



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Generación de un marcador molecular tipo
PCR-RFLP de *Suillus brevipes* e *Inocybe
splendens***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yeny Meza Meneses

Codirectoras:

Dra. Alba Mónica Montiel González

M. en C. Gema L. Galindo Flores

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2013



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Generación de un marcador molecular tipo
PCR-RFLP de *Suillus brevipes* e *Inocybe
splendens***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yeny Meza Meneses

Comité Tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González
M. en C. Gema L. Galindo Flores
Dr. Alejandro Alarcón
Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2013

HOJA DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto se realizó con apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la codirección de la M. en C. Gema L. Galindo-Flores y la Dra. Alba Mónica Montiel González, en el laboratorio de Micorrizas y el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03)



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Yeny Meza Meneses** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "**Generación de un marcador molecular tipo PCR-RFLP de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens***".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

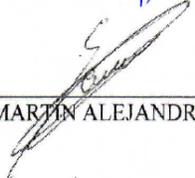
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 19 DE 2013


M. EN C. GEMA LILIA GALINDO FLORES


DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ


DR. ALEJANDRO ALARCÓN


DR. ARTURO ESTRADA TORRES


DR. MARTÍN ALEJANDRO SERRANO MENESES



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorga para realizar los estudios de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biológicas, con el número de registro: 419626 y número de beca: 261813.

A mi comité tutorial, M. en C. Gema L. Galindo-Flores, Dra. Alba Mónica Montiel González, Dr. Arturo Estrada-Torres, y al Dr. Dr. Alejandro Alarcón por su tiempo, sus valiosos comentarios y por el conocimiento aportado durante la revisión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la M. en C. Gema L. Galindo por darme la oportunidad de trabajar con ella, por sus valiosos conocimientos, por su tiempo y sus comentarios que me sirvieron para seguir adelante en esta etapa.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González por su apoyo y conocimientos en la realización de la tesis.

Al Dr. Arturo Estrada-Torres por participar con su asesoría, sus conocimientos compartidos y su tiempo.

Al Dr. Dr. Alejandro Alarcón por sus comentarios y tiempo en la revisión de la tesis.

A una gran amiga, Altayra Quiroz Lucas por amistad, su cariño, su apoyo en el momento más importante de mi vida.

A mis amigos de siempre, Nancy, Edith y José Luis por el apoyo moral, experiencias y lo vivido durante tanto tiempo.

A todas aquellas personas que conocí y que de alguna forma influyeron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS por darme el regalo más grande “LA VIDA”, y con ello a los seres que han sido de gran importancia en mí camino, que no ha sido fácil, pero que a pesar de los obstáculos siempre he salido adelante.

A mis padres: Hugo Meza Téllez y Delfina Meneses Ramírez, por su amor, por sus consejos, por todo su apoyo en esta etapa de mi vida.

A mi pequeño Dylan que ha llegado a iluminar mi vida, la personita q hace q cada esfuerzo valga la pena, el que alegra mis días y mis noches, el mejor regalo q m ha dado la vida.

A mis hermanas Mariela Meza Meneses y Lucero Meza Meneses por su cariño, apoyo incondicional y motivación a seguir adelante.

A mi sobrino “H” que siendo tan pequeñito me enseñó a luchar contra las adversidad.

Y sobre todo a una personita muy especial, que me ha estado conmigo en las buenas y en las malas, que me ha brindado su apoyo y su amor, que me ha demostrado que no hay obstáculos que pueda detenerme, muchas gracias, Rubén Alfredo Hernández Sánchez.

Gracias por ser parte de mi vida.

