

# ESTUDIO DEL ITS NUCLEAR EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO CANTHARELLUS DE MÉXICO

GONZALO GUEVARA GUERRERO\*, FORTUNATO GARZA OCAÑAS\*, EFRÉN CÁZARES GONZÁLEZ\*\*

Las especies del género *Cantharellus* son de gran importancia ecológica, económica y nutricional. Existen aproximadamente 65 especies cosmopolitas dentro del género *Cantharellus* y 16 variedades dentro de la especie tipo *C. cibarius*.<sup>1</sup> Esta especie es originaria de Europa y crece en asociación simbiótica, a través de sus raíces, con árboles de importancia forestal: *Quercus* spp., *Pinus* spp., *Picea* spp., *Pseudotsuga* spp., *Abies* sp., *Betula* spp., *Castanea* sp., *Fagus* sp., *Eucaliptus* sp., *Populus* sp. y *Tsuga* sp.<sup>2, 3, 4, 5, 6</sup> En temporadas de lluvia, este hongo es recolectado con fines alimenticios y de comercialización, principalmente en los estados del centro de México.<sup>7</sup> El aprovechamiento irracional de este recurso está ocasionando severos daños a los ecosistemas. Para evitar esto, el gobierno federal protege este recurso mediante la Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-059-Ecol-1994).<sup>8</sup> En Europa, *C. cibarius* está desapareciendo debido a los efectos combinados de lluvia ácida y por la radiación del desastre del Chernobyl, entre otros.<sup>9,10</sup> Esto provocó la desaparición de hasta 50% de biodiversidad en algunas localidades. Existen nuevos métodos para llevar a cabo estudios de taxonomía, filogenia y ecología en hongos mediante el uso de PCR (Polymerase Chain Reaction) y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Estos estudios consisten en el análisis de un gen o de una región del genoma, por ejemplo: el ITS (Internal Transcribed Spacer) que se encuentra repetidamente entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del ADN nuclear. El ITS contiene



dos regiones espaciadoras separadas por el gen 5.8S rRNA. Estas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de pares de *primers* o iniciadores universales, por ejemplo, ITS1f y ITS4 o ITS1f y ITS4b, entre muchos otros.

El producto amplificado es después digerido con enzimas de restricción para observar polimorfismo en sus fragmentos mediante electroforesis en agarosa. Esta técnica puede separar muchas especies relativamente rápido.<sup>11,12,13</sup> En algunos trabajos sobre sistemática molecular en este género han reportado que la longitud del ITS completo de *C. tubaeformis*, *C. infundibuliformis*, *C. cinnabariunus*,

\* Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, N.L., México. E-mail: guevaragg@hotmail.com

\*\* Department of Forest Science. Oregon State University. Corvallis, OR 97331-7501. E-mail: Efrén.Cazares@oregonstate.edu

*C. minor*, *C. subalbidus*, *C. lateritius*, *C. cibarius* y *Craterellus odoratus* varía de 720 pares de bases (pb) hasta más de 1600 bp. Asimismo, señalan que la variación de la longitud de la región del ITS ocurre inter e intraespecíficamente.<sup>14</sup> En otras investigaciones, en la subunidad menor nuclear y mitocondrial del ADN ribosomal, se han realizado estudios filogenéticos entre los hongos cantarelloides y clavarioides encontrando que la familia *Cantharellaceae* está muy relacionada con *Hydnum*, el cual es dentado, *Clavulina*, el cual es un hongo coraloide y *Stichoclavaria*, que tiene forma de clava y presentan esticobasidias. *Clavariadelphus* se relaciona con *Gomphus* y *Ramaria* y está correlacionado con la reacción verde del esporocarpio tratado con sales de hierro. Los parientes más cercanos de los hongos cantarelloides y clavarioides son los Gasteromycetes, incluyendo a *Geastrum*.<sup>15</sup> Asimismo, otros estudios sobre sistemática molecular en *Cantharellus* proponen 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 independientes, sino como sinónimos de *cornucopioides*.<sup>16</sup> El uso de herramientas moleculares, junto con las características de especie morfológica y biológica, tiene un gran poder en estudios taxonómicos sobre los hongos ectomicorizógenos. Debido a que la especie tipo *C. cibarius* es originaria de Europa, la investigación pretende contribuir al conocimiento de *C. cibarius*, *C. lateritius*, *C. minor*, *C. cinereus*, *C. cinnabarinus*, *C. aff. amethysteus* y *Cantharellus* spp., mediante la determinación o identificación taxonómica de estas especies en México con apoyo de técnicas moleculares y justificarlas (si es el caso) en la lista de especies protegidas por la Norma Oficial Mexicana.

