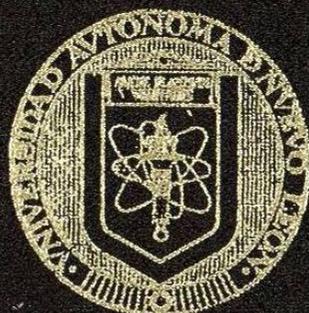


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES  
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



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. GONZALLO GUEVARA GUERRERO



1020150692

**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  
RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA**

**M.Sc. GONZALO GUEVARA GUERRERO**

**Linares, N.L.**

**Noviembre del 2003**

990334

TD  
Z5991  
FCF  
2003  
.G8



FONDO  
TESIS

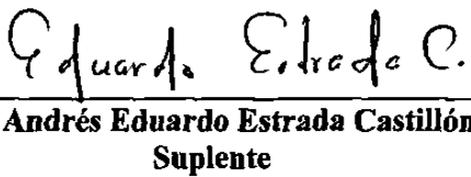
**Estudios moleculares del hongo comestible y ectomicorrizógeno *Cantharellus* spp. de algunas localidades de México**

**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

## **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.

## **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
<b>1.1 Taxonomía del género <i>Cantharellus</i></b> . . . . .	1
<b>1.2 Importancia ecológica, económica y nutricional del género <i>Cantharellus</i></b> . . . . .	4
<b>1.3 Estudio del ITS (espaciador transcrito interno) nuclear en <i>Cantharellus</i> spp.</b> . . . . .	8
<b>1.4 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear del hongo ectomicorrizógeno <i>Cantharellus</i>.</b> . . . . .	10
<b>1.5 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura (síntesis de ectomicorrizas de <i>Cantharellus cibarius</i> con <i>Quercus</i> sp.)</b> . . . . .	12
<b>1.6 Justificación</b> . . . . .	15
<b>1.7 Objetivo general</b> . . . . .	16
<b>1.8 Objetivos particulares</b> . . . . .	16

<b>1.9 Hipótesis</b>	16
----------------------	----

## CAPÍTULO 2

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
<b>2.1 Diagrama general de la investigación</b>	17
<b>2.2 Taxonomía morfológica de <i>Cantharellus</i> spp.</b>	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
<b>2.3 Taxonomía molecular</b>	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
<b>2.4 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura</b>	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 ectomicorrizas <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

<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Taxonomía morfológica . . . . .</b>	<b>34</b>
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
<b>3.2 Taxonomía molecular . . . . .</b>	<b>49</b>
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
<b>3.3 Aplicación de técnicas moleculares en la silvicultura . . . . .</b>	<b>84</b>
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

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

## CAPÍTULO 5

<b>CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS . . . . .</b>	<b>111</b>

## 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

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura	
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</i> II) 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</i> II) 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</i> III) 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 ectomicorrícica 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 ectomicorrícica 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 ectomicorrizógenos 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 canthareloides 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 canthareloides 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*. Pilz *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 canthareloides 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. *roseocanus* (Redhead *et al.*, 1997). Una nueva especie, *Cantharellus taberniensis*, 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 estípite 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. taberniensis* 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 CO<sub>2</sub> 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 cruzas 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 esticobasídias. *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 ínter 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 ectomicorrícicos 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 ectomicorrícica 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 deciduo. Es de interés que el triptófano inhibió la síntesis de auxinas en la cepa proveniente de bosque deciduo, 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.

## 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*.

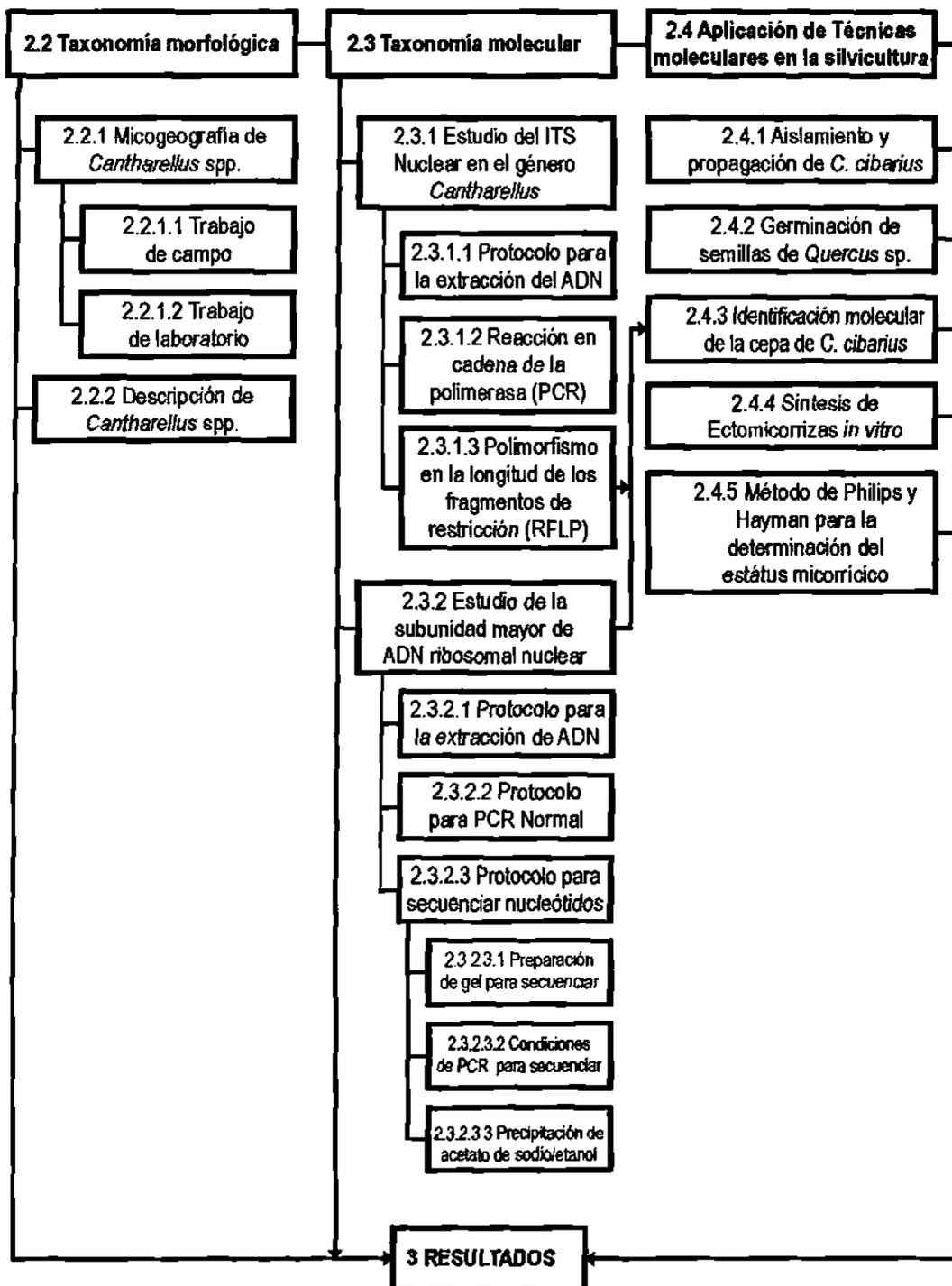
Ho: La secuenciación de nucleótidos de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear ofrecen suficiente resolución para separar especies y descubrir criptoespecies.