RESUMEN

Los hongos ectomicorrizógenos (HECM) tienen un papel importante en los ecosistemas forestales para el establecimiento y mantenimiento de los bosques templados. Debido a los amplios beneficios que a nivel ecológico y fisiológico obtienen las plantas al formar asociaciones micorrízicas, se han realizado estudios para conocer la diversidad de HECM mediante las técnicas moleculares basadas en el estudio del ADN que combina la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), para identificar a los hongos. En este trabajo se generaron los marcadores moleculares tipo PCR-RFLP de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*. Se realizó la extracción de ADN de las muestras de esporomas y micelio utilizando el protocolo de fenol-CIA, y se amplificó la región ITS del rDNA usando los primers ITS1F e ITS4. Los amplicones se secuenciaron y las secuencias fueron comparadas con las de la base de datos de NCBI mediante BLAST. Los RFLP se generaron mediante la digestión de los fragmentos ITS con las enzimas de restricción *AluI*, *HinfI*, *BsuRI* y *EcoRI*. Los amplicones y RFLP se verificaron con electroforesis de geles de agarosa al 1.5% y 2%. En nuestro estudio, obtuvimos 2 amplicones para *Suillus brevipes* el amplicón 1 de 700 pb y el amplicón 2 de 600 pb. El análisis del amplicón 1 presentó 96% de similitud con *S. pseudobrevipes*; y los patrones de bandeo de dicho amplicón generaron bandas de 600 y 100 pb con *AluI*, de 270, 230 y 200 pb con *HinfI* y de 490, 190 y 100 pb con *BsuR*. Para *I. splendens* se obtuvo un amplicón de 600 pb y 99 % de similitud con una especie de *Dothideomycete*, debido al resultado obtenido se optó por no utilizar dicha información, ya que no corresponde con la especie de HECM que se tiene caracterizada. En cuanto a *S. glandulosipes* se obtuvo un amplicón de 780 pb con 77% de similitud con *S. pungens*, a pesar del bajo porcentaje observado es la única especie a la que más se parece la secuencia. Estos resultados pueden estar indicando que las especies de este estudio y que han sido recolectadas en México pueden corresponder con especies no descritas aún. Por otro lado, los perfiles que se obtuvieron fueron de 650 y 130 pb con *AluI*, de 250, 200, 150, 100 y 80 pb con *HinfI* y de 490, 190 y 100 pb con *BsuRI*. Finalmente, el amplicón para *I. dulcamara* fue de 850 pb; el análisis presentó 92% de similitud con *I. dulcamara* y los patrones de

bandeo generados fueron de 380, 270 y 200 pb con *AluI*, de 650 y 130 pb *BsuRI*, y de 460 y 390 pb para *EcoRI*. Dichos perfiles, al ser diferentes para cada especie probada, dan evidencia de que los marcadores de este tipo son adecuados para la determinación de la especie de este grupo de hongos, aunque es necesario confirmar que sea reproducible con ejemplares de la misma especie.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Concepto de micorriza	1
1.2. La ectomicorriza	1
1.3. Marcadores moleculares	3
1.4. Espacios intergénicos	4
1.5. Reacción en cadena de la polimerasa	6
1.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1. Estudios de hongos ectomicorrizógenos	9
2.2. Importancia de los HECM en estudio	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
5. OBJETIVOS	15
5.1. Objetivo general	15
5.2. Objetivos específicos	15
6. METODOLOGÍA	16
6.1. Elección de los hongos ectomicorrizógenos de estudio	16
6.1.1. Esporomas	16
6.1.2. Cultivo para obtención de micelio	16
6.2. Amplificación de la región ITS del rADN	17
6.2.1. Extracción de ADN	17
6.2.2. Selección de los primers	18
6.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa	18
6.2.4. Electroforesis y recuperación de los ITS	19
6.2.5. Secuenciación	19
6.2.6. Análisis en BLAST	19
6.3. Obtención de los PCR-RFLP	20
6.3.1. Selección de las enzimas de restricción	20
6.3.2. Digestiones totales	20
6.3.3. Análisis de los patrones de bandeo de los RFLP's	20
6.4. Simulación de restricción con secuencias de base de datos	20
7. RESULTADOS	21
7.1. Hongos ectomicorrizógenos	21
7.2. Obtención de micelios: Reactivación de cepas	21
7.3. Identificación molecular de las especies de estudio	23
7.3.1. <i>Suillus brevipes</i>	23
7.3.2. <i>Inocybe splendens</i>	26
7.3.3. <i>Suillus glandulosipes</i>	29

