

Estudio de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear de algunas especies del género *Cantharellus* de México

Gonzalo Guevara Guerrero¹
Fortunato Garza Ocañas²

¹ Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Blvd. Emilio Portes Gil No. 1301 Pte. Ciudad Victoria, Tamaulipas, C.P. 87010, México

² Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, Carr. Nacional Km. 145, Linares 67700, Nuevo León, México

Study of the greater subunit of nuclear DNA ribosomal of some species of *Cantharellus* genus from Mexico

Abstract: The species of *Cantharellus* are of great economical and ecological importance. However, inter and intraspecific morphological variation exists. Therefore, there are taxonomic problems in some species including the type specie. A preliminary molecular taxonomic study was performed to solve this problem. The species used in this study were *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* and *Cantharellus* sp. Partial nucleotides sequences of the large subunit of the nuclear ribosomal DNA are analysed for these species.

Key words: Mexico, *Cantharellus*, nucleotide sequences, large subunit, molecular systematic, molecular markers.

Resumen: Las especies del género *Cantharellus* son de gran importancia para el mantenimiento y equilibrio de los ecosistemas forestales. 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 de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear de *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *Cantharellus* sp. para resolver este problema. Se presenta un análisis de las secuencias de nucleótidos parciales de este gen.

Palabras clave: México, *Cantharellus*, marcadores moleculares.

Received 23 February 2005; accepted 9 June 2005.

Recibido 23 de febrero 2005; aceptado 9 de junio 2005.

Introducción

Las especies del género *Cantharellus* Fr., son de gran importancia ecológica, económica y nutricional. La especie tipo, *C. cibarius* Fr. fue descrita de Europa y crece en simbiosis con árboles de importancia forestal como son los géneros: *Quercus*, *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Abies*, *Betula*, *Castanea*, *Fagus*, *Eucaliptus*, *Populus* y *Tsuga* [6-8, 15-18]. En México, algunas especies de *Cantharellus* son recolectadas con fines de alimentación y comercialización en temporadas de lluvia, principalmente en los estados del centro

Autor para correspondencia: Gonzalo Guevara
guevarag@hotmail.com

del país [19]. *C. cibarius* es la especie más común y diversa de este género [16]. Lo anterior ha ocasionado confusión taxonómica en algunas de sus especies y variedades. Existen métodos moleculares para determinar si la variación morfológica es parte de la plasticidad genética de las especies hacia su medio ambiente o si realmente son especies diferentes. Un método común es el uso de marcadores moleculares como: PCR-RFLPs. Estos consisten en el análisis de un gen o de una región del genoma e.g. el ITS (Internal Transcribed Spacer). Si la técnica no presenta suficiente resolución, la secuenciación de nucleótidos es otra alternativa. Esta técnica puede separar especies relativamente

rápido debido a su mayor resolución pero dependerá del marcador que se utilice. Marcadores muy conservados no se usan para estudios de variación interespecífica [1,9,12]. En otras investigaciones de 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 cercanamente relacionada con *Hydnum* el cual es dentado y *Clavulina* el cual es un hongo coraloide. Además, los parientes mas cercanos a estos hongos cantarelloides y clavarioides son los Gasteromycetes incluyendo a *Gastrum* [10,17]. Así mismo, en otros estudios en *Cantharellus* [6] proponen la reclasificación de *C. tubaeformis*, *C. lutescens* y *C. ignicolor* dentro del género. El uso de técnicas moleculares podría contribuir al conocimiento de *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *Cantharellus* spp., de México.

