharellus cibarius* Fr.

Fig. 4

Píleo de 30-46 mm de diámetro, depresso al centro, liso, seco, de color naranja o amarillo huevo, de margen enrollado, lobulado y entero, la superficie del píleo reacciona negativo al KOH. Himenóforo decurrente con venaciones o pseudoláminas, separadas, anastomosadas en la base, amarillas, gruesas, de bordo entero. Estípite de 35-50 x 8-10 mm, atenuándose hacia la base, seco, liso, amarillo naranja (ferruginoso al maltratarse), flexible, carnosos, sólido. Contexto de 4-6 mm de ancho, amarillo, naranja claro bajo el cutis, no cambia al exponerse, carnosos, olor dulce, sabor agradable.

Esporas de (4.9) 6.5-11.4 x 4.9-5.3 (7.5) μm , ampliamente elipsoides, lisas, de pared delgada, con un contenido intracelular granular o aceitoso que le da apariencia de rugosidad en algunas esporas, hialinas en KOH, amarillas en reactivo de Melzer.

Basidios de 53.3-82 (86.1) x (6.1) 7.3 - 9 (9.8) μm , claviformes o pedicelados, bi-

tetraspóricos, de pared ligeramente gruesa, con un contenido intracelular granular o aceitoso que a veces da el aspecto de revivir en KOH, esterigmas de 5.7-6.9 (9) μm de

longitud, hialinas en KOH. Trama himenoforal entrelazada, hifas de 3.2-10.2 μm de diámetro, cilíndricas-sinuadas, ramificadas, de pared gruesa, con un contenido granular

o aceitoso intracelular que en muchas hifas da el aspecto de revivir en KOH. Epicutis del píleo de hifas de 4.1-11.4 μm de diámetro, anchas, sinuadas o vermiformes, ramificadas,

de pared gruesa, hialinas y con un contenido o cuerpos intracelulares que en la mayoría de las hifas da el aspecto de revivir en KOH. Trama del píleo de hifas entrelazadas.

Trama del estípite de hifas entrelazadas en algunas partes en arreglo paralelo, hifas de 2.8-9 μm de diámetro, de paredes gruesas, hialinas y con cuerpos intracelulares que en la

mayoría da el aspecto de revivir en KOH. Septos abundantes, fíbulas presentes en todas las partes del basidiocarpo.

Hábitat.

Cuerpo fructífero de crecimiento gregario, en el mantillo del bosque mixto de *Pinus* y *Quercus* durante los meses de septiembre y octubre.

Material estudiado.

Durango: Municipio de Pueblo Nuevo, El Mil Diez, Pérez M. 250 (ITCV), Navajos, García 1790 (ITCV), Navíos, camino Dgo.-Mazatlán, García 1307, 4188 (ITCV); **Nuevo León:** Municipio de Santiago, El Ranchito, Guevara 57 (ITCV). Municipio de Garza García, meseta de Chipinque, Guevara 56 (ITCV), Garza 315 (CFNL), Garza 1495 (CFNL). La Camotera, Potrero Redondo, Garza 52, (CFNL). La Purísima, Iturbide, Garza 737, 1605 (CFNL). Municipio de Santiago, El Cercado, García 4522 (ITCV), Las Adjuntas, García 15 (ITCV), Municipio de Zaragoza, La Encantada Guevara 647 (ITCV); **Tamaulipas:** Villa Mainero, Garza S/N (CFNL). Municipio de Victoria, Cañón del Novillo, García 7875 (ITCV), Madroño, Guevara 783, 815, 604 (ITCV), García 4823 (ITCV). Municipio de Casas, Rancho El Lajadero, García 10610 (ITCV). Municipio de Gómez Farías, Ejido San José, Guevara 813 (ITCV); **Querétaro:** Municipio de Amelco, Laguna de Servín, García 10125 (ITCV), Garza S/N (CFNL); **Chiapas:** Municipio de San Cristóbal Km. 4 carretera S.C-Tenejapa, Guevara 808 (ITCV); **Guanajuato:** Sierra de Santa Rosa, Km. 83 carretera Dolores Hidalgo-Gto., García 10305 (ITCV); **Coahuila:** Sierra del Carmen, Guevara 850, 851, 852 (ITCV); **Veracruz:** Xalapa, García 6487 (ITCV); **Durango:** Navajos, García 1790 (ITCV), Navíos, García 1307 (ITCV), Km. 115 Carretera Dgo.-Mazatlán, García 4188, García (ITCV); **Chihuahua:** Cuiteco M. Quiñónez S/N (UCJ).

Observaciones.

Esta especie es común en bosques de encino, se caracteriza por presentar el basidiocarpo de color amarillo huevo, el himenóforo con pseudoláminas o venas. Se diferencia de *Cantharellus cinnabarinus* Schw. por el color bermellón que este último presenta.

El material estudiado concuerda bien con la descripción de Corner (1962) y Bigelow (1978). Castillo *et al.*, (1979) citaron este hongo para Nuevo León, mencionando que crece en bosques de encino y mixtos. Es una especie micorrícica con *Pinus* y *Quercus* según Trappe (1962). Es un hongo comestible y de buena calidad gastronómica.



Figura 4. Basidiomas de *Cantharellus cibarius* de la localidad El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas

3.1.2.2 *Cantharellus lateritius* (Berk.) Singer

Fig. 5

Píleo de 15 a 50 mm de diámetro, ligeramente cóncavo o depreso al centro, liso o ligeramente subescamoso, seco, de color anaranjado mostaza, de margen enrollado, lobulado, agrietado y entero, cambiando de color al maltratarse a un naranja ferruginoso, la superficie del píleo reacciona al KOH positivo a un naranja fuerte y con el FeSO₄ positivo o guindo. Himenóforo decurrente, liso o ligeramente con venaciones, de color naranja, reacciona con el KOH negativo y con el FeSO₄ negativo. Estípites de 20–54 (120) x 5–15 (20) mm. Atenuándose gradualmente hacia la base o sinuado, liso o finamente fibriloso, seco, naranja o amarillo mostaza a veces blanquecino hacia la base, cambiando al maltratarse a un ferruginoso, sólido a veces hueco. Contexto de 2–6 mm de ancho, blanco a veces cambiando a naranja fuerte, caroso, olor dulce, sabor agradable.

Esporas de (7.3) 8.2–9.4 x (4.5) 4.9–5.3 (5.7) μm, elipsoides o ampliamente elipsoides lisas, con un contenido intracelular verdoso que en algunas esporas le da la apariencia de rugosidad, hialinas en KOH, amarillas en reactivo de Melzer. Basidios de 60–74 x 8.2–10.2 μm, claviformes, tetráspóricos, rara vez trispóricos, con un contenido intracelular granular verdoso, hialinos en KOH, esterigmas largos. Trama himenoforal entrelazada, hifas de 4–16 μm de diámetro, cilíndricas o vermiformes y ramificadas, algunas constrictas, de pared delgada, hialinas en KOH. Epicutis del píleo de hifas de 5–8 μm de diámetro, entrelazadas, cilíndricas y algunas constrictas de pared gruesa, amarillas en KOH, con algunas hifas terminales más o menos erectas, sin contenido intracelular (no como las hifas del contexto). Epicutis del estípites de hifas más o menos postradas y coloreadas en KOH. Trama del estípites ligeramente paralela a entrelazada. Fíbulas y septos presentes en las hifas de la trama himenoforal, píleo y estípites.

Hábitat.

Cuerpo fructífero de crecimiento gregario, en bosques mixtos de *Pinus* spp. y *Quercus* spp. o en bosques de *Quercus rysophylla* Weath., en los meses de septiembre y octubre.

Material estudiado.

Nuevo León: Municipio de Santiago, camino El Salto a Potrero Redondo, Guevara 51 (ITCV), La camotera, García 922 (ITCV). El Manzano, García (1870), Municipio de Monterrey, La Estenzuela Guevara 847 (ITCV); Municipio Garza García, Chipinque, Garza 299 y 302 (CFNL); **Durango:** Municipio de Pueblo Nuevo, Km. 110 carretera Durango-Mazatlán, Guevara 52 (ITCV), El Mil Diez, Pérez M. 245 (UNL); **Tamaulipas:** Municipio de Victoria, Cañón del Novillo, García 7854 (ITCV).

Observaciones.

Este hongo se caracteriza por presentar el himenóforo liso, por mancharse el píleo de color naranja ferruginoso al maltratarse y por reacción del píleo al KOH, la cual es de un color naranja fuerte. A simple vista puede ser confundido con *Cantharellus cibarius* Fr., pero se diferencia por la superficie del himenóforo ya que este último presenta venaciones.

El material estudiado concuerda bien con la descripción de Bigelow, (1978) quien lo considera dentro del género *Cantharellus* por presentar fibulas, sin embargo, otros autores lo consideran dentro del género *Craterellus* por presentar el himenóforo liso y lo denominan *Craterellus cantharellus* Schw., el cual es sinónimo de *C. lateritius* (Graham, 1970). Esta especie se describe por primera vez para México. Probablemente sea micorrizógeno con *Pinus* y *Quercus*. Es un hongo comestible.

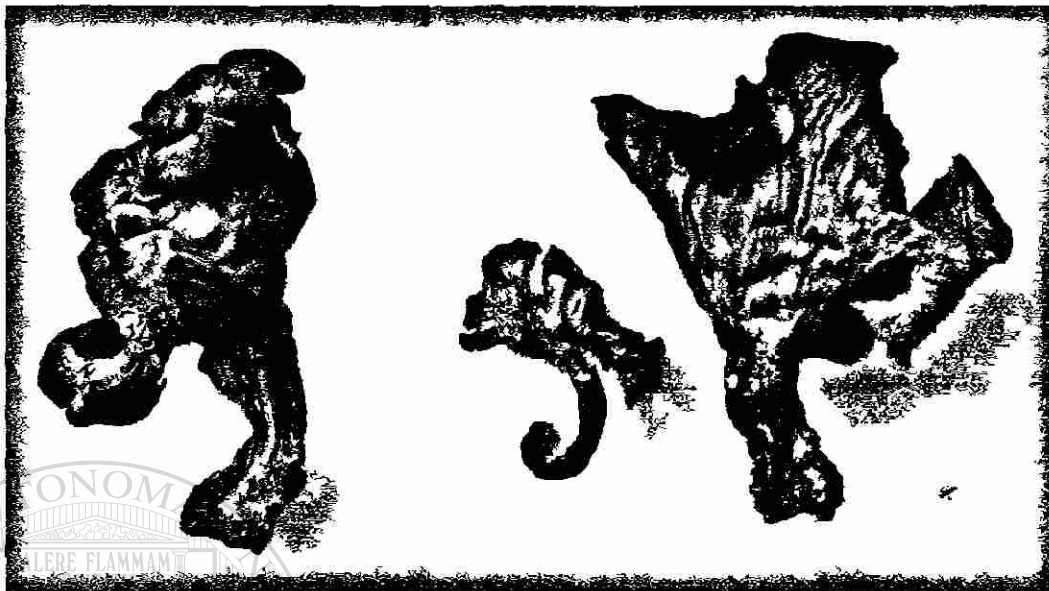


Figura 5. Basidiomas herborizados de *Cantharellus lateritius* de la localidad del Cañón del Novillo, Municipio de Victoria, Tamaulipas

3.1.2.3 *Cantharellus cinnabarinus* Schweinitz

Fig. 6

Pileo de 1-1.6 cm de ancho, convexo, plano convexo o plano cuando inmaduro, depresso a infundibuliforme, margen incurvado hacia adentro, undulado o lobado, de color rojo naranja o cinabarino, no higrófono, liso, seco, muy frágil, margen sin estrías,

Contexto delgado, de 2-3 mm de ancho, frágil, concoloro hacia la superficie del pileo mas claro hacia la parte interna. Olor y sabor fúngico. Pseudoláminas decurrentes, de 1-1.5 mm de ancho, estrechas, distantes, de color rojo naranja un poco mas claras, mas o menos gruesas, bifurcadas, anastomosadas e intervenosas, con el borde entero. Estípites de 1.5-3.5 cm de largo x 1.5-2 mm de ancho, igual, algunos sinuados o curvados, muy frágil, liso o con pequeñas fibras, de color cinabarino o rojo naranja, base algo blanquecina.

Esporas de 7-11 x 4-7 μm , ampliamente elipsoides, elipsoides a oblongas, reniformes vistas de lado algunas, vistas de frente algunas se comprimen a la mitad de la

espora, lisa, de pared delgada, hialinas con KOH, inamiloides. Basidios de 38-66 x 7.5-10 μm , elongados, claviformes, con 4-6 esterigmas de 4-8 μm , de longitud, robustos. Basidiolos abundantes e irregulares. Subhimenio con fíbulas. Epicutis del pileo con hifas postradas y entrelazadas, hifas cilíndricas o mas o menos infladas de 4-9 μm , de diámetro, con contenido intracelular aparentemente con pigmentos, pared delgada a mas o menos gruesa. Hifas del contexto cilíndricas a infladas de 3-13 μm de ancho. Trama himenoforal de hifas entrelazadas, de pared delgada, con un contenido granular con fíbulas anchas presentes.

Hábitat.

C. cinnabarinus es raro en la región Noreste del país, se encuentra en bosque mesófilo de montaña bajo *Quercus* sp. aunque a distancia se presenta *Pinus* sp. Crece solitario o en pequeños grupos en forma cespitosa a 1130 m.s.n.m., temperatura ambiente de 20 °C en el mes de septiembre y octubre. Cuando se herboriza a secado

lento algunos de los ejemplares mantienen su color bermellón. Otros cambian a crema y son muy parecidos a *C. minor*.

Material estudiado.

Tamaulipas: Municipio de Gómez Farías, San José (el Diez Millones, camino al vivero), Guevara 812 (ITCV). **Camino al Elefante, García S/N.** **Guanajuato:** Sierra de Santa Rosa Km. 83 Carretera Dolores Hidalgo-Guanajuato, García 10504 (ITCV). **Nuevo León:** Municipio de Zaragoza, La Encantada, García 8230 (ITCV) y Garza S/N (CFNL). **Chihuahua:** Cuiteco M. Quiñónez S/N (UCJ).



Figura 6. Basidiomas de *Cantharellus cinnabarinus* de la localidad del Ejido San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas

3.1.2.4 *Cantharellus minor* Peck

Fig. 7

Píleo de 0.5-3 cm. de diámetro, de color amarillo naranja o huevo, convexo a plano, ligeramente deprimido al centro a infundibuliforme, liso, seco, algunos con superficie ligeramente irregular, otros con ondulaciones o agrietados, con el margen entero y hacia arriba. Pseudoláminas con borde entero, decurrentes con lamélulas, secas, de borde entero, quebradizas, distantes, mas o menos gruesas, con venaciones transversales otras ramificándose bifurcadamente o trifurcadas de color amarillo naranja. Estípite de 7-30 mm de largo x 1-3 mm de ancho, central, mas o menos flexible, de color amarillo naranja, liso, seco, igual, sinuado o ligeramente curvo, aparentemente hueco. Contexto del píleo y estípite de color amarillo naranja blanquecino, muy delgado con olor y sabor fúngico.

Esporas de 8-10 x 4-6 μm , ampliamente elipsoides, elipsoides a oblongas, algunas reniformes, lisas, inamiloides, con un contenido granular intracelular, de pared lisa y delgada, hialinas en agua. Basidios de 30–65 x 6-10 μm , elongados, claviformes, de 4-6 esterígmias. Epicutis de píleo de hifas postradas y entrelazadas, cilíndricas de 3-10 μm , algunas hifas erectas, con pigmentos amarillos intracelulares. Hifas del contexto cilíndricas de 2-6 μm de diámetro, Hifas de la trama himenoforal entrelazada de hifas cilíndricas de 1.5 μm de diámetro. Fíbulas presentes y abundantes.

Hábitat.

C. minor crece abundantemente en la localidad Ejido San José, Municipio de Gómez Farías, Tam. Se encuentra en bosque mesófilo de montaña bajo *Quercus* sp., crece solitario, en pequeños grupos o en forma cespitosa a 1150 m.s.n.m. en el mes de septiembre. Cuando se herboriza cambia a crema y son muy parecidos a *C. cinnabarinus*.

Material estudiado.

Tamaulipas: Municipio de Gómez Farías, San José (camino al vivero) Guevara

771, 772, 769, 770, 810, 811, 818 (ITCV).



Figura 7. Basidiomas de *Cantharellus minor* de la localidad del Ejido San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas

3.1.2.5 *Cantharellus formosus* Comer

Figs. 8 y 9

Píleo de 1.2–8 cm de diámetro, convexo, plano o deprimido al centro a infundibuliforme, algunos giboso, de textura seca a higrófono con cutícula no desprendible, superficie lisa de color amarillo grisáceo con tintes café y algunos con tonos guindas, de borde entero, involuto y ondulado, algunos agrietados hacia el borde. Contexto, ancho blanco, amarillento hacia la superficie, caroso, de 0.8-2.5 cm, con olor agradable, sabor fúngico. Himenio con pseudoláminas o venaciones, decurrente, con venaciones transversales, de borde entero, de 1.4-5 cm de longitud, poco profundas, de color amarillo pálido. Estípote de 2.5-6 de longitud x 1-2 cm de ancho, robusto, igual, cilíndrico o atenuándose ligeramente hacia la base, liso, seco, de color blanco amarillento, amarillo azufre hacia la base, sólido, caroso.

Esporas de 8-14 x 6-8 μm , ampliamente elipsoides, lisas, algunas mas o menos elongadas, con un contenido granular intracelular, de pared delgada a mas o menos gruesa, hialinas en KOH. Basidios de 70-80 x 8-10 μm , elongados, claviformes, sinuados, tetraspóricos, algunos aparentemente monospóricos, con un contenido granular intracelular de pared gruesa, hialinos en KOH, fibulas presentes en hifas de la trama y basidiolos. Himenio de color amarillo naranja.

Hábitat.

Cantharellus formosus crece en bosque de encino (*Quercus* spp.), en grupo o solitario, algunos se desarrollan en forma cespitosa a 1450 m.s.n.m., en áreas rocosas, suelos bien drenados con pendiente pronunciada, recolectado en el mes de septiembre.

Material estudiado.

Tamaulipas: Municipio de Victoria, El Madroño, Guevara 796, 805 (ITCV).



Figura 8. Basidiomas de *Cantharellus formosus* de la localidad El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas

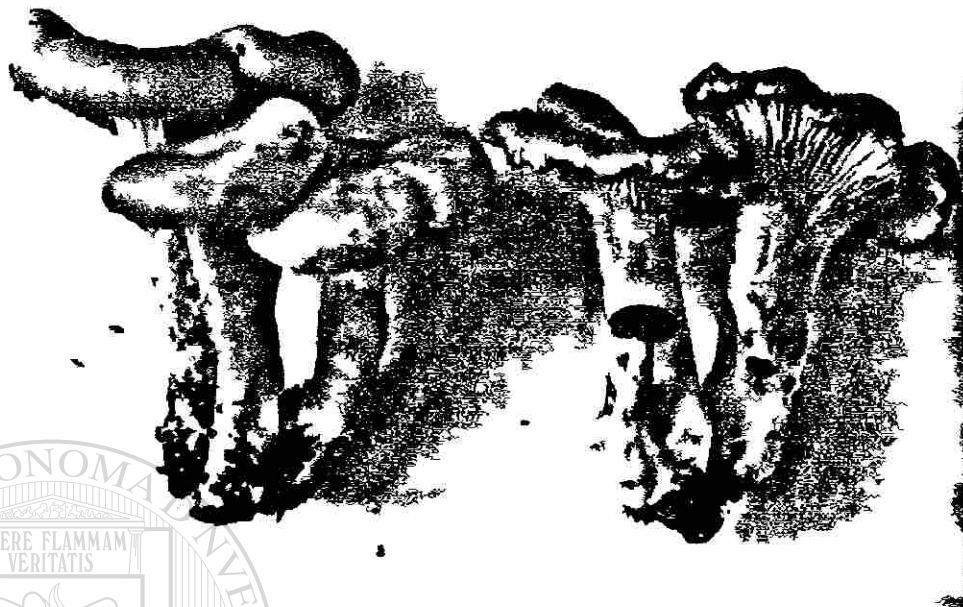


Figura 9. Comparación de basidiomas de *Cantharellus cibarius* (izquierda) y *C. formosus* (derecha)

3.1.2.6 *Cantharellus* sp.

Fig. 10

Píleo de 3 cm de diámetro, convexo, plano a infundibuliforme, de textura seca,

superficie escamosa hacia el centro, mas o menos liso hacia el margen, escamas de color obscuro notablemente visibles a simple vista aún cuando seco, de color naranja a amarillo, de borde entero, involuto y ondulado, algo agrietado hacia el borde. Con olor agradable, sabor harináceo. Himenio con pseudoláminas o venaciones, bifurcadas hacia el margen, interconectadas hacia el margen, decurrentes, sin venaciones transversales hacia el estípite, de borde entero, de 1.5-2 cm. de longitud, poco profundas, de color amarillo huevo a naranja. Estípite de 3.5 de longitud x 0.7 cm. de ancho, igual o cilíndrico, superficie lisa, seca, sin escamas o fibrilla, concoloro al píleo (anaranjado huevo), sólido, mas o menos caroso.

Esporas de 10-16 x 6-8 μm , ampliamente elipsoides, lisas, algunas mas o menos elongadas, con un contenido granular intracelular, de pared delgada a mas o menos gruesa, hialinas en KOH. Basidios de 70-100 x 10-12 μm , elongados, claviformes, sinuados, monospóricos, tetraspóricos, algunos aparentemente con mas de cuatro esterigmas, con un contenido granular intracelular de pared gruesa, hialinas en KOH, fibulas presentes en hifas de la trama y basidio los.

Hábitat.

Cantharellus sp. crece en bosque mesófilo bajo *Quercus* sp., en forma solitario.

Fue recolectado en el mes de septiembre.

Material estudiado.

Tamaulipas: Camino a San José-al vivero, Municipio de Gómez Farías, Guevara 814 (ITCV).

Observaciones.

Este hongo se caracteriza por presentar escamas oscuras en el centro del píleo.

A diferencia de otras colectas de *Cantharellus* esta característica no se ha observado.

Las colectas de *Cantharellus* de las costas del Pacífico Oeste de E.U.A. presentan esta característica. Corner (1966) propuso tres variedades dentro de *Cantharellus cibarius* con píleo escamoso. Las variedades son *Cantharellus cibarius* var. *squamulosus*, *Cantharellus cibarius* var. *squamosus* y *Cantharellus cibarius* var. *longipes*. El primero se caracteriza por presentar el píleo café, el segundo por presentar el píleo de color amarillo huevo con escamas ahumadas y la tercera con píleo agrietado por las escamas, estípites elongado y venaciones muy estrechas, apretadas o juntas.