7.3.4. <i>Inocybe dulcamara</i>	32
7.4. Generación de marcadores de tipo PCR-RFLP's utilizando la región ITS del rADN de las especies de HECM	35
7.4.1. Digestiones totales y perfiles de bandeo	35
7.4.2. <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i>	35
7.4.3. <i>Suillus</i> aff. <i>pungens</i>	36
7.4.4. <i>Inocybe</i> aff. <i>dulcamara</i>	36
7.5. Simulación de restricción con secuencias de base de datos	37
7.5.1. <i>Suillus</i>	37
7.5.2. <i>Inocybe</i>	39
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	45
10. PERSPECTIVAS	47
11. LITERATURA CITADA	49
12. PUBLICACIONES	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. a) Beneficios hongo-planta y b) Estructuras de la ectomicorriza (Tomando y modificado de Pérez-Moreno y cols. 2011)	2
Fig. 2. Genes ribosomales y espacios intergénicos (Tomado y modificado de Rodríguez-Tovar 2004)	5
Fig. 3. Reacción en cadena de la polimerasa	6
Fig. 4. Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción	7
Fig. 5. Hongos ectomicorrizógenos seleccionados: a) <i>Suillus brevipes</i> , b) <i>Inocybe splendens</i> , c) <i>Suillus</i> aff. <i>glandulosipes</i> , d) <i>Inocybe dulcamara</i>	21
Fig. 6. Resiembras de cepas en medio sólido BAF: a) <i>Suillus brevipes</i> , b) <i>Inocybe splendens</i>	22
Fig. 7. Cultivo de las cepas en medio líquido BAF	22
Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de la región ITS del rDNA a) extraído de esporoma de <i>Suillus brevipes</i> (carril 3). Marcador λPst I (carril 1) b) extraído de micelio (carril 3)	23
Fig. 9. Alineamiento de las secuencias de <i>Suillus brevipes</i> en BLAST	25
Fig. 10. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA de <i>Inocybe splendens</i> a) extraído de micelio (carril 2); b) extraído de esporoma. Marcador λPst I (carril 1)	26
Fig. 11. Alineamiento de la secuencia de <i>Inocybe splendens</i> en BLAST	28
Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA extraído de esporoma de <i>Suillus glandulosipes</i> (carril 4). Marcador λPst I (carril 1)	29
Fig. 13. Alineamiento de la secuencia de <i>Suillus glandulosipes</i> en BLAST	31
Fig. 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA extraído de esporoma de <i>Inocybe dulcamara</i> (carril 3). Marcador λPst I (carril 1)	32
Fig. 15. Alineamiento de la secuencia de <i>Inocybe dulcamara</i> en BLAST	34
Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i> (esporoma) con las enzimas de restricción <i>AluI</i> (carril 3), <i>HinfI</i> (carril 5) y <i>BsuRI</i> (<i>Hae</i> III) (carril 7)	35
Fig. 17. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de <i>Suillus</i> aff. <i>pungens</i> con las enzimas de restricción <i>AluI</i> (carril 2), (carril 4) y <i>BsuRI</i> (<i>Hae</i> III) (carril 6).	36
Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de <i>Inocybe</i> aff. <i>dulcamara</i> con las enzimas de restricción <i>AluI</i> (carril 2), <i>BsuRI</i> (<i>Hae</i> III) (carril 4) y <i>EcoRI</i> (carril 6)	37

ÍNDICE DE SECUENCIAS

Secuencia 1. Secuencia del amplicón 1 de <i>Suillus brevipes</i>	24
Secuencia 2. Secuencia del amplicón de micelio de <i>Inocybe splendens</i>	27
Secuencia 3. Secuencia del amplicón de <i>Suillus glandulosipes</i>	30
Secuencia 4. Secuencia del amplicón de <i>Inocybe dulcamara</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de bandeo de <i>Suillus</i>	38
Tabla 2. Patrones de bandeo de <i>Inocybe</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de micorriza

En la naturaleza, las raíces de la mayoría de las plantas se encuentran colonizadas por hongos que forman una asociación mutualista denominada micorriza, la cual tiene un papel crucial en la captura de nutrimentos del suelo. El término micorriza significa literalmente hongo-raíz y fue utilizado para describir la asociación entre ciertos hongos del suelo y algunos árboles (Sylvia 1999). Esta asociación constituye uno de los mecanismos desarrollados por las plantas para competir por nutrimentos en un ecosistema (Pate 1994) y se establece entre plantas tanto no vasculares como vasculares y ciertos grupos de hongos que colonizan el tejido cortical de los rizoides y las raíces durante los periodos de crecimiento vegetal activo.