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 Aphyllophorales 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).

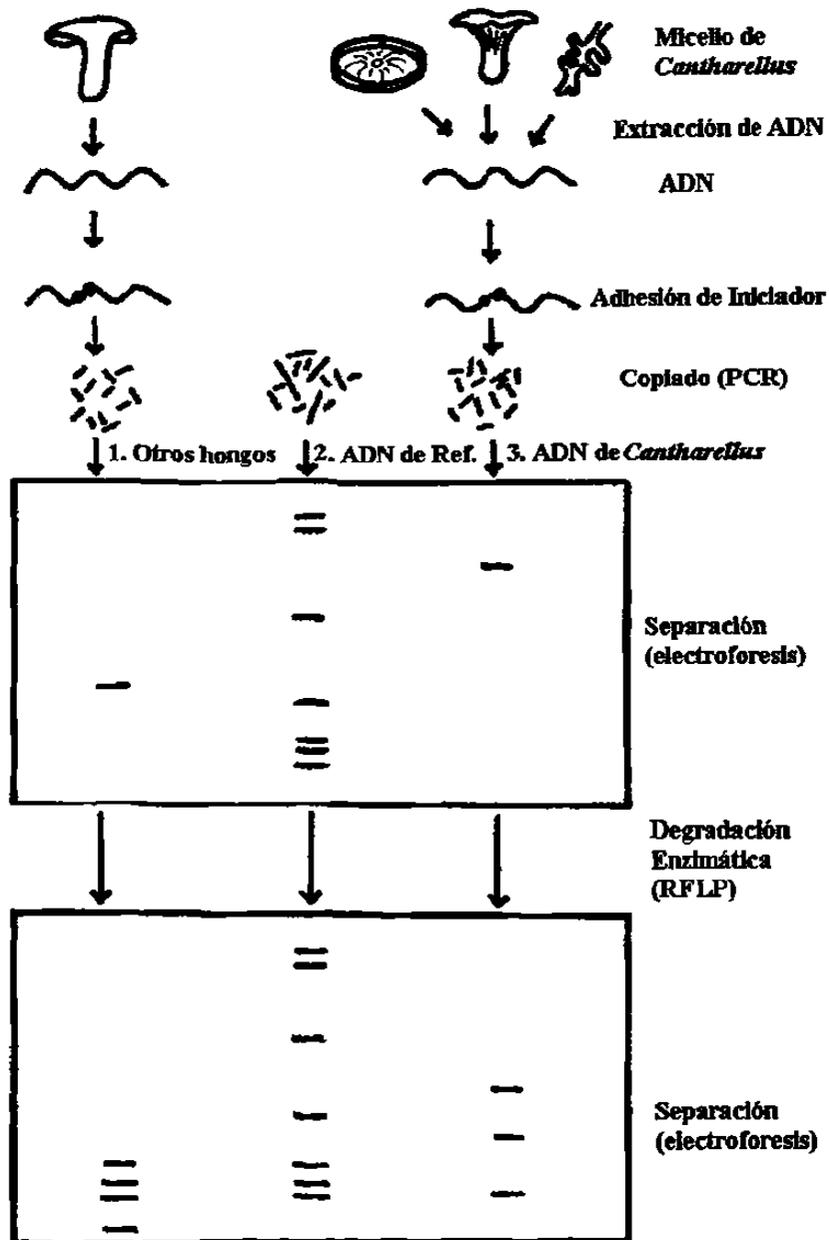


Fig.1. Esquema del protocolo utilizado para estudios de PCR y análisis de RFLP (Danell, 1994a).