Figura 10. Basidioma de *Cantharellus* sp. (píleo escamoso) de la localidad San José, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas

3.2 TAXONOMÍA MOLECULAR

Los resultados del análisis del ITS y de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear se presentan a continuación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.1 Estudios del ITS en el género *Cantharellus*

Las nuevas técnicas moleculares (PCR-RFLP) son ampliamente usadas por su “poder de resolución” para distinguir especies de diferentes grupos taxonómicos. La región del ITS presenta variación de sus secuencias y es utilizado para la identificación a nivel de especie utilizando enzimas de restricción para el análisis del RFLP. Esta técnica fue aplicada en muestras de tejido de especímenes herborizados provenientes de los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Durango, Querétaro, Guanajuato, Chiapas y

Veracruz, fueron procesadas para la amplificación del ITS completo del ADN ribosomal nuclear correspondiente a 36 colectas y cinco cultivos puros de *Cantharellus*.

En la tabla 1 se presenta los especímenes analizados molecularmente de *Cantharellus cibarius* de diferentes localidades y hábitat así como año y número de colecta.

Tabla. 1. Especie, hábitat, localidad, número y año de colecta de *Cantharellus cibarius* estudiadas molecularmente de México

Especie	Hábitat	Localidad	Núm. Colecta	Año de Colecta
<i>Cantharellus</i>	Bosque de Coníferas	La Encantada, N.L.	2423 (CFNL)	1982
		La Encantada, N.L.	647 (ITCV)	1985
		La Encantada, N.L.	8219 (ITCV)	1992
	Bosque de Pino-Encino	Chipinque, N.L.	1495 (CFNL)	1997
	Bosque de Encino	Iturbide, N.L.	1605 (CFNL)	1997
	Matorral Xerófito con Encino	El Cercado, N.L.	4522 (ITCV)	
	Bosque de Encino	El Madroño, Tam.	604 (ITCV)	1985
		El Madroño, Tam.	4823 (ITCV)	1985
		El Madroño, Tam.	781 (ITCV)	1999
		El Madroño, Tam.	783 (ITCV)	1999
		El Novillo, Tam.	7875 (ITCV)	1992
		El Novillo, Tam.	8303 (ITCV)	1992
		Cultivo puro del Madroño, Tam.	104 (ITCV)	2000
	Bosque Mesófilo	San José, El Vivero, Gómez Farías, Tam.	813 (ITCV)	2000
	Bosque de Pino-Encino	Navíos, Durango	1307 (ITCV)	1981
		Navajos, Durango	1790 (ITCV)	1981
		Km. 115, Durango	4188 (ITCV)	1984
	Bosque de encino	Laguna de Servín, Qro.	10125(ITCV)	1996
?	Carr. San Cristóbal-Chiapas	808 (ITCV)	1986	

En la tabla 2 se presentan las diferentes especies de *Cantharellus* estudiadas a nivel molecular, así como su hábitat, localidad, número y año de colecta.

Tabla 2. Especie, hábitat, localidad, número y año de colecta de las especies de *Cantharellus* estudiadas molecularmente de México

Especie	Hábitat	Localidad	Núm. Colecta	Año de Colecta
<i>Craterellus cinereus</i>	Bosque de Pino-Encino	El Novillo, Tam.	30 (ITCV)	1992
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque Mesófilo	San José, El Vivero, Gómez Farías, Tam.	S/N (ITCV)	2000
			812 (ITCV)	2000
<i>Cantharellus lateritius</i>	Bosque de Pino-Encino	La Camotera, N.L.	922 (ITCV)	1980
		El Manzano, N.L.	1870 (ITCV)	1981
	Bosque de Encino	El Novillo, Tam.	7854 (ITCV)	1992
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque Mesófilo	San José-El Vivero, Tam. Gómez Farías, Tam.	771 (ITCV)	1999
		Camino al Vivero, Tam.	811 (ITCV)	2000
<i>Cantharellus sp.</i>	Bosque de Encino	El Madroño, Tam.	796 (ITCV)	1999
			805 (ITCV)	1999
			816 (ITCV)	2000
	Bosque Mesófilo	San José-El Vivero, Tam. Gómez Farías, Tam.	814 (ITCV)	2000
<i>Cantharellus aff. guayanensis</i>	Bosque de Encino	Los Pescadores, N.L.	119 (ITCV)	1983
Cult. (tubo) 2 (esclerocios)			101 (CFNL)	
Cult. (tubo) 3 anaranjado			102 (CFNL)	
Cult. (tubo) 4 blanco			103 (CFNL)	
Cult. (caja Petri) blanco crema	Bosque de Encino	El Madroño, Tam.	104 (ITCV)	2001
Cult. (caja Petri) 1 café oscuro			100 (CFNL)	

0150692

La amplificación de la región completa del ITS nuclear de las especies de *Cantharellus* estudiados se puede observar en la figura 11 (análisis de basidiocarpos) y 12 (análisis de cultivos puros de *Cantharellus*). En la figura 11, las líneas 1 *C. cibarius* No. col. García 4823, (BE, Tam.), 2 *C. cibarius* No. col. García 8219, (BC, N.L.), 3 *C. cinnabarinus* col. Guevara S/N (BM, Tam.), 4 *C. lateritius* No. col. García 7854 (BE, Tam.), 5 *C. cibarius* No. col. Garza 1495 (BPE, N.L.), 6 *C. cibarius* No. col. Garza 1605 (BE, N.L.), 7 *Cantharellus* sp. No. col. Guevara 796 (BE, Tam.), 9 *Cantharellus* sp. No. col. Guevara 805 (BE, Tam.), 11 *C. cibarius* No. col. García 4522 (MXE, N.L.), 13 *Cantharellus* sp. (escamoso) No. col. Guevara 814 (BM, Tam.), 14 *C. minor* No. col. Guevara 771 (BM, Tam.), 15 *C. cinnabarinus* No. col. Guevara 812 (BM, Tam.), 16 *Cantharellus* sp. No. col. Guevara 816 (BE, Tam.), 17 *C. cibarius* No. col. Guevara 813 (BM, Tam.), 19 *C. cibarius* No. col. García 1790 (BPE, Dgo.), 20 *C. cibarius* No. col. Guevara 647 (BC, N.L.), 23 *C. cibarius* No. col. García 10125 (BE, Qro.), 28 *C. cibarius* No. col. Guevara 783 (BE, Tam.), 29 *C. lateritius* No. col. García 1870 (BPE, N.L.), 30 *Cantharellus aff. amethysteus* No. col. Guevara 119 (BE, N.L.), 32 *C. cibarius* No. col. Guevara 808 (se desconoce el hábitat, Chips.), 36 *C. cibarius* (cultivo puro No.100 CFNL) todos amplificaron el ITS. En contraste, las líneas que no amplificaron su ITS fueron las líneas 8 *C. cibarius* No. col. García 4188 (BPE, Dgo.), 10 *C. cibarius* No. col. García 1307 (BPE, Dgo.), 12 *C. cibarius* No. col. García 8303 (BE, Tam.), 18 *C. minor* No. col. Guevara 811 (BE, Tam.), 21 *C. lateritius* No. col. García 922, (BPE, N.L.), 22 *C. cibarius* No. col. Guevara 604 (BE, Tam.), 24 *C. cibarius* No. col. García 10610 (BE, Tam.), 25 *C. cibarius* No. col. García 7875 (BE, Tam.) 26 *C. cibarius* No. col. Guevara 781 (BE, Tam.), 27 *C. cinereus* (= *Craterellus cinereus*) No. col. Guevara 30 (BPE, Tam.), 31 *C. cibarius* No. col. García 10305 (BE, Gto.), 33 *C. cibarius* No.

col. García 2423 (BC, N.L.), 34 *C. cibarius* No. col. García 15 (BPE, N.L.), 35 *C. cibarius* No. col. García 6487 (BM, N.L.).

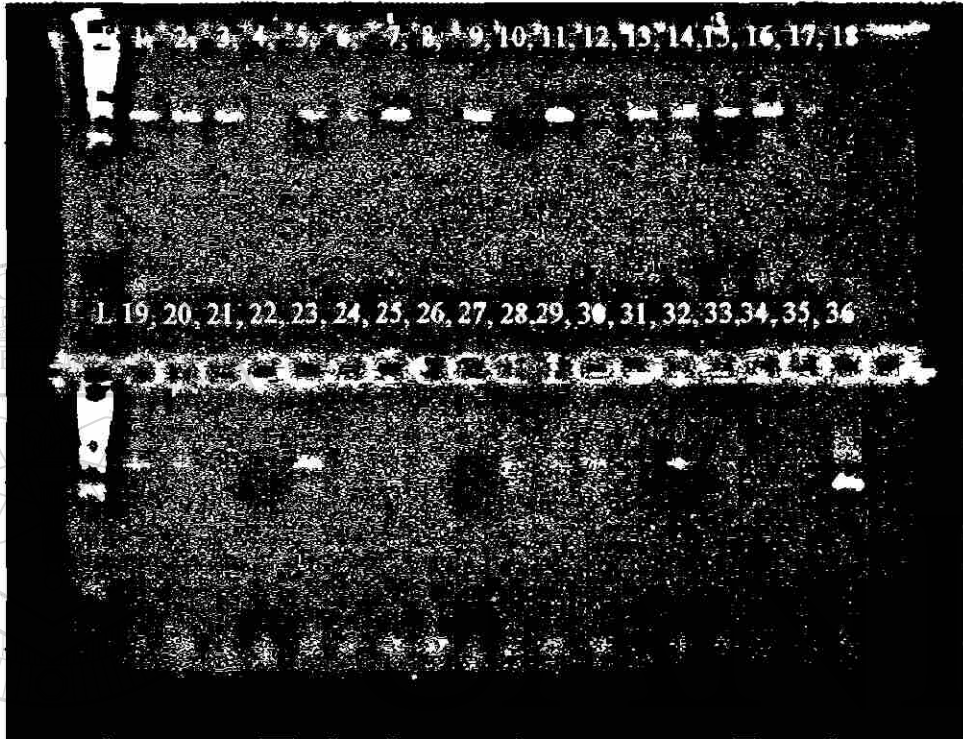


Figura 11. Amplificación del ITS nuclear (usando los primers ITS1F e ITS4) de 35 colectas de basidiocarpos de *Cantharellus* spp. y 1 cultivo puro de México. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. *C. cibarius* de 7 diferentes estados de México, líneas 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36 (cultivo puro); *Cantharellus* sp. líneas 7, 9, 13, 16; *C. lateritius* líneas 4, 21, 29; *C. cinnabarinus* líneas 3 y 15; *C. minor* líneas 14 y 18; *Cr. cinereus* 27 y *Cantharellus* aff. *guyanensis* 30. Al observar algunas de las muestras que no amplificaron se observó que eran colectas algo viejas o mal secadas para su herborizado e.g. líneas 8, 10, 22, 25, 33, 34 y 35.

En la figura 12 se observa que todas las muestras amplificaron el ITS en los cultivos puros, sin embargo presentaron diferente peso molecular a excepción de la línea 4 (No. col. Guevara 104, cultivo puro de *C. cibarius* de la localidad El Madroño, Tam.), que presenta un peso molecular similar al de la mayoría de los basidiocarpos en la figura

9. Las líneas 1, 2 y 3 son cultivos puros de *C. cibarius* de CFNL, línea 5 es un control positivo (*Leccinum* sp. del laboratorio de Ciencias Forestales de Oregon State University, EUA), línea 6 agua.

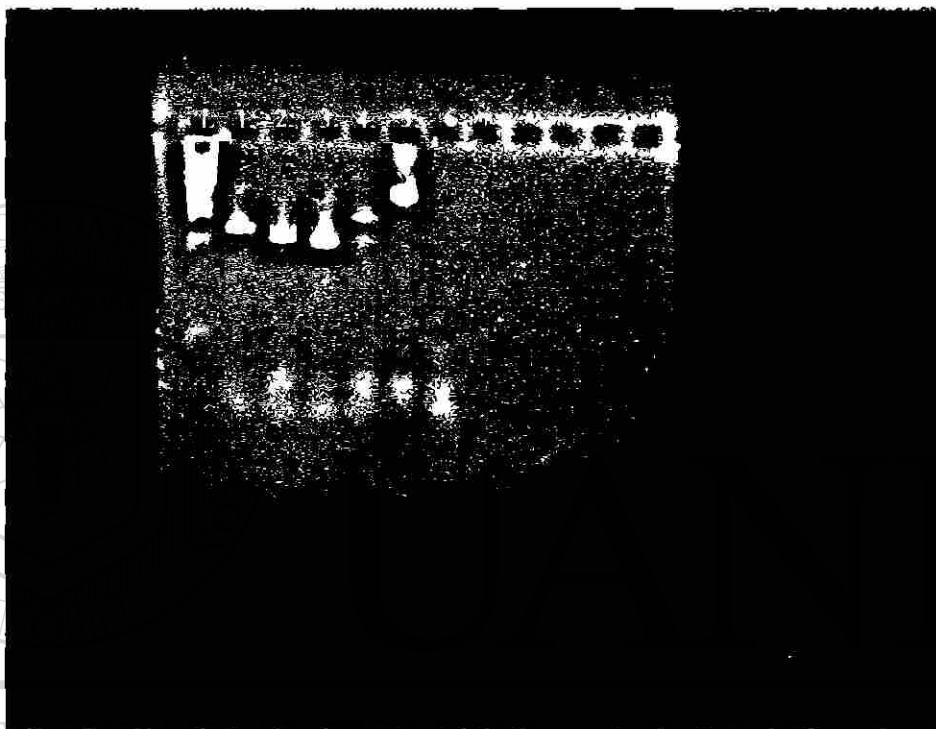


Figura 12. Amplificación del ITS nuclear (usando los primers ITS1f e ITS4) de cuatro cultivos puros aislados de basidiocarpos provenientes de los estados de Nuevo León y Tamaulipas. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. Cultivos puros de *C. cibarius* líneas 1-4; *Leccinum* sp. (control positivo) línea 5; agua, línea 6.

De las muestras que no amplificaron el ITS en la figura 11, éstas fueron tratadas con MgCl y BSA para la amplificación de esta región. Los resultados se observan en la figuras 13 y 14, respectivamente.

En la figura 13 se puede observar que las líneas 1 (col. 15, N.L.), 3 (col. 1307, Dgo.), 5 (col. 1870, N.L.), 9 (col. 647, N.L.), 12 (col. 6487, Ver.), 13 (col. 8302, Tam.), 16 (col. 19305, Gto.), 17 (col. 10610, Tam.), 18 (col. 781, Tam.), 19 (col. 783, Tam.), 20

(col. 813, Tam.) y 23 (col. 1495, N.L.) no amplificaron el ADN cuando se trataron con BSA. Sin embargo el resto de las muestras demostró amplificación del ADN.

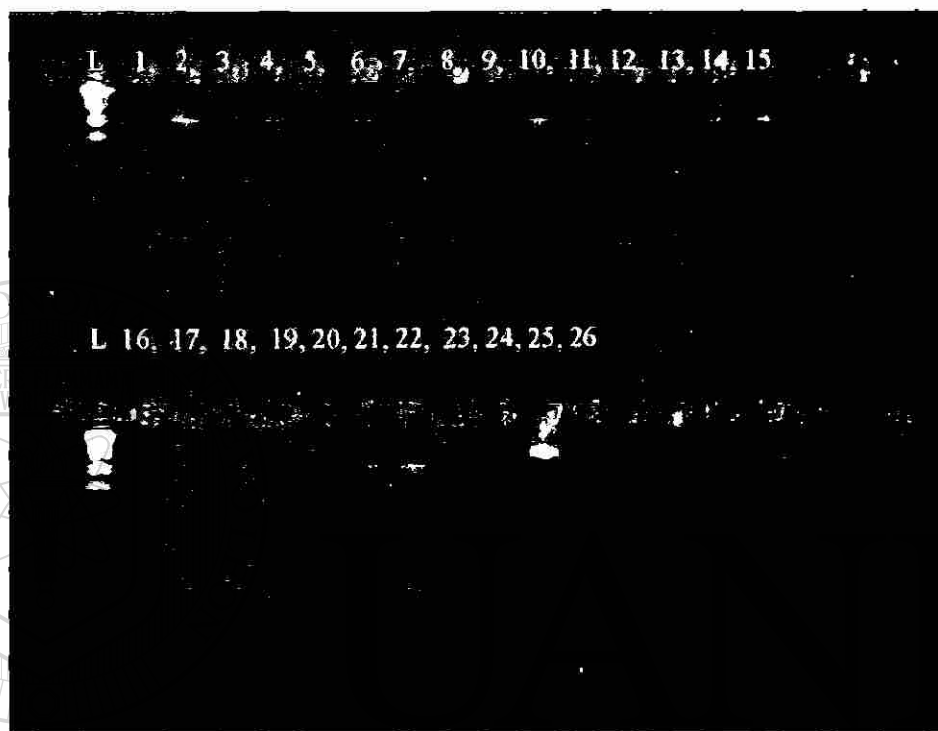


Figura 13. Amplificación del ITS nuclear con BSA (usando los primers ITS1f e ITS4). En la línea 1 *C. cibarius* (No. C. 15, pino-encino, N.L.), 2 *C. lateritius* (No. C. 922, pino-encino, N.L.), 3 *C. cibarius* (No. C. 1307, pino-encino, Dgo.), 4 *C. cibarius* (No. C. 1790, pino-encino, Dgo.), 5 *C. lateritius* (No. C. 1870, pino-encino, N.L.), 6 *C. cibarius* (No. C. 2423, pino, N.L.), 7 *C. guayanensis* (No. C. 119, encino, N.L.), 8 *C. cibarius* (No. C. 4188, pino-encino, Dgo.), 9 *C. cibarius* (No. C. 647, pino, N.L.), 10 *C. cibarius* (No. C. 604, encino, Tam.), 11 *C. cibarius* (No. C. 808, Chps.), 12 *C. cibarius* (No. C. 6487, mesófilo, Vtz.), 13 *C. cibarius* (No. C. 8302, encino, Tam.), 14 *C. cibarius* (No. C. 7875, encino, Tam.), 15 *Craterellus cinereus* (No. C. 30, pino-encino, Tam.). 16 *C. cibarius* (No. C. 10305, encino, Gto.), 17 *C. cibarius* (No. C. 10610, encino, Tam.), 18 *C. cibarius* (No. C. 781, encino, Tam.), 19 *C. cibarius* (No. C. 783, encino, Tam.), 20 *C. cibarius* (No. C. 813, mesófilo, Tam.), 21 *C. minor* (No. C. 811, encino, Tam.), 22 *C. lateritius* (No. C. 7854, encino, Tam.), 23 *C. cibarius* (No. C. 1495, pino-encino, N.L.), 24 *C. cibarius* (No. C. 1605, encino, N.L.), 25 *Leccinum* sp. (control positivo, OSU), 26 (control negativo, agua), L es un marcador estándar de 100 pb.

En la figura 14 podemos observar la amplificación del ITS utilizando MgCl. Las líneas donde no hubo amplificación fueron la 1 (No. col. García 15, N.L.), 16 (No. col. García 10305, Gto.), 17 (No. col. García 10610, Tam.) y 22 (No. col. García 7854, Tam.).

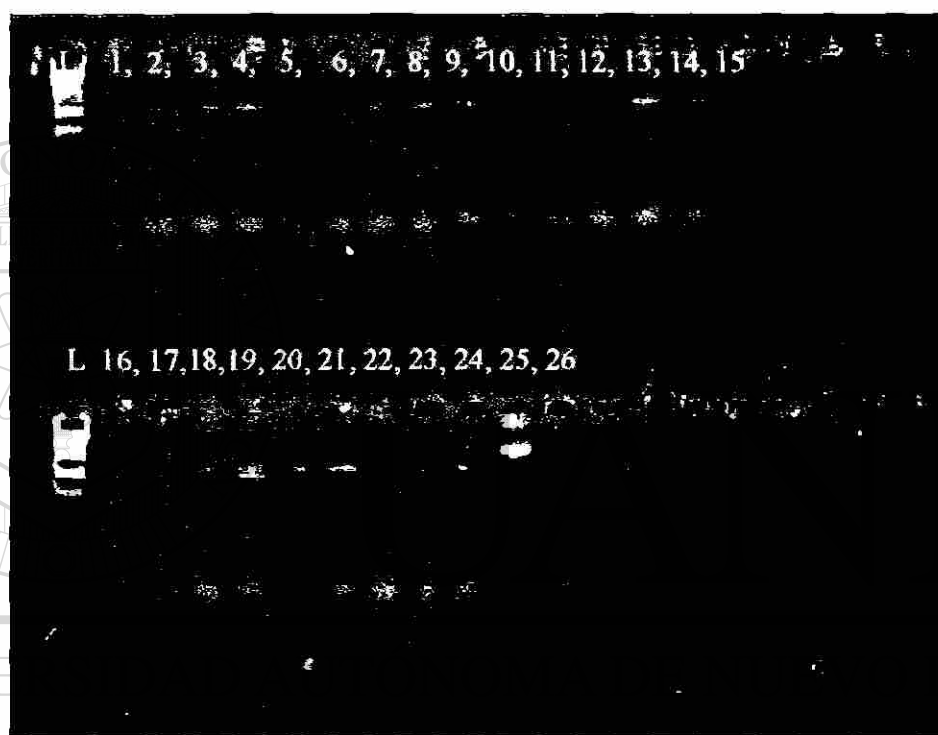


Figura 14. Amplificación del ITS nuclear con MgCl (usando los primers ITS1f e ITS4). En la línea 1 *C. cibarius* (No. C. 15, pino-encino, N.L.), 2 *C. lateritius* (No. C. 922, pino-encino, N.L.), 3 *C. cibarius* (No. C. 1307, pino-encino, Dgo.), 4 *C. cibarius* (No. C. 1790, pino-encino, Dgo.), 5 *C. lateritius* (No. C. 1870, pino-encino, N.L.), 6 *C. cibarius* (No. C. 2423, pino, N.L.), 7 *C. guayanensis* (No. C. 119, encino, N.L.), 8 *C. cibarius* (No. C. 4188, pino-encino, Dgo.), 9 *C. cibarius* (No. C. 647, pino, N.L.), 10 *C. cibarius* (No. C. 604, encino, Tam.), 11 *C. cibarius* (No. C. 808, Chps.), 12 *C. cibarius* (No. C. 6487, mesófilo, Vtz.), 13 *C. cibarius* (No. C. 8302, encino, Tam.), 14 *C. cibarius* (No. C. 7875, encino, Tam.), 15 *Craterellus cinereus* (No. C. 30, pino-encino, Tam.). 16 *C. cibarius* (No. C. 10305, encino, Gto.), 17 *C. cibarius* (No. C. 10610, encino, Tam.), 18 *C. cibarius* (No. C. 781, encino, Tam.), 19 *C. cibarius* (No. C. 783, encino, Tam.), 20 *C. cibarius* (No. C. 813, mesófilo, Tam.), 21 *C. minor* (No. C. 811, encino, Tam.), 22 *C. lateritius* (No. C. 7854, encino, Tam.), 23 *C. cibarius* (No. C. 1495, pino-encino, N.L.), 24 *C. cibarius* (No. C. 1605, encino, N.L.), 25 *Leccinum* sp. (control positivo, OSU), 26 (control negativo, agua), L es un marcador estándar de 100 pb.