1.2. La ectomicorriza

Existen varios tipos de micorrizas; particularmente, la ectomicorriza es una de las asociaciones micorrízicas más importantes debido a que es primordial en el mantenimiento de los ecosistemas forestales. La ectomicorriza se establece entre ciertos grupos de hongos del suelo, principalmente basidiomicetos, y algunas plantas que pertenecen a varias familias de coníferas y dicotiledóneas. Las raíces micorrizadas poseen una cubierta compacta de micelio que rodea la raíz de las plantas llamado manto, algunas hifas penetran entre las células corticales o epidérmicas de la raíz, formando la Red de Hartig (Nava y Hernández 2003).

Este tipo de micorriza se desarrolla principalmente en las áreas de clima templado y frío o de montaña, en los bosques de coníferas, de encino y mesófilos en varias partes de México (Kong-Luz 2003). Los hongos ectomicorrizógenos (HECM) son un grupo clave funcional en los ecosistemas forestales ya que mejoran la adquisición de nutrientes esenciales, principalmente nitrógeno, fósforo y agua (Walker y cols. 2005); dan protección contra patógenos y proporcionan a la planta mayor tolerancia al estrés ambiental (Fig. 1), determinando en gran medida la conservación y el mantenimiento ecológico de las comunidades forestales (Boyd y cols. 1986, Pennanen y cols. 2005).

