

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

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

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

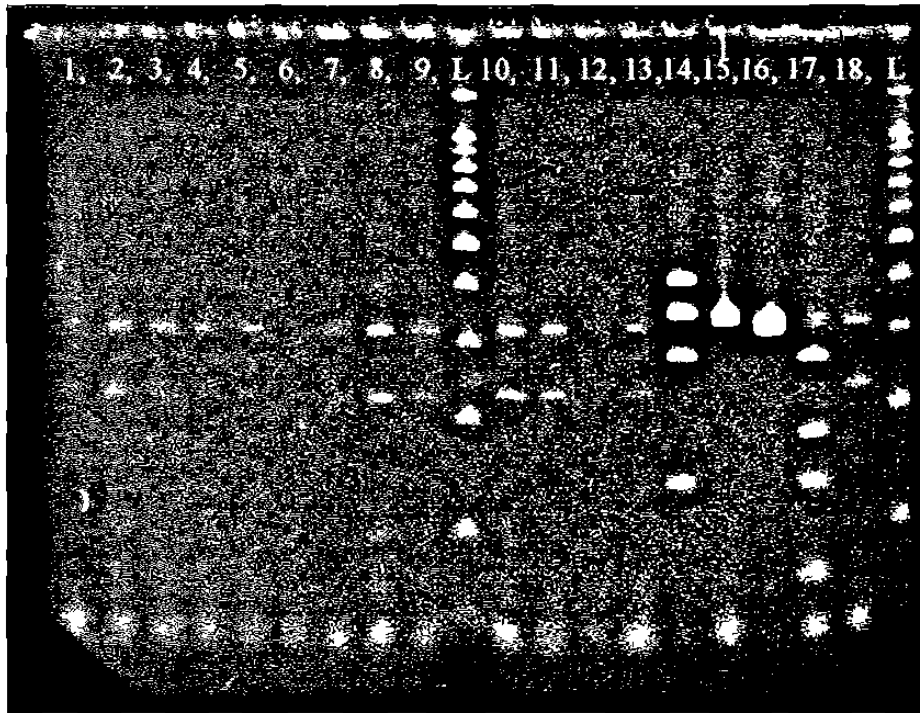


Figura 18. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de varias especies de *Cantharellus* de distintos estados del país y 4 cultivos puros. En la línea 1 *Cr. cinereus* de Tam.; línea 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tam.; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tam.; línea 5 *C. lateritius* de N.L.; líneas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

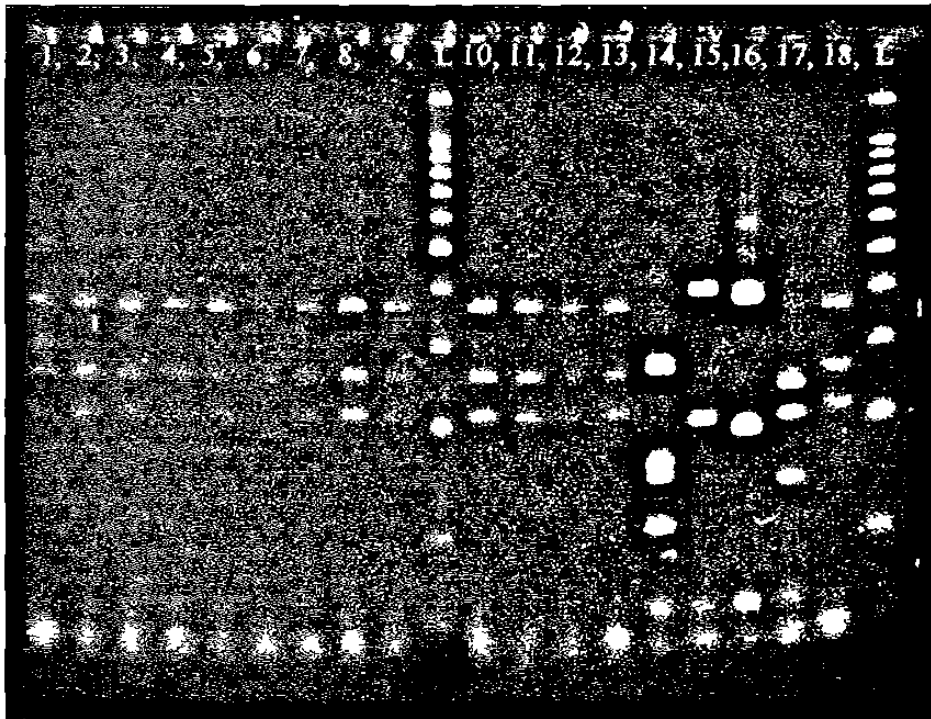


Figura 19. Análisis del RFLP (*Dpn II*) de los ITS amplificados de varias especies de *Cantharellus* de distintas partes del país y 4 cultivos puros. En la línea 1 *Cr. cinereus* de Tam.; línea 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tam; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tam.; línea 5 *C. lateritius* de N.L.; líneas 7 *C. minor* de Tam.; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. de Tam.; línea 12 *C. aff. amethysteus* de N.L.; línea 13 *C. aff. minor* de Tam.; líneas 14, 15, 16 y 17 cultivos puros de *C. cibarius* de N.L.; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas. Similarmente a la Fig. 3, no se observó polimorfismo entre las especies de *Cantharellus* excepto en los cultivos puros y en la línea 6 donde se aprecia una banda extra. L es el marcador estándar de 100 pb.

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

Tabla 5. Número de pares de bases del ITS nuclear completo de algunas especies de <i>Cantharellus</i> de diferentes localidades de México				
Especie	Hábitat	Localidad	Núm. Colecta	No. De pb del ITS (<i>HaeIII</i>)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de Coníferas	La Encantada, N.L.	8219 (ITCV)	910
	Bosque de Pino-Encino	Chipinque, N.L.	1495 (CFNL)	900
	Bosque de Encino	El Madroño, Tam.	4823 (ITCV)	910
		Cultivo puro, El Madroño, Tam.	104 (ITCV)	910
			104 mg (ITCV)	929
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque Mesófilo	El Cielo, Tam.	S/N (ITCV)	892
<i>Cantharellus lateritius</i>	Bosque de Encino	El Novillo, Tam.	7854 (ITCV)	900
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque Mesófilo	San José-El Vivero, Gómez Farías, Tam.	771 (ITCV)	919
			771 mg (ITCV)	919
<i>Cantharellus subalbidis</i>	Bosque de Coníferas	Oregon State University	414S (OSU)	1746

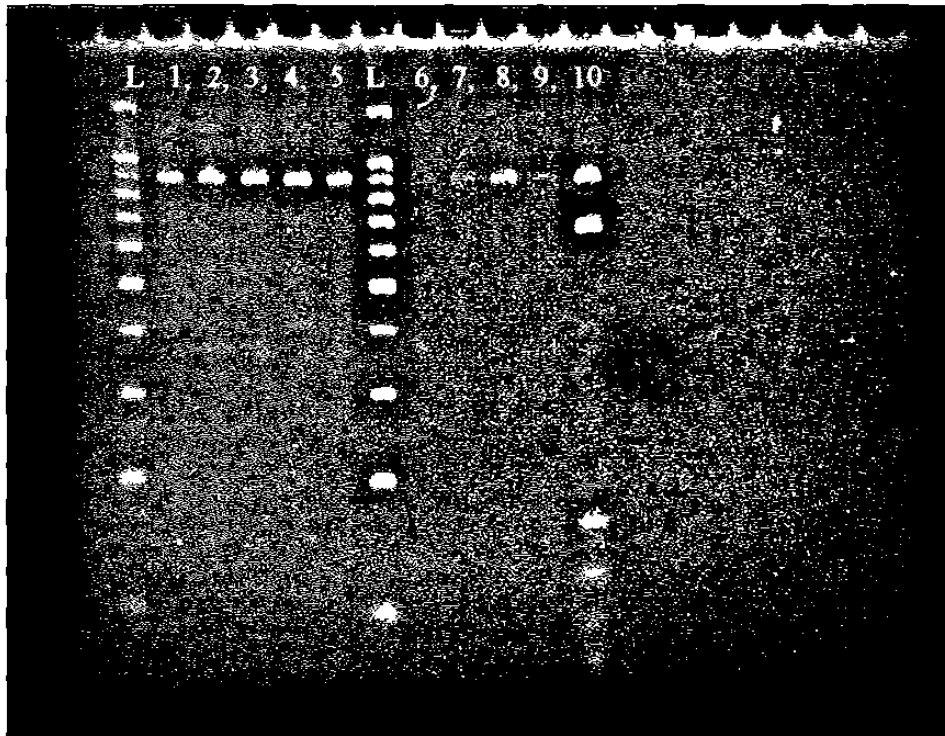


Figura 20. Análisis del RFLP (*Hae* III) de los ITS completos amplificados de *C. cibarius* (líneas 1-3), *C. cinnabarinus* (línea 4), *C. lateritius* (5), *C. minor* (línea 6 y 7), *C. subalbidus* (control positivo, línea 10) y un cultivo puro de *C. cibarius* (líneas 8 y 9). L (al centro y al extremo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