### 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.

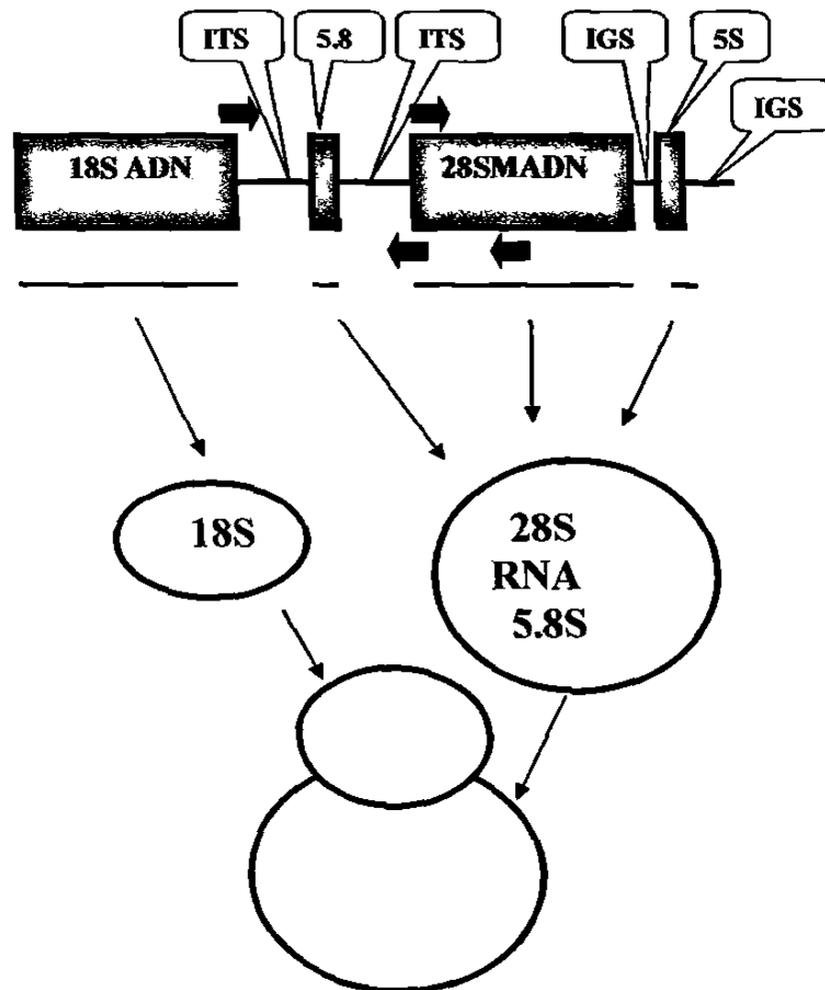


Figura 2. Regiones estudiadas y primers utilizados. Primer ITS1F e ITS 4 de la región ITS, son señalados con flechas negras; Primers LROR y LR3 que amplifican la región de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear, son señalados con flechas rojas.

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  $\mu$ l y se colocó en tubos nuevos etiquetados. Posteriormente se agregaron 3 volúmenes de NaI (600  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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'... $\nabla$ 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 µl 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 µl 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 µl y se colocó en tubos nuevos etiquetados. En seguida, se agregaron 3 volúmenes de NaI (600 µl) 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 µl 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  $\mu$  para remover impurezas
- 4.- Para filtrar se usa una bomba de vacío o aspirador
- 5.- Se agregan 250  $\mu$ l de persulfato de amonio y 28  $\mu$ 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
<b>Producto de PCR</b>		
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 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Mezcla de rx. ter.	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l
Cantidad de ADN	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Bufer 5 X para secuenciar	1 $\mu$ l	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Agua desionizada (hasta)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ 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  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M (NaOAc), pH 4.6 y 25  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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*.