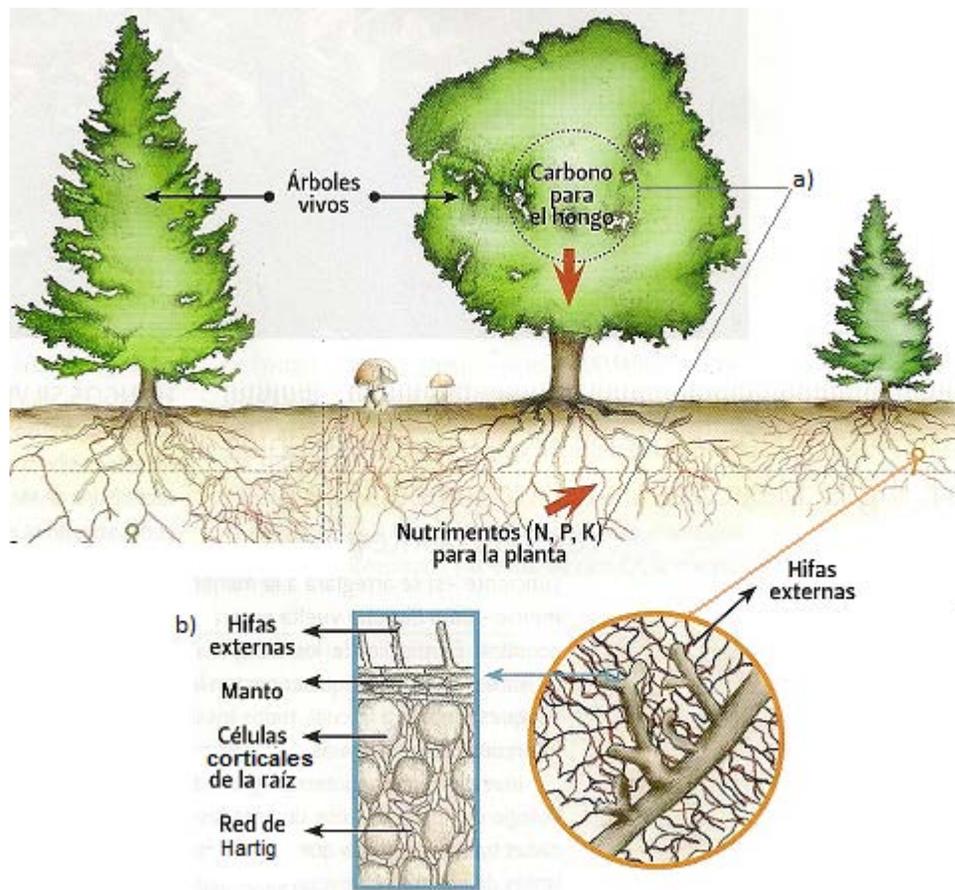


Figura 1. a) Beneficios hongo-planta y b) Estructuras de la ectomicorriza (Tomando y modificado de Pérez-Moreno y cols. 2011).

La composición de especies de HECM es variable durante el desarrollo de un bosque, algunas especies son características de bosques jóvenes y otras de bosques maduros; la sucesión de estos hongos está dada por la etapa de desarrollo de la planta en la que se asocian (Arnolds 1991, Deacon y Fleming 1992). Según Bowen (1994) los HECM pueden ser considerados de etapas tempranas cuando la germinación de sus esporas es estimulada por las raíces de las plantas, estos hongos se asocian en las primeras etapas de vida de las plántulas y conforme alcanzan su madurez son reemplazados por especies de etapas tardías. Especies de los géneros *Suillus*, *Inocybe*, *Hebeloma*, *Laccaria*, y *Thelephora* son considerados simbiosiontes de etapas tempranas (Dighton y Mason 1985, Alvarado 2008). Estas clasificaciones han sido posibles

gracias a la determinación de las especies, sin embargo no en todas las condiciones es esto posible, al menos en lo que respecta a la caracterización morfológica.

1.3. Marcadores moleculares

Para evaluar la biodiversidad de los hongos primero es necesario hacer la identificación de los esporomas y posteriormente de sus micelios cultivados *in vitro*, tratando de aproximarnos lo más posible a la especie. Por lo general, la identificación de HECM se basa principalmente en análisis morfológicos de los distintos tipos de micorriza formada en las raíces colonizadas del fitobionte, sin embargo, la caracterización morfológica tiene la desventaja de que los morfotipos sólo permiten reconocer a los hongos asociados a nivel de género. Ante esta problemática, recientemente se han implementado las técnicas de biología molecular, que permiten identificar a las especies de hongos que se encuentran formando las micorrizas en las raíces de las plantas hospederas (Castellano y Bougher 1993).

Actualmente existen varias metodologías en el ámbito molecular que permiten conocer la estructura, dinámica y variabilidad genética de la población fúngica de HECM en su hábitat, mediante la generación de marcadores genéticos para la identificación de los organismos. Básicamente la diferencia consiste en el nivel de identificación al que se puede llegar con su aplicación (género, especie, cepa). No obstante, en todos los casos, la circunscripción del objeto de estudio puede ser determinante en la elección del método a utilizar para un buen análisis de los resultados. Algunas herramientas útiles para el estudio de las comunidades de HECM implican, por ejemplo, el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos generados por restricción (RFLP) de regiones génicas específicas seleccionadas por la información que pueden dar respecto a las variaciones inter específicas de los organismos o el análisis de los amplicones de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y la obtención al azar del ADN polimórfico (RAPDS). Como es una metodología que requiere de grandes cantidades de ADN durante su desarrollo, se realiza una amplificación sintética de las regiones de estudio por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permiten tener la cantidad suficiente de un fragmento de ADN para que se pueda secuenciar. Finalmente, el análisis culmina al realizar la comparación con secuencias de la misma región depositadas en

una base de datos, de preferencia de orden mundial (GeneBank, IBOLD, etc.), que permita identificar al grupo de hongos (Gardes y cols. 1991, Henrion y cols. 1992, Bruns y Gardes 1993).