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

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

3.2.2 Estudios de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear

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

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

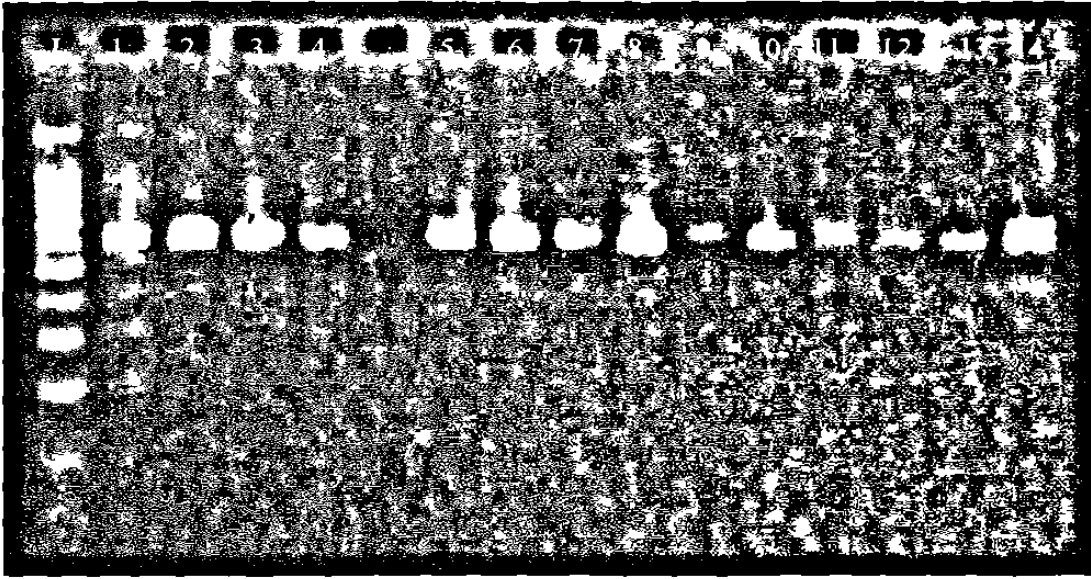


Figura 21. Amplificación de la subunidad mayor (usando los primers LROR y LR 3) del ADN ribosomal nuclear de catorce colectas incluyendo un cultivo puro de *C. cibarius*. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. *Cantharellus cinnabarinus* (Tam.) líneas 1 y 6; *Cantharellus* sp. (Tam) líneas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

Las secuencias génicas parciales de *Cantharellus* spp. mexicanos fueron comparadas y alineadas con las registradas por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para su identificación.

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

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

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

5' → 3'

ATTCCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGNAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGT
GCACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTCCGTCTGGACTGCATGGCGTNCAAGTACA
ATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACGCTAATGTGCA
AGTCTATTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTNNGGATTTGCTGCTTAAACAT
GGGAGGTAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCCGAGAGACCGATAGAGAACAAGTACC
GCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGGCGTAAATTTGTTGCG
AGAGAAGCGATTC AAGTAGCGTACTAGGCCATCAAGCGTCTTCGCTTTGGACTAGCTT
TGCCAGCGGTCTTGTCCCTTAAAGAGACTNGACTTGTAATATGTCCAGCCCTGCGTGCA
CAGCAGCCCTTCTGGGGCCAGTGCATGGGCTGGTGAATGCTTGCAATCGACCGCTGNT
TANAANAACGNNNNNNNNNNNNTNNNNNNANGNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNAN
NGNNN

No. de colecta 10125, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCCCCNNCNCNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNGNTTACTTAACCTN
CTCGCCNCCCCTGGCCCCAAAGGGCTGCTGTGCACGCTNGGCTGGACATATTACAAGTC
AAGTTTTTTTTAAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCGAAGACGCTTGATG
GGCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTTGACTCC
CTTACAGAGTGCTATTTTCATCTTCCCTTGGCGACTTGTCTCTATCGGCTCTCGCCTG
TATTTAGCTTTAGAAGGAATCTACCTCCCATGTTTAAGCAGCAAATCCCAACTGCTCGA
CTCTCTGAGATAGCCATCGTAATAGACTTGCACATTAGCGTCAAGGACGGGATNGCACC
TNTATGATGTCCACTGACGGCCTATTGTACTTGGACGCCATGCAGTCCAGNCGGCTACT
CCTAATCTACACTCGACAGGGAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTTTCCCTCTCAA
TCNCAGTTACTGGGGGAATCTAGTTAGTTNCTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTTAAG
TTACNNGGGTAANNNNNNNNNNNNNNCTTTCATCTNTCCCNNCNTTACACNCNCTAATN
CACTCTCCCCCNCNCCCNTNCTCTCACTCCTCCNNNTCNTNNTCCCNTNNNTTTCC
NNNCTNNNNATACNNCNCCTCTCNTCNCCTCNCNCCCTTNNNNNTTNCNCCCCCTNNAATCN
CCCTCTCTCCTTCTTCCNCTCTATCCTNCTNCCNCTTCCNCTACCCCTNCTCCTNNCN
TCTNNTCTNNNTCTCTCCTCCCCCNCNCCATNCCNCTCTCCTNCCNCCCCCNC
CCCTTCTCCTCCANCTCNCCTCNCNCCNCCCTCNCNTCANCCNTCACNCTTCTC
TNCTCCCTCCCCNCCCTCCCTCCCCNANNTCTCTCNCNCCNCCC

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

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

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

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

5' → 3'

```
GNNNNNAGNTTTNNNTTNNNNCCNNGANNGAACTAACTAGGATTCCCCAGTAACTGCGA
GTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTCCTGTCGAGTTGTAGA
TGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTGAGTGGGACA
TCATAGAGGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTAT
CTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCTTCTA
AACTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCANGGGAAAGATGAATAGC
ACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGGCGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGC
GTACTAGNCCATTAAGCCTTTTTGCTTGGCTACTTTGCAACGGTCTTGTCTAAAACCTT
GCTTGATGTCAGCCTGTNTCACAGTAGCCCCCGGTAGNGCTGGTTGNGGATGCTTNAT
CACCGTGAAAAAAAAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCN
```

No. de colecta 104, primer LR3

3' → 5'

```
GACCCCGGGGGCTCCTGTGTATACCTTNTGGACATACAAGTCAAGTCTCTAGGACAAGA
CCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCAAAAAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGA
ATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTTGACTCCCTTCACAGAGTGCTATTTTCAT
CTTTCCCTTGCGGTACTTGTCTCTATCGGTCTCTTGCCGTGATTTAGCTTTAGAAGGA
ATCTACCTCCCATGTTAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTGCTCGACTCTCTGAGATAGCCAT
CATAATGGACTTGCACATGGCATCAAGGACGGGATTGTCACCCTCTATGATGTCCTACT
GACGGCCTATTGTACTTGGACGCCATGCAGTCCAGATGAACTACTCCTCATCTACAAC
CGGACAGTGAAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTNCCTCTTCACTCGCAGNTA
CTGGGGGAATCCTAGTTAGTTCTTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTAAGTNCNGGGGTA
ANNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNN
```

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

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

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

No. de colecta 1495 (FCF), primer LROR

5' → 3'

GNNNNNNNTTTTCTTTTNNNTCCCGGTTAACNCNAACTGGATNCCCCATAACTGCGAGTG
AAGAGNNAAGAGCTCATCATTGAATCTGGCNGTGTTTCACTGNCCGAGTTGTAGATGA
GGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAGTGGGACATCA
TAGAGGGTGACAATCCCGTCCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTATCTC
AGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCTTCTAAAG
CTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGCA
CTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCG
TAGCTAGGCCCATTAAGCCTTTTGCTTTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGTCCTAGA
GACTTGACTTGTATGTCCAGCCTGGTATACACAGGTAGCCCCCGGGTCAGTGGCATGG
CTGGTGGAAATGGCTTGCAATCGACCGCTGAAAAANCNNTNNNNNNCNTNCCCTTANN
ANNNTGCNNNTGCNTTAANNNNCCNTTNCNNNCNCNNNNTTNCNTNNNNN