En la figura 15 se puede observar la amplificación del ITS de *C. cibarius* proveniente de diferentes hábitat así como de *C. cinnabariumus*, *C. lateritius*, *C. minor* y un cultivo puro de *C. cibarius*. Las 9 líneas a la izquierda no fueron tratadas con MgCl mientras que las de la derecha sí. En esta figura a la izquierda se puede observar que la línea 1 (No. col. García 8219, *C. cibarius* de coníferas, N.L.), 2 (No. col. García 4823, *C. cibarius* de encino, Tam.) y el control, no amplificaron el ADN. En contraste, las mismas muestras tratadas con MgCl, si amplificaron el ADN. Excepto la línea 6 (No. col. Guevara 771, *C. minor* de bosque mesófilo, Tam.). Además se puede observar que el producto de la amplificación del cultivo puro de *C. cibarius* en la línea 7 (aislado de basidiocarpos creciendo en bosque de encino en Tamaulipas) concuerda con el mismo peso molecular de los basidiocarpos del resto de las muestras.

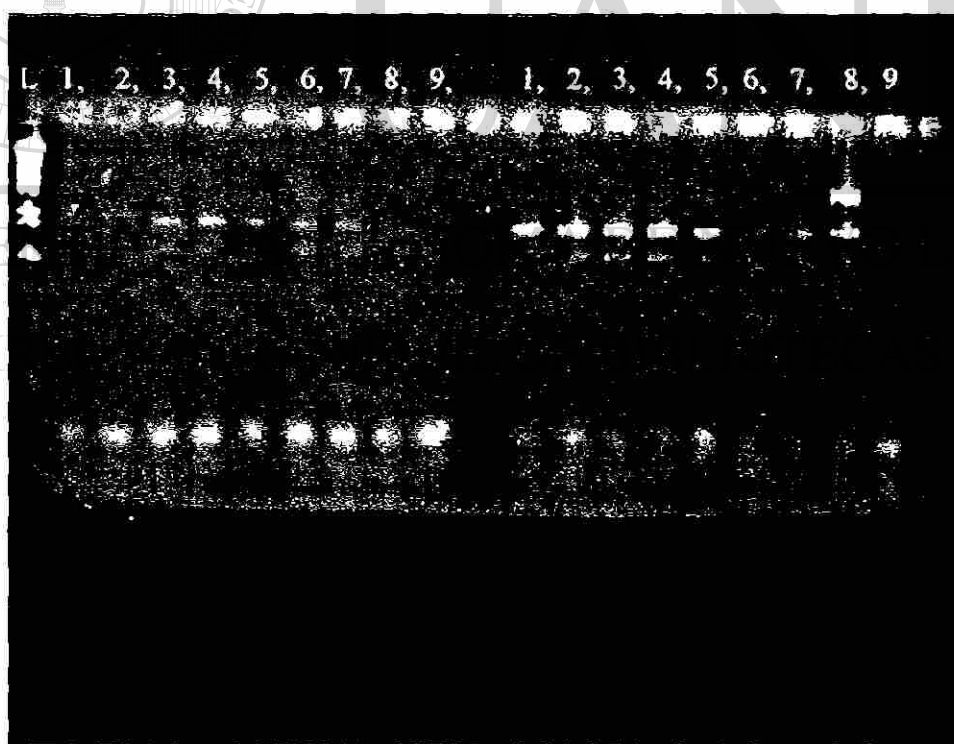


Figura 15. Amplificación del ITS con (derecha) y sin MgCl (izquierda) en *Cantharellus* spp. de diferentes localidades y hábitat. En la línea 1 hacia la derecha e izquierda corresponden a *C. cibarius* (No. C. 8219, coníferas, N.L.). De igual manera, 2 *C. cibarius* (No. C. 4823, encino, Tam.), 3 *C. cibarius* (No. C. 1495,

pino-encino, N.L.), 4 *C. cinnabarinus* (No. C. S/N, mesófilo, Tam.), 5 *C. lateritius* (No. C. 7854, encino, Tam.), 6 *C. minor* (No. C. 771, mesófilo, Tam.), 7 *C. cibarius* cultivo puro (No. C. 104, encino, Tam.), 8 *Leccinum* sp. (control positivo), 9 agua (control negativo), L es el marcador estándar.

Después de la amplificación del ITS nuclear de la mayoría de las especies de *Cantharellus*, los productos del PCR (17 colectas y un cultivo puro) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf* I, *Dpn* II y *Hae* III. Los resultados se pueden observar en las figuras 16 a 20.

La longitud de los fragmentos digeridos fue analizada con el programa Gene Profiler Marca Scanalyticis. Un RFLP tipo es definido como un compuesto de datos de las tres digestiones de restricción y los tipos son considerados idénticos si concuerdan con las tres endonucleasas.

En la tabla 3 (y figuras 16 y 17), se presenta el número de pares de bases del ITS completo digerido con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Dpn* II en *Cantharellus cibarius* de diferentes regiones biogeográficas y hábitat para determinar si existen

diferencias intra específicas con respecto a su distribución y ecología.

Tabla. 3. Número de pares de bases del ITS nuclear completo de *Cantharellus cibarius* de diferentes localidades y hábitat de México

Especie	Hábitat y Estado	Núm. Colecta	Núm. de BP del ITS completo (<i>Hinf I</i>)	Núm. De BP del ITS completo (<i>Dpn II</i>)	
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de Coníferas, N.L.	647 (ITCV)	514	804	
		2423 (CFNL)	514	804	
		8219 (ITCV)	526	805	
	Bosque de Pino-Encino, N.L.	1495 (CFNL)	514	804	
	Bosque de Encino N.L.	1605 (CFNL)	511	795	
	Matorral, N.L.	4522 (ITCV)	518	793	
	Bosque de Encino Tam.	104 (ITCV)	528	813	
		604 (ITCV)	513	791	
		781 (ITCV)	516	790	
		783 (ITCV)	2 bandas 516 (861)	788 (1368)	
		4823 (ITCV)	513	795	
		7875 (ITCV)	523	804	
		8303 (ITCV)	521	795	
		Bosque Mesófilo Tam.	813 (ITCV)	516	793
		Bosque de Encino Qro.	10125 (ITCV)	516	802
		Bosque de Pino-Encino, Durango	4188 (ITCV)	514	811
	1790 (ITCV)		516	824	
	1307 (ITCV)		520	813	
	Hábitat ? Chiapas	808 (ITCV)	681	870	

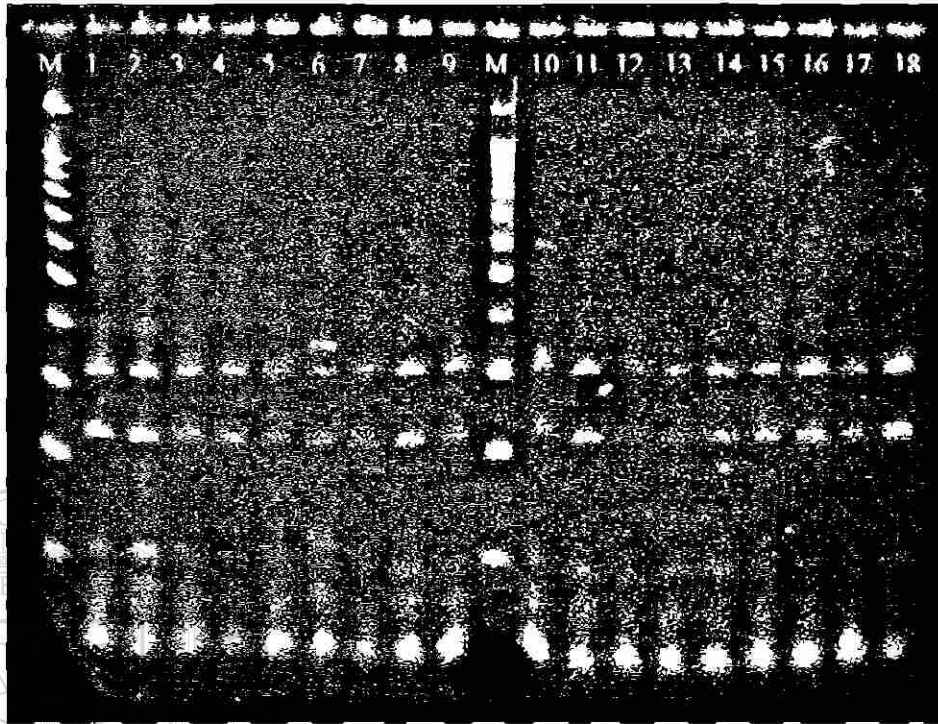


Figura 16. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de las 17 colectas de *C. cibarius* de diferentes estados y un cultivo puro (línea 18). En la líneas 1, 2, 7, 12, 13, 14, *C. cibarius* de N.L. En la línea 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 18, *C. cibarius* de diferentes localidades de Tam. En la línea 11, *C. cibarius* de Qro. En las líneas 15, 16 y 17 *C. cibarius* de Dgo. Aparentemente no se observan diferencias entre las muestras analizadas incluyendo el cultivo puro de *Cantharellus* excepto en la línea 6 se puede apreciar una banda extra. M es el marcador del tamaño del fragmento de 100 pb.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



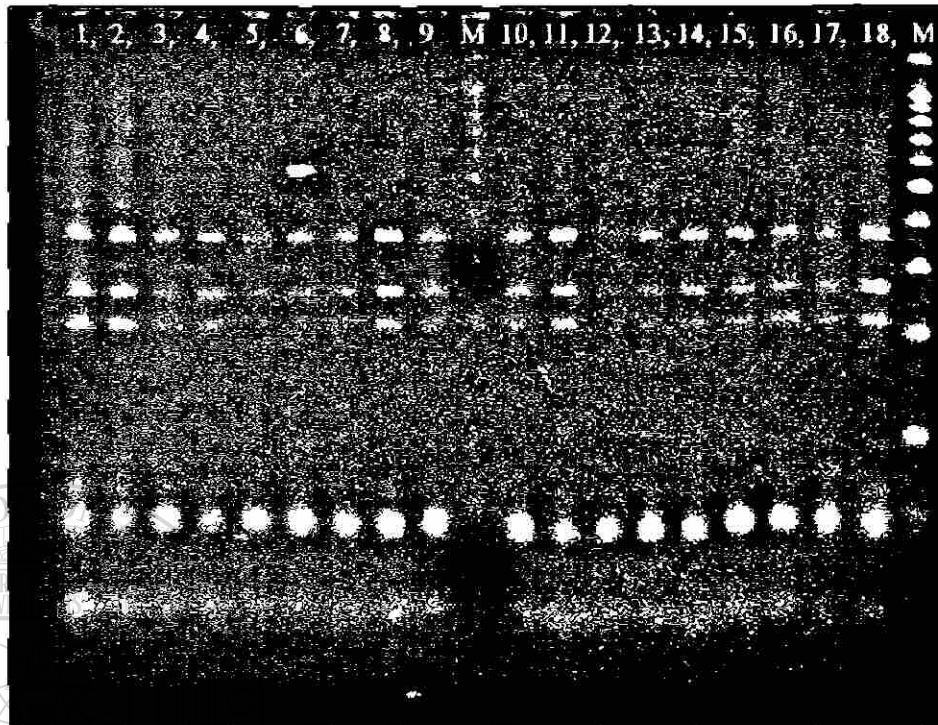


Figura 17. Análisis del RFLP (*Dpn II*) de los ITS amplificados de las 17 colectas de *C. cibarius* de diferentes estados y un cultivo puro. En las líneas 1, 2, 7, 12, 13, 14, *C. cibarius* de N.L. En la línea 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 18, *C. cibarius* de diferentes localidades de Tam. En la línea 11, *C. cibarius* de Qro. En las líneas 15, 16 y 17 *C. cibarius* de Dgo. Aparentemente no se observan diferencias entre las muestras analizadas incluyendo el cultivo puro de *Cantharellus* excepto en la línea 6 se puede apreciar una banda extra. M es el marcador estándar de 100 pb.

En la tabla 4 (y figuras 18 y 19), se presenta el número de pares de bases del ITS completo digerido con las enzimas de restricción *Hinf I* y *Dpn II* en las diferentes especies y cultivos de *Cantharellus* estudiadas provenientes de diferentes localidades y hábitat para determinar si existe variación interespecífica con respecto a su distribución y ecología.

Tabla 4. Número de pares de bases del ITS nuclear completo de las especies de <i>Cantharellus</i> de México				
Especie	Hábitat y Estado	Núm. Colecta	Núm. de BP del ITS completo (<i>Hinf</i> I)	Núm. de BP del ITS completo (<i>Dpn</i> II)
<i>Craierellus cinereus</i>	Bosque de Pino-Encino, Tam.	30 (ITCV)	656	857
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque Mesófilo Tam.	S/N (ITCV)	650	847
		812 (ITCV)	650	844
<i>Cantharellus lateritius</i>	Bosque de Pino-Encino, N.J..	922 (ITCV)	646	838
		1870 (ITCV)	637	831
	Bosque de Encino, Tam.	7854 (ITCV)	646	842
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque Mesófilo Tam.	771 (ITCV)	638	829
<i>Cantharellus aff. minor</i>	Bosque Mesófilo Tam.	811 (ITCV)	645	835
<i>Cantharellus</i> sp.	Bosque de Encino Tam.	796 (ITCV)	634	838
		805 (ITCV)	635	832
		816 (ITCV)	639	828
	Bosque Mesófilo Tam.	814 (ITCV)	639	828
<i>Cantharellus aff. guayanensis</i>	Bosque de Encino N.L.	119 (ITCV)	643	832
Cult. (tubo) 2 (esclerocios)		101 (CFNL)	1151	685
Cult. (tubo) 3 anaranjado		102 (CFNL)	675	605
Cult. (tubo) 4 blanco		103 (CFNL)	653	588
Cult. (caja Petri) 1 café obscuro		100 (CFNL)	593	611

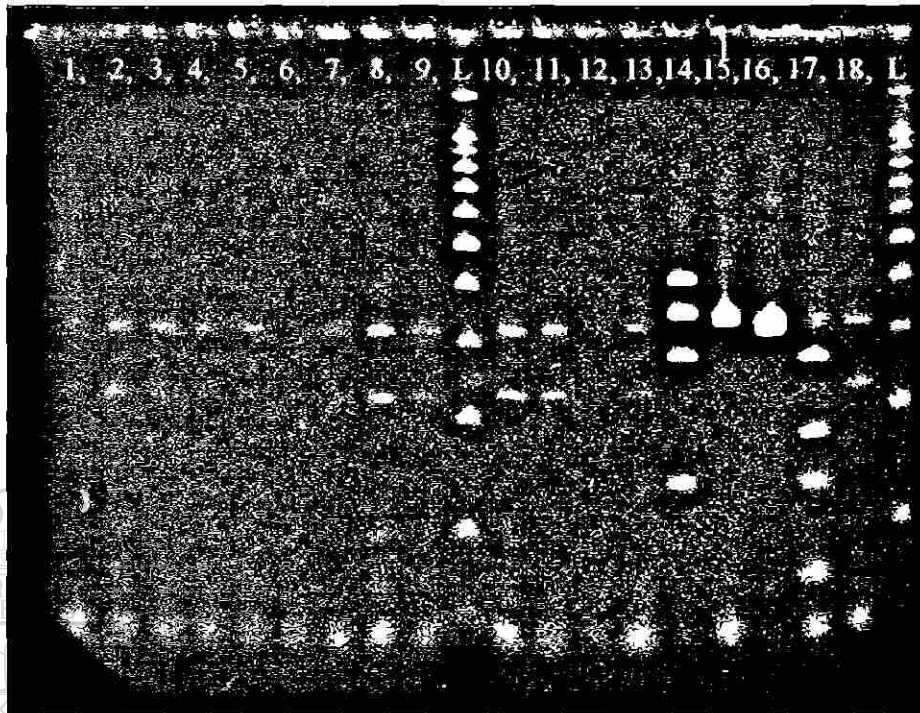


Figura 18. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de varias especies de *Cantharellus* de distintos estados del país y 4 cultivos puros. En la línea 1 *Cr. cinereus* de Tam.; línea 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tam.; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tam.; línea 5 *C. lateritius* de N.L.; líneas 7 *C. minor* de Tam.; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. de Tam.; línea 12 *C. aff. amethysteus* de N.L.; línea 13 *C. aff. minor* de Tam.; líneas 14, 15, 16 y 17 cultivos puros de *C. cibarius* de N.L.; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas. Aparentemente no se observa polimorfismo entre las especies de *Cantharellus* excepto en los cultivos puros y en la línea 6 donde se aprecia una banda extra. L es el marcador estándar de 100 pb.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

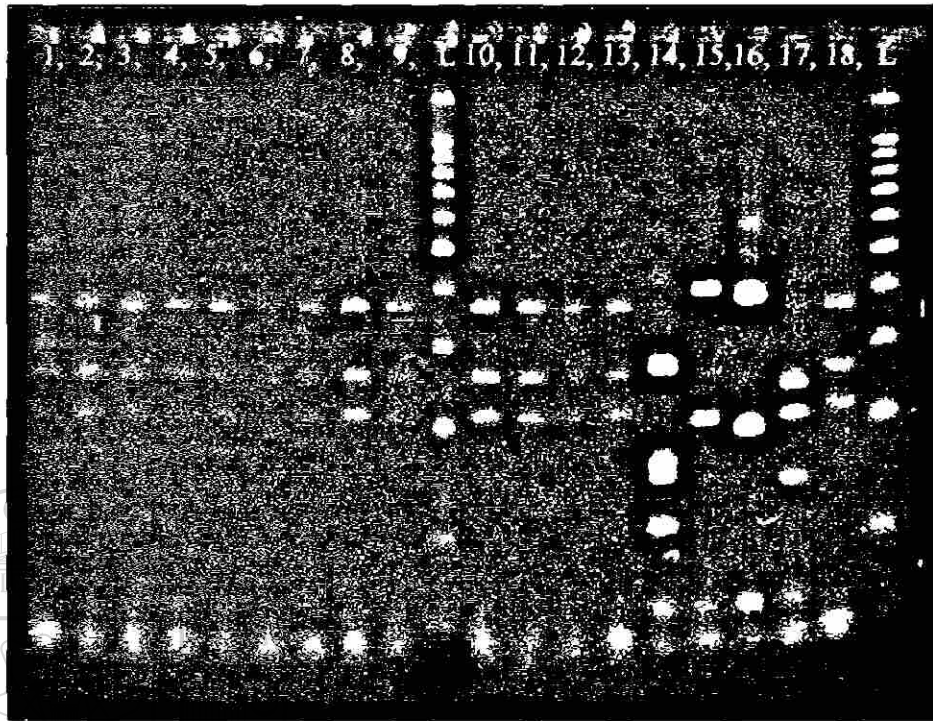


Figura 19. Análisis del RFLP (*Dpn II*) de los ITS amplificados de varias especies de *Cantharellus* de distintas partes del país y 4 cultivos puros. En la línea 1 *Cr. cinereus* de Tam.; línea 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tam.; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tam.; línea 5 *C. lateritius* de N.L.; líneas 7 *C. minor* de Tam.; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. de Tam.; línea 12 *C. aff. amethysteus* de N.L.; línea 13 *C. aff. minor* de Tam.; líneas 14, 15, 16 y 17 cultivos puros de *C. cibarius* de N.L.; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas.

Similarmente a la Fig. 3, no se observó polimorfismo entre las especies de *Cantharellus* excepto en los cultivos puros y en la línea 6 donde se aprecia una banda extra. L es el marcador estándar de 100 pb.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la tabla 5 (y figura 20), se presenta el número de pares de bases (pb) del ITS completo digerido con la enzimas de restricción *HaeIII* en las diferentes especies de *Cantharellus* estudiadas y un control positivo, provenientes de diferentes localidades y hábitat para determinar si existen variación inter e intra específicas con respecto a su distribución y ecología.

Tabla 5. Número de pares de bases del ITS nuclear completo de algunas especies de *Cantharellus* de diferentes localidades de México

Especie	Hábitat	Localidad	Núm. Colecta	No. De pb del ITS (<i>Haelll</i>)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de Coníferas	La Encantada, N.L.	8219 (ITCV)	910
	Bosque de Pino-Encino	Chipinque, N.L.	1495 (CFNL)	900
	Bosque de Encino	El Madroño, Tam.	4823 (ITCV)	910
		Cultivo puro, El Madroño, Tam.	104 (ITCV)	910
			104 mg (ITCV)	929
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque Mesófilo	El Cielo, Tam.	S/N (ITCV)	892
<i>Cantharellus lateritius</i>	Bosque de Encino	El Novillo, Tam.	7854 (ITCV)	900
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque Mesófilo	San José-El Vivero, Gómez Farías, Tam.	771 (ITCV)	919
		771 mg (ITCV)	919	
<i>Cantharellus subalbidis</i>	Bosque de Coníferas	Oregon State University	414S (OSU)	1746

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

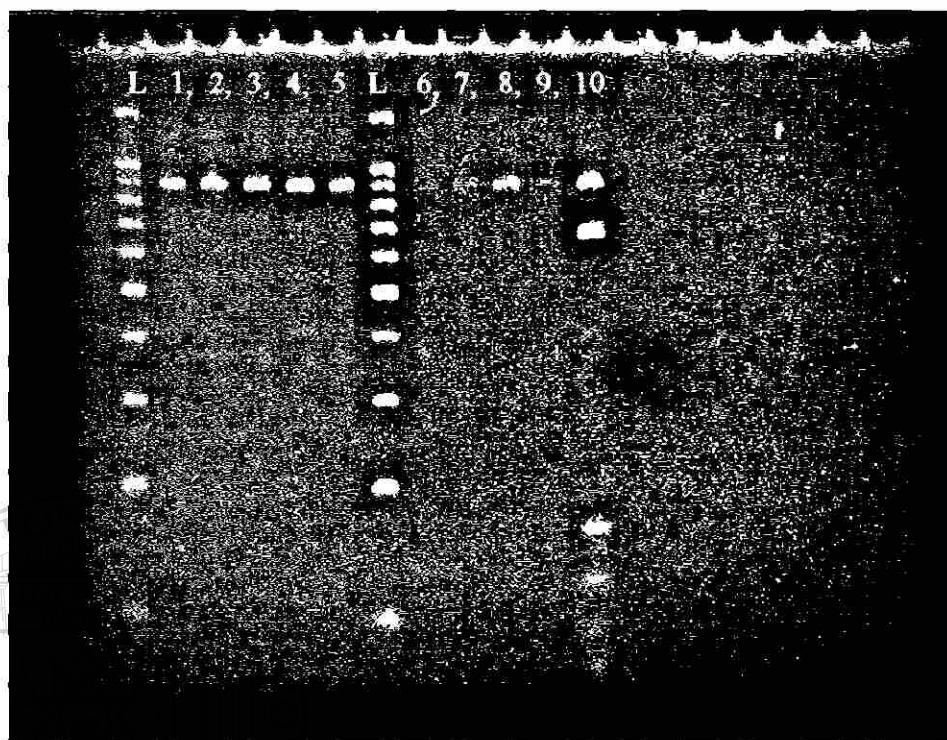


Figura 20. Análisis del RFLP (*Hae* III) de los ITS completos amplificados de *C. cibarius* (líneas 1-3), *C. cinnabarinus* (línea 4), *C. lateritius* (5), *C. minor* (línea 6 y 7), *C. subalbidus* (control positivo, línea 10) y un cultivo puro de *C. cibarius* (líneas 8 y 9). L (al centro y al extremo derecho) es el marcador estándar de 100 pb.