Algunas de las regiones preferidas para la identificación han sido regiones hipervariables del rDNA (ITS o espacio transcrito interno e IGS o espacios intergénicos, LSU o subunidad grande ribosomal y SSU o subunidad pequeña ribosomal). El rADN puede encontrarse en mitocondrias, cloroplastos y núcleo y contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El rADN se presenta en repeticiones en tándem (unidades repetidas una junto a la otra) y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18S, 5.8S y 28S), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos de recombinación como entrecruzamiento desigual o conversión génica. Estas secuencias, por la baja tasa de sustitución que presentan, son extremadamente útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Hillis y Dixon 1991).

1.4. Espacios intergénicos

La mayor parte de la ecología molecular de HECM ha involucrado análisis de restricción del espaciado transcrito interno (ITS). Esta región nuclear, conocida en ecología molecular y sistemática de hongos, se encuentra entre la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) de los genes que codifican para el rARN y contiene dos regiones espaciadoras no codificantes separadas por el gen 5.8S que codifica para el rARN. En los hongos, este fragmento suele tener un tamaño de aproximadamente 650-900 pb, incluyendo al gen 5.8S (Fig 2). Por lo general, se amplifica con el par de primers universales ITS1 e ITS4 (Gardes y cols. 1991), o con primers específicos para hongos o basidiomicetos (ITS1f e ITS4 o ITS1f e ITS4b, respectivamente; Gardes y Bruns 1993).

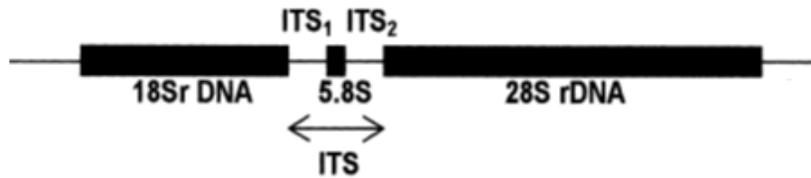


Fig. 2. Genes ribosomales y espacios intergénicos (Tomado y modificado de Rodríguez-Tovar 2004).

Los genes ribosomales y sus espacios intergénicos, tienen muchas ventajas: tienen una organización conservada en el genoma de todos los eucariontes y su presencia está en unidades repetidas una junto a la otra (Débaud y cols. 1999); tienen un gran número de copias, lo que facilita su amplificación (van Tuinen y cols. 1999).

Además contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S), lo que ha permitido un fácil diseño de iniciadores (Gardes y Bruns 1993); y estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencias, debido a eliminaciones e inserciones; son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo (Gardes y cols. 1991, Gardes y Bruns 1993, Henrion y cols. 1994, Martín y cols. 1998b).

Las regiones más divergentes de los genes ribosomales son los espaciadores intergénicos transcritos (ITS). La variabilidad de la secuencia observada en las dos regiones ITS de los genes ribosomales que separan la subunidad ribosomal pequeña 5.8 de la subunidad ribosomal grande 25S, ha sido determinante para distinguir un hongo de otro. La mayoría de los estudios de ecología molecular de los HECM se ha hecho restringiendo las regiones ITS que están separadas por el gen ribosomal 5.8S. Es claro que en estas metodologías es necesario contar con el recurso de la secuenciación de los fragmentos obtenidos, para poder realizar las identificaciones. Sin embargo, es igualmente válido el contar con una huella de cada especie que ayude a determinar su identidad, sin tener que llegar hasta la secuenciación de los fragmentos, basándose en un patrón de bandeo (Rodríguez-Tovar y cols. 2004).

1.5. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es una herramienta que contribuye a la realización de objetivos tales como la caracterización molecular de hongos simbioses, gracias a la amplificación de secuencias específicas. La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN desde un pequeño número de células fúngicas, de una sola espora, o aún más, de material de herbario seco, incluyendo especímenes que están extintos. Además, permite la amplificación de los fragmentos del rADN en la mayoría de los hongos, conduciendo al desarrollo de los estudios taxonómicos y filogenéticos intra e interespecíficos (Gardes y Bruns 1993).