Materiales y métodos

El material fúngico estudiado proviene de los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Durango y Querétaro. Los basidiocarpos fueron recolectados en diferentes hábitats tales como bosque de coníferas, bosque de encino, bosque mesófilo de montaña y bosque mixto de pino-encino. El material herborizado estudiado está depositado en los herbarios micológicos del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria (ITCV) y Facultad de Ciencias Forestales, UANL (CFNL). Los basidiomas fueron determinados siguiendo las técnicas estándar de micología que consistió en la comparación morfológica (macro y microscópica) de los basidiomas con la descrita en la literatura especializada [2,5,13]. Las secuencias génicas se generaron a partir de basidiomas secados a temperatura ambiente para evitar daños al ADN y de un cultivo puro de *C. cibarius* aislado en medio de Melin [8] y está depositada en el cepario del laboratorio de microbiología del ITCV. Muestras del ADN y archivos

fotográficos se depositaron en el laboratorio de Ciencias Forestales de la Universidad del Estado de Oregon (OSU). Se utilizó la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una sección de aproximadamente 550 nucleótidos de esta región [3,4,10,14]. Las secuencias génicas de este análisis están disponibles a solicitud al primero de los autores. La técnica para la extracción del ADN y PCR se detallan en un trabajo previo sobre el ITS [11]. Las reacciones de secuenciación cíclica de nucleótidos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular en el Departamento de Botánica y Fitopatología de la Universidad del Estado de Oregon (EUA). Los productos de la secuenciación se visualizaron en un secuenciador de ADN automatizado marca Applied Biosystems 373A. Las secuencias génicas obtenidas fueron analizadas con el programa Blast del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para su alineación e identificación.

En la Tabla 1 se presenta la lista de las especies de *Cantharellus* secuenciadas así como su localidad, hábitat, número de colecta y herbario.

Resultados y discusión

1.- *Cantharellus cibarius*, colectado creciendo bajo encino, Laguna del Servín, Querétaro, *García 10125* (ITCV).

Número de nucleótidos 444. Los nucleótidos 1 al 525 se alinearon al 27 hasta el 557 de la secuencia reportada en el AY745708.1 que corresponde a una cepa de *C. cibarius*, según BLAST del NCBI. Una identidad de 516/532 (96%) y presentaron 8/532 gaps (1%), un promedio de 872 (bits) y un Valor de E de 0.0. Un valor de 0 para E indica que entre más cercano esté el valor de E a 0, mayor será su significancia de similitud.

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

Tabla. 1 Especies de *Cantharellus* secuenciadas.

Especie	Hábitat	Localidad	No. de colecta y Herbario
<i>Cantharellus cibarius</i>	Bosque de conífera	La Encantada, Zaragoza, Nuevo León	8219 (ITCV)
	Bosque de pino-encino	Chipinque, Garza García Nuevo León	1495 (CFNL)
		Navajos, Durango	1790 (ITCV)
	Iturbide, Nuevo León	1605 (CFNL)	
	Bosque de encino	Laguna del Servín Querétaro	10125 (ITCV)
<i>C. cibarius</i> (cultivo puro aislado de basidioma)		El Madroño, Mpio. de Victoria, Tamaulipas	783 (ITCV) 104 (ITCV) 814 (ITCV)
<i>C. cibarius</i> (escamoso) <i>Cantharellus minor</i>	Bosque mesófilo de montaña	San José, camino al vivero, Mpio. de Gómez Farías, Tamaulipas	771 (ITCV) 811 (ITCV)
<i>Cantharellus</i> sp.	Bosque de encino	El Madroño, Mpio. de Victoria, Tamaulipas	796 (ITCV) 805 (ITCV)
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Bosque mesófilo de montaña	San José, camino al vivero, Mpio. de Gómez Farías, Tamaulipas	812 (ITCV) N/N (ITCV)

Tamaulipas, *Guevara 104* (ITCV)

Número de nucleótidos 522. Los nucleótidos 2 al 402 de la secuencia reportada se alinearon con los nucleótidos 16 hasta el 420 respectivamente Promedio de bits 664, un valor de E de 0.0. Una identidad de 391/405 (96%) y 4/405 gaps (0%).

3.- *C. cibarius*, colectado bajo bosque mixto de pino-encino, Chipinque, Nuevo León, *Guevara 1495* (FCF).

Número de nucleótidos 575. Los nucleótidos 55 al 556 de las secuencias reportadas se alinearon con los nucleótidos 1 al 507 reportadas en el No. de acceso AY041167.1 del NCBI el cual corresponde a un *Cantharellus* sp. Presentó una identidad de 488/507 (96%) y 5/507 gaps (0%). un score (bits) 852 y un E=0.0.