### **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

## 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.

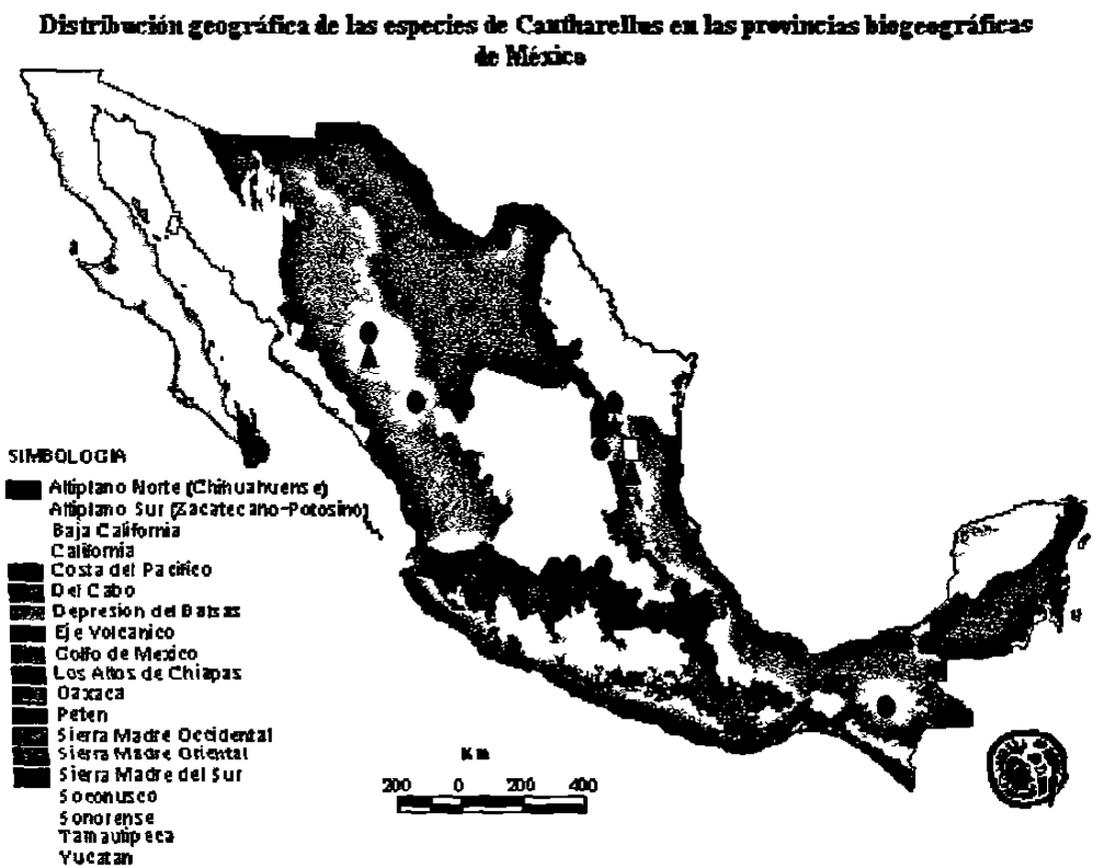


Figura 3. Micogeografía de las especies de *Cantharellus*. (●) *C. cibarius*; (■) *C. formosus*; (□) *C. minor*; (\*) *C. lateritius*; (▲) *C. cinnabarinus*; (▼) *Cantharellus* sp.

### 3.1.2 Descripción de las especies

#### 3.1.2.1 *Cantharellus cibarius* Fr.

Fig. 4

Píleo de 30-46 mm de diámetro, depreso 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)  $\mu\text{m}$ , 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)  $\mu\text{m}$ , 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)  $\mu\text{m}$  de longitud, hialinas en KOH. Trama himenoforal entrelazada, hifas de 3.2-10.2  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 FeSO<sub>4</sub> positivo o guindo. Himenóforo decurrente, liso o ligeramente con venaciones, de color naranja, reacciona con el KOH negativo y con el FeSO<sub>4</sub> negativo. Estípite 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, carnoso, 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, tetraspóricos, rara vez trispóricos, con un contenido intracelular granular verdoso, hialinos en KOH, esterígmata 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 mas o menos erectas, sin contenido intracelular (no como las hifas del contexto). Epicutis del estípite de hifas mas o menos postradas y coloreadas en KOH. Trama del estípite ligeramente paralela a entrelazada. Fíbulas y septos presentes en las hifas de la trama himenoforal, píleo y estípite.

### **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 fíbulas, 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.

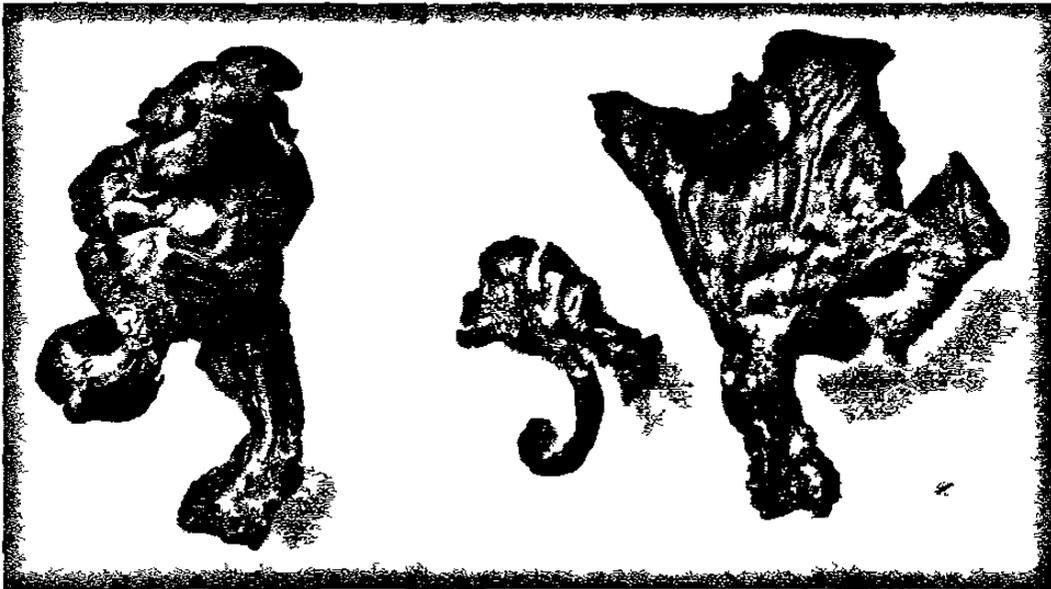


Figura 5. Basidiomas herborizados de *Cantharellus lateritius* de la localidad del Cañón del Novillo, Municipio de Victoria, Tamaulipas