## Materiales y métodos

El material fúngico estudiado proviene de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Durango, Chiapas, Chihuahua, Querétaro, Guanajuato y Veracruz. Los basidiocarpos fueron recolectados de diferentes hábitats tales como matorral con encino (MaQ), bosque de coníferas (BC), bosque de encino (BQ), bosque mesófilo de montaña (BMM) y bosque mixto de pino-encino (BP-Q). El muestreo de los basidiomas de las diferentes especies se colectó presentando apariencias morfológicas similares bajo diferentes hábitats y regiones biogeográficas y apoyado en los métodos estándar en micología para su identi-

cación.<sup>1,17</sup> Los cultivos puros de *C. cibarius* se obtuvieron siguiendo los principios técnicos para el aislamiento y propagación de tejidos fúngicos utilizando el medio de Melin.<sup>3</sup> Los estudios moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Ciencias Forestales de la Universidad del Estado de Oregon (OSU). La variable a medir fue la secuencia génica del ITS completo, localizado entre el gen de la subunidad menor y la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear. La variación del ITS fue analizada con el programa Geneprofile 4.03 (Scanalytics) que compara la similitud y disimilitud de los fragmentos digeridos. Se utilizó la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (polimorfismo de los fragmentos de restricción) para el análisis del ITS completo.<sup>14, 18, 19, 20</sup> El protocolo para la extracción del ADN, PCR y RFLP consistió en lo siguiente:

1. Extracción de ADN. Muestras del tejido fúngico se humedecieron dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml con 300  $\mu$ l de 2x CTAB buffer. El tejido blando se congeló -en hielo seco- y se derritió a 65°C, este paso se repitió dos veces. El tejido se trituró con un micromacerador de plástico cambiando de macerador entre muestra y muestra. Después se congeló nuevamente y se incubó a 65°C por 30 a 60 min., y se le agregó 300  $\mu$ l de cloroformo (V:V con una cantidad igual de CTAB) y se agitó brevemente. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. Se colectó la parte acuosa superior con una pipeta de 200  $\mu$ l y se colocó en tubos nuevos etiquetados. Enseguida se agregaron tres volúmenes de NaI (600  $\mu$ l) y se agitó suavemente. Se agregó "leche de vidrio" (milk glass), asegurándose de que estuviera bien mezclado (suavemente con el vórtex) antes de agregarlo. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, agitándolos a la vez suavemente cada dos minutos. Entonces, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por cinco segundos y el precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ l de New Wash, se agitó suavemente para luego centrifugar a 13000 rpm por cinco segundos y nuevamente se tiró el supernadante, este paso se repitió tres veces con New Wash. Después del tercer lavado se tiró el supernadante y se volvió a centrifugar por 30 seg. y se retiró lo que restaba del supernadante con una pipeta de 20  $\mu$ l. Las muestra de las 35 colectas y los cinco cultivos puros de *Cantharellus* se secaron en una cámara de flujo laminar o en una incubadora estéril por diez minutos. Después se agregaron 50  $\mu$ l de TE buffer para eludir el ADN del

vidrio, se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm por 30 seg., y el supernadante donde se encuentra el extracto del ADN se colocó en un tubo nuevo, listo para el PCR y subsecuentemente para el RFLP.

2. PCR. El extracto de ADN 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) para determinar la mejor opción para su amplificación. El porcentaje de primer/extracto de ADN fue de 50:50 (.34 µl por reacción). Mezclas para PCR fueron elaboradas (10 x dNTP, primers ITS1F y ITS4, buffer para PCR y DNA polimerasa Taq). El número de ciclos de amplificaciones del termociclador (MJ Research Programmable Thermal Controller, (PTC)-100) de 35 (pasos b-d):

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

Los productos del PCR fueron observados en un gel de agarosa 2% en electroforesis. Un Ladder de 100 pares de bases fue usado como estándar, así como el extracto de ADN de un hongo conocido (*Leccinum* sp. y *C. subalbicus* control positivo). El gel fue teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta para su fotografiado.