Los resultados del RFLP por sí mismos no cuantifican adecuadamente la variación de los nucleótidos en el ITS para delimitar las especies estudiadas. Ni la amplificación del ITS nuclear con los primers ITS1F e ITS4, ni la digestión del ITS con enzimas de restricción *Hinf* y *Dpn* II demostraron diferencias entre las colectas de *Cantharellus cibarius* de las diferentes localidades y hábitat de México, ni entre las especies de *Cantharellus* estudiadas. Sin embargo, estas técnicas sí demostraron diferencias contra y entre los cinco cultivos puros de *Cantharellus* y los de referencia. Es probable que 4 de los cinco cultivos estudiados sean otros taxa diferentes a *Cantharellus*. Por otro lado, una posible razón por la que no se observaron diferencias en

la amplificación y la digestión con enzimas de restricción del ITS nuclear en la mayoría de las especies estudiadas es porque éstas tienen un peso molecular muy similar entre sí en sus pares de bases. Feibelman *et al.*, (1994) determinó el tamaño de las bases de pares del ITS-1 en *C. cibarius* éstas varían de 820 a 1100 pb., *Cantharellus* sp. (P30) 820 pb, *C. minor* (P23) 760, *C. lateritius* (1547) 880 pb y *C. cinnabarinus* (1380) 480 pb. Un RFLP tipo se define como un compuesto de datos de las tres digestiones de restricción y un tipo se considera idéntico si concuerdan con las tres endonucleasas. Por lo anterior se cree conveniente realizar más estudios para determinar los pesos moleculares o los pares de bases de las especies aquí estudiadas o secuenciar el ITS para su comparación u otro gen *e.g.* el LSU rDNA amplificado con los primers LROR Y LR3.

3.2.2 Estudios de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear

Parte del gen 28 S de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear de 14 colectas incluyendo un cultivo puro de *Cantharellus* sp. fue amplificado con los primers LROR (5' gta ccc gct gaa ctt aag c) y LR 3 (3' ggt ccg tgt ttc aag acg gg). La amplificación de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear se puede observar en la figura 21. Se reportan por primera vez la secuenciación parcial de nucleótidos de la subunidad mayor de ADN ribosomal nuclear de *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *Cantharellus* sp. para Latinoamérica. En la tabla 6 se presenta la lista de las especies de *Cantharellus* secuenciadas así como su localidad y hábitat.

Tabla. 6 Especies de <i>Cantharellus</i> spp. secuenciadas						
Especie	Hábitat	Localidad	No. de colecta	Porcentaje de coincidencia con NCBI	Valor de error	
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de conifera	La Encantada, Zaragoza, N.L.	8219 (ITCV)	No alineado	No alineado	
	Bosque de pino-encino	Chipinque, Garza García N.L.	1495 (CFNL)	96 %	0.0	
		Navajos, Durango	1790 (ITCV)	97 %	0.0	
	Bosque de encino	Iturbide, N.L.	1605 (CFNL)	95 %	0.0	
		Laguna del Servín Querétaro	10125 (ITCV)	96 %	0.0	
		El Madroño, Mpio. de Victoria, Tamaulipas	783 (ITCV)	97 %	<i>P. nuda</i>	0.0
<i>C. cibarius</i> (cultivo puro)			104 (ITCV)	97 %	0.0	
<i>C. cibarius</i> (escamoso)						
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque mesófilo de montaña	San José, camino al vivero, Mpio. de Gómez Farías, Tamaulipas	814 (ITCV)	96 %	0.0	
			771 (ITCV)	94 %	0.0	
			811 (ITCV)	95 %	e-116	
<i>Cantharellus</i> sp.	Bosque de encino	El Madroño, Mpio. de Victoria, Tamaulipas	796 (ITCV)	93 %	<i>C. formosus</i>	0.0
			805 (ITCV)	93 %		0.0
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque mesófilo de montaña	San José, camino al vivero, Mpio. de Gómez Farías, Tamaulipas	812 (ITCV)	97 %	0.0	
			S/N (ITCV)	98 %	0.0	

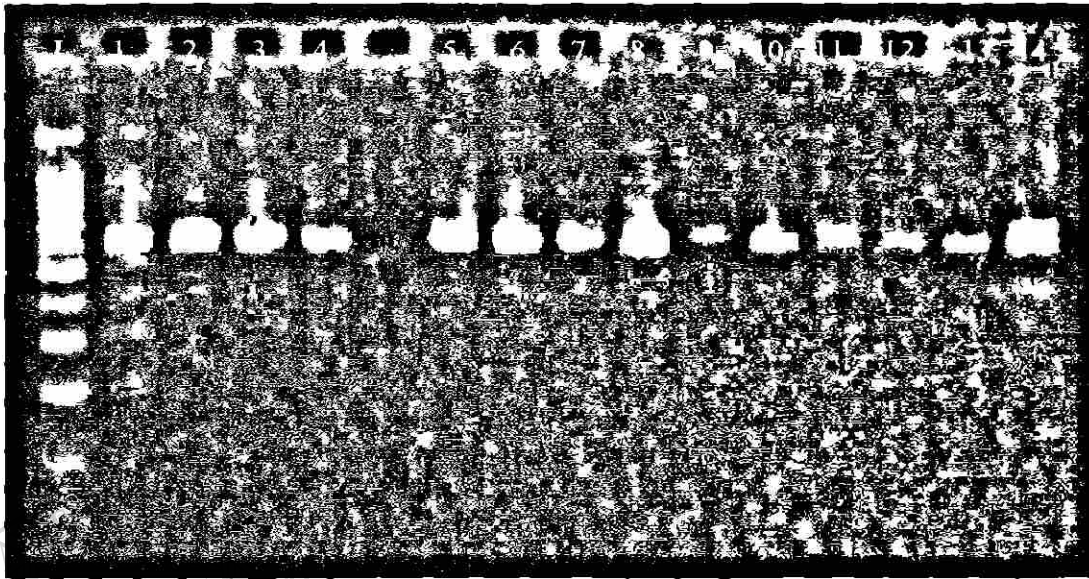


Figura 21. Amplificación de la subunidad mayor (usando los primers LROR y LR 3) del ADN ribosomal nuclear de catorce colectas incluyendo un cultivo puro de *C. cibarius*. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. *Cantharellus cinnabarinus* (Tam.) líneas 1 y 6; *Cantharellus* sp. (Tam) líneas 2, 3 y 4; *C. minor* (Tam.) líneas 5 y 14; *C. cibarius* líneas 7 (Qro.), 9 (Tam.), 10 (Dgo.), 11,12 y13 (N.L.), cultivo puro de *C. cibarius* (Tam.) línea 8.

Las secuencias génicas parciales de *Cantharellus* spp. mexicanos fueron

comparadas y alineadas con las registradas por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para su identificación.

La secuenciación parcial de nucleótidos del gen con el primer LROR demostró que *C. cibarius* de Laguna del Servín, Querétaro creciendo con *Quercus* sp., colecta García 10125 (ITCV), coincidió con la registrada por el NCBI para esta especie en 96% con 850 bits (score) y un valor de E de 0.0. En segundo lugar, según NCBI esta secuencia es también muy similar a *C. cascadiensis* en un 96% con 839 bits en promedio. Y con el primer LR3 concordó con *C. cibarius* var. *cibarius* en un 94% con 613 bits (score) y un valor de E de e-172. A continuación se presenta la secuenciación parcial de la región.

1.- *Cantharellus cibarius*, (basidiocarpo colectado creciendo bajo encino, Laguna del Servín, Querétaro).

No. de colecta García 10125 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

ATTCCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGNAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTT
GCACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTCCGTCTGGACTGCATGGCGTNCAAGTACA
ATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACGCTAATGTGCA
AGTCTATTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTNGGGATTGCTGCTTAAACAT
GGGAGGTAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCCGAGAGACCGATAGAGAACAAGTACC
GCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCCTGAAATTGTTGCG
AGAGAAGCGATTC AAGTAGCGTACTAGGCCATCAAGCGTCTTCGCTTTGGACTAGCTT
TGCCAGCGGTCTTGTCCCTTAAAGAGACTNGACTTGTAAATATGTCCAGCCCTGCGTGCA
CAGCAGCCCTTCTGGGGCCAGTGCATGGGCTGGTGAATGCTTGCAATCGACCGCTGNT
TANAANAACGNNNNNNNNNNNNTNNNNNNANGNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNAN
NGNNN

No. de colecta 10125, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCCCCNNCNCNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNGNTTACTTAACCTN
CTCGCCNCCCCGGCCCCAAAGGGCTGCTGTGCACGCTNGGCTGGACATATTACAAGTC
AAGTTTTTTTTAAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCGAAGACGCTTGATG
GGCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTGACTCC
CTTACAGAGTGCTATTTTCATCTTCCCTTGGCGACTTGTCTCTATCGGCTCTCGCCTG
TATTTAGCTTTAGAAGGAATCTACCTCCCATGTTTAAAGCAGCAAATCCCAACTGCTCGA
CTCTCTGAGATAGCCATCGTAATAGACTTGCACATTAGCGTCAAGGACGGGATNGCACC
TNTATGATGTCCACTGACGGCCTATTGTACTTGGACGCCATGCAGTCCAGNCGGCTACT
CCTAATCTACACTCGACAGGGAACACTGCCAGATTC AATGATGAGCTTTCCCTCTCAA
TCNCAGTTACTGGGGGAATCTAGTTAGTTNCTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTTAAG
TTACNGGGGTAANNNNNNNNNNNNNNCTTATCTNTCCCNCCNNTACACNCNCTAATN
CACTCTCCCCCNCCNCCNTNCTCTCACTCCTCCNNNNNTCNTNNTCCCNNTNNTTTTCC
NNNCTNNNNATACNNCNCCTCTCNTCNCCTCNCNCCCTCNCNNNTTNCNCCCCCTNNAATCN
CCCTCTCTCCTTCTTCCNCTCTATCCTNCTNCCNCTTCCNCTACCCCTNCTCCTNNCN
TCTNNTCTNNTCTCTCCTCCCCNCCCCATNCCNCTCTCCTNCCCNCCCCCNCC
CCCTTCTCCTCCANCTCNCCTCNCNCCNCCCTCNCNTCANCCNTCACNCTTCTC
TNCTCCCTCCCCNCCCTCCCTCCCCNANNTCTCTCNCNCCNCCC

La variación de las secuencias en el cultivo puro de *C. cibarius* de la localidad el Madroño, Tamaulipas colectado con *Quercus* sp., colecta Guevara 104 (ITCV), la secuencia parcial de nucleótido amplificado con el iniciador LROR concordó con un *Cantharellus* sp. no determinado aún registrado en el NCBI en un 97% de similitud con 652 bits y un valor de E de 0.0. De igual manera con el primer LR3 demostró una

similitud de 97% con 769 bits y un valor de E de 0.0. Se presenta la secuenciación parcial del gen.

2.- Cultivo puro de *C. cibarius*, aislado de basidiocarpo, colectado bajo encino, El Madroño, Municipio de Victoria, Tam.

No. de colecta Guevara 104 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GNNNNNAGNTTTNNNTTNNNNCCNNGANNGAACTAACTAGGATTCCCCAGTAACTGCCA
GTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTCCTGTCGAGTTGTAGA
TGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTGAGTGGGACA
TCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTAT
CTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCTTCTA
AACTAAATACAGGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCANGGGAAAGATGAATAGC
ACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAGGCGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGC
GTACTAGGNCCATTAAGCCTTTTTGCTTGGCTACTTTGCAACGGTCTTGTCTAAAACCTT
GCTTGATGTCAGCCTGTNTCACAGTAGCCCCCGGTAGNGCTGGTTGNGGATGCTTNAT
CACCGTGAAAAAAAAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

No. de colecta 104, primer LR3

3' → 5'

GACCCCGGGGGCTCCTGTGTATACCTTNTGGACATACAAGTCAAGTCTCTAGGACAAGA
CCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCAAAAAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGA
ATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTTGACTCCCTTCACAGAGTGCTATTTTCAT
CTTTCCCTTGCGGTACTTGTCTCTATCGGTCTCTTGCCGTGATTTAGCTTTAGAAGGA
ATCTACCTCCCATGTTAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTCGACTCTCTGAGATAGCCAT
CATAATGGACTTGCACATTGGCATCAAGGACGGGATTGTCACCCTCTATGATGTCCACT
GACGGCCTATTGTACTTGGACGCCATGCAGTCCAGATGAACTACTCCTCATCTACAAC
CGGACAGTGAAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTNCCTCTTCACTCGCAGNTA
CTGGGGGAATCCTAGTTAGTTCTTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTAAGTNCNGGGGTA
ANN

En el mismo análisis los especímenes de una colecta determinada como *C. cibarius* creciendo en un bosque mixto de pino-encino en Chipinque, San Pedro, N.L.

No. de colecta 1495 (CFNL) la secuencia del gen amplificado con el iniciador LROR concordó un *Cantharellus* sp. según NCBI en un 96% con 852 bits y un valor de E de 0.0. La secuenciación con el primer LR3 no fue alineada en el banco de genes por presentar muchas "N". Se presenta la secuencia génica con los primer LROR y LR3.

3.- *C. cibarius*, colectado bajo bosque mixto de pino-encino, Chipinque, N.L.

No. de colecta 1495 (FCF), primer LROR

5' → 3'

GNNNNNNNTTTTCTTTTNNNTCCCGGTTAACNCNAACTGGATNCCCCATAACTGCGAGTG
AAGAGNNAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCNGTGTTCCTGNCCTGAGTTGTAGATGA
GGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAGTGGGACATCA
TAGAGGGTGACAATCCCGTCCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTATCTC
AGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCTTCTAAAG
CTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGCA
CTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCG
TAGCTAGGCCCATTAAGCCTTTTGCTTTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGTCTAGA
GACTTGACTTGTATGTCCAGCCTGGTATACACAGGTAGCCCCCGGGTCAGTGGCATGG
CTGGTGGAAATGGCTTGAATCGACCGCTTGAAAAANCNNTNNNNNNNCNTNCCCTTANN
ANNNTGCNNNTGCNTTAANNNNCCNTTNCNNNCNCNNNNTTNCTNNNNN

No. de colecta 1495, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCNNTCCCCCTACCCNNNNCNENNNANNCANNTTACTGAACCTATAGGA
ACCCANGCCCNCCATTCTNAANAAATTTTTNAATATTTANGNTGGGGANAGACNG
GAGGAAAGCTAGTACANATCAAATGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAATNGC
TACTCTCGCAACAATTCACGCANTNGACTCCCTTCACAGAGNGCTATCTNATATTNC
CCTGCGGNACTCGANCNCTATCGGTCTCTNGACTGTANNTAGATTTAGAAGGAATNNCC
TNCCACGCNTANAGCAGANATCCCAAACCTGCTCGANTCNCTGNGATAGCCATCATAATG
GNNTCGCACATCGGCATCCAANGACGNGNTTGTNCACTCTATGGAGGNCCACTGACGGN
CTANCGCACNTGGNNNCCANGCAGCCNAAAANAACCACTTNNCTTACNACTCCGNNAG
NGAAAANCGGGAGANTTCAANGNAGAGTCNTNCNANTATNGCAGCACNGGGGGANATCC
ANCCAGCNCTCTCCTCNCTCACNGAATGCANAANCANNNGGTCACCNTCCTTACACNCA
CCANTAATANTNTTCANNCTCNCGAACCTCCTCCNCCCTCTTCTAANTGCTCGCTCCAA
NCCNCTANTCNTNTCTTCAANCGTACCACNTANCNNCTNACTNNGTCACTCACTCNCN
CCTTNACAATTCCTNANACTTAAATCCATNTATCATCNTNTNCTTNNNTGCNCTATAAC
AANCCNACNATTCACACTTNTAANNCCNACCTNACNACNGACNCCNCTNANCTCN
CNTNTCCTCCACATCACTCCCTCTCTCENNACCCCANACANCANNTCNNNTTANCNCNN
NCCGNNTCGTACCACCACTCCNAANNNNCCNENNTATCACAANAANCNENCCNTNN
TCTATACACANTCCNCACTNCAANNCTCTAACNAACNENCCANNACCTNGANACTCGCN
CCC

Los especímenes determinados como *C. cibarius* recolectados en el Municipio de Iturbide, N.L. creciendo bajo encino, No. de colecta Marmolejo 1605 (UANL), coincidió con *Cantharellus* sp. en un 95% con 694 bits y un valor de E de 0.0 al alinear la secuencia en Blast (NCBI). Sin embargo, también es similar a *C. formosus* en un 96%

pero con 662 bits y un valor de E de 0.0. La secuencia amplificada con el primer LR3 de la colecta anterior no fue alineada por presentar "N".

4.- *C. cibarius*, colectado bajo encino, Municipio de Iturbide, N.L.

No. de colecta Marmolejo 1605 (FCF), primer LROR

5' → 3'

AGNNNNNGNTNNTTANCTTTAACCCGGTTTAGAAACNNCCNGGATTCCCCCATAACTGCG
AGTGAAGAGGNNAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTTCACTGTCCGAGTTGTAG
ATGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTGAGTGGGAC
ATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTA
TCTCAGAGAGTTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCCTTCT
AAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAAT
AGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTAAAGTC
AGCGTACTAGGCCCATTAAGCCTTTTGNNTGGACTAGCTTGCCAGCGGGGCTTGTCTAG
AGACTTGCTTGATGTCCAGCCTGTATACACAGGTAGCCCCCGGGTCAGGGNATGGNTG
NNGAATGGTTTGAATCGACCCNNTGAANANACGGNN

No. de colecta 1605, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCCCCNCTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNANNGNATTACTTGAGCC
NAANC GGCCCCCGACCGANNGTTTCGGGGNACTTNTNGNNANANAAGTAAGGNTNGT
GGGANAGNACNGTGGGAAAAGNTGCCNAANGNAAAAGGGNTAAAGGGGCNAAGNNCCC
CNGNCTGGANNGGNTCTTTCGGAACNAATTCAANGCNTTTGNNCNCNTCAANANGGGG
CATTTCATNNTTCCCTGGGGGCCTGGNTCTCAATNGNCCTTTGGCCGGATTTAACTTTAN
NANGNAATNACCTCNTNGTTPANNAANAAAATCCCAANNGGNCGNCTTTTNGGNATNCCA
TAATATGGNCNTGGCCATTGGGATNAAGNCCGGAATGGGNACCCNTNNGAGGCCACGGC
GNCCANTGGCCTGGCNGCCNNGCAGNCANAAGAACCANCCNCATCNNCACNCCNNCNG
GGAAAACGGCNGAATCCAAANGAGGAGCNTTNCNNTTTANCTCGANGTACNGGGGGANC
CTAGTTNGTPTCTTTTCCCTCCCTAANGGAAANGCTAAAGTCNNGGGGNAACCNCNNAN
CNCCTNNCNCCTANNNCNCCTTCTTNNCCCTCCCTCNTCTNTCNCNCACCTTCNTCT
CTNNCNACTCNCNTCACNCATCNCCTCNCNCANANNNNCNTATTATNCTACATTCNTN
NTCTCTTACCTCTTNTCTCNATCTCACTATCCNNCTCCTTNNCNTTTNCCNTCATTCTN
TNTACTCCCTTCCNTNNTTATACNNCTCCNTCCTANCCCNATCCTCACATCNCNCCN
CTTACNCCNCCNCCCCTCCCNNTNCTCTNCCCTCACTCNTCCNCTTCTNCCCCCTTCCCT
NTATNCCATTCCTCTCTCNCNCCCCCTNCACTCNCACCCCCCNTNNATTCTCNANCC
CNCCTNCCCTNTACNCACCCCNCTCTANTACCACNCCTTCTNCACCCC

C. cibarius de Navajos, Durango colectado en un bosque de pino-encino, colecta García 1790 (ITCV), la secuencia amplificada con LROR al alinearla en el banco de genes concordó con un *Cantharellus* sp. en un 97% de similitud con 710 bits y un valor

de E de 0.0. La secuencia amplificada con el primer LR3 no fue alineada por presentar efectos de ruido.