### 3.1.2.3 *Cantharellus cinnabarinus* Schweinitz

Fig. 6

Píleo 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 píleo 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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ , elongados, claviformes, con 4-6 esterigmas de 4-8  $\mu\text{m}$ , de longitud, robustos. Basidiolos abundantes e irregulares. Subhimenio con fíbulas. Epicutis del píleo con hifas postradas y entrelazadas, hifas cilíndricas o mas o menos infladas de 4-9  $\mu\text{m}$ , de diámetro, con contenido intracelular aparentemente con pigmentos, pared delgada a mas o menos gruesa. Hifas del contexto cilíndricas a infladas de 3-13  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ , elongados, claviformes, de 4-6 esterígmata. Epicutis de píleo de hifas postradas y entrelazadas, cilíndricas de 3-10  $\mu\text{m}$ , algunas hifas erectas, con pigmentos amarillos intracelulares. Hifas del contexto cilíndricas de 2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, Hifas de la trama himenoforal entrelazada de hifas cilíndricas de 1.5  $\mu\text{m}$  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

Pileo de 1.2–8 cm de diámetro, convexo, plano o deprimido al centro a infundibuliforme, algunos giboso, de textura seca a higrófano 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, carnoso, 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. Estípíte 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, carnoso.

Esporas de 8-14 x 6-8  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ , 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).

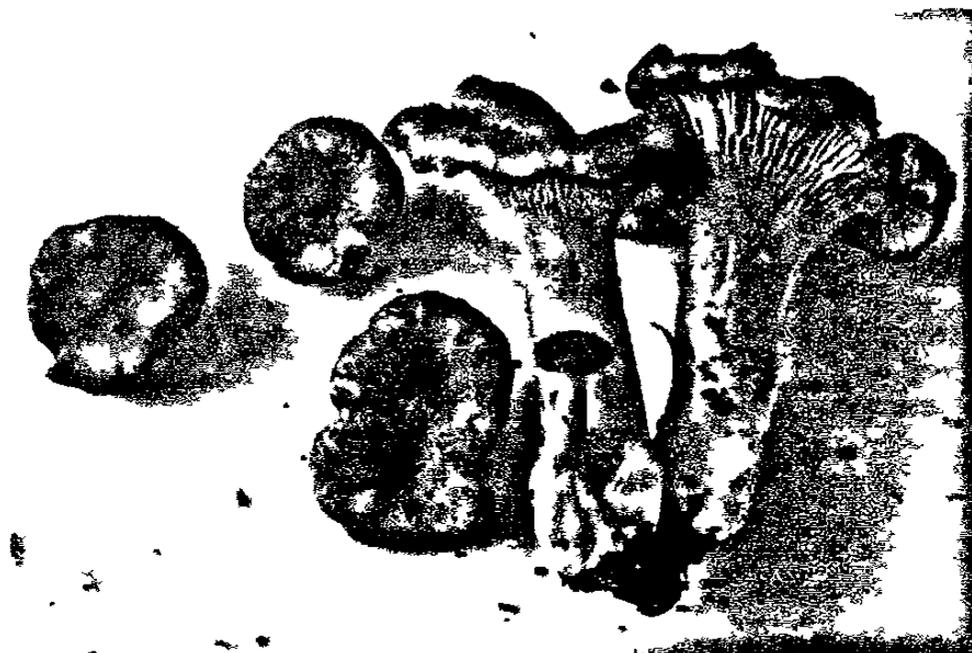


Figura 8. Basidiomas de *Cantharellus formosus* de la localidad El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas

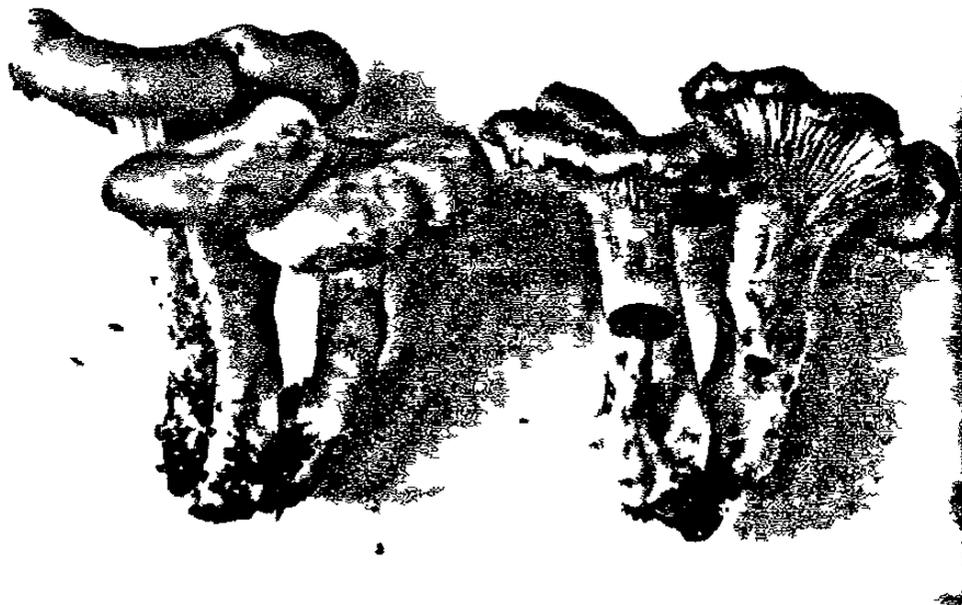


Figura 9. Comparación de basidiomas de *Cantharellus cibarius* (izquierda) y *C. formosus* (derecha)

### 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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ , elongados, claviformes, sinuados, monospóricos, tetraspóricos, algunos aparentemente con mas de cuatro esterígmata, con un contenido granular intracelular de pared gruesa, hialinas en KOH, fibulas presentes en hifas de la trama y basidioolos.

#### **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 elongados 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.