No. de colecta 1495, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCNCNNTCCCCCTACCCCNNNNCNCNNNNANNCANNTTACTGAACCTATAGGA
ACCCANGCCCCNCCATTCTNAANAAATTTTTNAATATTTANGNTGGGGANAGACNG
GAGGAAAGCTAGTACANATCAAATGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAATNGC
TACTCTCGACAATTTACGCANTNTGACTCCCTTCACAGAGNGCTATCTNATATTNC
CCTGCGGNACTCGANCNCTATCGGTCTCTNGACTGTANNTAGATTTAGAAGGAATNNCC
TNCCACGCNTANAGCAGANATCCCAAACCTGCTCGANTCNCTGNGATAGCCATCATAATG
GNNTCGCACATCGGCATCCAANGACGNGNTTGTNCACTCTATGGAGGNCCACTGACGGN
CTANCGCACNTGGNNNCCANGCAGCCNAAAANAACCACTTNNCTTACNACTCCGNNAG
NGAAAANCGGGAGANTTCAANGNAGAGTCNTNANCANTATNGCAGCACNGGGGGANATCC
ANCCAGCNCTCTCCTCNCTCACNGAATGCANAANCANNGGTCACCNTCCTTACACNCA
CCANTAATANTNTTCANNCTCNCGAACCTCCTCCNCCCTCTTCTAANTGCTCGCTCCAA
NCCNCTANTCNTNTCTTCAANCGTACCACNTANCNNCTNACTNNGTCACTCACTCNCN
CCTTNACAATTCCTNANACTTAAATCCATNTATCATCNTNTNCTTNNNTGCNCTATAAC
AANCCNACNATTCACACTTNTAANNNCCNCNACCTNCNACNGACNCCNCTNANCTCN
CNTNTCCTCCACATCACTCCCTCTCTCANNACCCCANACANCANNTCNNNTTANCNCN
NCCGNNTCGTACCACCACTCCNAANNNNCCNCNNTATCACAANAANCNCNCCNTNN
TCTATACACANTCCNCACTNCAANNCTCTAACNAACNCNCCANNACCTNGANACTCGCN
CCC

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

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

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

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

5' → 3'

AGNNNNNGNTNTTANCTTTAACCCGGTTTAGAAACNNCCNGGATCCCCCATAACTGCG
AGTGAAGAGGNNAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTTCACTGTCCGAGTTGTAG
ATGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTACAATAGGCCGTGAGTGGGAC
ATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAAGTCCATTATGATGGCTA
TCTCAGAGAGTTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCCTTCT
AAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAAT
AGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGTGAAATTGTTGCCGAGAGAAGCGATTAAAGTC
AGCGTACTAGGCCATTAAAGCCTTTTGNNTGGACTAGCTTGCCAGCGGGGCTTGTCTAG
AGACTTGCTTGATGTCCAGCCTGTATACACAGGTAGCCCCCGGGTCAGGGNATGGNTG
NNGAATGGTTTGAATCGACCCNNTGAANANACGGNN

No. de colecta 1605, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCCCCNCTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNANNGNATTACTTGAGCC
NAANCGGCCCCCGACCGANNGTTTCGGGGNACTTNTNGNNANANAAGTAAGGNTNGT
GGGANAGNACNGTGGGAAAAGNTNGCCNAANGNAAAAGGGNTAAAGGGGCNAAGNNCCC
CNGNCTGGANNGGNTCTTTCGGAACNAATTCANGGCNTTTGNNCNCNTCAANANGGGG
CATTCATNNTTCCCTGGGGGCCTGGNTCTCAATNGNCCTTTGGCCGGATTTAACTTTAN
NANGNAATNACCTCNTNGTTPANNAANAAAATCCCAANNGGNCGNCTTTTNGGNATNCCA
TAATATGGNCNTGGCCATTGGGATNAAGNCCGGAATGGGNACCCNTNNGAGGCCACGGC
GNCCANTGGCCTGGCNGCCNNGCAGNCANAAGAACCANCCNCATCNNCACNCCNNCNG
GGAAAACGGCNGAATCCAAANGAGGAGCNNTNCNNTTTANCTCGANGTACNGGGGGANC
CTAGTTNGTTCCTTTCCTCCCTAANGGAAANGCTAAAGTCNNGGGGNAACCNCNNAN
CNCCTNNCNCCTANNNCNCCTTCTTNNNCCCTCCCTCNCCTNTCNCNCACCTTCNTCT
CTNNCNACTCNNTCACNCATCNCCTCNCNCANANNNCNCCTATTATNCTACATTCNTN
NTCTCTTACCTCTTNCCTCNATCTCACTATCCNNCTCCTTNNCNTTTNCCNTCATTN
TNTACTCCCTTCCNTNNTTATACNNNCTCNCCTANCCCNATCCTCACATCNCNCCN
CTTACNCCNCCNCCCTCCCNNTNCTCTNCCTCACTCNCCTTCTNCCCCCTTCCCT
NTATNCCATTCCTCTCTCNCNCCCCCTNCACTCNCACCCCCNTNNTTCTCNANCCCT
CNCTCNCCTNTACNCACCCCNCTCTANTACCACNCCTTCTNCACCCC

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

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

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

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

5' → 3'

GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGNAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGT
TTCACGTGCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTTCATCTGGACTGCATGGCGTCCAAGTAC
AATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCCTCCTTGATGCCAATGTGC
AAGTCCATTATGATGGCTATCTCAGAGAGTTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACA
TGGGAGGTAGATTCCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTAC
CGCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGGCGTGAAATTTGTTGC
GAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTACTAGGCCCATTAACCTTTTGGCTTTGGACTAGCTT
GCCAGCGGCTTGTCCTTAANACTTGATTGTTTGNCANCTGGTTACCAAGTAGCCCCCGG
GTCANGNANTGGTTGNGGAATGNTTGAATCANCTTTAAAAAACGGNNNNNNNNNNNN
NN

No. de colecta 1790, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCCTNTATCANNANANCNTNTNTNNNNNGNCNNGTNACTGAGCTTCATAGCA
NCCCTGCCCGGGGGCTCCTGNGTATAACCATTTGGACATAACAAGTCAAGTCTGTAGGGAC
ANGACGGAGGGNAAANCTAGTCAAAGNAAAANGNTAAAGGGGCNTANNNANNNNGAC
TGGAATCGCTNTNCTCNNAANTTTACANGCACTTCGGACTCCNCTAANANAGNGCNAT
TTNANTNNCCCCTGGCGGNCCTCCNCCANGGCNNCANNACTGNNNCCCCTGTAANAN
GCANTCNACTCGCANNNGTNNNCTCTNCANCCNAAACGCCGAAAANGCCCANATCTCCNC
AAAANCNCTCCNGACNCANNNTNCNANCGNCGTCAAGGCCCCCCCNAANCCCCNACANN
GCAANGNCGCACACNCNTCNCNCCAAAGNANNACACCCATCCCCTNCCNCGACCNNNA
NTGNGAACCAACATGACACNGACATTTANTCTTACNNGNNGNCCNNGNNGNACNTCCCA
NCCTTTTNNNCNTTCTANNNCNCNCCNATCCGNNCTCCCTCCCCATCTCTCNCCATNN
TCNNCACNNTNGCANTCNNCANNATCNCNACNGCACNCACATCNCNTACATNANAACC
CATCCCNCAACTATCTAACNACNCAATACTTACANCNCTNANTNTCTTAANCACNNACG
ANACATATCATACCCNACGCTCNCNNTCNCACNANTCACACNNACNNCATTNACACN
NTACTNTCCANCNTNACTCTCACTCNNCACNCACNNTNNAATNCNATCGTCTCCATCA
CNNTTCCCTCNCCCTNTACNCTNTNCATACCTATCACACNCAACCNNCATAACNCCATCC
CNCCNCTCTACGNTNACNCTTNCACACCTNCCNTCCTNCCTACATNACAACNTACCT
NCCACNTACATNCNCCNCTCNNTCTCNCNTNCANCTTNNCCNNTTCC

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

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

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

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

5' → 3'

```
GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGT
TGCGCTGTCCGAGTTGTAGATGAGAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGT
ACAATAGGCCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACACCAATGT
ACGAGTCCTTTACGATGCCTATCTCGGAGAGTTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAA
CACGGGAGGTAGATTCCTTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGT
ACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGN
TGCGAGAGAAGCGATTAAAGTCAGCGTAGCTGGCCCATCAAGCCTGCGCTTTGGACCAGC
TTTGCCAGCGGTCTTGTCCCTAGAGACTTGACTAAGGTGCCCTGCCGGTCTAACGGACA
GACCTNCCCTTTGGGGAGGCCAGTGGCATGNTTGTGGATGNTTGCAATCGACCGNTTGA
AAAAANNANGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAATANTAC
```

No. de colecta 771, primer LR3

3' → 5'

```
GGNNNGNTTNTCTTGAGCCTTCANCGNCATGCCCTGGCCTCCCCAGAGGGAGGTCTGTC
CGTTAGACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTCTAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCT
GGTCCAAAGCGCGAGGCTTGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCA
ACAATTTACGTCTTTTTGACTCCCTTCACAGAGTTCTATTTTCATCTTTCCCTTGCGGT
ACTTGTTCACTATCGGTCTCTTGCCTGTATTTAGCTTTGGAAGGAATCTACCTCCCGTG
TTTAAGCAGCAAATCCCAAACCTGCTCGACTCTCCGAGATAGGCATCGTAAAGGACTCGT
ACATTGGTGTCAAGGACGGGATTGCACCTNTATGATGTCCACTGACGGNCTATGNACTT
GACACCATGCAGCCAGATGTCCTACTTTTTTNTATNTACTCGACAGNGAACGCTGCCA
GATTCAATGATGAGCTCTTCCNTTCACTCGCAGTACTGGGGGAATCCTGGTAGTTCTT
TCCTCCGTTANTGATATGCTAAAGTAACGGGGTANNNNNNTTCNTCCNCCCCACCNA
CNCNANNNNCCNCCNNCTCTNNCNCNTCNTNTNNNTNCCNNCCCTNCCNNTNNNNCCC
CCNCTCNCNCCNCCNNNNNNNNNTNNNTNNNNCTTNNNTNNTTNCNNNTNTNNCCCN
NTNTNCNNNANCNNNNNNNNNNCTCCCCNCCNCTTNNCNCNTNNTCTTNCCTTNCCTCNC
NCNNNCCNNTNCCNCCNCCNTTNTCNCNTCNCNCCNTNCCNCCCTCTTNTNCNCCNTN
NTNTCNTNCTCCNCCNCCNTNCCNTNNTNCCNTCNCNCCNTTANNNCTCCCTTCCT
CCTCCNCCNCTCNCNCCNNTNNTTNTTCCCTCNTNCCNCCNCCNNTCTTNTNCCCC
CCCCC
```