5.- *C. cibarius*, colectado bajo pino-encino, de la localidad Navajos, Durango

No. de colecta García 1790 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGNAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGT
TTCAC TGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTAC
AATAGGCCGT CAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCCTCCTTGATGCCAATGTGC
AAGTCCATTATGATGGCTATCTCAGAGAGT CGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACA
TGGGAGGTAGATTCCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTAC
CGCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGTGAAATTTGTTGC
GAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTACTAGGCCCATTAACCTTTTGCTTTGGACTAGCTT
GCCAGCGGCTTGTCCTTAANACTTGATTGTTTGNCANCTGGTTACCAAGTAGCCCCCGG
GTCANGNANTGGTTGNGGAATGNTTGAATCANCTTTAAAAAACGGNNNNNNNNNNNN
NN

No. de colecta 1790, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCTNTATCANNANANCNTNTNTNNNNNGNCNNGTNACTGAGCTTCATAGCA
NCCCTGCCCGGGGGCTCCTGNGTATACCATTTGGACATACAAGTCAAGTCTGTAGGGAC
ANGACGGAGGGNAAANCTAGTCAAAGNAAAANGNTAAAGGGGCNTANNNANNNNGAC
TGGAATCGCTNTNCTCNAAANTTTACANGCACTTCGGACTCCNCTAANANAGNGCNAT
TTNANTNNCCCCCTGGCGGNCCTCCNCCANGGCNNCANNACTGNNNCCCCTGTAANAN
GCANTCNACTCGCNNNGTNNNCTCTNCANCCNAAACGCCGAAAANGCCCANATCTCCNC
AAAANCNCTCCNGACNCANNTNCNANCGNCGTCAAGGCCCCCCCNAANCCCCNACANN
GCAANGNCGCACACNCNTCNCNCCAAAGNANNACACCCATCCCCCTNCCNCGACCNNNA
NTGNGAACCAACATGACACNGACATTTANTCTTACNNGNNGNCCNGNNGNACNTCCCA
NCCTTTTNNCNTTCTANNNCNCCNATCCGNNCTCCCTCCCCCATCTCTCNCCATNN
TCNNCACNNTNGCANTCNCNNTATCNCACNGCACNCACATCNCNTACATNANAACC
CATCCCNCAACTATCTAACNACNCAATACTTACANCNCTNANTNTCTTAANCACNNACG
ANACATATCATACCCNNCACGCTCNCNNTCNCACNANTCACACNNACNNCATTNACACN
NTACTNTCCANCNTNACTCTCACTCNCACNACNNTNNAATNCNATCGTCTCCATCA
CNNTTCTCNCCTNTACNCTNTNCATACCTATCACACNCAACCNNCATAACNCCATCC
CNCCCNTCTACGNTNACNCTTNCACACCTNCNNTCCTNCCTACATNACAACNTACCT
NCCACNTACATNCNCCNCTCNCNTTNCANCTTNNCCNNTTCC

La colecta determinada morfológicamente como *C. minor* creciendo bajo *Quercus* sp. en un bosque mesófilo de montaña en el ejido San José, Tamaulipas No. de colecta Guevara 771 (ITCV), la secuencia amplificada con el primer LROR al alinearla

en el banco de genes coincidió con *C. cinnabarinus* en un 94% de similitud con 694 bits y un valor de E de 0.0. Al alinear la secuencia amplificada con el primer LR3 coincidió en un 92% con *C. cinnabarinus* con 496 bits y un valor de E de e-137.

6.- *C. minor*, colectado en bosque mesófilo de montaña bajo *Quercus* sp., San José, camino al vivero, Municipio de Gómez Farías, Tam.

No. de colecta Guevara 771 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGT
 TGCGCTGTCCGAGTTGTAGATGAGAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGT
 ACAATAGGCCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACACCAATGT
 ACGAGTCCTTTACGATGCCTATCTCGGAGAGTGCAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAA
 CACGGGAGGTAGATTCCCTTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGT
 ACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGN
 TGCGAGAGAAGCGATTAAAGTCAGCGTAGCTGGCCCATCAAGCCTGCGCTTTGGACCAGC
 TTTGCCAGCGGTCTTGTCCCTAGAGACTTGACTAAGGTGCCCTGCCGGTCTAACGGACA
 GACCTNCCCTTTGGGGAGGCCAGTGGCATGNTTGTGGATGNTTGCAATCGACCGNTTGA
 AAAAANNANGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAATANTAC

No. de colecta 771, primer LR3

3' → 5'

GGNNNGNTTNTCTTGAGCCTTCANCGNCATGCCCTGGCCTCCCCAGAGGGAGGTCTGTC
 CGTTAGACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTCTAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCT
 GGTCCAAAGCGCGAGGCTTGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCA
 ACAATTTACGTCCTTTTTGACTCCCTTCACAGAGTTCTATTTTCATCTTTCCCTTGCGGT
 ACTTGTTCACTATCGGTCTCTTGCCTGTATTTAGCTTTGGAAGGAATCTACCTCCCGTG
 TTTAAGCAGCAAATCCCAAACCTGCTCGACTCTCCGAGATAGGCATCGTAAAGGACTCGT
 ACATTGGTGTCAAGGACGGGATTGCACCTNTATGATGTCCACTGACCGNCTATGNACTT
 GACACCATGCAGCCAGATGTCCTACTTTTTTNTATNTACACTCGACAGNGAACGCTGCCA
 GATTCAATGATGAGCTCTTCCTNTTCACTCGCAGTACTGGGGGAATCCTGGTAGTTCTT
 TCCTCCGTTANTGATATGCTAAAGTAACGGGGTANNNNNNTTTCNTCCNCCCCACCNA
 CNNCANNNNCCNCCNNCTCTNNCNNCTCNTNTNNNTNCCNNCCTNCCNNTNNNNCCC
 CCCNTCNCNNCCNCCNNNNNNNTNNNTNNNNCTTNNNTNNNTTNNNTNTTNNCCCN
 NTNTNCNNANCCNNNNNNNNNNCTCCCCNCCNCTTNNCCTNNTCTTCNCTTNCCTCNC
 NCNNCANNCTNNCNCNCCNTTNTCNNTCNCNCCNTNCCNNCCCTCTTNTNCNCCNTN
 NTNTCNTNCTCCNCCNCCNTNCCNTNNNTNCCNTCNCNCCNTTANNNCTCCCTTCCT
 CCTCCNCCNCTCNCNNNNNTNNTTNTCCTCNTNCNNNNCCNCTNNTCTTNTNNCCCC
 CCCCC

La colecta Guevara 783 (ITCV) de *C. cibarius* de un bosque de encino de la localidad el Madroño, Tamaulipas, la secuencia amplificada con LROR coincidió en un

97% con *Peniophora nuda* con 930 bits y un valor de E de 0.0, al compararla en el NCBI. La secuencia amplificada con el primer LR3 no fue alineada por presentar demasiado ruido. Se presenta la secuencia génica parcial del gen.

7.- *C. cibarius*, colectado en un bosque de encino, El Madroño, Municipio de Victoria, Tam.

No. de colecta Guevara 783 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GGATNCCCCANTAACTGCGAGTGAAGCGNTATGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTCT
 TCGGCGTCCGAGTTGTAATTTAGAGAAGCGTTTTCCGCGCCGGACCGTGTACAAGTCTC
 CTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACCCCGGTGCTC
 TGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAA
 CTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAA
 GATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACG
 CTTGAAGTCAGTCGCGTCCGCCAGGATTANCCTACGGTGTACTTTTTGGTGGACGGCCA
 GCATCACTTTCAATCATCGGACAAGGTCGAGAGGAATGTGGCACCTTCGGTGTGTTATA
 GCCTCTTGTCGTATACNGTGACTGGGAGTGAGGACCGCTTTGTAGGATCTGCGTAATGG
 CTTTAAACGACCGNTTGNTNAANACGNNNNNNNNNN

No. de colecta 783, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCNCCCTNCTNTNNNNNNNNNNNGGGNGCTTACTGANCTCACAGACNCCG
 GCCCGGCTTGGGAGNGANTTTAGAGNTAAAAACACGGGGAGTNAGATNGATNTCGATCN
 GTCGAGATTGAAAGCGCGCTGTCCGGCACCANANAGTACACCGTGAGGCTGAACCNNT
 GGACGCGACTGACTTCAAGCGTCCCTTTNANCANTTCACGTACTGTTCACTTCNTCCA
 AAGGCGNTTNAFTCTNTTCCCTCNCGCCACTCGTCGCTACCGGCTCTCGCCAAAACCTAANC
 TTNANATGGAGCCACCACCATTTTGGCTGCATCCNAACAACCTGACTNTTCGAGAGCGT
 ATCAAAGAGCACCGGGGGCCGCAAGACGGGATTCTACCCTTATGACGCCCCGTTT
 AGNAGACTGGACACGGCCCGGGCGGAAAACGCTCNTAAAATTACAACCGGACGCCGAGA
 CGCCAGATTTAAATTTGAGCTCATCCGCTCACTCGCAGNTNNAGGGGAATCCTGGTAG
 GTTCTTNTCCCGGTAATGGATATGCNTAAGNNACNGNCCNCNCCNNTNCNCACNTC
 CNCCANTCTCNCNTTACTNTTCCCNNTNCCCTCCAACCCTCCTNCNCANTNNTCTTCNAT
 CTTACANTTTAANCNCTTNAATCCCCCGCCCCCTNTCCTTNTNCCACCANNACTANT
 CCTCCACNNTACCCTNTCCTCCTNACCCCCCCCCNTNCTNNACACCNNTTATCTTCNCA
 ACCNCCCCCCCCAANCNTCCCCACATNCACCATTNCTCATCCCCNCCNCCCCNNTCA
 ATCCNCTCTCTCCCCACCCNACCNCATATCCCCCCCCCTCCTTACANNCTTCCCCNCG
 CCCNCTCTCTNCCCTCTNCCANTAACNCCCCCNNTACCCCCCCC

La colecta Guevara 796 (ITCV) identificada como *Cantharellus* sp. creciendo con encino en el ejido el Madroño en Tamaulipas al alinear la secuencia amplificada con

LR3 coincidió en primer lugar con *C. formosus* en un 93% con 676 bits y un valor de E de 0.0. La secuencia amplificada con LROR no fue alineada. *C. formosus* es reportado por primera vez para la micoflora Mexicana. Es la primera especie de *Cantharellus* determinada por su secuencia génica.

8.- *Cantharellus formosus*, colectado en un bosque de encino, El Madroño, Municipio de Victoria, Tam.

No. de colecta Guevara 796 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GTNCCGTA CTGATGAAGNAANTATATTGATTGCANGTGCTGNCNGTGAATAGGATGGTA
 TTGGCTGATGGCGTCAAGTCAATAGCCGCACTGGACATATAGAGGGGACAATCCGTCTT
 GTGCNATGTCAAGTCCGTACGATGGCTTTTNAAGAGTCGAGCAGTTGGGATTTGCTGC
 TTAAACATGGGAGGNAGATTCCCTTCTAAAGCTAAATACAGGGCAGAGACCGATAGAGAA
 CAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTTGTGAAGGGAGTCAAAAGACGTGAA
 ATTTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATTAAGCCTATTTGCT
 TTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGNTTNCCTAATAAGAGACACTTGGACTTGTATAT
 GTNCAGCCTGGTATGCACANGTAGTCCCCCTTGGGGGCCAGTGACATGGCTGGTGGAAAT
 GGCTTGCAATCGACCCTNTTNTNAAAAAANGANNNNN

No. de colecta 796, primer LR3

3' → 5'

GNGNNNGNNTTNCCTTTGNAGCCTTACCAGCCANTGNCACCTGGCCCCANGGGGACTAC
 CTGTGCATACNANGCTGGACATATAACAAGTCAAGTGTCTCTTATTAGGGAAACAAGACC
 GCTGGCAAAGCTAGTCAAAGCAAATAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAAT
 CGCTTCTCTCGCAACAATTTACAGTCTTTGACTCCCTTACAGAGTGCTATTTTCATCT
 TTCCCTGCGGTACTTGTCTCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGAAGGAATC
 TACCTCCATGTTAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTGACTCTCTGAGATAGCCATCGTA
 ACGGACTTGCACATTCATCAAGGACGGGATTGTCACCCTCTATGATGTCCCACTGACG
 GCCTATTGNACTTGGACGCCATGCAGCCAGATGAACCACTCCTCATCTACAACCTCGGAC
 AGTGCAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTNCCTCTTACTCGCAGTTACTGGGG
 GAATCCTAGTTAGTTTCTTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTTAAGTNNCNGNGAANN
 NNCNNNNNNNNNNCNCNNNNNNNNNNNNNNNNCTNNNNNNNNNNCNCNNNNNCNNN

Similarmente, La secuencias amplificadas con los primers LROR y LR3 de la colecta Guevara 805 (ITCV) proveniente de un bosque de encino del ejido el Madroño en Tamaulipas al alinearla en Blast coincidieron con *C. formosus* en un 93% con un valor de E de 0.0 con 720 y 674 bits respectivamente.

9.- *Cantharellus* sp., colectado en un bosque de encino, el Madroño, Municipio de Victoria, Tam.

No. de colecta Guevara 805 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

ATTCCCCNTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTG
CACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTGGTTCATCTGGGCTGCATGGCGTCCAAGTACAA
TAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAA
GTCCGTTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATG
GGAGGTAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCG
CAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGACGTGAAATGTTGCGAG
AGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATTAACCTATTTGCTTTGGACTAGCTTT
GCNGCGGTCTTGTTCCTAATAAGAGACACTTGACTTGTATATGTCCAGCCTGTATGC
ACANGTAGTCCCCCTGGGGCCAGTGACATTGGTGGTGGAAATGCTTGCAATCGANCCGC
TTGNNTTNAANAANCNCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

No. de colecta 805, primer LR3

3' → 5'

GNNCAGNNTTNNCTTGAAGCCTTCANCAGCCATGTCACTGGCCCCANGGGGACTACCTG
TGCATACNANGCTGGACATATAACAAGTCAAGTGTCTCTTATTAGGGAAACAAGACCGCT
GGCAAAGCTAGTCCAAAGCAAATAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGC
TTCTCTCGCAACAATTTACGCTTTTTGACTCCCTTCACAGAGTGCTATTTTCATCTTTC
CCTTGCGGTACTTGTCTCTATCGGCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGAAGGAATCTAC
CTCCCATGTTTAAAGCAGCAAATCCCAAACCTGCTCGACTCTCTGAGATAGCCATCGTAAC
GGACTTGCACATTCATCAAGGACGGGATTGNCACCCTCTATGATGTCCACTGACGGCC
TATTGNACTTGGACGCCATGCAGCCAGATGAACCACTCCTCATTACAACCTCGGACAGT
GAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTCCNTTCACTCGCAGTTACTGGGGGGAA
TCTAGTAGTTCTTTTCTCGGTTAGTGATATGCTTAAGTNACGNGNGGNANNNNNNNNN
NNNNNNNNNNCNCNNNCNNNNCNCNNNNNNNNCTNNNNTNNNNCNTNCNNN

La colecta No. Guevara 811 (ITCV) identificada morfológicamente como *C. minor* proveniente de un bosque mesófilo de montaña, creciendo con encino en Tamaulipas, al alinear su secuencia amplificada con el primer LROR en Blast, el gen coincidió con *C. cinnabarinus* en un 92% y con *C. minor* en un 95% con 476 bits (e-131) y 424 bits (e-116) respectivamente. De igual manera se presentó para la secuencia amplificada con el primer LR3 concordando con *C. cinnabarinus* en un 87%, 394 bits y un e-107.

10.- *Cantharellus* aff. *minor*, colectado en un bosque mesófilo de montaña, bajo encino, camino San José-al vivero, Municipio de Gómez Farías, Tam.

No. de colecta Guevara 811 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

AGGGGGANTTCCCTTNTCTTTAACCCAGGNTTAGAACTAACACGGATTCCCNACAGTAAC
TGCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGAATCTGGCAGCGTTGCGCTGTCCGAGTT
GTAGATGANAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAG
TGGNACATCATAGAGGGGTGCAATCCCGTCTTGACACCAATGTACGAGTCCTTTACGAT
GCCTATCTCGGAGAGTTCGNGCANTTTGGGATTGCTGCTTAAACACGGTAGGTNGATTNC
TTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGTNCCGCANGGGAAAGATN
AAATAGACTCTGTGAAGGAGTCANAAAGACGTGAAATTGTGCGAGAGANNCGATTAAGN
CATCGTACTTGGGCCATNAGCCTCCGCCTTGGACCACTTTGCNAGCGTCTTGNCCTANA
ACTTGNTAGGNCCTGCCGGCTACGCANACTNCTTTGGAGGCAAGGGCTTGTGGGAANG
TTGAATANCCTTGAAAAAAGNNANNNNGNNNNNGGAANGATCCNTCCGCNNNNNAAA
AANN

No. de colecta 811, primer LR3

3' → 5'

GCCNNNAGCNTTANCTTGAGCCTTCCANCGACANGCCCTGGCCTNCCAGAGGGAGGTCT
GTCCGTTNACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTTAGGGACAAGACCGCTGGCAAA
GCTGGTCCAANGCGCGAGGCTNGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTNTC
GCAACAATTTACGCTTTTTTGGACTCCCTTACAGAGTTCTATTTNATCTNTCNTTGGC
GACTNGNTCACTATCGGTCTCTTGCCTGTATTTAGCTTGGAAAGGAATCTACCTCCGGAG
TTAACAGCAAATCCAAACTGCTCGACTCTCCGAGATAGGCATNGAAAGGACTCGNACAT
GGTGTCAAGGACGGGATGGCACCCCTCTATGATGCCACTGCCGGCCTATGTAAGTTGGACA
CCATGCGAGGCGAGATGTCTACTCTTTCAATTACAACCTCGACAGCGCAACGCTGCCAGAT
TCCAATGATGAGCTCTTCCCTTACTCGCAGTACTGGGGGAATCCTGGTAGGTTCTTTT
CCTNCGTTAGTGATATGCTTAAGTANGGGNNTACTTTTCNNTTNCNTTCCCTCCCTANA
CGATANGCTTAAGTAANNNGCNNNNNNNCNNNNNNNCTCNCCTCCTANNNTNCNNCT
NNTCTCNCNTNCCNNNNNCTNCTNTCTTNTNTCNTNNNNNCNNNNNTNTCTNCTNNT
CNNCNCNTNCCTCANNATNNTNCNTNTCCNCTNCCNCCNCCNCTCTNTCNCCTTCT
TCNTCNCNNCTTCTTCCCTCANNNTNCNNNCNNNCTNCCNCTCTCTNNTNNNCNCNC
TCNNCNCANNNCNNTANNTCTCTCCNCTCNATNNTCTCNCCTCTCCNCTCTCNCNT
NNNCNNNCNNTNCTCNCCTCNTCTNCTNTCTCCTCCTCCNNTCTCTTNTCNCNT
CNCCTCCTNNTCCTCCCTCACNNNCNTTCNNTCNCNNTTCNNNCNCNNCNCCTCC

Los basidiomas identificados morfológicamente como *C. cinnabarinus* provenientes de bosque mesófilo de montaña creciendo con encino (No. de colecta Guevara 812 (ITCV), al alinear las secuencias amplificadas con LROR en el NCBI coincidieron con *C. cinnabarinus* en un 97% de similitud con 654 bits y un valor de E de 0.0. La secuencia amplificada con el primer LR3 de la colecta 812 no fue alineada. Se presenta la secuencia génica parcial del gen a continuación.

11.- *C. cinnabarinus*, colectado en un bosque mesófilo de montaña bajo encino, camino San José-el vivero, Municipio de Gómez Farías, Tam.

No. de colecta Guevara 812 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGT
TGCGCTGTCCGAGTTGTAGATGAGAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGT
ACAATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACACCAATGT
ACGAGTCCTTTACGATGCCTATCTCGGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAA
CACGGGAGGTAGATTCCTTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGT
ACCGCAGGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGT
TGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTACTGGCCCATCAAGCCTCGCGCTGGACCANT
TTGCAGCGGTCTTGTCTTANAGACTTGCTAAGTNCCTGCCGGCTACGGCAGACCTCCC
TTTGGGGAGCCATGGCATGGGTGGGGGAANGGTTTCAATCACCNNTGAANNNAAAAAAAG
NN

No. de colecta 812, primer LR3

3' → 5'

GNNNGNNTTANCTTGAGCCTTCACCGCCTGCCCTGGCCTCCCCAGAGGGAGGTCTGTC
CGTTNNACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTNTAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCT
GGTCCAAAGCGCGAGGCTTGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCCAA
CAATTTACGCTTTTGGACTCCTTCACAGAGTCTATTATCTTTCCCTGGCGGACTGG
TTACTATCGGTCTTTGCCTGNNTTNANTTTGGAGGAATNACCTCCCGGGTTAAACAGN
AAATCCCAANCTGTTTCGACTTCCANANTGNATCGTAAAGGANTCGCCTTTGGGGTNA
GGACGGGNTTGNCCCTTTNTNNGGCCCCCGCCGCTTTNGGCTTGGACCCATGCCG
TCNAATTCNCNTNNTTTNNTAACANCGGGNANGNAAACCTTCCAATTCAAAGGAGAC
NTTCCCNNTTATCCCNANNCGGGGAACCNTGGNGNTTTTCNCCCGTTAAGAAGNCTAA
GNCCNNGGTTANNNCNCNNNTNCTNCCCTCNNNNNCCTNNNCTCTCNCCTTCCCC
CTCNTTCCNCTCATNCCNTNNTCNCNCCCNCTTNCNTNCTNTNNTTTCCNCCNNC
NCCTCNTNCTNCCCTCTNNNNNNTNCCNCTTNTCCTTCNNTCNTTCCCTCNANTNTC
CNCNCCNNTNNNNNCCNCTCNTNCTNNTNCCNCTCCCNNNCTTCCNCCNCTNTCNC
NNNNCCCTCNNTTTCCTNCTNCTNNTCTCNCNCCCTTCCCTCNCNTTTTCTCCNCCN
CCNCCNCTNNNNNNTCCACTCCNCCCCCTCTCTTTNCTNCCNTCTCNATANNTC
TCTNNTNACTTCCCC

Los basidiomas determinados como *C. cibarius* con el píleo escamoso colectado de un bosque mesófilo de montaña en el ejido San José en Tamaulipas (No. de colecta Guevara 814 (ITCV) fue secuenciado con los primer LROR y LR3. Al alinear las secuencias en Blast coincidieron ambas con una especie de *Cantharellus* no descrita en un 96 y 94% respectivamente, el primero con un valor de E de 0.0 y 785 bits y el segundo con un e-175.

12.- *C. cibarius* (píleo escamoso), colectado en bosque mesófilo de montaña, camino San José-el vivero, Municipio de Gómez Farías, Tam.