La ventaja de la PCR es su propiedad de producir millones de copias de un segmento de ADN particular con alta fidelidad. En esta técnica la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas sometiéndola a temperaturas mayores a 92 °C, después se hibridan o alinean con primers complementarios, los cuales deben ser diseñados de tal manera que sólo hibriden con el ADN del microorganismo que se desee y su tamaño generalmente es de 18 a 25 bases. Una vez que los iniciadores están unidos a las cadenas complementarias se adiciona a la reacción una ADN polimerasa la cual va a formar la nueva cadena tomando como bases la cadena sencilla y uno de los extremos del iniciador. Después de este primer ciclo, si se partió de una sola cadena doble de ADN se tendrían dos cadenas dobles. Esta amplificación se incrementa en forma geométrica a medida que se repite el número de ciclos, así después de dos ciclos tendríamos cuatro cadenas dobles de ADN, y después de tres, ocho y así sucesivamente (Fig. 3), después de treinta ciclos tendríamos una gran cantidad de ADN amplificado para ser visualizado (Louie y cols. 2000).

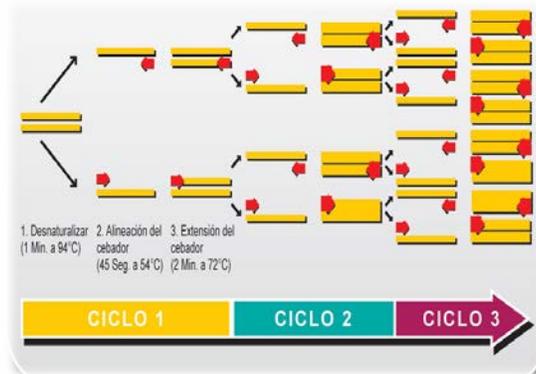


Fig. 3. Reacción en cadena de la polimerasa (Tomado de www.fitolab.com.mx)

1.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El análisis de los RFLP's expresa diferencias específicas del ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas), cada una de las endonucleasas, reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN (Fig. 4). Por consiguiente cualquier ADN puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de estos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl 2000). Los RFLP's de los hongos ectomicorrizógenos en asociación con la planta hospedera han sido analizados con un par de iniciadores (IST1F e IST4) descritos por Bruns y Gardes (1993); estos iniciadores fueron diseñados para amplificar el gen 5.8S y las regiones ITS de los basidiomicetos. La variabilidad inter-especie del ITS1 y el ITS2, ha sido especialmente estudiada para establecer marcadores para la identificación de las especies de hongos.

La técnica acoplada conocida como PCR-RFLP consiste consecuentemente, en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN y la posterior digestión de los amplicones con endonucleasas de restricción para obtener patrones de bandas y así detectar polimorfismo en las regiones de ADN que se ha amplificado con primers específicos. Está técnica ha sido utilizada con éxito para analizar las regiones del rADN de los HEM (Gardes y cols. 1991, Erland y cols. 1994, Henrion y cols. 1994, Farmer y Sylvia 1998, Gomes y cols. 1999, Glen y cols. 2001) y poder determinar su identidad a nivel de especie.

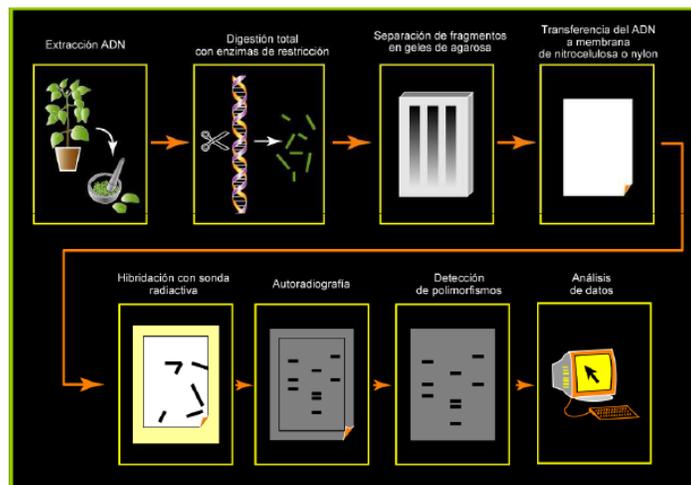


Fig. 4. Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (Tomado de Hopp 2010).