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

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

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

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

5' → 3'

```
GGATNCCCCPANTAACCTGCGAGTGAAGCGNTATGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTCT
TCGGCGTCCGAGTTGTAATTTAGAGAAGCGTTTTCCGCGCCGGACCGTGTACAAGTCTC
CTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACCCCGGTGCTC
TGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAA
CTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAA
GATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACG
CTTGAAGTCAGTCGCGTCCGCCAGGATTANCCTACGGTGTACTTTTTGGTGGACGGCCA
GCATCACTTCAATCATCGGACAAGGTGAGAGGAATGTGGCACCTTCGGTGTGTTATA
GCCTCTTGTCGTATACNGTGACTGGGAGTGAGGACCGCTTTGTAGGATCTGCGTAATGG
CTTTAAACGACCCGNTTGNTNAANACGNNNNNNNNNN
```

No. de colecta 783, primer LR3

3' → 5'

```
CCCCCCCCCNCCCTNCTNTTNNNNNNNNNNNGGGNGCTTACTGANCTCACAGACNCCG
GCCCCGCTTGGGAGNGANTTTAGAGNTAAAAACACGGGGAGTNAGATNGATNTCGATCN
GTCGAGATTGAAAGCGCGCTGTCCGGCACCANANAGTACACCGTGAGGCTGAACCNNT
GGACGCGACTGACTTCAAGCGTCCCTTTNANCANTTACGTACTGTTCACTTNTCCA
AAGGCGNTTNAFCTNTTCCCTCNCGCCACTCGTCGCTACCGGCTCTCGCCAAAACCTAANC
TTNANATGGAGCCACCACCATTTTGGCTGCATCCNAACAACCTGACTNTTCGAGAGCGT
ATCAAAGAGCACCGGGGGCCGGCCAAAGACGGGATTTCTACCCTCTATGACGCCCCGTTT
AGNAGACTGGACACGGCCCCGGCGGAAAACGCTCNTAAAATTACAACCGGACGCCGAGA
CGCCAGATTTTAAATTTGAGCTCATCCGCTCACTCGCAGNTNNAGGGGAATCCTGGTAG
GTTCTTNTCCCGGTAATGGATATGCNTAAGNNACNGNCCNCCNNTNCCNACNTC
CNCCANTCTCNCNTTACTNTTCCCNNTNCCCTCCAACCCTCCTNCCNANTNNTCTTCTNAT
CTTACNTTTTAANCNCTTNTATCCCCCGCCCCCTNTCCTTNTNCCACCANNACTANT
CCTCCACNNTACCCTNTCCTCCTNACCCCCCCCCNTNCTNNACACCNTTNTATCTTNCNA
ACCCNCCCCCCCCAANCNTCCCCACATNACCATTNCTCATCCCNCNCCNCCCNNTCA
ATCCNCTCTCTCCCCACCCNACCNCATATCCCCCCCCCTCCTTACANNCTTCCCCNCG
CCCNCTCTCTNCCCTCTNCCANTAACNCCCCCNNTACCCCCCCCC
```

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

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

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

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

5' → 3'

```
GTNCCGTA CTGATGAAGNAANTATATTGATTGCANGTGCTGNCNGTGAATAGGATGGTA
TTGGCTGATGGCGTCAAGTCAATAGCCGAGTGGACATATAGAGGGGACAATCCGTCTT
GTGCNATGTCAAGTCCGTACGATGGCTTTTNAAGAGTCGAGCAGTTGGGATTTGCTGC
TTAAACATGGGAGGNAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGGCAGAGACCGATAGAGAA
CAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTTGTGAAGGGAGTCAAAAGACGTGAA
ATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATTAAGCCTATTTGCT
TTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGNTTNCCTAATAAGAGACACTTGGACTTGTATAT
GTNCAGCCTGGTATGCACANGTAGTCCCCCTTGGGGGCCAGTGACATGGCTGGTGGAAAT
GGCTTGCAATCGACCCTNTTTNTNAAAAAANGANNNNN
```

No. de colecta 796, primer LR3

3' → 5'

```
GNGNNNGNNTTNCCTTTGNAGCCTTACCAGCCANTGNCACTGGCCCCANGGGGACTAC
CTGTGCATACNANGCTGGACATATAACAAGTCAAGTGTCTCTTATTAGGGAAACAAGACC
GCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCAAATAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAAT
CGCTTCTCTCGCAACAATTTACGTCTTTGACTCCCTTACAGAGTGCTATTTTCATCT
TTCCCTGCGGTACTTGTCTCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGAAGGAATC
TACCTCCATGTTTAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTCGACTCTCTGAGATAGCCATCGTA
ACGGACTTGCACATTGCATCAAGGACGGGATTGTCACCCTCTATGATGTCCCACTGACG
GCCTATTGNACTTGGACGCCATGCAGCCAGATGAACCACTCCTCATCTACAACCTCGGAC
AGTGCAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTNCCTCTTACTCGCAGTTACTGGGG
GAATCCTAGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTAGTGATATGCTTAAGTNNCNGNGAANN
NNCNCNNNNNNNNCNCNNNNNNNNNNNNNNCTNNNNNNNNNNCNCNNNNCNCNN
```

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

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

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

5' → 3'

```
ATTCCCCNTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGTGTTG
CACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTGGTTCATCTGGGCTGCATGGCGTCCAAGTACAA
TAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGATGCCAATGTGCAA
GTCCGTTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATG
GGAGGTAGATTCCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCG
CAAGGGAAAGATGAAATAGCACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAGACGTGAAATGTTGCGAG
AGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATTAACCTATTTGCTTTGGACTAGCTTT
GCNGCGGTCTTGTTCCTAATAAGAGACACTTGACTTGTATATGTCCAGCCTGTATGC
ACANGTAGTCCCCCTGGGGGCCAGTGACATTGGTGGTGGAAATGCTTGCAATCGANCCGC
TTGNNTTAAAAANCNCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

No. de colecta 805, primer LR3

3' → 5'