3. Protocolo para RFLP. Una cantidad de 10 µl de ADN amplificado fue digerida con las enzimas de restricción *Dpn* II (5'...∇gatc...3') y *Hinf* I (g∇antc) durante tres horas a 37°C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa al 1% durante 30 minutos a 110 v. El ADN fue teñido en bromuro de etidio (10 mg/l) por diez minutos y lavado en agua otros diez minutos. La luz UV se utilizó para visualizar los fragmentos para su fotografiado final. El programa Geneprofile 4.03 (Scanalytics) se usó para calcular en número de bases de los fragmentos observados.

## Resultados y discusión

Los productos del PCR de los basidiomas de *C. cibarius* y un cultivo puro de diferentes regiones biogeográficas y hábitats fueron digeridos con las enzi-

mas de restricción *Hinf* I y *Dpn* II y los resultados se observan en las figuras 1 y 2.

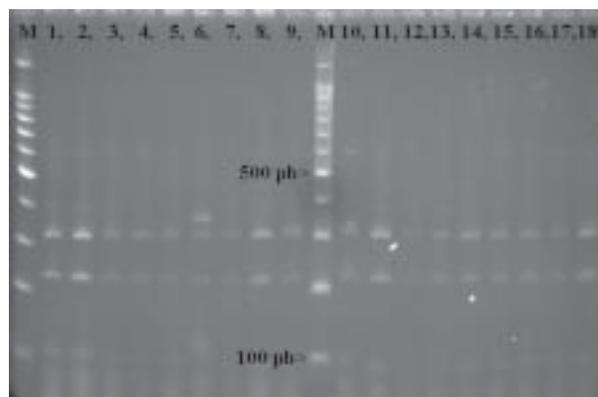


Fig. 1. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de las 17 colectas de *C. cibarius* de diferentes estados y un cultivo puro (línea 18). Líneas 1, 2, 7, 12, 13, 14, C.c. de N.L. Líneas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 18, C.c. de diferentes localidades de Tamaulipas. Línea 11, C.c. de Querétaro. Líneas 15, 16 y 17, C.c. de Durango. 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.

En ambos casos, el análisis del RFLP no demostró polimorfismo intraespecífico en *C. cibarius* de las diferentes localidades de la República Mexicana, excepto en la línea 6 donde se aprecia una banda extra.

Similarmente, los productos del PCR obtenidos de los basidiomas de *C. lateritius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, *C. aff. amethysteus*, *Cantharellus* spp., *Cr. cinereus* y cuatro cultivos puros de *C. cibarius*, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Dpn* II y los resultados se observan en las figuras 3 y 4.

Nuevamente, en ambos casos, el análisis del RFLP no mostró polimorfismo aparente entre las especies de *Cantharellus* estudiadas. Sin embargo, sí demostró diferencias al compararlos con los cultivos puros. La longitud de los fragmentos digeridos fue calculada con el programa Geneprofile, para analizar la variación del ITS intraespecífica de *C. Cibarius* (tabla I). En la digestión con la enzima *Hinf* I, en la mayoría de los especímenes de *C. cibarius*, el ITS varió de 511 a 861 pb. Solamente las colectas de *C. cibarius* de Tamaulipas (figura 1 línea 6) presentaron fragmentos de restricción de 861 pb. En la misma figura 1, las líneas 12 y 13 (BC- N.L.), 14

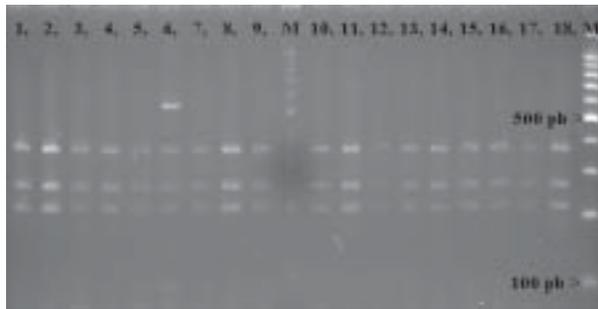


Fig. 2. Análisis del RFLP (*Dpn* II) de los ITS amplificados de las 17 colectas de *C. cibarius* de diferentes estados y un cultivo puro. Líneas 1, 2, 7, 12, 13, 14, C.c. de Nuevo León. Líneas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 18, C.c. de diferentes localidades de Tamaulipas. Línea 11, C.c. de Querétaro. Líneas 15, 16 y 17, C.c. de Durango. 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.