4.- *C. cibarius*, colectado bajo encino, Municipio de Iturbide, Nuevo León, *Marmolejo 1605* (FCF).

Número de nucleótidos 575. Los nucleótidos 59 al 512 de la secuencia reportada se alinearon con los nucleótidos 1 al 461 reportadas en el banco de genes (AY041167.1) de acuerdo a Blast, el cual corresponde a un

Cantharellus sp. Presentó una identidad de 441/462 (95%) y 4/462 gaps (1%), un score (bits) de 694 y un E=0.0.

5.- *C. cibarius*, colectado bajo pino-encino, de la localidad Navajos, Durango, *García 1790* (ITCV).

Número de nucleótidos 522. Los nucleótidos 19 al 431 se alinearon con los nucleótidos 1 hasta el 417 en las reportadas en el banco de genes, (AY041167.1), el cual corresponde a un *Cantharellus* sp. Así mismo, presentó una identidad de 406/417 (97%) y 4/417 gaps (0%), un score (bits) de 710 y un E=0.0.

6.- *C. Minor*, colectado en un bosque mesófilo de montaña bajo *Quercus* sp., San José, camino al vivero, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas, *Guevara 771* (ITCV).

Número de nucleótidos es de 543 nucleótidos. Los nucleótidos 6 al 459 de esta secuencia se alinearon con los nucleótidos 4 al 461 de *Cantharellus garnierii*. reportadas en gen bank (AY392767) Así mismo, la alineación presentó una identidad de 437/458 (95%) y 4/458 gaps (0%), un score de 712 (bits) y un E=0.0.

7.- *C. cibarius*, colectado en un bosque de encino, El

Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas, *Guevara 783* (ITCV).

Número de nucleótidos 560. Los nucleótidos 6 al 543 se alinearon con los nucleótidos 1 al el 545 de las reportadas en el banco de genes, (AF287880.1), el cual corresponde a un *Peniophora nuda*. Así mismo, la alineación presentó una identidad de 532/535 (95%) y 7/545 gaps (0%), un score (bits) de 930 y un E=0.0.

Cabe señalar que mas estudios son necesarios para concluir sobre esta secuencia.

8.- *Cantharellus* sp. colectado en un bosque de encino, El Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas, *Guevara 796* (ITCV).

Número de nucleótidos 581. Los nucleótidos 102 hasta el 552 se alinearon con los nucleótidos 456 al 1 de las reportadas para *C. cibarius*, (AY745708.1). Asimismo, la alineación presentó una identidad de 437/456 (95%) y 4/456 gaps (1%), un score (bits) de 718 y un E=0.0.

9.- *Cantharellus* sp. colectado en un bosque de encino, el Madroño, Municipio de Victoria, Tamaulipas, *Guevara 805* (ITCV)

Número de nucleótidos 548. Los nucleótido 17 al 530 de esta secuencia coincidieron con los nucleótidos 1 al 512 (AY041166.1) el cual corresponde a *C. formosus*. Además, la alineación presentó una identidad de 488/521

(93%) y 16/521 gaps (3%), un score (bits) de 720 y un E=0.0.

10.- *Cantharellus minor*, colectado en un bosque mesófilo de montaña, bajo encino, camino San José-al vivero, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas, *Guevara 811*(ITCV).

Número de nucleótidos 559 Los nucleótido 47 al 409 de esta secuencia coincidieron con los nucleótidos 1 al 368 reportadas para *C. garnierii* (AY392767.1) La alineación presentó una identidad de 339/368 (92%) y 5/368 gaps (1%), un score (bits) de 486 y un E=-134.

11.- *C. cinnabarinus*, colectado en un bosque mesófilo de montaña bajo encino, camino San José- el vivero, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas, *Guevara 812* (ITCV).

Número de nucleótidos 523. Los nucleótidos 6 al 405 de esta secuencia coincidieron con los nucleótidos 4 al 405 reportadas para *C. garnierii* (AY392767.1) Además, la alineación presentó una identidad de 387/402 (96%) y 2/402 gaps (0%), un score (bits) de 662 y un E=0.0. Sin embargo, el segundo en la alineación fue *C. cinnabarinus* presentando 654 bits y E=0.0. (AY041168.1).