```
GNNCAGNNTTNNCTTGAAGCCTTCANCAGCCATGTCACTGGCCCCANGGGGACTACCTG
TGCATACNANGCTGGACATATAACAAGTCAAGTGTCTCTTATTAGGGAAACAAGACCGCT
GGCAAAGCTAGTCCAAAGCAAATAGGCTTAATGGGCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGC
TTCTCTCGCAACAATTTACGCTCTTTTGACTCCCTTCACAGAGTGCTATTTTCATCTTTC
CCTTGCGGTACTTGTCTCTATCGGCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGAAGGAATCTAC
CTCCCATGTTTAAGCAGCAAATCCCAAAGTCTCGACTCTCTGAGATAGCCATCGTAAC
GGACTTGCACATTGCATCAAGGACGGGATTGNCACCCTCTATGATGTCCACTGACGGCC
TATTGNACTTGGACGCCATGCAGCCCAGATGAACCACTCCTCATTACAAGTCCGGACAGT
GAACACTGCCAGATTCCAATGATGAGCTCTTCCTNTTCACTCGCAGTTACTGGGGGGAA
TCTAGTAGTTCTTTTCTCGGTTAGTGATATGCTTAAGTNACGNGNGGNANNNNNNNNN
NNNNNNNNNCCNNNNCCNNNNCCNNNNNNNNNNCTNNNNNTNNNNCNTNCNNN
```

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

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

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

5' → 3'

AGGGGGANTTCCTTNTCTTTAACCCAGGNTTAGAACTAACACGGATTCCCNCAGTAAC
TGCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTTGGAATCTGGCAGCGTTGCGCTGTCCGAGTT
GTAGATGANAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAG
TGGNACATCATAGAGGGGTGCAATCCCGTCCCTTGACACCAATGTACGAGTCCTTTACGAT
GCCTATCTCGGAGAGTTCGNGCANTTTGGGATTGCTGCTTAAACACGGTAGGTNGATTNC
TTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGTNCCGCANGGGAAAGATN
AAATAGACTCTGTGAAGGAGTCANAAAGACGTGAAATTTGTGCGAGAGANNCGATTAAGN
CATCGTACTTGGGCCATNAGCCTCCGCTTGGACCACTTTGCNAGCGTCTTGNCCTANA
ACTTGNTAGGNCCTGCCGGCTACGCANACTNCTTTGGAGGCAAGGGCTTGTGGGAANG
TTGAATANCCTTGAAAAAAGNANNNNNGNNNNNGGAANGATCCNTCCGCNNNNNAAA
AANN

No. de colecta 811, primer LR3

3' → 5'

GCCNNNAGCNTTANCTTGAGCCTTCCANCGACANGCCCTGGCCTNCCAGAGGGAGGTCT
GTCCGTTNACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTCTAGGGACAAGACCGCTGGCAAA
GCTGGTCCAANGCGGAGGGCTNGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTNTC
GCAACAATTTACGTCCTTTTGGACTCCCTTACAGAGTTCTATTTNATCTNTCNTTGGC
GACTNGNTCACTATCGGTCTCTTGCCCTGTATTTAGCTTGAAGGAATCTACCTCCGGAG
TTAACAGCAAATCCAACTGCTCGACTCTCCGAGATAGGCATNGAAAGGACTCGNACAT
GGTGTCAAGGACGGGATGGCACCCCTCTATGATGCCACTGCCGGCCTATGTACTTGGACA
CCATGCAGGCCAGATGTCTACTCTTTTCATTACAACCTCGGACAGCGCAACGCTGCCAGAT
TCCAATGATGAGCTCTTCCTCTTACTCGCAGTACTGGGGGAATCCTGGTAGGTTCTTTT
CCTNCGTTAGTGATATGCTTAAGTANGGGNNTACTTTTCNNTTNCNTTTCCTCCCTANA
CGATANGCTTAAGTAANNNGCNNNNNNNCNNNNNNNCTCNCCCTCCTANNNTNCNNCT
NNTCTCNCTNNCNNNNNCTNCTNTCTTNTNTCNTNNNNNCNNNNNTNTCTNCTNNNT
CNNCNCNTNCCTCNNNATNNTNCNTNTCCCNCTNCCNCCNCCCNTCTNTCNCCCTCCT
TCNTCNCNNCTTCNTTCCCTCNNNTNCCNCCNCCNCTNCCNCTCTCTNNTNCCNCCN
TCNNCNCANNNCNNTANNTCTCTCCCTCNATNNTCTCNCTCTCCNCCCTCTCNCCT
NNNCNNCNCNTNCTCNCCTCNTCTNCTNTCTCCCTCCTCCCNNTCTCTTNTCNNTC
CNCTCCTNNTCCTCCCTCACNNNNCNTTCNNTCNCNNTTCNNNCNCNNCNCCTCCC

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

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

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

5' → 3'

GGATTCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGT
TGCGCTGTCCGAGTTGTAGATGAGAAGAGTAGGACATCTGGACTGCATGGTGTCCAAGT
ACAATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCCTTGACACCAATGT
ACGAGTCCTTTACGATGCCTATCTCGGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAA
CACGGGAGGTAGATTCCTTCCAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGTGAACAAGT
ACCGCAGGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGT
TGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTACTGGCCCATCAAGCCTCGCGCTTGGACCANT
TTGCAGCGGTCTTGTCTTANAGACTTGCTAAGTNCCTGCCGGCTACGGCAGACCTCCC
TTTGGGGAGCCATGGCATGGGTGGGGGAANGGTTTCAATCACCNNTGAANNNAAAAAAG
NN

No. de colecta 812, primer LR3

3' → 5'

GNNNGNNTTANCTTGAACCTTACCAGCCTGCCCTGGCCTCCCCAGAGGGAGGTCTGTC
CGTTNNACCGGGCAGGGCACCTTAGTCAAGTCTNTAGGGACAAGACCGCTGGCAAAGCT
GGTCCAAAGCGCGAGGCTTGATGGGCCAGCTACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCAA
CAATTTACGCTTTTGGACTCCTTACAGAGTTCTATTCATCTTTCCCTGGCGGACTGG
TTACTATCGGTCTTTGCCTGNNTTNANTTTGGAGGAATNACCTCCCGGGTTAAACAGN
AAATCCCAANCTGTTGACTTTCANANTGNATCGTAAAGGANTCGCCTTTGGGGTNA
GGACGGGNTTGNCCCTTTNPNNGGCCCCCGCCGGCCTTNGGCTTGGACCCATGCCG
TCNAATTCNCNTNNTTTNNTAACANCGGGNANGNAAACCTTCCAATTCAAAGGAGAC
NTTCCCNNTATCCCNANNNCGGGGAACCNTGGNGNTTTTCNCCCCTTAAAGAAGNCTAA
GNNCNNGGGTTANNNCNCNNNTNCTNCCCTCNNNNNCCTNNNCTCTCNCCTTCCCC
CTCNTTCCNCTCATNCCNTNNTCNTCNCNCCNCTTNCNTNCTNNTNNTTTCCNCCNNC
NCCTCNTNCTNCCCCTCTNNNNNTNCCNCTTNTCCTTCNNTCNTTCCCTCNANTNTC
CNNCNCNNTNNTNCCNCTCNCNTNNTNCCNCTCCNCCNCTTCCNCCNCTNNTCNCNT
NNNNCCCTCNNTTTCCTNCTNCTNNTCTCNCNCCCTTCCCTNCTNNTTCTCCNCCN
CCNCCNCTNNTNNTCCACTCCNCCCCCTCTCTTTNCTNCCNNTCTCNATANNCT
TCCTNNTNACTTCCCC

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

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

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

5' → 3'

AACNTAACTAGGATTCCCCCAGTAACTGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCTCATCATTGGAA
TCTGGCAGTGTGCACTGTCCGAGTTGTAGATGAGGAGTAGTCCATCTGGACTGCATGG
CGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAGTGGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTGA
TGCCAATGTGCAAGTCCGTTACGATGGCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTGGGATTTG
CTGCTTAAACATGGGAGGTAGATTCCTTCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAG
AGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAGGCGT
GAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATTCAAGTCAGCGTAGCTAGGCCCATCAAGCGTCTCGN
TTTGGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTGTCTCGGAGACTTGACAAATTGTGTCCAGCCT
GGTATGCACAGCAGCCCCCTGGGGGCCAGCGGCACGGNTGGTGAATGNTTGCAATCG
ACCGNTTGANAAAACNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

No. de colecta 814, primer LR3

3' → 5'

CCCCCNCCCNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNTTACTGAGCCTTCNC
NCCTNCCGNGGCCCCAGGGGGCTGNCTGTGCATACTTGCTGGACACAATTTGTCAAGTN
TCCGAGGACAAGACCGCTGGCAAAGCTAGTCCAAAGCGAGACGCTTGATGGGCCTAGCT
ACGCTGACTTGAATCGCTTCTCTCGCAACAATTTACGCCTTTTACTCCCTTCACAGA
GTTCTATTTTTCATCTTTCCCTTGCGGTACTCGTTCTCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTA
GCTTTAGAAGGAATCTACCTCCCATGTTTAAAGCAGCAAATCCCAAAGTGCCTCGACTCTC
TGAGATAGCCATCGAACGGACTTGCACATTGCCATCAAGGACGGGATGGCACCCTCTAT
GATGTCCACTGACGGCCTATNGACTTGGACGCCATGCAGTCCAGATGGACTACTCCTAA
TNTACAACCTCGGACAGNGCAACACTGGCAGATCCAATGATGAGCTCTTCTCTTTACTC
GCAGTTNTTGGGGGAATCCTANTTAGTTTCTTTTCTCCGTTAAGTGATATGCTTAAGT
CACCNGGTAANNCCNNTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
CCANNACACCNTCCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
NTACTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
NCT
NCT
TCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
TCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
TCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
ANCCNACCCTCCCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT

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

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

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

5' → 3'

```
GNNNNNNNNNNNTTNNCTTTTNNCNGGGAAANAAAATAACTAGGATTCVVCCAGTAACT  
GCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCTCATCATTGGAATCTGGCAGCGTTGCGCTGTCCGAGTTG  
TAGATGAGAAGAGTAGGCCATCTGGACTGCGTGGTGTCCAAGTACAATAGGCCGTCAGT  
GGGACATCATAGAGGGTGACAATCCCCTCTTGACACCAACGTACGAGTCCATTACGAT  
GCCTATCTCAGAGAGTCGAGCAGTTTGGGATTTGCTGCTTAAACATGGGAGGTAGATT  
CTTCTAAAGCTAAATACAGGCAAGAGACCGATAGAGAACAAGTACCGCAAGGGAAAGAT  
GAAATAGAACTCTGTGAAGGGAGTCAAAAAGACGTGAAATTGTTGCGAGAGAAGCGATT  
CAAGTCAGCGTACTAGGCCCATCAAGCCTTGTCTTGACTAGCTTTGCCAGCGGTCTTG  
TCCTTTAGAGAGACTTGCTTTTGACGTGCCCTGCCGCTAACGGCAGACCTCCCTTTG  
GGAGGCCACGGCATGGCTGGTGAATGGCTTGAATCACCCGNTTNNNAAAAAAANGGN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