(BP-Q- N.L.) y 15 (BP-Q- Dgo.), tienen 514 pb en sus fragmentos. Asimismo, en las líneas 3 (BMM-Tamps.), 5, 6 (BQ- Tamps.), 11 (BQ- Qro.) y 16 (BP-Q- Dgo.) contienen 516 pb en sus fragmentos. En las líneas 4 y 8 (BQ- Tamps.) presentaron 513 pb, mientras que el resto de las líneas presentaron fragmentos de 511-528 pb. Asimismo, la digestión del ITS con la enzima *Dpn* II, analizada con el programa Geneprofile, demostró que la variación del ITS dentro de la especie *C. cibarius* de diferentes localidades varió de 790-1368 pb (figura. 2 y tabla I).

La colecta 783 (línea 6, BQ, Tamps.) presentó 1368 pb, mientras que la línea 5 (BQ, Tamps.) mostró el menor número de pb con 790. La línea 4 (BQ, Tamps.) 791 pb; las líneas 2 (MaQ, N.L.) y 3 (BMM, Tamps.) demostraron 793 pb, las líneas 7 (BQ, N.L.), 8 y 10 (BQ, Tamps.) tienen 795 pb; la línea 11 (BQ, Qro.) 802 pb; las líneas 9 (BQ, Tamps.), 12, 13 (BC, N.L.) y 14 (BP-Q, N.L.) tienen 804 pb; la línea 1 (BC, N.L.) tiene 805 pb y la 15 (BP-Q, Dgo.) 811 pb; las líneas 17 (BP-Q, Dgo.) y 18 (BQ, Tamps.) presentaron ambas 813 pb, la 16 (BQ, Tamps.) tiene 824 pb y la línea 6 (BQ, Tamps.) presentó 1368 pb. Por otro lado, para el análisis de la variación del ITS interespecífica del género *Cantharellus* y los cultivos puros, el RFLP digerido con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Dpn* II fue también analizado (figuras 3 y 4, y tabla II). Los fragmentos digeridos con la enzima *Hinf* I en la línea 1 *C. cinereus* (= *Cr. cinereus*, BP-Q, Tamps.) presentó 656 pb; en las líneas 2 y 3 *C. cinnabarinus*

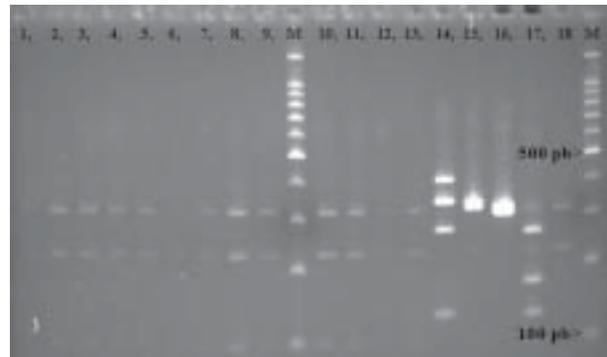


Fig. 3. Análisis del RFLP (*Hinf* I) de los ITS amplificados de varias especies de *Cantharellus* de distintos estados del país y 4 cultivos puros. En la línea 1, *Cr. cinereus* de Tamaulipas; líneas 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tamaulipas; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tamaulipas; línea 5 *C. lateritius* de Nuevo León; línea 7, *C. minor* de Tamaulipas; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. de Tamaulipas; línea 12, *C. aff. amethysteus* de Nuevo León; línea 13, *C. aff. minor* de Tamaulipas; líneas 14, 15, 16 y 17 cultivos puros de *C. cibarius* de Nuevo León; 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. M es el marcador del tamaño del fragmento de 100 pb.