No. de colecta Guevara 814(ITCV), primer LROR

5' → 3'

AACNTAACTAGGATTCCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGGAA
TCTGGCAGTGTGCACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTCCATCTGGACTGCATGG
CGTCCAAGTACAATAGGCCGTGAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTGA
TGCCAATGTGCAAGTCCGTTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTG
CTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCCGAGAGACCGATAG
AGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCCGT
GAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATCAAGCGTCTCGN
TTTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGTCTCGGAGACTTGACAAATTGTGTCCAGCCT
GGTATGCACAGCAGCCCCCTGGGGGCCAGCGGCACGGNTGGTGAATGNTTGCAATCG
ACCGNTTGANAAAACNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

No. de colecta 814, primer LR3

3' → 5'

CCCCCNCCCNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNTTACTGAGCCTTCNC
NCCTNCCGNGGCCCCAGGGGGCTGNCTGTGCATACTTGCTGGACACAATTTGTCAAGTN
TCCGAGGACAAGACCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCGAGACGCTTGATGGGCCTAGCT
ACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTTACTCCCTTCACAGA
GTTCTATTTTCATCTTTCCCTTGGGTAAGTCTCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTA
GCTTTAGAAGGAATCTACCTCCCATGTTTAAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTCGACTCTC
TGAGATAGCCATCGAACGGACTTGACATGCCATCAAGGACGGGATGGCACCCTCTAT
GATGTCCACTGACGGCCTATNGACTTGACGCCATGCAGTCCAGATGGACTACTCCTAA
TNTACAAGTCCGACAGNGCAACACTGGCAGATCCAATGATGAGCTCTTCCCTTTACTC
GCAGTTNTTGGGGGAATCCTANTTAGTTTCTTTTCCCTCGTTAAGTGATATGCTTAAGT
CACCNGGTAANNCCNNTNTCNGCTNNTAAAACGNCCCTNCTNCTCNCCTCTCNCCTC
CCANNACACCNTCCTNCTCNCCTNNTACNCCNNTNNNNNNNNNNCCNTTTTCCATNNNN
NTACTNACANTNCATANNAACNNTNANCTCTNCCNCCNANCNNTCTCTCNCNNTT
NCNTNTTNNATCNTNCCNCCNNTANNTCTCCTCCNCTNNTACNNTNCTCNANC
NTCANCCCCCTACNTCTTTNCTTNTAATNCNCCNCCANCTNCTCTCCTNNTCTNCT
TCTCNCNCTCNCNNTNCTTTNCCCCCTCTNCACTCNCNCTCCCTNCTCNTTNNNTN
TCCCTACNTTNCNACNCCCTCACTCNCNCCNCTNNTNCCCTNCCNNTNNTNNTNNTN
ANCCNACCCTCCCTNCCNNTTNTCTTTCCCC

Las secuencias de nucleótidos de la colecta S/N (ITCV) de *C. cinnabarinus* colectado en un bosque mesófilo de montaña en Tamaulipas, fueron alineadas ambas hélices en el banco de genes coincidieron con *C. cinnabarinus* en un 98 y 96%, 912 y 755 bits con un valor de E de 0.0 en ambos casos.

13.- *C. cinnabarinus*, colectado en bosque mesófilo de montaña, bajo encino, San José Municipio de Gómez Farías, Tam.

No. de colecta S/N (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GNNNNNNNNNNNTTNNCTTTTNNCNGGGAAANAAAATAACTAGGATTCCCCCAGTAACT
GCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGTTGCGCTGTCCGAGTTG
TAGATGAGAAGAGTAGGCCATCTGGACTGCGTGGTGTCCAAGTACAATAGGCCGT CAGT
GGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTGACACCAACGTACGAGTCCATTACGAT
GCCTATCTCAGAGAGTTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATT C
CTTCTAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGAT
GAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATT
CAAGTCAGCGTACTAGGCCCATCAAGCCTTGCTTTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTG
TCCTTTAGAGAGACTTGCTTTTGACGTGCCCTGCCGGTCTAACGGCAGACCTCCCTTTG
GGAGGCCACGGCATGGCTGGTGGAAATGGCTTGCAATCACCCGNTTNNNAAAAAANGGN
NN

No. de colecta S/N LR3

3' → 5'

AGGGGAGGTTTANCTTNAACCCNCTTTAGACAGCCNTGGCCTCCAGNGGAGGTCTGCC
CGTTANCCCGGGCAGGGCACGTCAAAGTCAAGTCTCTCTAAAGGACANGACCGCTGGC
AAAGCTAGTCCAAAGCAAGGCTTGATGGCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGTTCTCT
CGCAACAATTCACGTCTTTTTGACTCCCTTCACAGAGTTCTATTTTCATCTTTCCCTGC
GGTACTTGTTCTCTATCGGTCTCTTGCCGTATTTAGCTTTAGAAGGAATCTACCTCCC
ATGTTTAAGCAGCAAATCCCAAACCTGCTCGACTCTCTGAGATAGGCATCGNAATGGACT
CGTNCGTTGTGTCAAGGACGGGATGNCACCCTCTATGATGTCCACTGACGGCCTATGGA
CTTGACACCACGCAGTCCAGATGGCTACTCTTCTCATCTACAACCTCGGACAGCGCAAC
GCTGNCAGATTCAATGATGAGCTCTTCCCTCTTACTCGCAGNTACTGGGGGAATCCTAG
TTAGTCTTTTCCCTCCGTTAGTGATATGCTAAGTNNCACCGNNANCNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNCNNNNNNNCNNNNNNNCNNNNNCNCNCCGNCNNNNNNNTNCNCNCCNNCTCN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNCN
CNNNNNNNNCCNNNNNNNNNCNNNNNCNCNCCNNCCNNNNNNNNCTNCNCNNNNNN
CNCNCCNNNNNNCTNNNNNCNNNNNCNCNCCNNNNNNNNNNNNNNNTTNCNNNTCNCN
NNNNNNNNNCNNNCTNNTCNNNCTCNCNCTNCNNNNNNNNNTNNNNNCNNNCCNC
NNNNNCTNCTNCTCNCNNTNNNCNNNNNNNTNNNNCTNNCNCNNNNNNNNNTNNCCCT
NNTCCNCTNNNCNCTTNCCTCCNNANCNCNNCNCNNNNNNNCNCNTNNCNNNNNNNCN
TNNCCCCC

Finalmente, las secuencias de la colecta García 8219 (ITCV) no fueron alineadas por presentar demasiados nucleótidos desconocidos.

14.- *C. cibarius*, colectado en bosque de coníferas, La Encantada, Municipio de Zaragoza, N. L.

No. de colecta García 8219 (ITCV), primer LROR

5' → 3'

GAAGNNNTTTGAGCTCATNATTGGAATCTGGCGGTNTTACACTGCGCGANNTGNACATG
AGGAGTNGTNCGCNTGCGACTGCNTGGCGCACAAAGNACANTAGNCCGTCANTGGGACAT
NATANAGGGNGACACTCCCNNCTTGACNCCNATNTGCNNGNNTATNACTATGGNTNTCT
CATAGAGTNGANCAGCTNGNNTATNGGCTGNTTAAACATGGGAGGNAGATTCCCTTCTANG
CTNANNCCAGNCGAGAGNCCGATCNGAACNAGTACCGNAAGGGAACATGAAATNNCA
CTCTGNGAAGGGAGNNANAGGGCGNGNAATTGNTGNGAGAGAACCAATCATGTAGNGAT
CTAGCCCATAAGCGTNTTNNTTTGTACTAGCTTGCCAGCGNTCTTGTNCTTAAAGAGAC
TTGACTTGNAATATGTGCAGNCTGCGNCACAGGNAGCCCTTCTGGGGCAGTGGCATGGA
TGNGGANGCTTGCAATCANNCCGCTNNAANANCGACCTTNACACTTATGATGTTCTTANG
GCTTTAATGGCCGCTNATNAACGNNNCTNNNTNTTNNCTNTCTCCNNNTNTNCTTTC
NTTTNNCCNNNNNTNNCTTCTNNCNCNNTNTNTNTCNNNNNNCNCNNNTNTNTCTT
TNNTCNCCNCTCNCNTTTTTCTCNNCCCTNTNNTNCANCTTCNCTNCTCCNTCTATCT
TCNTNCTTTCNCTTNTTCTNNTNCTTCNTNNTNCTNNTNNTNCTNNTNNTNCTNNTCNCN
CTCNCCTCNCCTCCNCTCTTNCATNCNCTCCNTCTNCTNTNCTTCTTTNCNCTCTCC
TNTNCTNTCACNTTCTTNTTTCNTTNTCCTTCNNCCTTNTCTCNCNTNCCTTNCNC
CCC

No. de colecta 8219, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCNCCNCCANATANNANNAATNAANNNNNNCNAGGNNNGGTNACCNGAACC
NANTCGGAACNCCNGGNNAGAGGNGGTGNAAGAAGAGTTTTANTGNAACANAAAAAG
GAGGGGNAGATAAGGGAGAGGATCANTAANAAAGCTAGNANNAAGCNAAGACGNTAGAT
GGGCTAGCNACGCAGACTAGANCCGCCCGCCCAACAATNNCACGCNGACGACTCNGA
ACAGAGCGNAACACAGACCGACNTTGGCGACTANNACNAAAANNACNCCGGNGNAAAN
ANACCAAANNGAACTACNCTCANGTCAANCCAAAAGCAAANNGCGCGANCCCGAGN
ANNCAACNANCAGACGCNNNAACGANNNCNAGGANNNTATCGNGNCACNNAAGACNNC
NNGGAGGCCNANNNNCANCGCANNCTANGCCNNAANAAAGACAANCNCATAGNNAGCCG
NANNNNCGGCANANNGGCANCNGNANCTNNGGCNANNNGMCNNCTAAANAGCNCNGNNG
TANCANATACATANCACANNANANAACANTGANGCNCTCACTGNAACAGGCACACGCAA
NTNANNNCNCCNATNNTCNCNNAACANAAAACCACNGNCACGNACGNACNNCGGA
NNANNACNCCNNTCNANACNCCNCCAANGCGNGTCGNCCGNAANNGANNACNNNNAC
AANANACCACACNCCGCTGCGACNNAAGNANTNTCATNANGNAAAGAGTACTCATGA
TNNACCAAGAAGCCNATNTANNACANTNTNNNCCANTGNNNACCANCACTAAACNCNCC
AAANCAACAGCTACACACAANGACNNTACATNCTCACCNCTACGATACAANNCANACN
ATNCCACTCNCNTCAGNTCCNCGCGNCCNCCNCCCTCNCGCCGCACGNACNTNCN
CNNCGCACNAACACTCGACTCGTGNTNNGNACCTACACACNACAACACTACCNTNN
ANGANANAAACCNNNTNGCTNNCCC

3.3 APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA SILVICULTURA.

La aplicación de los marcadores moleculares se llevó a cabo en el aislamiento y síntesis de ectomicorrizas de *C. cibarius* con *Quercus* sp. para demostrar su utilidad.

3.3.1 Aislamiento y propagación asexual de *Cantharellus cibarius*.

El aislamiento y purificación de *C. cibarius* se logró en el medio modificado de Melin Norkrans. Uno de los principales problemas para el aislamiento de este hongo fue la contaminación de los cultivos por una colonia acuosa no estudiada. A pesar de la densa contaminación por estos microorganismos, *C. cibarius* pudo crecer y sobresalir la colonia de los contaminantes después de una mes de incubación a 20 °C. La purificación de *C. cibarius* se logró tomando una pequeña pieza de agar colonizada del margen de la colonia y transferida nuevamente a cajas con medio de Melin hasta lograr el crecimiento axénico. Los cultivos se aislaron de cuerpos fructíferos de *C. cibarius* y *Cantharellus* sp. (fenotípicamente diferente) procedentes de un bosque de encino de la localidad el

Madroño en el estado de Tamaulipas, lográndose aislar solamente una cepa después de varios años consecutivos de intentar.

Después del aislamiento los cuerpos fructíferos fueron registrados, herborizados y finalmente se depositaron en el herbario José Castillo Tovar (ITCV), Tamaulipas.

3.3.2 Identificación molecular (PCR-RFLP) y secuenciación de nucleótidos de un cultivo puro de *C. cibarius*.

Antes de utilizar la cepa de *C. cibarius* en la síntesis de ectomicorrizas *in vitro*, el cultivo puro fue estudiado con las técnicas moleculares PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos para corroborar la identificación del hongo (ver figura 21 y secuencia génica No. 2, pagina 71). La secuenciación parcial del gen 28 S del cultivo puro registrado con

el número 104 (ITCV) coincidió con *Cantharellus* sp. en un 97% de similitud y con un E value de 0.0 según Blast del NCBI.

3.3.3 Descripción de la colonia de *Cantharellus cibarius in vitro*

El crecimiento asexual de *C. cibarius* fue lento, menos de 1 mm por día. La colonia es de forma irregular, color blanco cambiando a amarillo brillante con el tiempo. El micelio creció en forma plana y bajo el agar, pero no en una forma densa o abundante, ni formó rizomorfos figura 22. El olor de la colonia era fragante como en los basidiocarpos frescos. Otra cepa aislada recientemente de la misma localidad (El Madroño, Municipio de Victoria) presentó las mismas características, excepto que ésta presentó formación de primordios hacia el margen de la caja Petri. El micelio bajo el microscopio compuesto confirmó la presencia de fibulas de forma irregular, ancha con pared gruesa, con un contenido intracelular granular, pero no abundantemente. La adición de antibióticos (Estreptomina contra gram - y Penicilina para controlar gram +, ambas a 80 ppm) al medio de cultivo para el control de bacterias, no controló la aparición de colonias acuosas en el medio de cultivo. En contraste, el uso del fungicida Benlate a 100 ppm en el medio controló efectivamente la proliferación de hongos contaminantes, principalmente Deuteromycetes. A pesar de todos los intentos por eliminar a la bacteria asociada a las hifas de *C. cibarius* fue imposible. Aparentemente es un micobionte del hongo. Una vez aislado *C. cibarius* fue propagado en cajas Petri con medio de MMN (medio modificado de Melin Norkrans) y ADA (agua desionizada agar) para la síntesis de ectomicorrizas con *Quercus* sp. *in vitro*. El crecimiento del hongo en ADA fue irregular debido a la falta de nutrientes. En contraste, el crecimiento de éste fue muy regular en MMN.

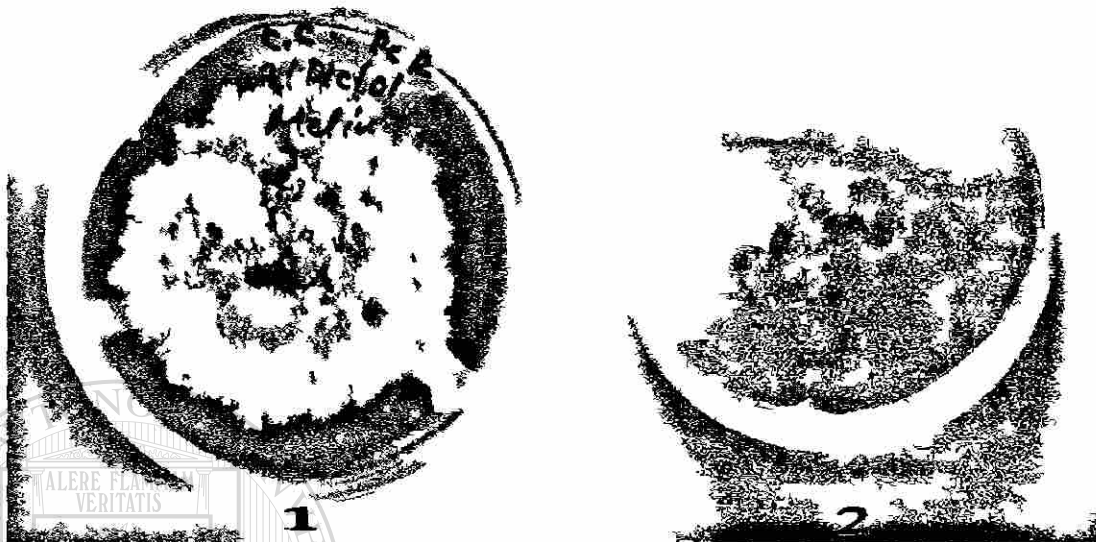


Figura 22. Cultivo puro de *Cantharellus cibarius* (1. anverso y 2. reverso)

3.3.4 Síntesis de ectomicorrizas *in vitro* de *Cantharellus cibarius* y *Quercus* sp.

La síntesis de ectomicorrizas de *C. cibarius* con *Quercus* sp. *in vitro* en los medios de MMN y ADA se puede observar en la figura 23 y 25. Las plántulas de *Quercus* sp. de un mes de edad y los cultivos puros de *C. cibarius* fueron colocados en cajas Petri con MMN, obteniendo después de seis meses la síntesis ectomicorrícica de *Cantharellus cibarius* con las plántulas de *Quercus* sp.

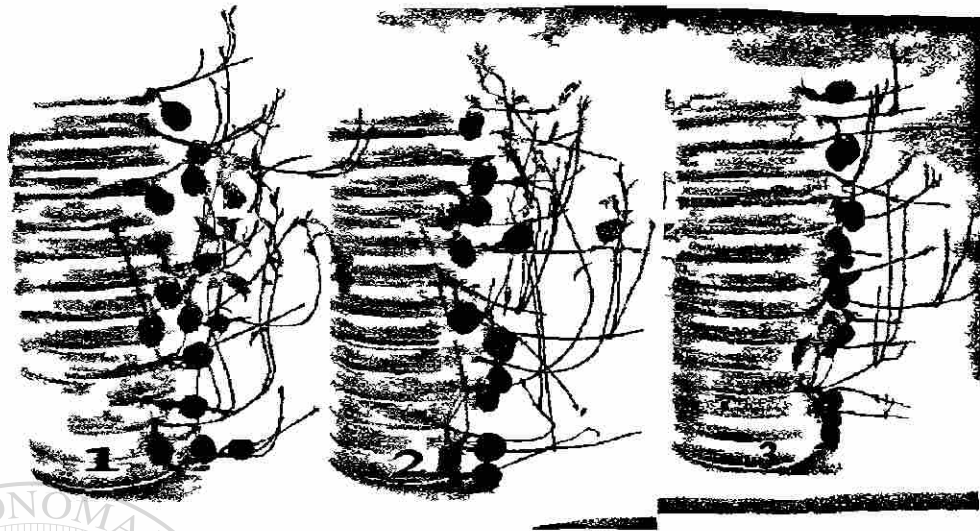


Figura 23. Síntesis de ectomicorrizas *in vitro* de *C. cibarius* con *Quercus* sp.
 (1) control, (2) medio de MMN, (3) medio de ADA

3.3.5 Método de Phillips y Hayman para la determinación del estatus micorrícico en la síntesis de ectomicorrizas.

Un análisis histológico y citológico de las raíces de plántulas micorrizadas tratadas con el método de Phillips y Hayman (1970) se llevó a cabo con ayuda del microscopio estereoscópico y compuesto revelando la presencia del manto o hifas en la superficie de la raíz, figura 24. Lo anterior fue utilizado para determinar el estatus micorrizógeno de las plántulas de encino. Cuando la raíz no presentaba manto, se observó la presencia de hifas sobre la superficie de la raíz presentando rara vez fíbulas y la superficie de la hifa cubierta por microorganismo no identificados.



Figura 24. Raíz de plántula de encino micorrizada con *C. cibarius*.

Las flechas indican el manto.

El porcentaje de micorrización de las plántulas de encino en medio de MMN

fue 66.66% y en ADA 13.33% (figura 25) después de 6 meses a una temperatura de 20°C con 15 horas de luz fluorescente diarias. El porcentaje de micorrización se determinó en plántulas que sobrevivieron después de este periodo. Uno de los principales problemas para la evaluación de las síntesis micorrícica de *C. cibarius* en estos medios fue la presencia de hongos endófitos (*Ceratocystis* sp. y *Verticillum* sp.) en raíces de plántulas de encino provocando ahogamiento o “damping off” y ocasionando la muerte de varias plantas en los diferentes medios.

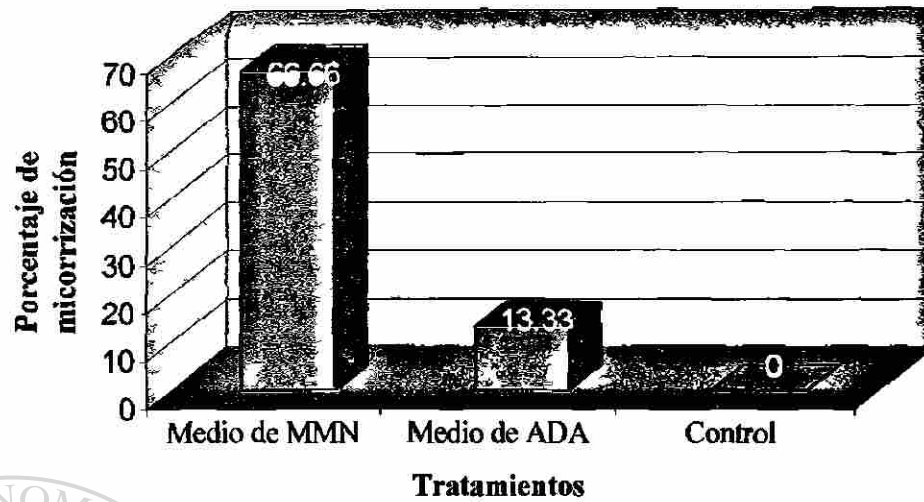


Figura 25. Síntesis de ectomicorrizas de *C. cibarius* con *Quercus* sp.

A pesar de los tratamientos y cuidados para seleccionar las semillas para este estudio, se presentaron problemas de larvas de insectos no estudiados (aparentemente de coleópteros barrenadores) en las bellotas provocando la muerte en varias plántulas (figura 26).