No. de colecta S/N LR3

3' → 5'

```
AGGGGAGGTTTANCTTNAACCCNCTTTAGACAGCCNTGGCCTCCAGNGGAGGTCTGCC  
CGTTANCCCGGCAGGGCAGTCAAAGTCAAGTCTCTCTAAAGGACANGACCGCTGGC  
AAAGCTAGTCCAAAGCAAGGCTTGATGGCCCTAGCTACGCTGACTTGAATCGTTCTCT  
CGCAACAATTTACGCTCTTTTTGACTCCCTTCACAGAGTTCTATTTTCATCTTTCCCTGC  
GGTACTTGTTCCTATCGGTCTCTTGCCTGTATTTAGCTTTAGAAGGAATCTACCTCC  
ATGTTTAAGCAGCAAATCCCAAACCTGCTCGACTCTCTGAGATAGGCATCGNAATGGACT  
CGTNCGTTGTGTCAAGGACGGGATGNCACCCCTCTATGATGTCCACTGACGGCCTATGGA  
CTTGGACACCACGCAGTCCAGATGGCTACTCTTCTCATCTACAACCTCGGACAGCGCAAC  
GCTGNCAGATTCAATGATGAGCTCTTCCCTCTTACTCGCAGNTACTGGGGGAATCCTAG  
TTAGTCTTTTCCCTCCGTTAGTGATATGCTAAGTNNCACCGNNANCNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNCNNNNNNNCNNNNNNNCNNNNNCNCNCCGNCNNNNNNNTNCNCNCCNCTCN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNCNNNCNNNNNNNCNCNNNNNNNCN  
CNNNNNNNNNCNNNNNNNNNCNNNNNCNCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN  
CNCNCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN  
NNNNNNNNNCNNNNNTNNTCNNNNCTCNCTNCNCTNCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN  
NNNNCTNCTNCNTCNCCNNTNNCNNNNNNNTNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN  
NNTCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN  
TNNCCCCC
```

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

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

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

5' → 3'

GAAGNNNTTTGAGCTCATNATTGGAATCTGGCGGTNTTACACTGCGCGANNTGNACATG
AGGAGTNGTNCGCNTGCGACTGCNTGGCGCACAAGNACANTAGNCCGTCANTGGGACAT
NATANAGGGNGACACTCCCNNCTTGACNCCNATNTGCNNGNNTATNACTATGGNTNTCT
CATAGAGTNGANCAGCTNGNNATNGGCTGNTTAAACATGGGAGGNAGATTCCTTCTANG
CTNANNCCAGNCGAGAGNCCGATCNGAACNAGTACCGNAAGGGAACATGAAATNNCA
CTCTGNGAAGGGAGNNANAGGGCGNGNAATTGNTGNGAGAGAACCAATCATGTAGNGAT
CTAGCCCATAAGCGTNTTNNTTTGTAAGTACTAGCTTGCCAGCGNTCTTGNTCTTAAAGAGAC
TTGACTTGNAATATGTGCAGNCTGCGNCACAGGNAGCCCTTCTGGGGCAGTGGCATGGA
TGNGGANGCTTGCAATCANNCCGCTNNAANANCGACCTTNACACTTATGATGTTCTTANG
GCTTTAATGGCCGCTNATNAACGNNNCTNNNTNTTNCNNTCNTCTCCNNNTNTNCTTTC
NTTTNNCCNNNNNTNNTTCTNNCNNTNNTCNTNTCNNNNNNCNCNNNTNNTNTCTT
TNNTCNCNCNCTCNCNTTTTCTCNNNCCTNNTNNTNCANCTTCNCTNCTCCNTCTATCT
TCNTNCTTTTNCNTTNTTCTNNTNCTTCTNNTNCTNNTNNTNCTNNTNNTNCTNNTCNCN
CTCNCCTCNTCTCCNCTCTTNCATNCNCTCCNTCTNCTNCTTCTTTNCNCTCTCC
TNCTNCTNTCACNTTCTNCTTTCCNTTNTCCTTCNNCNCCTNCTCNCNTNCCTTNCNC
CCC

No. de colecta 8219, primer LR3

3' → 5'

CCCCCCCCNCCNCCANATANNANNAATNAANNNNNNNCNAGGNNGGTNACCNGAACC
NANTCGGAACNCCNGGNNNGAGAGGNGGTGNAAGAAGAGT'TTTANTGNAACANAAAAAG
GAGGGGNAGATAAGGGAGAGGATCNTAANAAAGCTAGNANNAAGCNAAGACGNTAGAT
GGGCCTAGCNACGCAGACTAGANCCGCCCGCCCAACAATNNCACGCNGACGACTCNGA
ACAGAGCGNAACACAGACCGACNTTGGCGACTANNACNAAAANNACNCCGGNGNAAAN
ANACCAAANNGAACTACNCNTCANGTCAANCCAAAAGCAAANNGCGCGANCCNGAGN
ANNCAACNANCAGACGCNNNAACGANNNCAGGANNNNTATCGNGNCACNNAAGACNNC
NNGGAGGCCNANNNNCANCGCANNCTANGCCNNAANAAAGACAANCNCATAGNNAGCCG
NANNNCGGCANANNNGGCANCNGNANCTNNGGCNANNGMCNNCTAAANAGCNCNGNNG
TANCANATACATANCACANNANANAACANTGANGCNCTCACTGNAACAGGCACACGCAA
NTNANNCNCCNCATNNTCNCNNNAACANAAAACCACNGNCACGNACGNACNNCGGA
NNANNACNCCNNTCNANACNCCNCCAANGCGNGTGCNCCGNAANNGANNACNNNNAC
AANANACCACACNCCGCCTGCGACNNNAAGNANTNTCATNANGNAAAGAGTACTCATGA
TNNACCAAGAAGCCNATNTANNACANTNTNNNCCANTGNNNACCANCACTAAACNCNCC
AAANCAACAGCTACACACAANGACNNTACATNCTCACCNCTACGATACAANNCANACN
ATNCCACTCNCNTNCTCAGNTCCNCGCGCNCNCCNCCCTCNCGCCGCACGNACNTNCTN
CNCNCGCACNAACACTCGACTCGTGNCTNNGNACCTACACACNACAACACTACCNTNN
ANGANANAAACCNNNTNGCTNNCCC

3.3 APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA SILVICULTURA.

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

3.3.1 Aislamiento y propagación asexual de *Cantharellus cibarius*.

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

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

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

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

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

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

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

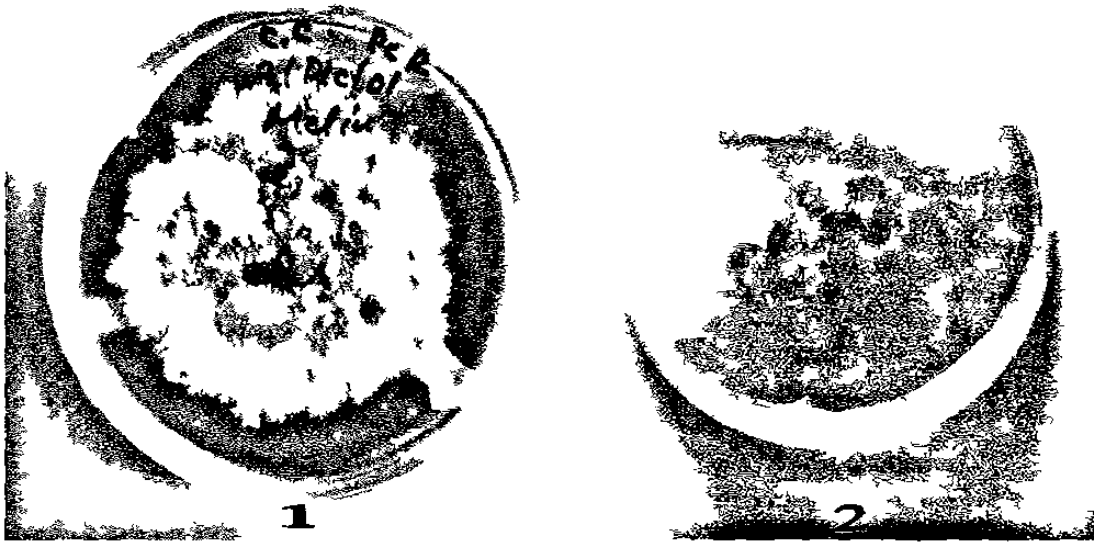


Figura 22. Cultivo puro de *Cantharellus cibarius* (1. anverso y 2. reverso)