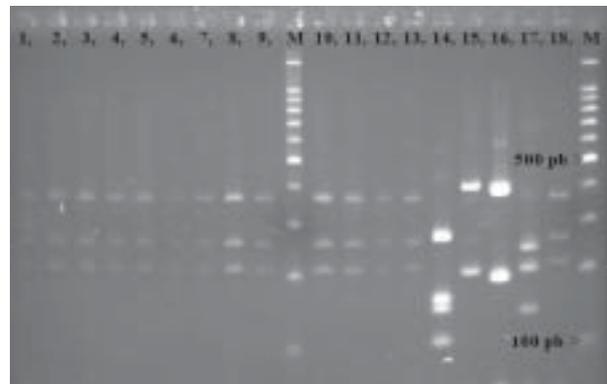


Fig. 4. Análisis del RFLP (*Dpn* II) de los ITS amplificados de varias especies de cantarelaceos de distintas partes del país y cuatro cultivos puros. En la línea 1, *Cr. cinereus* de Tamps.; líneas 2 y 3 *C. cinnabarinus* de Tamaulipas; líneas 4 y 6 *C. lateritius* de Tamaulipas; línea 5 *C. lateritius* de N.L.; línea 7, *C. minor* de Tamaulipas; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. de Tamaulipas; línea 12, *C. aff. amethysteus* de Nuevo León; línea 13, *C. aff. minor* de Tamaulipas; líneas 14, 15, 16 y 17 cultivos puros de *C. cibarius* de Nuevo León; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas. Similarmente a la figura 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. M es el marcador del tamaño del fragmento de 100 pb.

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

Especie	Hábitat y Estado	Núm. colecta y herbario	Núm. de Pb del ITS completo ( <i>Hinf</i> I)	Núm. de Pb del ITS completo ( <i>Dpn</i> II)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de coníferas, N.L.	647 (ITCV)	514	804
		2423 (CFNL)	514	804
		8219 (ITCV)	526	805
	Bosque mixto de pino-encino, N.L.	1495 (CFNL)	514	804
	Bosque de encino Nuevo León	1605 (CFNL)	511	795
	Matorral con encino, N.L.	4522 (ITCV)	518	793
	Bosque de encino Tamaulipas.	104 (Cult. puro, ITCV)	528	813
		604 (ITCV)	513	791
		781 (ITCV)	516	790
		783 (ITCV)	861	1368
		4823 (ITCV)	513	795
		7875 (ITCV)	523	804
		8303 (ITCV)	521	795
	Bosque mesófilo de montaña Tamaulipas.	813 (ITCV)	516	793
	Bosque de encino Querétaro.	10125 (ITCV)	516	802
	Bosque mixto de pino-encino, Durango	4188 (ITCV)	514	811
		1790 (ITCV)	516	824
		1307 (ITCV)	520	813
	Hábitat Chiapas	808 (ITCV)	681	870

(BMM, Tamps.) 650 pb ambas; líneas 4, 5 y 6 *C. lateritius* (BQ, BP-Q, Tamps. y N.L.) tienen de 637 a 646 pb; líneas 7 y 13 *C. minor* (BMM, Tamps.) contienen 638 pb; líneas 8, 9, 10 y 11 *Cantharellus* sp. (BQ, BMM, Tamps.) 634 a 645 pb; línea 12 *C. aff. amethysteus* (BQ, N.L.) tiene 643 pb; líneas 14-17 cultivos puros de *Cantharellus* (BQ, BP-Q, N.L. y Tamps.) varió de 593 a 1151 pb; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas con 681 pb. Con la enzima *Dpn* II (figura 4) la línea 1 *Cr. cinereus* presentó 857 pb; las líneas 2 y 3 *C. cinnabarinus* 844 a 847 pb; líneas 4, 5 y 6 *C. lateritius* 831 a 842 pb; líneas 7 y 8 *C. minor* entre 829 y 835 pb; líneas 8 a 12 *Cantharellus* sp. varió de 828 a 838 pb. línea 13 *C. aff. amethysteus* 832 pb; líneas 14 a 16 cultivos puros (BQ, BP-Q, N.L., Tamps.) con 588 a 685 pb; línea 18 *C. cibarius* de Chiapas con 870 pb. 8-12.

Las especies del género *Cantharellus* pueden ser reconocidas por su fenotipo (morfología). Sin embargo, existen variantes dentro del grupo *cibarius* que hacen la ubicación taxonómica de algunas de sus especies muy difícil o ambigua, esto es debido a que la especie tipo es originaria de Europa. Las técnicas moleculares están siendo ampliamente usa-