12.- *C. cibarius* (píleo escamoso), colectado en bosque mesófilo de montaña, camino San José-el vivero, Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas, *Guevara 814* (ITCV).

Número de nucleótidos 551. Los nucleótido 5 al 443 de esta secuencia coincidieron con los nucleótidos 19 al 458 reportados para una cepa de *C. cibarius* (AY745708.1)

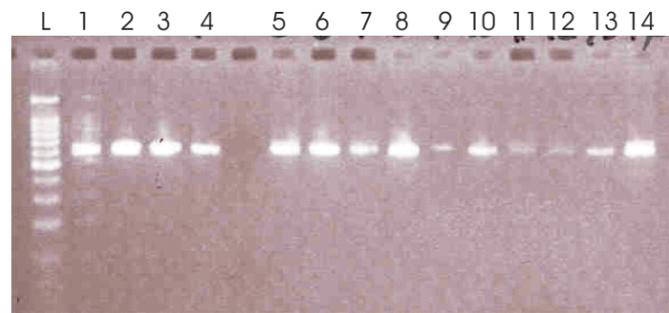


Figura 1. Amplificación de la subunidad mayor (usando los primers LROR y LR 3) del ADN ribosomal nuclear de catorce colectas incluyendo un cultivo puro de *C. cibarius*. L es un marcador estándar de 100 pares de bases. *Cantharellus cinnabarinus* (Tamaulipas) líneas 1 y 6; *Cantharellus* sp. (Tamaulipas) líneas 2, 3 y 4; *C. minor* (Tamaulipas) líneas 5 y 14; *C. cibarius* líneas 7 (Querétaro), 9 (Tamaulipas), 10 (Durango), 11,12 y 13 (Nuevo León), cultivo puro de *C. cibarius* (Tamaulipas) línea 8.

Además, la alineación presentó una identidad de 432/440 (98%) y 1/440 gaps (0%), un score (bits) de 803 y un E=0.0.

13.- *C. cinnabarinus*, colectado en bosque mesófilo de montaña, bajo encino, San José Municipio de Gómez Farías, Tamaulipas, S.N. (ITCV).

Número de nucleótidos 554. Los nucleótidos 37 al 543 de esta secuencia coincidieron con los nucleótidos 1 al 512 reportadas para *C. cinnabarinus* (AY041168.1). Además, la alineación presentó una identidad de 504/512 (98%) y 5/502 gaps (0%), un score (bits) de 912 y un E=0.0.

Discusión

La amplificación de la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear de las morfoespecies *C. cibarius*, *C. minor*, *C. cinnabarinus* y *Cantharellus* sp. se puede observar en la figura 1. En un estudio molecular previo en las especies de *Cantharellus* de diferentes regiones y ecosistemas de México, se analizó el ITS mediante RFLPs para analizar la variación génica inter e intraespecífica del género considerando estos aspectos biogeográficos, sin embargo, la técnica no ofreció suficiente resolución para separar las especies ni diferencias intraespecíficas en *C. cibarius* [11]. La secuenciación de nucleótidos presentó mayor resolución y permitió observar variación inter e intra específica en los hongos estudiados sin embargo, no fue contundente. Desde el punto de vista fenético (similitud total) los resultados del análisis del gen estudiado (550 nucleótidos en promedio) demostraron que 3 de las 7 colectas determinadas morfológicamente como *C. cibarius* provenientes de diferentes ecosistemas (hábitats), correspondieron en su alineación con la especie, 3 coincidieron con *Cantharellus* sp. (dos colectas provienen de bosque de encino y una de pino-encino) y 1 con *Peniophora nuda*. Similarmente, las secuencias génicas del cultivo puro de *C. cibarius* coincidieron con la misma. Así mismo, los 2 *Cantharellus* sp. estudiados se alinearon con *C. formosus* y *C.*