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

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

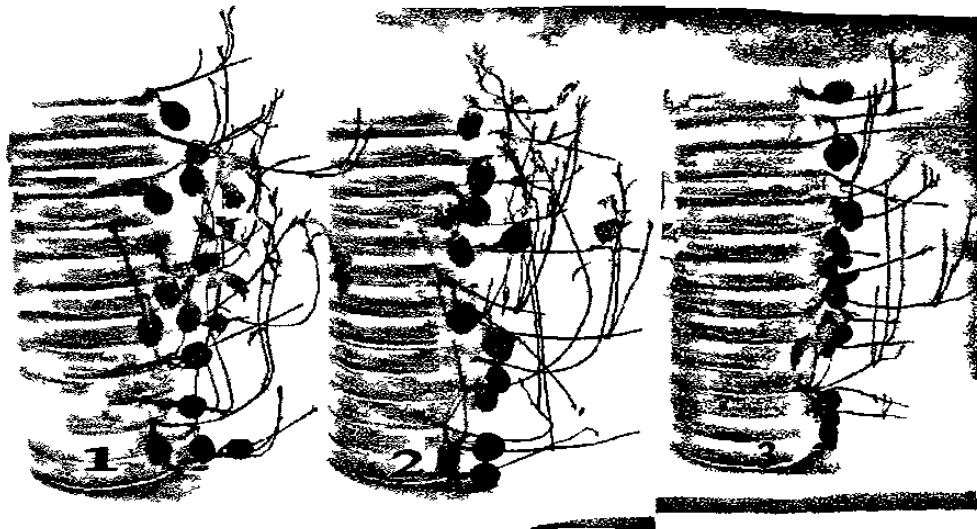


Figura 23. Síntesis de ectomicorrizas *in vitro* de *C. cibarius* con *Quercus* sp.
(1) control, (2) medio de MMN, (3) medio de ADA

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

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

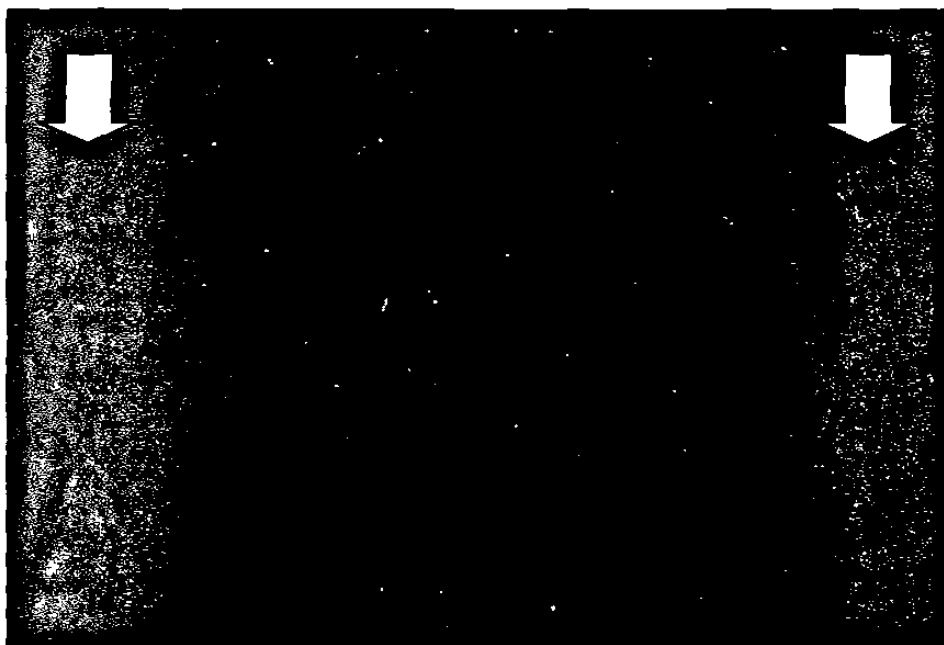


Figura 24. Raíz de plántula de encino micorrizada con *C. cibarius*.
Las flechas indican el manto.

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

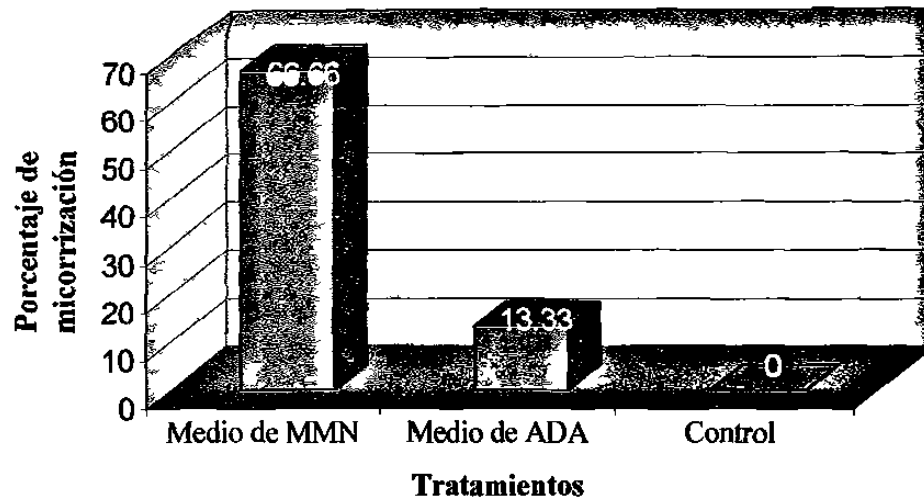


Figura 25. Síntesis de ectomicorrizas de *C. cibarius* con *Quercus* sp.

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

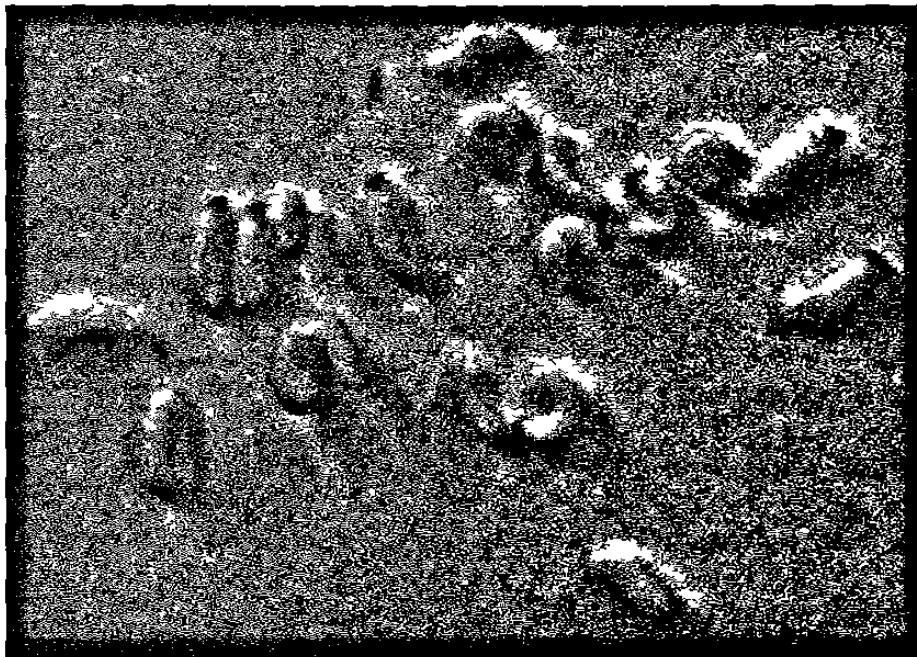


Figura 26. Larvas de insectos barrenadores de semillas de encino

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Taxonomía morfológica de las especies de *Cantharellus*

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

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

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

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

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

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

4.3 Estudio del ITS de las especies de *Cantharellus*

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

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

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

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

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

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

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

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

4.4 Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear en las especies de *Cantharellus*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Dahm, H., E. Strzelczyk, R. Pachlewski y K. Redlak. 1997. Impact of Media and Growth Conditions on Biomass Production by the Ectomycorrhizal Fungus *Cantharellus cibarius* Fr. *Folia Forestalia Polonica* 39:17-26.
- Danell, E. y N. Fries. 1990. Methods for Isolation of *Cantharellus* Species and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* 38:141-148.
- Danell, E. y D. Eaker. 1992. Amino Acid and Total Protein Content of the Edible Mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries). *J. Sci. Food Agric.* 60:333-337.
- Danell, E., S. Alstrom y A. Ternstrom. 1993. *Pseudomonas fluorescens* in Association with Fruit Bodies of the Ectomycorrhizal Mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycol. Res.* 97 (9): 1148-1152.
- Danell, E. 1994a. *Cantharellus cibarius: Mycorrhiza Formation and Ecology*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 35.
- Danell, E. 1994b. Formation and Growth of the Ectomycorrhiza of *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 5:89-97.
- Danell, E. 1997a. Progress in Chantarelle (*Cantharellus cibarius*) Cultivation. *Revue Forestiere Francaise* 49:214-221.
- Danell, E. 1997b. Les Progrès Dans la Maîtrise de la Culture de la Chanterelle, *Cantharellus cibarius*. *Rev. For. Fr.* 49:214-221.
- Danell, E. y F.J. Camacho. 1997. Successful Cultivation of the Golden Chantarelle. *Nature London* 385 (23):303.
- Degreef, J., F. Malaisse, J. Rammeloo y E. Baudart. 1997. Edible Mushrooms of the Zambezi Woodland Area: A Nutritional and Ecological Approach. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* 1(3):221-231.
- Dowling, T. E., C. Moritz, J. D. Palmer y L. H. Rieseberg. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites. 249-320. *En: Molecular Systematics*. Eds. D.M. Hillis, C. Moritz y B.K. Mable, 2a. Ed. Sinauer, EUA.
- Dyke, A. J. y A. C. Newton. 1999. Commercial Harvesting of Wild Mushrooms in Scottish Forest: Is It Sustainable?. *Scottish Forestry* 53(2):77-85.
- Egger, K. N. 1995. Molecular Analysis of Ectomycorrhizal Fungal Communities. *Can. J. Bot.* Vol. 73 (suppl.1) S1415-S1422.
- Egger, K. N. , G. Kernaghan, T. E. O'Dell y Q. F. Baldwin. 1996. Describing DNA Using Molecular Techniques. *En: A Manual of Concise Descriptions of North American*