#### 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.

<b>Tabla 2. Especie, hábitat, localidad, número y año de colecta de las especies de <i>Cantharellus</i> estudiadas molecularmente de México</b>				
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</i> sp.	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) I 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.).

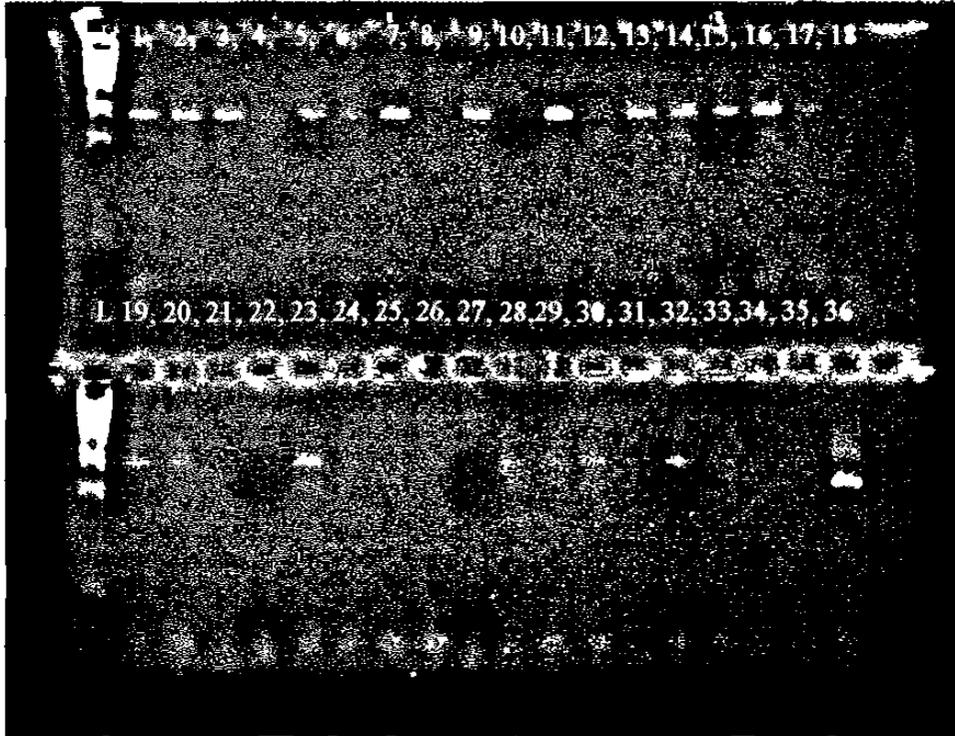


Figura 11. Amplificación del ITS nuclear (usando los primer ITS1F e ITS4) de 35 colectas de basidiocarpos de *Cantharellus* spp. y 1 cultivo puro de México. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. *C. cibarius* de 7 diferentes estados de México, líneas 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 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.

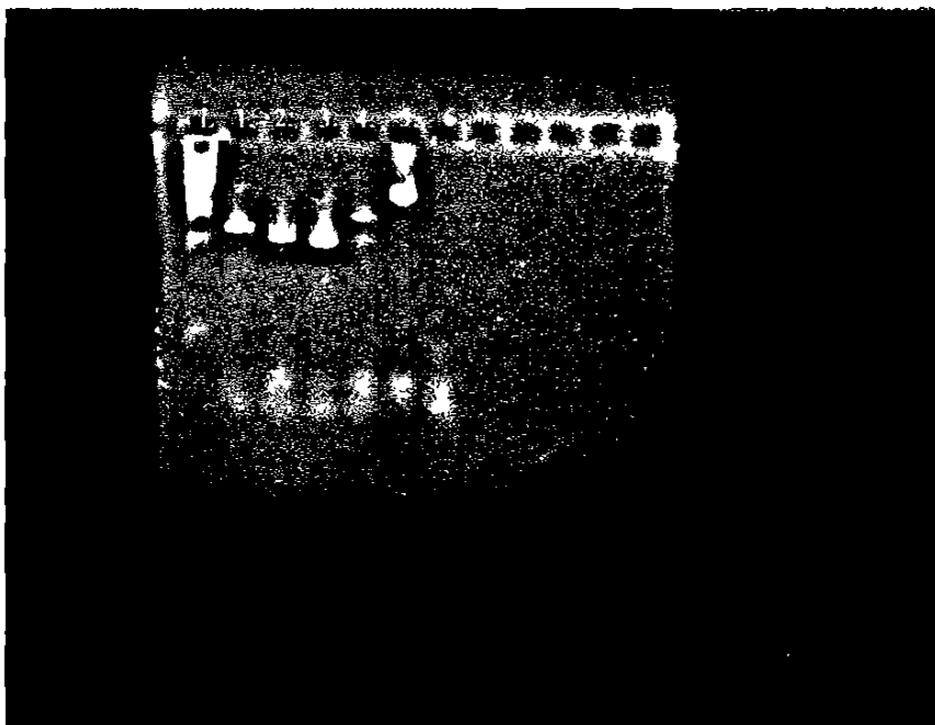


Figura 12. Amplificación del ITS nuclear (usando los primers ITS1f e ITS4) de cuatro cultivos puros aislados de basidiocarpos provenientes de los estados de Nuevo León y Tamaulipas. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. Cultivos puros de *C. cibarius* líneas 1-4; *Leccinum* sp. (control positivo)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