das para fortalecer los estudios de sistemática en grupos complejos. En este estudio las especies del género *Cantharellus* presentaron un ITS muy similar en tamaño. Las especies mexicanas demostraron polimorfismo al compararlas con *C. subalbidus* proveniente de los bosques de coníferas de Oregon, EE UU (no ilustrado), presentando hasta 1746 pb en su ITS completo. En contraste, las especies mexicanas no demostraron polimorfismo en sus fragmentos al compararlas entre sí. De igual manera, no se observó polimorfismo en colectas de diferentes lugares biogeográficos de la especie tipo (*C. Cibarius*). Los resultados del ITS para *C. cibarius* en este estudio contrastan para la misma especie con los de Feibelman y cols. (1994), quienes determinaron el tamaño del ITS completo encontrando variación intraespecífica en *C. cibarius* variando de 1375 a más de 1600 pb. Solamente una colecta de California varió de 1400 a 1600 pb, mientras que el resto de los *C. cibarius* varió de 1375 a 1425 pb. Estos resultados probablemente se deban a la enzima *Rsa* 1 utilizadas por los investigadores. Asimismo determinaron que la longitud del ITS completo en las especies del género *Cantharellus* varía de 720

Tabla II. Número de pares de bases del ITS nuclear completo *Cantharellus* spp. de México

Especie	Hábitat y Estado	Núm. colecta y herbario	Núm de Pb del ITS completo ( <i>Hinf</i> I)	Núm de Pb del ITS completo ( <i>Dpn</i> II)
<i>Craterellus cinereus</i>	Bosque de pino-encino, Tamps.	30 (ITCV)	656	857
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque mesófilo de montaña, Tamps.	S/N (ITCV)	650	847
		812 (ITCV)	650	844
<i>Cantharellus lateritius</i>	Bosque mixto de pino- Encino, N.L.	922 (ITCV)	646	838
		1870 (ITCV)	637	831
<i>Cantharellus minor</i>	Bosque de encino, Tamps.	7854 (ITCV)	646	842
<i>Cantharellus aff. minor</i>	Bosque mesófilo de montaña, Tamps.	771 (ITCV)	638	829
		811 (ITCV)	645	835
<i>Cantharellus</i> sp.	Bosque de encino, Tamps.	796 (ITCV)	634	838
		805 (ITCV)	635	832
		816 (ITCV)	639	828
	Bosque mesófilo de montaña, Tamps.	814 (ITCV)	639	828
<i>Cantharellus aff. amethysteus</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 caféoscuro		100 (CFNL)	593	611

a 1600 pb para *Cantharellus cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, *C. lateritius*, *C. subalbidus* y *Cantharellus* sp., de diferentes regiones biogeográficas, concluyendo que el ITS-1 es la región más variable y que el ITS varía *inter* e *intraespecíficamente* en el género *Cantharellus*. Por otro lado, el aislamiento de *C. cibarius in vitro* es muy difícil, debido a los requerimientos nutricionales, ambientales y por la contaminación que este hongo presenta a causa de la presencia de una bacteria endobiótica natural. De los cinco cultivos que se estudiaron, se esperaba encontrar que los productos del PCR y los fragmentos digeridos de éstos presentaran similitud. Sin embargo, solamente un cultivo puro lo presentó (figuras 1 y 2 línea 18, *C. cibarius* de Tamaulipas), por lo que el resto de los cultivos se descartaron hasta no compararlos con el ADN del basidiocarpo de donde se aislaron. Hasta entonces no se puede determinar si corresponden a *C. cibarius* o a otro microorganismo. Asimismo, se requieren más estudios para determinar si la colecta 783 de *C. cibarius* creciendo el encino en Tamaulipas, y que presentó polimorfismo bien marcado con las enzimas *Hinf* I y *Dpn* II es realmente *C. cibarius* o un nuevo taxón.

## Conclusiones

La variación *intra* e interespecífica del ITS en la mayoría de los basidiocarpos de *C. cibarius* provenientes de diferentes regiones y hábitats de México no es considerable. El RFLP no demostró polimorfismo en la longitud de sus fragmentos de restricción de la región del ITS nuclear. Sin embargo, la longitud de los fragmentos de restricción varía con las enzimas utilizadas. Se requieren de técnicas moleculares con mayor resolución como la secuenciación de nucleótidos del ITS u otros genes para determinar el grado de similitud o disimilitud de las especies estudiadas y determinar si existe *C. cibarius* en México, debido a que la especie tipo es originaria de Europa.