- Ectomycorrhizae, Including Microscopic and Molecular Characterization. Eds. D.M. Goodman, D. M. Durall, J. A. Tröfymow y S. M. Berch. Mycologue Publ. Canada.
- Eyssartier, G. y B. Buyck. 1999. Contributions of a Mycological Inventory in Madagascar. 2. New Taxa in the Genus *Cantharellus*. *Mycotaxon* 70:203-211.
- Feibelman, T., P. Bayman y W. G. Cibula. 1994. Length Variation in the Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA in Chanterelles. *Mycol. Res.* 98 (6):614-618.
- Feibelman, T. P., J. W. Bennett y W. G. Cibula. 1996. *Cantharellus tabernensis*: a New Species from the Southeastern United States. *Mycologia* 88 (2):295-301.
- Fries, N. 1979. Germination of Spores of *Cantharellus cibarius*. *Mycologia* 71:216-219.
- Fries, N. y E. Danell. 1990. Methods for Isolation of *Cantharellus* Species, and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* 38:141-148.
- Froidevaux, L. 1975. Identification of Some Douglas Fir Mycorrhizae. *European Journal of Forest Pathology* 5(4):212-216.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns y J. W. Taylor. 1991. Identification of Indigenous and Introduced Symbiotic Fungi in Ectomycorrhizae by Amplification of Nuclear and Mitochondrial DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Garza, F. 1991. Competition Between Ectomycorrhizal Fungi During Establishment on the Rotos of Tropical Pines. D. Phil Thesis University of Oxford, Oxford Forestry Institute. 383 pp.
- Garza-Ocañas, F. 1993. Producción de Compuestos Antibióticos por Dos Especies de Hongos Ectomicorrizógenos. Contribuciones Micológicas en Homenaje al Biólogo José Castillo Tovar por su Labor en Pro de la Micología Mexicana. *Reporte Científico, Número Especial* 13:132-146.
- Garza, F., R. Mota, J. Martínez-Ávalos y G. Sánchez-Ramos. 2001. Síntesis de Ectomicorrizas *in vitro* de *Pinus caribaea*, *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*. *BIOTAM*. Vol. 12 (3):37-56.
- Grochowski, W. y R. Ostalski. 1993. Changes in the Forest Environment Under a 65 Years Old Pine Stand Caused by Sprinkling the Forest Ground. *Prace Instytutu Badawczego Lesnictwa* No. 761-769:145-160.
- González, P. y J. Labarere. 2000. Phylogenetic Relationships of *Pleurotus* Species According to the Sequence and Secondary Structure of the Mitochondrial Small-Subunit rRNA V4, V6 and V9 Domains. *Microbiology* 146: 209-221.
- Goodman, D. M., D. M. Durall y J. A. Tröfymow. 1996. Describing Ectomycorrhizae, Describing Morphology and Anatomy. *En: A Manual of Concise Descriptions of North*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Jong, S. C. 1978. Conservation of the Cultures. 119-135. *En: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Eds. S. T. Chang y W. A. Hayes. Academic Press, NY, E.U.A.
- Kalinowski, M. y M. Korhonen. 1998. Non Wood Forest Products in Poland. *En: Sustainable Development of Non Wood Goods and Benefits from Boreal and Cold Temperate Forest*. Proceedings of the International Workshop, Joensuu, Finland. H.G. Lund, B. Pajari Ed. *EFI-Proceedings* 23:87-92.
- Kerrigan, R. W. y I. K. Ross. 1989. Allozymes of a Wild *Agaricus bisporus* Population: New Alleles, New Genotypes. *Mycologia* 81 (3) 433-443.
- Kocher, T. D. y T. J. White. 1989. Evolutionary Analysis Via PCR. *En: PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. 137-147. Ed. H. A. Erlich. M Stockton Press, E.U.A.
- Kuhner, R. y H. Romagnesi (1953). *Flore Analytique des Champignons Superieurs (agarics, Bolets, Chanterelles)*. Masson, ET, Paris. 556 pp.
- Largent, D. 1986. *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*. MRP, E.U.A. 166 pp.
- Largent, D. y T. J. Baroni. 1988. *How to Identify Mushrooms to Genus VI: Modern Genera*. MRP, E.U.A. 277 pp.
- Lee, K. H., Y. S. Kim, T. S. Lee y K. S. Kim. 1986. A Comparative Study on the Mushroom Populations Between Matsutake Producing and Non-producing *Pinus densiflora* Stands. *Journal of Korean Forestry Society* 72:27-31.
- Lee, S. B. y J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores. *En: PCR Protocols, A Guide for Methods and Applications*. 282-287. Eds. Michael A. Innis *et al.* Academic Press, E.U.A.
- Liegel, L., D. Pilz y T. Love. 1998a. The MAB Mushroom Study: Background and Concerns. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio, Special Report* No. 9:3-7.
- Liegel, L., D. Pilz, T. Love y E. Jones. 1998b. Integrating Biological, Socioeconomic and Managerial Methods and Results in the MAB Mushroom Study. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *AMBIO, Special Report* No. 9:26-33.
- Love, T., E. Jones y L. Liegel. 1998. Valuing the Temperature Rainforest: Wild Mushrooms on the Olympic Peninsula Biosphere Reserve. The Biological, Socioeconomic and Managerial Aspects of Chanterelle Mushroom Harvesting: The Olympic Peninsula, Washington State, U.S.A. *Ambio, Special Report* No. 9:16-25.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Trappe, J. M. 1962. Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28:538-606.
- Velikanov, L. y I. Sidorova. 1998. Regulation of Myco and Microbiotic Structure of Forest Soil and Litter by Higher Basidiomycetes. II. Influence of Basidiomycetes on Species Diversity of Soil Micromycetes. *Mycologiya i Fitopatologiya* 32 (1):33-36.
- Vetter, J. 1993. Chemical Composition of Eight Edible Fungi. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 196 (3):224-227.
- Vigalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and Recent Patterns of Geographic Speciation in the Oyster Mushroom *Pleurotus* Revealed by Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Sequences. *Proc. Natl. Acad. USA* Vol. 91:4599-4603.
- Villarreal, L. y J. Pérez-Moreno. 1989. Los Hongos Comestibles Silvestres de México, un Enfoque Intergral. *Micol. Neotrop. Apl.* 2:77-114.
- Villarreal, L. y A. Gómez. 1997. Inventory and Monitoring Wild Mushrooms in Mexico: Challenge and Opportunity for Sustainable Development. 99-109. *En: Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Eds. M.E. Palm e I. H. Chapela. Parkway, NC, E.U.A.
- Voiblet, C., S. Duplessis, N. Encelot y F. Martin. 2001. Identification of Symbiosis-related Genes in *Eucalyptus globus* - *Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhiza by Differential Hybridization of Arrayed cDNAs. *Plant J.* 25:1-12.
- Vrot, F. y J. Grente. 1985. Research for a Method of Biological Control of Ink Disease by Using Mycorrhizal Symbiosis. *European Journal of Forest Pathology* 15 (5-6):379-383.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. 315-322. *En: PCR Protocols, A Guide for Methods and Applications*. 282-287. Eds. M. A. Innis *et al.* Academic Press, E.U.A

ANEXOS

1.- Preparación de Medios de Cultivo.

Agua Desionizada Agar + Tiamina

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

Agua Desionizada Agar Purificado (ADA)

Agar purificado	15 g
Agua Desionizada	1000 ml.

Medio de Melin Norkrans (MMN)

Extracto de levadura	0.50 g
Extracto de malta	3 g
D-glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.25 g
KH ₂ PO ₄	0.50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g
CaCl ₂	0.05 g
FeCl ₃ (1%)	1.20 ml
NaCl	0.025 g
Tiamina HCl	100 µg
Agar	15 g
Agar purificado	15 g

Agua desionizada 1000 ml

Medio de Melin Norkrans

Extracto de levadura 1 g

Extracto de malta 3 g

D-glucosa 10 g

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

KH_2PO_4 10 ml/lt

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

CaCl_2 10 ml/lt

FeCl_3 (1%) 10 ml/lt

NaCl 10 ml/lt

Tiamina HCl 1 ml/lt

Agar 15 g

Agar purificado 18 g

Agua desionizada 800 ml.

Para obtener un pH de 6.3

Fosfato dibásico de sodio .5 M 56 ml/lt

Acido cítrico .5 M 13.2 ml/lt

Esterilizar 120 °C / 5 min.

Disolver

Esterilizar 120 °C / 5 min.