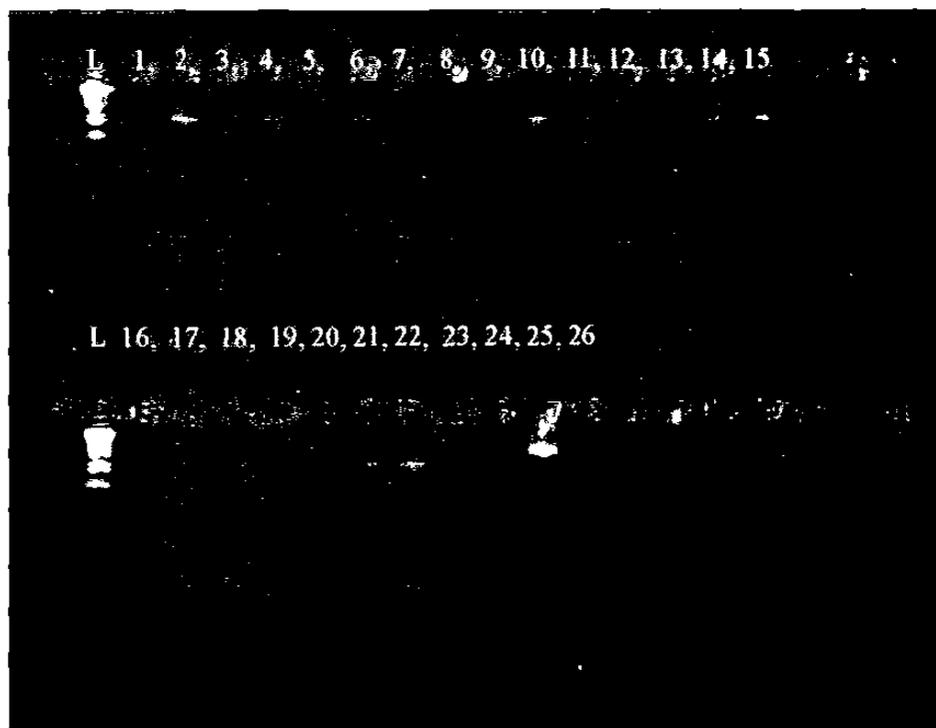


Figura 13. Amplificación del ITS nuclear con BSA (usando los primers ITS1f e ITS4). En la línea 1 *C. cibarius* (No. C. 15, pino-encino, N.L.), 2 *C. lateritius* (No. C. 922, pino-encino, N.L.), 3 *C. cibarius* (No. C. 1307, pino-encino, Dgo.), 4 *C. cibarius* (No. C. 1790, pino-encino, Dgo.), 5 *C. 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, Vrz.), 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.).

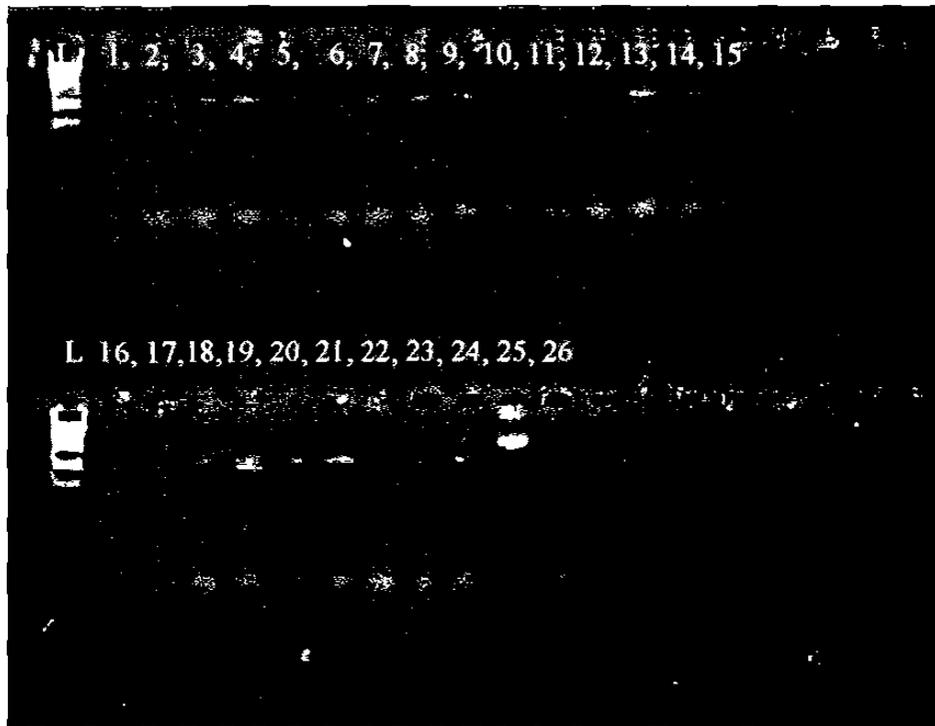


Figura 14. Amplificación del ITS nuclear con MgCl (usando los primers ITS1f e ITS4). En la línea 1 *C. cibarius* (No. C. 15, pino-encino, N.L.), 2 *C. lateritius* (No. C. 922, pino-encino, N.L.), 3 *C. cibarius* (No. C. 1307, pino-encino, Dgo.), 4 *C. cibarius* (No. C. 1790, pino-encino, Dgo.), 5 *C. 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, Vrz.), 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. cinnabarinus*, *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.