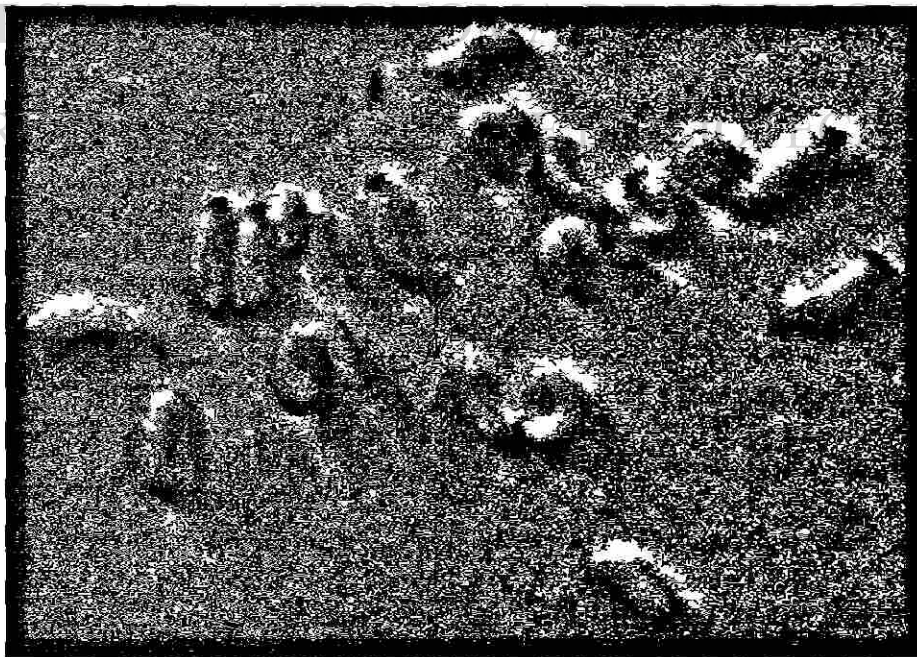


Figura 26. Larvas de insectos barrenadores de semillas de encino

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Taxonomía morfológica de las especies de *Cantharellus*

Las especies mas comunes del género *Cantharellus* pueden ser fácilmente diferenciadas por su fenotipo (morfoloía). *Cantharellus cibarius* es reconocido por su color amarillo “yema de huevo” con venaciones en el himenio y olor agradable dulce o fragante. Sin embargo, existe un complejo de especies que se asignan generalmente a *C. cibarius* y su morfología es muy ambigua. *C. cinnabarinus* se caracteriza por su color bermellón o rojo naranja, tamaño pequeño, y presencia de pseudoláminas.

Esta especie es muy rara en el noreste de México y crece asociada con encinos en bosque mesófilo. Por otro lado, *Cantharellus lateritius* es también raro y es muy parecido a *Cantharellus cibarius* pero se distingue porque el primero presenta el himenio liso. En el caso de *Cantharellus minor* como su nombre lo indica es una especie pequeña con un himenio con pseudoláminas angostas parecido a un *Cantharellus cibarius*, pero diminuto y hueco. Algunos micólogos consideran esta especie una forma amarilla de *Cantharellus cinnabarinus*. Una colecta de un *Cantharellus* sp. con el pileo de color gris claro, amarillo pálido con tintes guinda o café pálido fue identificada como *Cantharellus formosus* según Blast del NCBI al alinear la secuenciación parcial de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en el banco de genes. Sin embargo, la especie tipo crece en bosque de coníferas mientras que la aquí descrita crece asociada con encinos por lo que se requieren más estudios para delucidar sobre este caso.

Similarmente, otra colecta determinada como *Cantharellus* sp., presenta el pileo

escamoso y la alineación de su secuencia parcial en el banco de genes concordó con una especie de *Cantharellus* aun no determinada. Otras colectas identificadas como *Cantharellus cibarius* al alinear sus secuencias en el NCBI coincidieron con una especie de *Cantharellus* aún no determinada. En estos dos últimos casos, también se requieren más estudios para concluir.

4.2 Micogeografía de las especies de *Cantharellus* estudiadas de México.

La distribución geográfica de las especies estudiadas fue llevada a cabo en el mapa de las provincias biogeográficas de México de la Comisión Nacional para la biodiversidad (CONABIO). Se observa que las especies de *Cantharellus* están representadas en la Sierra Madre Oriental y Occidental así como en el Altiplano Norte y Sur en el centro y sur de México (Los Altos de Chiapas). Las especies de *Cantharellus* estudiadas crecen con bosques de encinos, mixto de pino-encino, coníferas, mesófilo de montaña y matorral con encino. Es muy probable que se encuentren también distribuidas donde se presentan otros tipos de vegetación en México.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3 Estudio del ITS de las especies de *Cantharellus*

Contrario a lo que la literatura refiere sobre la variabilidad del ITS para separar especies con el uso de PCR-RFLPE, el ITS de 31 basidiomas de *Cantharellus*, *Craterellus* y otros Basidiomycetes afines a los cantharelaceos no presentó variación en sus secuencias. Nuestros resultados contrastan con los de Feibelman *et al.*, (1994) quienes citan que el ITS es altamente variable en longitud en la familia Cantharellaceae. Además, señalan que el ITS1 entre el gen 18 S y 5.8 S es el más variado y que el grupo

de *C. cibarius* presenta el ITS-1 más grande variando de 820-1100 pb comparado con otros hongos Basidiomycetes que tienen de 240-350 (Feibelman *et al.*, 1994).

Aunque la región del ITS permite la separación de especies cercanamente emparentadas, ésta puede no ser suficientemente variable para distinguir especies biológicas. Sin embargo, el IGS, (espaciador intergénico) puede ser usado cuando el ITS no ofrece suficiente resolución (Egger *et al.*, 1996).

La variación intra específica de *Cantharellus cibarius* de diferentes regiones biogeográficas y hábitat de México, no presentó polimorfismo. Estos resultados también contrastan con lo citado por Horton, (2002) quien señaló que una especie muestra polimorfismo en el ITS en función de su distribución geográfica. Una posible razón es que la variación en la secuenciación del ADN se debe a la acumulación de varios efectos o procesos durante la evolución y no todos los grupos fúngicos son de la misma edad evolutiva y diferentes organismos han estado sujetos a diferentes presiones evolutivas (Hillis, *et al.*, 1996). Se ha encontrado que los niveles de variación del ITS encontrados dentro de una especie varía mientras que en otras especies no varía en lo absoluto.

La base de datos de los RFLP funcionan mejor cuando son enfocados en ecosistemas específicos donde la variación intra específica es baja y la comparación concuerda más y reduce el potencial de la sobrestimación (Horton y Bruns, 2001).

Comparaciones exactas de los RFLPs basadas en búsqueda en bases de datos no son comunes porque las estimaciones de los tamaños de los fragmentos varía y presenta geográficamente variación intra específica (Horton y Bruns, 2001). *Rhizoctonia* ha sido reportado con una variación en las secuencias del ITS de hasta 40% mientras que variedades intra específicas de *Metarhizium* presentó variación en sus secuencias de <

5% y hasta 9.4 % de variación en variedades de *M. anisopliae* (Horton y Bruns, 2001). Por otro lado, *Ganoderma* ha sido reportado con una variación en el ITS de 0-4 %, para *Laccaria* de 1-2 % entre otros (Bridge, 2002). El ITS en hongos es típicamente de entre 650 –900 pb en tamaño incluyendo el gen 5.8 S (Horton y Bruns, 2001).

En nuestro estudio, solamente una colecta determinada como *Cantharellus cibarius* presentó un polimorfismo claro. En este caso se sospecha de una posible criptoespecie pero se requieren más estudios para llegar a una conclusión. En un estudio molecular con *Tricholoma* se encontró que una especie de este género (*Tricholoma* sp. 1) está más relacionada a *T. focale* que a *T. caligatum*. Esto, a pesar de tener algunas características en común con ambas especies. Además, en este mismo estudio, un análisis filogenético demostró que una especie que estaba identificada como *T. flavovirens* y que era indistinguible morfológicamente de otras colectas con el mismo nombre resultó ser otra especie (criptoespecie) (Horton, 2002).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN 4.4 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en las especies de *Cantharellus* [®] DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Contrario a lo que se conoce sobre la conservación de nucleótidos del ADN en la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear, el estudio de la variación en las secuencias de la región antes mencionada de las especies de *Cantharellus* fue suficiente para separar las especies al alinearlas en el Blast del banco de genes NCBI. El gen de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear es más informativo para la identificación de hongos ectomicorrizógenos. La subunidad mayor del ADN ribosomal mitocondrial es muy ambigua en la colocación de secuencias desconocidas dentro de grupos de familias incluyendo la *Cantharellaceae* (Horton y Bruns, 2001). Las secuencias génicas de los

Cantharellus mexicanos estudiados presentaron gaps “N” (i.e. nucleótidos desconocidos) debido probablemente a “ruido” (efectos electrónicos del secuenciador) y se pueden corregir comparando éstas con la secuencia complementaria o comparándola con otras secuencias de la misma localidad al alinearlas para sustituir el nucleótido faltante. Esto traería como consecuencia un aumento en el porcentaje de similitud. En algunos casos, el porcentaje de similitud fue igual pero con diferentes especies al alinearlas en Blast e.g. la secuencia de la colecta García 10125 (ITCV) de Querétaro presentó un 96 % de similitud con *Cantharellus cibarius* reportada en el Banco de genes con 850 bits pero también presentó esa misma secuencia 96% de similitud con *Cantharellus cascadiensis* pero con 839 bits.

Lo mismo ocurrió con las colectas Guevara 805, 811, 796, 814 (ITCV) ya sea con el primer LROR o LR3 y en algunos casos el porcentaje es mayor pero con menor número de bits promedio. Varias colectas determinadas morfológicamente como *C. cibarius* al alinearlas en el banco de genes, concordaron con especies de *Cantharellus* aún no determinadas tal es el caso de la colecta García 1495, García 1790, Guevara 814 (ITCV). En otro caso, en varias colectas determinadas como *Cantharellus* sp. sus secuencias génicas concordaron con *Cantharellus formosus*. Las secuencias del *Cantharellus* sp. con el píleo escamoso, coincidieron con una especie de *Cantharellus* aún no descrita. Finalmente, lo mismo ocurrió con la secuencia génica del cultivo puro y de basidiomas de donde se obtuvo el cultivo.

Las secuencias del gen 18S han sido determinadas para algunos grupos de hongos de importancia ectomicorrícica tales como la familia Cantharellaceae, Pezizales y Gomphaceae. Estudios del gen 28 S ribosomal fue secuenciado y comparado con otros miembros de la familia Cantharellaceae. El análisis de la secuencia demostró que

Cantharellus y *Craterellus* deben ser tratados como géneros distintos (Dahlman *et al.*, 2000).

4.5 Síntesis de ectomicorrizas de *Cantharellus cibarius* con *Quercus* sp.

Los cultivos puros creciendo *in vitro* pueden espontáneamente cambiar de dicarióticos a monocarióticos después de transferencias sucesivas en medios de cultivo como un resultado adaptativo y las fibulas y otras características microscópicas se pueden perder, además algunos hongos diferentes pueden parecer similares en cultivo (Goodman *et al.*, 1996). Lo anterior fue observado en los cultivos aislados de *Cantharellus cibarius* en este estudio. Estos cambios aumentan el grado de dificultad para trabajar con hongos para estudios de síntesis de ectomicorrizas.

El uso de marcadores moleculares PCR-RFLP y secuenciación de nucleótidos son herramientas que pueden apoyar este tipo de investigación para garantizar la identificación del organismo con que se está trabajando.

Cantharellus cibarius ha sido citado en la literatura como un hongo ectomicorrícico de amplio rango de hospederos ya que se asocia con coníferas y latifoliadas (Trappe, 1962; Danell, 1994a). Sin embargo, no se encontró ningún estudio sobre la síntesis micorrizógena de *C. cibarius* con *Quercus* sp. En este estudio, el porcentaje de micorrización fue de 66% bajo condiciones asépticas. Las posibles causas de estos resultados son la siguientes:

La hipótesis de que la susceptibilidad de las raíces de los árboles a la infección o colonización por hongos ectomicorrizógenos está controlada genéticamente fue propuesta por Marx y Bryan, (1971). Ellos demostraron que el genotipo del hospedero (*Pinus elliotti*) estaba envuelto en el desarrollo de las micorrizas. Esto trajo como

consecuencia más estudios para determinar el efecto de las fuentes de semillas naturales y su habilidad para formar micorrizas. Por varias décadas, se ha estado asumiendo que la variación genotípica del árbol (hospedero) y del hongo ectomicorrizógeno pueden influenciar en el desarrollo de la micorriza. Los primeros datos de la expresión génica de ecosistemas micorrizógenos fueron presentados por Voiblet *et al.*, (2001) quien presentó los resultados de un análisis de los genes relacionados con la simbiosis en *Eucalyptus globus* y el hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* analizando la expresión diferencial de 486 genes selectos en el hongo, hospedero y micorriza.

En otros estudios genéticos con micelio monocariótico y reconstruido de *Laccaria bicolor* para la formación de micorrizas, se encontró que existían diferencias entre cepas monocarióticas, unas formaron micorrizas mientras que otras perdían esa capacidad de síntesis con *Pinus banksiana* (Barker *et al.*, 2002). Esto indicó que el genotipo micorrizógeno se segregó durante meiosis y sugiere que una base génica puede ser responsable al menos en parte en la capacidad de *L. bicolor* para establecer la simbiosis con su hospedero (Tagu *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2002).

Investigaciones genéticas han sido aplicadas a otros rasgos que se cree están relacionados en la formación de la micorrizas (e.g. producción de hormonas, metabolismo del nitrógeno, etc.). Un ejemplo es el estudio de la variabilidad intraespecífica en cepas monocariótica y dicarióticas de *Hebeloma cylindrosporum* para la producción de auxinas (Barker *et al.*, 2002). La variación genética entre las cepas monocarióticas y dicarióticas demostró que la producción de auxina era un rasgo complejo heredable y que las cepas monocarióticas retienen su habilidad para formar ectomicorrizas con *Pinus pinaster* pero formó pocas micorrizas al compararlas con las cepas dicarióticas. Esto también ocurre en otra especie ectomicorricas y la condición

dicariótica parece ser requerida para la expresión de la habilidad de formar ectomicorriza. Parece ser que existe una interacción entre los núcleos de la misma célula para regular la expresión del gen y optimizar la función celular necesarios para la expresión del fenotipo micorrizógeno. Algunos flavonoides (rutina, metabolito secundarios excretadas por la raíz) han sido identificados de las raíces de *Eucalyptus* y éstos estimularon el crecimiento de *Pisolithus* a concentraciones muy bajas (1 pM) sin embargo, la acción no fue específica de *Pisolithus* o para hongos ectomicorrizógenos.

La zeatina (una citocinina de plantas) también fue detectada en los exudados de raíz de *Eucalyptus*. Ambos rutina y zeatina juegan un rol complementario en las señales hacia las hifas de *Pisolithus*. En síntesis de hongo ectomicorrizógenos se ha reportado que producen hormonas vegetales como las auxinas en el sustrato. Las auxinas sirven como una señal potente morfogenético hacia la raíz. A muy baja concentración estimula la formación de nuevos meristemos y raíces laterales. Estas nuevas raíces son el blanco para la colonización por hifas ectomicorrizógenas. Se ha demostrado que un hongo mutante que produce de 3-5 veces más auxinas, tiene una mayor capacidad para producir micorrizas que una cepa silvestre (Tagu *et al.*, 2002 y Podila *et al.*, 2002).

Los socios de las micorrizas tienen que reconocerse uno a otro y lo hacen mediante el uso de moléculas difusas en la rizósfera. Este reconocimiento dirige a la interacción celular entre raíz y células fúngicas dirigido por cambios en los genes y expresión de las proteínas. Algunas especies de hongos ectomicorrizógenos son específicos con ciertas especies de plantas hospederas mientras que otros no. Tagu *et al.*, (2002) indicaron que la habilidad para formar ectomicorriza es un rasgo heredable probablemente controlado poligenéticamente por hongos.

En este experimento no se observó los cambios que sufre la raíz al ser expuestos al micobionte, sin embargo, se han propuesto mecanismos para la formación de la ectomicorriza (Tagu *et al.*, 2002 y Podila *et al.*, 2002). Es un proceso que implica una sucesión regulada en tiempo de las modificaciones morfológicas durante la colonización de las hifas. En el primer paso, la hifa explora la superficie de la raíz del hospedero. Las hifas colonizadoras pueden estar conectadas a una espora germinada con bajas reservas de energía o pueden estar conectadas a células fúngicas ya establecidas en la micorrización. La colonización de las puntas de las nuevas raíces de una planta micorrizada, ocurre antes de que emerja la nueva raíz.

Un proceso de comunicación de célula a célula ocurre durante la formación de la micorriza a partir de estos dos tipos de hifas y pudieran diferir debido a la concentración y naturaleza de las moléculas de señal que producen. Después de la pre-infección, las hifas buscan la superficie de la raíz induciendo modificaciones en la morfología de las células del hongo. Las hifas se ramifican y forman nuevas puntas. Las hifas en contacto con la raíces se hinchan y se adhieren firmemente a la raíz. La ramificación de la hifa se debe a exudados de la raíz, mientras que la hinchazón pudiera ser estimulada por la sensación topográfica de la superficie de la raíz. La colonización de la superficies de la raíz está acompañada por la inhibición de los pelos radiculares preexistentes.

Las células fúngicas excretan un material fibrilar en la superficie de la raíz el cual probablemente juega un papel en el anclaje de la hifa. Un material fibrilar semejante es también depositado entre dos hifas adyacentes formando el manto. La formación del manto induce cambios importantes en el material extramatricial, además de otras nuevas interfaces entre el hongo y la raíz. Las hifas que forman la red de Hartig progresan dentro del apoplasto de la raíz. La pared celular y la membrana plasmática son

invaginadas y las células se toman multinucleadas y ricas en mitocondrias y retículos endoplásmicos que indican una actividad metabólica alta en estas células. Durante la penetración y progresión de las hifa, la colonización de la raíz en algunas especies de angiospermas cambia la orientación de crecimiento. Dichas modificaciones están probablemente correlacionadas a cambios en el citoesqueleto. Por lo tanto, el apoplasto en la raíz es drásticamente modificado por el ingreso del hongo. La mayoría de estas modificaciones morfológicas están acompañadas por cambios en la expresión de genes y acumulación de proteínas (Tagu *et al.*, 2002 y Podila *et al.*, 2002).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1.- *Cantharellus cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *C. lateritius* son especies que pueden ser determinadas por estudio morfológicos. Estas están distribuidas en las provincias biogeográficas del centro, sur y norte de México a través.

2.- El análisis del ITS con PCR-RFLP en las especies del género *Cantharellus* Mexicanas, no varía lo suficiente para separarlas. Sin embargo, sí presentó suficiente resolución al comparar el ITS de las especies mexicanas contra una de EUA y los cultivos puros.

3.- El PCR-RFLP del ITS no presentó suficiente resolución para separar a las especies del complejo *Cantharellus cibarius*.

4.- La secuenciación parcial de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear sí presentó suficiente variación en sus nucleótidos para separar a *Cantharellus cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *C. formosus*.

5.- La identificación molecular de los cultivos puros de los hongos ectomicorrizógenos es un paso necesario para estudio de síntesis micorrícica.

6.- Se requiere llevar a cabo más estudios sobre las secuencias de los *Cantharellus* spp. del complejo *Cantharellus cibarius* para determinar el taxón a que corresponden o en su defecto proponer nuevos taxa considerando otros efectos biogeográficos y ecológicos.

BIBLIOGRAFÍA

Adhikary, R. K., P. Baruah, P. Kalita y D. Bordoloi. 1999. Edible Mushrooms Growing in Forests of Arunachal Pradesh. *Advances in Horticulture and Forestry*. 6:119-123.

Amaranthus, M. y D. Pilz. 1996. Productivity and Sustainable Harvest of Wild Mushrooms. 42-61. *En: Managing Forest Ecosystem to Conserve Fungus Diversity and Sustain Wild Mushroom Harvest*. Eds. D. Pilz y R. Molina. Dept. Agriculture, Forest Service, OR, E.U.A.

Anderson, J. B. 1993. Molecular Tools in Breeding *Agaricus*. *En: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. Eds. S-T. Chang, J.A. Buswell y P.G. Miles. Gordon and Breach Sci. Pub. E.U.A.

Arnolds, E. 1991. Decline of Ectomycorrhizal Fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 35:209-244.

Amheim, N., T. White y W. E. Rainey. 1990. Application of PCR: Organismal and Population Biology. *BioScience* Vol. 40 No. 3:174-182.

Baldwin, Q. F. y K. N. Egger, 1996. Protocols for Analysis of DNA Mycorrhizal Roots. *En: A Manual of Concise Descriptions of North American Ectomycorrhizae, Including Microscopic and Molecular Characterization*. Eds. D.M. Goodman, D. M. Durall, J. A. Trofymow y S. M. Berch. Mycologue Publ. Canada.

Barker, S., S. Duplessis y D. Tagu. 2002. The Application of Genetic Approaches for Investigations of Mycorrhizal Symbioses. 85-95. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas*. ICOM 3. Ed. S.E. Smith y F.A. Smith.. Kluwer Acad. Holanda.

Bessette, A. E , A. R. Bessette y D. Fisher 1997. *Mushrooms of Northeastern North America*. Syracuse University Press. 582 pp.

Bigelow, H. E. 1978. The Cantharelloid Fungi of New England and Adjacent Areas. *Micologia* 70:707-756.

Boujon, C. 1997. Decrease of Mycorrhizal Macrofungi in a Forest: A Retrospective Study from 1925 to 1994. *Mycologia Helvetica* 9 (2):117-132.

Burova, L. G. y I. L. Trapido. 1975. Mycological Features of a Birch Forest of the *Carex pilosa* Type in Relation to Prolonged Recreational Usage. *Lesovedenie* 1:49-55.

Brayford, D. *et al.* 1995. *Modern Techniques for the Identification of Bacteria & Filamentous Fungi*. International Mycological Institute. Gran Bretaña.

Bridge, P. 2002. The History and Application of Molecular Mycology. *Mycologist*, Vol. 16: Parte 3. 90-99 pp.

Bruns, T. D., R. Fogel y J. W. Taylor. 1990. Amplification and Sequencing of DNA from Fungal Herbarium Specimens. *Mycologia* 82 (2):175-184 pp.

Castillo, J., J. García y F. E. San Martín. 1979. Algunos Datos sobre la Distribución Ecológica de los Hongos Principalmente los Micorrízicos en el Centro del Estado de Nuevo León. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 13:229-237.

Chalot, M., A. Javelle, D. Blaudez, R. Lambilliotte, R. Cooke, H. Sentenac, D. Wipf y B. Botton. 2001. An Update on Nutrition Transport processes in Ectomycorrhizas. 165-175. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas. ICOM 3.* Ed. S.E. Smith y F.A. Smith. Kluwer Acad. Holanda.

Chang, S-T., J. A. Buswell y P. G. Miles. 1989. *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. CRC Press, FL. E.U.A. 345 pp.

Chen, X. X. 1986. Researches on the Effect of Pure Culture of Mycorrhizal Fungi on the Growth of Masson's Pine Seedlings. *Forest Science and Technology*. 1:11-14.

Chen, K. 1997. Applied Potential of Ectomycorrhizae on the Forestry in Yunnan. *Mycorrhiza News* 9 (3):13-17.

Chiu, S., H. Kwan y S. Cheng. 1993. Application of Arbitrarily- Primed Polymerase Chain Reaction in Molecular Studies of Mushroom Species with Emphasis on *Lentinula edodes*. 265-284. *En: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.* Eds. S. Chang, J.A. Buswell y P.G. Mills. Gordon and Breach Sci. Publ. E.U.A.