## Resumen

Las especies del género *Cantharellus* son de gran importancia económica y ecológica. Sin embargo, la variación morfológica *inter* e *intraespecífica* de este género ha dificultado la ubicación taxonómica de algunas de sus especies, incluyendo la especie tipo. Por lo anterior, se llevó a cabo un estudio

taxonómico molecular. El ITS de 35 colectas y cinco cultivos puros de *Cantharellus*, provenientes del centro, sur y norte de México, fue analizado mediante el uso de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción). Las especies estudiadas fueron: *C. cibarius*, *C. lateritius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, *C. aff. amethysteus*, *Cantharellus* spp. y *Cr. cinereus* (= *C. cinereus*). El RFLP no demostró suficiente resolución para observar variación *inter* e *intraespecífica*, pero sí demostró diferencias en cinco cultivos puros de *Cantharellus*.

**Palabras clave:** México, *Cantharellus*, ITS, PCR, RFLP, Sistemática molecular, Marcadores moleculares.

## Abstract

The species of *Cantharellus* are of great economical and ecological importance. However, inter and intraspecific morphological variation exists within this genus, making it difficult to taxonomically place some of its species, including the type specie. Due to this situation, a preliminary molecular taxonomic study was performed. The ITS (internal transcribed spacer) from 35 collections and five pure cultures of *Cantharellus*, from the center, south and northeast regions of Mexico, was analyzed by using PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (restriction fragment length polymorphism). The studied species were *C. Cibarius*, *C. lateritius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus*, *C. aff. amethysteus*, *Cantharellus* spp., and *Cr. cinereus* (= *C. cinereus*). The RFLP did not show enough resolution to see inter and intraspecific variation among the studied species, however, it did demonstrate differences among the 5 pure *Cantharellus* cultures.

**Keywords:** México, *Cantharellus*, ITS, PCR, RFLP, Molecular systematic, Molecular markers

## Agradecimientos

El primero de los autores agradece al Cosnet (Clave: 696.01-P) y al Conacyt el apoyo brindado para la realización de esta investigación. También se agradece a los doctores: Randy Molina, David Pilz, James Trappe, Doni Mckey del Forestry Sciences Lab. Dept. of Agriculture, Corvallis Oregon, E.U.A.

## Referencias

1. Corner, E. J. H. 1966. *A Monograph of Cantharelloid Fungi*. Oxford University Press. Gran Bretaña. 255 pp.
2. Danell, E. 1994. Formation and Growth of the Ectomicorriza of *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 5: 89-97.
3. Danell, E. y N. Fries. 1990. Methods for Isolation of *Cantharellus* Species and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* (38) 141-148.
4. Trappe, J. M. 1962. Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606.
5. Singer, R. y B. Harris. 1987. *Mushrooms and Truffle (Botany, Cultivation and Utilization)*. 2a. Ed. Koeltz Scient. B., Alemania Federal. 389 pp.
6. 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.
7. 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. Parway, NC, E.U.A.
8. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (1995). *Gaceta Ecológica*. Vol. VII N°. 33.
9. Arnolds, E. 1991. Decline of Ectomycorrhizal Fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 35: 209-244.
10. Pilz, D., R. Molina y L. Liegel. 1998. Biological Productivity of Chanterelle Mushrooms in and Near the Olympic Peninsula Biosphere Reserve. *En: AMBIO Special Report 9*: 8-13.
11. Horton, T. R. and T. D. Bruns. 2001. The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking Into the Black-box. *Molecular Ecology* (10) 1855-1971.
12. Egger, K. 1995. Molecular Analysis of Ectomycorrhizal Fungal Communities. *Can. J. Bot.* 73 (Supl. 1): S1415-S1422.
13. Arnheim, N., T. White y W. E. Rainey. 1990. Application of PCR: Organismal and Population

- Biology. *BioScience* Vol. 40 No. 3: 174-182.
14. 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.
  15. 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.
  16. Dahlman M., E. Danell y J W. Spatafora. (2000). Molecular Systematics of *Craterellus*: Claddistic Analysis of Nuclear LSU rDNA Sequence Data. *Mycol. Re.* 104 (4): 388-394.
  17. Bigelow, H. E. 1978. The Cantharelloid Fungi of New England and Adjacent Areas. *Mycologia* 70: 707-756.
  18. 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.
  19. 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
  20. Brayford, D. *et al.* 1995. *Modern Techniques for the Identification of Bacteria & Filamentous Fungi.* International Mycological Institute. Gran Bretaña.