cibarius. Además, 2 colectas de la morfoespecie *C. minor* coincidieron con *C. garnierii* en sus secuencias génicas. Finalmente, 2 colectas de *C. cinnabarinus* alinearon en sus secuencias con *C. cinnabarinus* y *C. garnierii*. Por otro lado, es importante señalar que se requieren más estudios para concluir sobre la variación intraespecífica de *C. cibarius* provenientes de diferentes hábitats (principalmente del bosque de encino o pino-encino) y que se alinearon con *Cantharellus* sp. Un análisis cladístico de las secuencias estudiadas más la secuenciación de *C. cibarius* proveniente de Europa son necesarios para corroborar las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas.

Conclusión

De acuerdo a los resultados del análisis de los 550 nucleótidos del gen de la subunidad mayor del ADN ribosomal y tomando en cuenta la similitud entre pares de bases de las especies de *Cantharellus* estudiadas, *C. cibarius*, *C. cinnabarinus*, *C. formosus*, *C. garnierii* y varios *Cantharellus* sp. están presentes en México.

Agradecimientos

El primero de los autores agradece al COSNET y al CONACYT el apoyo económico otorgado para llevar a cabo esta investigación. Así mismo se agradece a los Drs. Efrén Cázares, Joseph Spatafora, David Pilz, Randy Molina y Juan Flores Gracia de la Universidad de Oregon y del ITCV y a los evaluadores anónimos de este trabajo.

Literatura citada

1. Arnheim, N., T. White, W. E. Rainey, 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *BioScience* Vbl. 40 No. 3: 174-182.

2. Bigelow, H. E., 1978. The cantharelloid fungi of New England and adjacent areas. *Mycologia* 70: 707-756.
3. Brayford, D. 1995. Modern Techniques for the identification of bacteria & filamentous fungi. International Mycological Institute. Gran Bretaña.
4. Bruns, T. D., R. Fogel, J. W. Taylor. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175-184
5. Corner, E. J. H. 1966. A monograph of cantharelloid fungi. Oxford University Press. Oxford.
6. Dahlman M., E. Danell, J W. Spatafora, 2000. Molecular systematics of *Craterellus*: claddistic analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 104: 388-394.
7. Danell, E. 1994. Formation and growth of the ectomycorrhiza of *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 5: 89-97.
8. Danell, E., N. Fries. 1990. Methods for isolation of *Cantharellus* species and the synthesis of ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon* 38: 141-148.
9. Egger, K. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal Botany* 73 (Supl. 1): S1415-S1422.
10. Feibelman, T., P. Bayman, W. G Cibula, 1994. Length variation in the internal transcribed spacer of ribosomal DNA in Chanterelles. *Mycological Research* 98 (6): 614-618.
11. Guevara, G., F. Garza, E. Cázares, 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL* 7: 371-378.
12. Horton, T. R., T. D. Bruns, 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 19: 1855-1971.
13. Larget, D. L., D. Johnson, R. Watling, 1977. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Mad River. 147 pp.
14. Lee, S. B., J. W. Taylor, 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols, A guide for methods and applications. 282-287. Eds. Michael A. Innis *et al.* Academic Press, Nueva York.
15. Molina, R., H. Massicotte, J. M. Trappe, 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. 357-423. In: mycorrhizal functioning (an integrative plant-fungal process). Ed. M.F. Allen. Chapman & Hall, Nueva York.
16. Pilz, D., R. Molina, L. Liegel. 1998. Biological productivity of chanterelle mushrooms in and near the Olympic Peninsula Biosphere Reserve. *AMBIO Special Report* 9: 8-13.
17. Pine, E. M., D. S. Hibbett, M. J. Donoghue. 1999. Phylogenetic relationship of cantharelloid and clavarioid homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia* 91: 944-963.
18. Trappe, J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606.
20. Villarreal, L., A. Gómez. 1997. Inventory and monitoring wild mushrooms in Mexico: challenge and opportunity for sustainable development. 99-109. In: M.E. Palm e I.H. Chapela. *Mycology in sustainable development: expanding concepts, Vanishing Borders*. Parway.