Corner, E. J. H. 1966. *A Monograph of Cantharelloid Fungi*. Oxford University Press. Gran Bretaña. 255 pp.

Crisan, E. V. y A. Sands. 1978. Nutritional Value. 137-168. *En: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms.* Eds. S.T. Chang y W.A. Hayes. Academic Press. NY., E.U.A.

Dabrowska, E. y B. Gayny. 1988. Residues of Pyrethroid Plant Protection Preparations Used in 1980 to 1986 Occurring in Forest Fruits and Fungi. *Przemysl Fermentacyjny i Owocowo Warzywny* 32:5-6 pp.

Dahlman M., E. Danell y J. W. Spatafora. 2000. Molecular Systematics of *Craterellus*: Cladistic Analysis of Nuclear LSU rDNA Sequence Data. *Mycol. Res.* 104 (4):388-394.

Dahm, H., E. Strzelczyk, R. Pachlewski y H. Rozycki. 1999. Cellulasa, Pectinase and Proteinase Production by the Ectomycorrhizal Fungus *Cantharellus cibarius* Fr. *Pedobiologia* 43 (3):193-205.

Dahm, H., E. Strzeleczyk, R. Pachlewski y K. Redlak. 1997. Impact of Media and Growth Conditions on Biomass Production by the Ectomycorrhizal Fungus *Cantharellus cibarius* Fr. *Folia Forestalia Polonica* 39:17-26.

Danell, E. y N. Fries. 1990. Methods for Isolation of *Cantharellus* Species and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* 38:141-148.

Danell, E. y D. Eaker. 1992. Amino Acid and Total Protein Content of the Edible Mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries). *J. Sci. Food Agric.* 60:333-337.

Danell, E., S. Alstrom y A. Ternstrom. 1993. *Pseudomonas fluorescens* in Association with Fruit Bodies of the Ectomycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycol. Res.* 97 (9): 1148-1152.

Danell, E. 1994a. *Cantharellus cibarius: Mycorrhiza Formation and Ecology*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 35.

Danell, E. 1994b. Formation and Growth of the Ectomycorrhiza of *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 5:89-97.

Danell, E. 1997a. Progress in Chantarelle (*Cantharellus cibarius*) Cultivation. *Revue Forestiere Francaise* 49:214-221.

Danell, E. 1997b. Les Progrès Dans la Maîtrise de la Culture de la Chanterelle, *Cantharellus cibarius*. *Rev. For. Fr.* 49:214-221.

Danell, E. y F.J. Camacho. 1997. Successful Cultivation of the Golden Chantarelle. *Nature London* 385 (23):303.

Degreef, J., F. Malaisse, J. Rammeloo y E. Baudart. 1997. Edible Mushrooms of the Zambezi Woodland Area: A Nutritional and Ecological Approach. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* 1(3):221-231.

Dowling, T. E., C. Moritz, J. D. Palmer y L. H. Rieseberg. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites. 249-320. *En: Molecular Systematics*. Eds. D.M. Hillis, C. Moritz y B.K. Mable, 2a. Ed. Sinauer, EUA.

Dyke, A. J. y A. C. Newton. 1999. Commercial Harvesting of Wild Mushrooms in Scottish Forest: Is It Sustainable?. *Scottish Forestry* 53(2):77-85.

Egger, K. N. 1995. Molecular Analysis of Ectomycorrhizal Fungal Communities. *Can. J. Bot.* Vol. 73 (suppl.1) S1415-S1422.

Egger, K. N. , G. Kernaghan, T. E. O'Dell y Q. F. Baldwin. 1996. Describing DNA Using Molecular Techniques. *En: A Manual of Concise Descriptions of North American*

Ectomycorrhizae, Including Microscopic and Molecular Characterization. Eds. D.M. Goodman, D. M. Durall, J. A. Trofymow y S. M. Berch. Mycologue Publ. Canada.

Eyssartier, G. y B. Buyck. 1999. Contributions of a Mycological Inventory in Madagascar. 2. New Taxa in the Genus *Cantharellus*. *Mycotaxon* 70:203-211.

Feibelman, T., P. Bayman y W. G. Cibula. 1994. Length Variation in the Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA in Chanterelles. *Mycol. Res.* 98 (6):614-618.

Feibelman, T. P., J. W. Bennett y W. G. Cibula. 1996. *Cantharellus tabernensis*: a New Species from the Southeastern United States. *Mycologia* 88 (2):295-301.

Fries, N. 1979. Germination of Spores of *Cantharellus cibarius*. *Mycologia* 71:216-219.

Fries, N. y E. Danell. 1990. Methods for Isolation of *Cantharellus* Species, and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* 38:141-148.

Froidevaux, L. 1975. Identification of Some Douglas Fir Mycorrhizae. *European Journal of Forest Pathology* 5(4):212-216.

Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortín, T. D. Bruns y J. W. Taylor. 1991. Identification of Indigenous and Introduced Symbiotic Fungi in Ectomycorrhizae by Amplification of Nuclear and Mitochondrial DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.

Garza, F. 1991. Competition Between Ectomycorrhizal Fungi During Establishment on the Rotos of Tropical Pines. D. Phil Tesis University of Oxford, Oxford Forestry Institute. 383 pp.

Garza-Ocañas, F. 1993. Producción de Compuestos Antibióticos por Dos Especies de Hongos Ectomicorizógenos. Contribuciones Micológicas en Homenaje al Biólogo José Castillo Tovar por su Labor en Pro de la Micología Mexicana. *Reporte Científico, Número Especial* 13:132-146.

Garza, F., R. Mota, J. Martínez-Ávalos y G. Sánchez-Ramos. 2001. Síntesis de Ectomicorizas *in vitro* de *Pinus caribaea*, *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*. *BIOTAM*. Vol. 12 (3):37-56.

Grochowski, W. y R. Ostalski. 1993. Changes in the Forest Environment Under a 65 Years Old Pine Stand Caused by Sprinkling the Forest Ground. *Prace Instytutu Badawczego Lesnictwa* No. 761-769:145-160.

González, P. y J. Labarere. 2000. Phylogenetic Relationships of *Pleurotus* Species According to the Sequence and Secondary Structure of the Mitochondrial Small-Subunit rRNA V4, V6 and V9 Domains. *Microbiology* 146: 209-221.

Goodman, D. M., D. M. Durall y J. A. Trofymow. 1996. Describing Ectomycorrhizae, Describing Morphology and Anatomy. *En: A Manual of Concise Descriptions of North*

American Ectomycorrhizae, Including Microscopic and Molecular Characterization. Eds. D. M. Goodman, D. M. Durall, J. A. Trofymow y S. M. Berch. Mycologue Publ. Canada.

Grabowski, D., W. Muszynski, M. Petrykowska, B. Rubel, G. Smagala, W. Lada, G. Desmet. 1994. Activity of Cesium-134 in Game and Mushrooms in Poland. *Science of the Total Environment* 157:227-229; 2 ref.

Guzmán, G. 1985. Estudios sobre los Cantarelaceos de México (Fungi, Aphyllophorales). *BIOTICA* 10 (4):395-400.

Haselwandter, K. y M. Berreck. 1989. Accumulation of ¹³⁷Cs in Fruit Bodies of Edible Fungi. A Comparison Between Wild and Cultivated Mushrooms. *Mushroom Sci.* XII (2): 587-592.

Hibbett, D. S. y R. Vilgalys. (1991). Evolutionary Relationship of *Lentinus* to the Polyporaceae o Evidence from Restriction Analysis of Enzimatically Amplified Ribosomal DNA. *Mycologia* 83 (4):425-439.

Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S. K. Davis y E. A. Zimmer. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. 321-381. *En: Molecular Systematics*. Eds. D.M. Hillis, C. Moritz y B.K. Mable, 2a. Ed. Sinauer, E.U.A..

Horton, T. R. y T. D. Bruns. 2001. The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking into the Black-Box. *Molecular Ecology* 10:1855-1871.

Horton, T. R. 2002. Molecular Approaches to Ectomycorrhizal Diversity Studies: Variation in ITS at a Local Scale. 29-39. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas*. ICOM 3. Ed. S.E. Smith y F.A. Smith.. Kluwer Acad. Holanda.

Hosford, D., D. Pilz, R. Molina y M. Amaranthus. 1997. Ecology and Management of the Commercially Harvested American Matsutake. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-412*. Portland, Or. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 68 pp.

Iwase, K. 1997. Cultivation of Mycorrhizal Mushrooms. *Food Reviews International* 13 (3):431-442.

Itävaara, M. y H. Willberg. 1988. Establishment of a *Cantharellus cibarius* Culture Collection in Finland. *Karstenia* 28:34.

Jansen, E. y H. F. Van Dobben. 1987. Is Decline of *Cantharellus cibarius* in the Netherlands Due to Air Pollution?. *AMBIO* 16(4):211-215.

Jones, S. B. y A. E. Luchsinger. 1986. *Plant Systematics*. McGraw Hill. 2ª. Ed. New York, EUA. 512 pp.

Jong, S. C. 1978. Conservation of the Cultures. 119-135. *En: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Eds. S. T. Chang y W. A. Hayes. Academic Press, NY, E.U.A.

Kalinowski, M. y M. Korhonen. 1998. Non Wood Forest Products in Poland. *En: Sustainable Development of Non Wood Goods and Benefits from Boreal and Cold Temperate Forest*. Proceedings of the International Workshop, Joensuu, Finland. H.G. Lund, B. Pajari Ed. *EFI-Proceedings* 23:87-92.

Kerrigan, R. W. y I. K. Ross. 1989. Allozymes of a Wild *Agaricus bisporus* Population: New Alleles, New Genotypes. *Mycologia* 81 (3) 433-443.

Kocher, T. D. y T. J. White. 1989. Evolutionary Analysis Via PCR. *En: PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. 137-147. Ed. H. A. Erlich. M Stockton Press, E.U.A.

Kuhner, R. y H. Romagnesi (1953). *Flore Analytique des Champignons Superieurs (agarics, Bolets, Chanterelles)*. Masson, ET, Paris. 556 pp.

Largent, D. 1986. *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*. MRP, E.U.A. 166 pp.

Largent, D. y T. J. Baroni. 1988. *How to Identify Mushrooms to Genus VI: Modern Genera*. MRP, E.U.A. 277 pp.

Lee, K. H., Y. S. Kim, T. S. Lee y K. S. Kim. 1986. A Comparative Study on the Mushroom Populations Between Matsutake Producing and Non-producing *Pinus densiflora* Stands. *Journal of Korean Forestry Society* 72:27-31.

Lee, S. B. y J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores. *En: PCR Protocols, A Guide for Methods and Applications*. 282-287. Eds. Michael A. Innis *et al.* Academic Press, E.U.A.

Liegel, L., D. Pilz y T. Love. 1998a. The MAB Mushroom Study: Background and Concerns. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio, Special Report No. 9:3-7*.

Liegel, L., D. Pilz, T. Love y E. Jones. 1998b. Integrating Biological, Socioeconomic and Managerial Methods and Results in the MAB Mushroom Study. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *AMBIO. Special Report No. 9:26-33*.

Love, T., E. Jones y L. Liegel. 1998. Valuing the Temperature Rainforest: Wild Mushrooms on the Olympic Peninsula Biosphere Reserve. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio. Special Report No. 9:16-25*.

Marx, D. H. y W. G. Bryan. 1971. Formation of Ectomycorrhizae on Half-sib Progenies of Slash Pine in Aseptic Culture. *Forest Sci.* 17. 488-492.

Miller, O., 1986. Mycorrhizal Synthesis of *Amanita muscaria* var. *persicina* With Hard Pines. *Mycotaxon*. Vol. XXVI: 165-172.

Molina, R., H. Massicotte y J.M. Trappe. 1992. Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbioses: Community-Ecological Consequences and Practical Implications. 357-423. *En: Mycorrhizal Functioning (an Integrative Plant-Fungal Process)*. Eds. M.F. Allen. Chapman & Hall, NY. E.U.A.

Molina, R., T. O'Dell, D. Louma, M. Amaranthus, M. Castellano y K. Russell. 1993. Biology, Ecology and Social Aspects of Wild Edible Mushrooms in the Forests of the Pacific Northwest: a Preface to Managing Commercial Harvest. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-309*. Portland, OR: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 42 pp.

Morain, S. A. 1984. Systematic and Regional Biogeography. Van Nostrand Reinhold, Univ. New Mexico, EUA. 199 pp.

Moore, L. M., A. E. Jansen y L. J. L. D. Van Griensven. 1989. Pure Culture Synthesis of Ectomycorrhizas with *Cantharellus cibarius*. *Acta Botanica Neerlandica* 38 (3):273-279.

Mui, D., T. Feibelman y J. W. Bennett. 1998. A Preliminary Study of the Carotenoids of some North American Species of *Cantharellus*. *Int. J. Plant. Sci.* 159 (2) 244-248.

Nohrstedt, H. O. 1994. Fruit Body Production and ¹³⁷Cs-activity of *Cantharellus cibarius* After Nitrogen and Potassium Fertilization. *Report Skog Forsk* 2:19 pp.

Nuhamara, S.T. 1987. Multidisciplinary Research on Shorea Javanica. III. Mycorrhizae in Agroforestry: a Case Study. *Biotropia* 1(1):53-57.

Pachlewski, R., E. Strzelczyk y J. Kermen. 1996. Studies of *Cantharellus cibarius* a Mycorrhizal Fungus of Pine and Spruce. *Acta Mycologica* 31(2):143-150.

Pegler, D. 1983. *Agaric Flora of the Lesser Antilles*. Kew Bulletin Additional Series IX, Royal Botanic Gardens, Kew. London. 668 pp.

Persson, O. 1997. *The Chanterelle Book*. Ten Speed Press, E.U.A. 120 pp.

Petersen, R. H. 1976. Notes on Cantharelloid Fungi. VII. The Taxa Described by Chares H. Peck. *Mycologia* 68:304-326.

Phillips, J. M. y D. S. Hayman, 1970. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.

Pine, E. M., D. S. Hibbett y M. J. Donoghue. 1999. Phylogenetic Relationship of Cantharelloid and Clavarioid Homobasidiomycetes Based on Mitochondrial and Nuclear rDNA Sequences. *Mycologia* 91 (6):944-963.

Pilz, D., R. Molina y L. Liegel. 1998a. Biological Productivity of Chanterelle Mushrooms in and Near the Olympic Peninsula Biosphere Reserve. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushrooms Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio Special Report* No. 9:8-13.

Pilz, D., F. D. Brodie, S. Alexander y R. Molina. 1998b. Relative Value of Chanterelles and Timber as Commercial Forest Products. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushrooms Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio Special Report* No. 9:14-16.

Pilz, D., L. Norvell, E. Danell y R. Molina. 2003. Ecology and Management of Commercially Harvested Chanterelle Mushrooms. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-576*, Dept. Agric. E.U.A. Servicio Forestal, Pacific Northwest Research Station. 83 pp.

Podila, G. K., J. Zheng, S. Balasubramanian, S. Sundaram, S. Hiremath, J. H. Brand y M. J. Hymes. 2002. Fungal Gene Expression in Early Symbiotic Interactions between *Laccaria bicolor* y Red Pine. 117-128. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas*. ICOM 3. Ed. S. E. Smith y F. A. Smith.. Kluwer Acad. Holanda.

Rasmussen, L. 1998. Ectomycorrhizal Fungi in the NITREX Site at Gardsjon, Sweden Below and Above Ground Responses to Experimentally Changed Nitrogen Inputs. *En: Special issue: The Whole Ecosystem Experiments of the NITREX and EXMAN Projects*. Brandrud, T. E., V. Timmermann y R. F. Wright Ed. *Forest Ecology and Management* 101(1-3):207-214.

Redhead, S., L. L. Norvell y E. Danell. 1997. *Cantharellus formosus* and the Pacific Golden Chanterelle Harvest in Western North America. *Mycotaxon* 65:285-322.

Redhead, S. A. 1997. The Pine Mushroom Industry in Canada and the United States: Why it Exists and Where it is Going. *En: Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Eds. Mary E. Palm e Ignacio H. Chapela. Parkway Publishers. 15-54 pp.

Royse, D. J. y B. May. 1993. Use of Isozyme Variation to Identify Genotypic Classes of *Agaricus brunneoscens*. *En: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. Eds. S. Chang, J.A. Buswell y P.G. Mills. Gordon and Breach Sci. Publ. E.U.A.

Salo, K. 1993. Yields of Commercial Edible Mushroom Species in Mineral Soil Forests in Finland. Proceedings of the 3rd Finnish Soviet Congress on Products Gathered from Nature, Oulu, Finland. *Aquilo. Ser. Botanica* 31:115-121.

Sanon, K. B., A. M. Ba y J. Dexheimer. 1997. Mycorrhizal Status of Some Fungi Fruiting Beneath Indigenous Trees in Burkina Faso. *Forest Ecology and Management*. 98 (1):61-69.

Schouten, S. P. y M. H. Waadrager. 1978. Problems in Obtaining Pure Cultures of *Cantharellus cibarius*. *Mushroom Sci.* X (1):885-890.

Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (1995). *Gaceta Ecológica*. Vol. VII Num. 33.

Söderström, B. 2002. Challenges for Mycorrhizal Research Into the New Millennium. 1-7. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas*. ICOM 3. Ed. S. E. Smith y F. A. Smith.. Kluwer Acad. Holanda.

Sogin, M. L. 1990. Amplification of Ribosomal RNA Genes for Molecular Evolution Studies. 307-314. *En: PCR Protocols, A Guide for Methods and Applications*. Eds. M. A. Innis *et al.* Academic Press, E.U.A.

Straatsma, G., R. N. H. Konings y L. J. L. D. Van Griensven. 1985. A Strain Collection of the Mycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius* Obtained by Germination of Spores and Culture of Fruit Body Tissue. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85 (4):689-697.

Straatsma, G. y J. Bruinsma. 1986. Carboxylated Metabolic Intermediates as Nutritional Factors in Vegetative Growth of the Mycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius* Fr. *J. Plant Physiol.* Vol. 125:377-381.

Straatsma, G. y L. J. L. D. Van Griensven. 1986. Growth Requirements of Mycelial Cultures of the Mycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87 (1):135-141.

Straatsma, G., L. J. L. D. Van Griensven y J. Bruinsma. 1986. Root Influence on *in vitro* Growth of Hyphae of the Mycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius* Replaced by Carbon Dioxide. *Physiol. Plant.* 67:521-528.

Strzelczyk, E., M. Kampert y R. Pachlewski. 1997a. Production of Cytokinin Like Substances and Ethylene by the Ectomycorrhizal Fungus *Cantharellus cibarius*. *Acta Mycologica* 32 (1):5-12.

Strzelczyk, E., H. Dahm, R. Pachlewski y H. Rozycki. 1997b. Production of Indole Compounds by the Ectomycorrhizal Fungus *Cantharellus cibarius* Fr. *Pedobiologia* 41 (5):402-411.

Tagu, D., F. Lapeyrie y F. Martin. 2002. The Ectomycorrhizal Symbiosis: Genetics and Development. 97-105. *En: Diversity and Integration in Mycorrhizas*. ICOM 3. Ed. S.E. Smith y F.A. Smith. Kluwer Acad. Holanda.

Taylor, J. W. y E. C. Swann. 1994. Dried Samples: Soft Tissue 11 DNA from Herbarium Specimens. 166-181, *En: Ancient DNA*. Eds. Herrmann, B. y S. Hummell. Springer-Verlag, New York, E.U.A.

Trappe, J. M. 1962. Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28:538-606.

Velikanov, L. y I. Sidorova. 1998. Regulation of Myco and Microbiotic Structure of Forest Soil and Litter by Higher Basidiomycetes. II. Influence of Basidiomycetes on Species Diversity of Soil Micromycetes. *Mycologiya i Fitopatologiya* 32 (1):33-36.

Vetter, J. 1993. Chemical Composition of Eight Edible Fungi. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 196 (3):224-227.

Vigalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and Recent Patterns of Geographic Speciation in the Oyster Mushroom *Pleurotus* Revealed by Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Sequences. *Proc. Natl. Acad. USA* Vol. 91:4599-4603.

Villarreal, L. y J. Pérez-Moreno. 1989. Los Hongos Comestibles Silvestres de México, un Enfoque Intergral. *Micol. Neotrop. Apl.* 2:77-114.

Villarreal, L. y A. Gómez. 1997. Inventory and Monitoring Wild Mushrooms in Mexico: Challenge and Opportunity for Sustainable Development. 99-109. *En: Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Eds. M.E. Palm e I. H. Chapela. Parkway, NC, E.U.A.

Voiblet, C., S. Duplessis, N. Encelot y F. Martin. 2001. Identification of Symbiosis-related Genes in *Eucalyptus globus* - *Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhiza by Differential Hybridization of Arrayed cDNAs. *Plant J.* 25:1-12.

Vrot, F. y J. Grente. 1985. Research for a Method of Biological Control of Ink Disease by Using Mycorrhizal Symbiosis. *European Journal of Forest Pathology* 15 (5-6):379-383.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. 315-322. *En: PCR Protocols, A Guide for Methods and Applications*. 282-287. Eds. M. A. Innis *et al.* Academic Press, E.U.A



ANEXOS
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.- Preparación de Medios de Cultivo.

Agua Desionizada Agar + Tiamina

Tiamina HCl	100 µg
Agar	20 g
Agua Desionizada	1000 ml.

Agua Desionizada Agar Purificado (ADA)

Agar purificado	15 g
Agua Desionizada	1000 ml.

Medio de Melin Norkrans (MMN)

Extracto de levadura	0.50 g
Extracto de malta	3 g

D-glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.25 g
KH ₂ PO ₄	0.50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g
CaCl ₂	0.05 g
FeCl ₃ (1%)	1.20 ml
NaCl	0.025 g
Tiamina HCl	100 µg

Agar	15 g
Agar purificado	15 g

Agua desionizada 1000 ml

Medio de Melin Norkrans

Extracto de levadura 1 g

Extracto de malta 3 g

D-glucosa 10 g

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 10 ml/lt

KH_2PO_4 10 ml/lt

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 ml/lt

CaCl_2 10 ml/lt

FeCl_3 (1%) 10 ml/lt

NaCl 10 ml/lt

Tiamina HCl 1 ml/lt

Agar 15 g

Agar purificado 18 g

Agua desionizada 800 ml.

Para obtener un pH de 6.3

Fosfato dibásico de sodio .5 M 56 ml/lt

Acido cítrico .5 M 13.2 ml/lt

Esterilizar 120 °C / 5 min.

Disolver

Esterilizar 120 °C / 5 min.