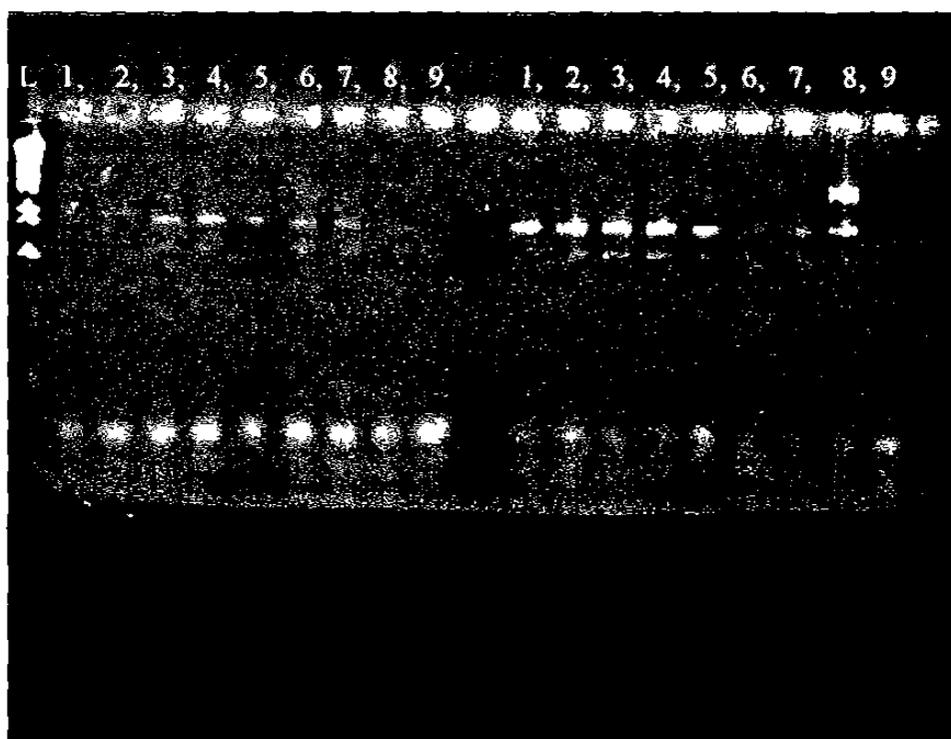


Figura 15. Amplificación del ITS con (derecha) y sin MgCl (izquierda) en *Cantharellus* spp. de diferentes localidades y hábitat. En la línea 1 hacia la derecha e izquierda corresponden a *C. cibarius* (No. C. 8219, coníferas, N.L.). De igual manera, 2 *C. cibarius* (No. C. 4823, encino, Tam.), 3 *C.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

<b>Tabla. 3. Número de pares de bases del ITS nuclear completo de <i>Cantharellus cibarius</i> de diferentes localidades y hábitat de México</b>				
<b>Especie</b>	<b>Hábitat y Estado</b>	<b>Núm. Colecta</b>	<b>Núm. de BP del ITS completo (<i>Hinf</i> I)</b>	<b>Núm. De BP del ITS completo (<i>Dpn</i> II)</b>
<b><i>Cantharellus cibarius</i></b>	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

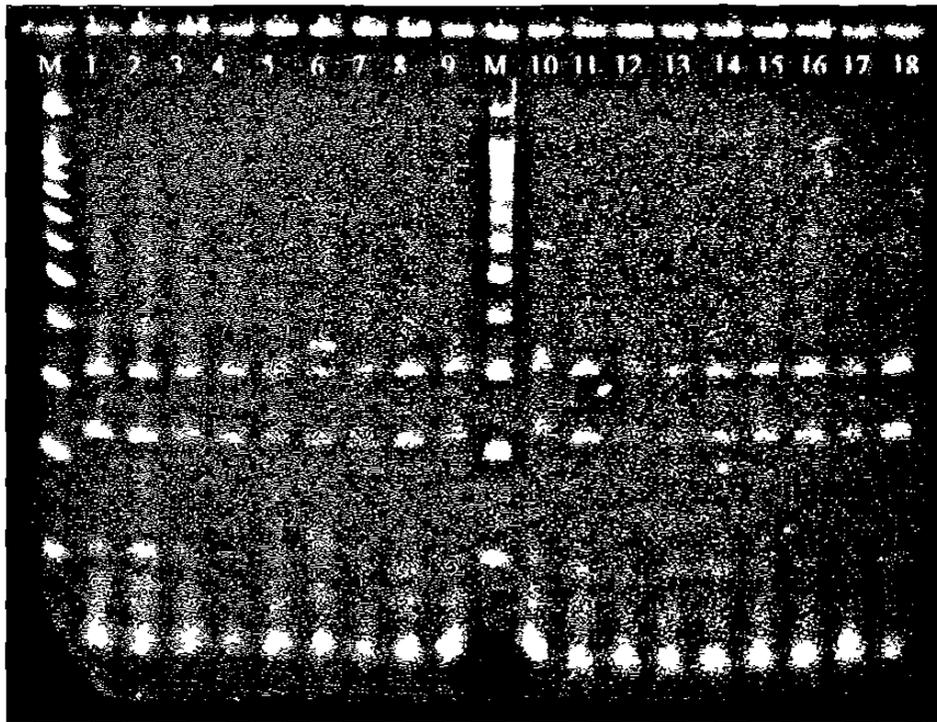


Figura 16. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de las 17 colectas de *C. cibarius* de diferentes estados y un cultivo puro (línea 18). En la líneas 1, 2, 7, 12, 13, 14, *C. cibarius* de N.L. En la línea 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 18, *C. cibarius* de diferentes localidades de Tam. En la 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.