Dentro de las principales ventajas que presentan los RFLP son las siguientes: se requieren cantidades mínimas de ADN, es una metodología sumamente sólida, recomendable para el análisis filogenético de especies emparentadas porque se basan en la homología de las secuencias, poder discriminatorio, tanto a nivel de especie o de población, como a nivel de individuo. Sin embargo, esta técnica tienen algunas desventajas, entre ellas: se necesitan disponer de una genoteca de sondas apropiadas y requieren la distribución de sondas a los laboratorios colaboradores (Horton 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios de hongos ectomicorrizógenos

Los HECM, seleccionados, caracterizados y probados, que son utilizados para la inoculación de plantas en vivero y que se destinan a sitios en campo, por ejemplo para su reforestación, podrían ser desplazados debido a la competencia con los hongos presentes en la rizósfera, haciendo difícil concluir respecto a la efectividad del tratamiento realizado con las especies selectas y aletargando la aplicación de procedimientos remediales. Desafortunadamente, la identificación morfológica de la micorriza no es suficiente para distinguir a la especie inoculada de las existentes en la rizósfera, por lo que el seguimiento de los HECM debe evaluarse mediante el empleo de marcadores moleculares (Weber y cols. 2002).

Los marcadores moleculares implementados con la PCR son herramientas potencialmente específicas para el seguimiento de los HECM a nivel de especie. Por ejemplo, los primers específicos diseñados a partir de los espacios transcritos internos (ITS) de genes del rRNA y la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) fueron utilizados para identificar especies de *Tuber* en etapas vegetativas y reproductivas (Amicucci y cols. 1998, Bertini y cols. 1998, Mello y cols. 1999).

En este contexto, Gomes y cols. (2002) evaluaron la variación inter e intraespecífica de 26 aislamientos de HECM pertenecientes a 8 géneros y 19 especies mediante el análisis de la región ITS del rADN utilizando los RFLP. Para la amplificación utilizaron el par de primers ITS1 e ITS4 y para los RFLP's las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* y *HpaII*, reportando que los tamaños de la región amplificada estuvieron entre 560 y 750 pb para todos los aislamientos. Los fragmentos amplificados con las enzimas de restricción revelaron polimorfismo extenso y lograron identificar a un mayor número de especies, generando un patrón de bandeo para *Suillus brevipes*. Concluyeron que el análisis de la región ITS mediante PCR-RFLP tiene un gran potencial para la identificación de varias especies de hongos, ya que esta técnica requiere de cantidades mínimas del ADN inicial.

Horton (2002) evaluó la diversidad de cuerpos fructíferos de HECM recolectados en las Dunas de Oregon utilizando la región ITS y el marcador molecular de tipo RFLP, la región ITS del rADN fue amplificada utilizando el par de primers ITS1F e ITS4-b y los patrones RFLP's fueron generados con las enzimas de restricción *HinfI*, *AluI* y *DpnII*. De un total de 311 cuerpos fructíferos, identificó 18 géneros y 44 especies, incluyendo los géneros *Suillus* e *Inocybe*, además de *Laccaria*, *Lactarius*, *Rhizopogon*, *Tricholoma*, *Russula*, *Phellodon*, *Cortinarius*, *Boletus*, *Amanita*, *Bankera*, *Boletopsis*, *Chroogomphus*, *Hydnellum*, *Leccinum*, *Sarcodon*, y *Thelephora*.

Gryta y cols. (2000) realizaron la identificación y seguimiento del inóculo en campo del micelio de *Hebeloma cylindrosporum* en un periodo de cuatro años utilizando marcadores moleculares (polimorfismo de rADN y RAPD). Reportaron que la cepa utilizada en la inoculación estuvo presente durante ese periodo y además identificaron un nuevo genotipo, por lo que concluyeron que hubo presencia de endogamia, pero que no se llevó a cabo la sustitución de la cepa inoculada.

Por otro lado, Martin y cols. (2005) realizaron diferentes ensayos para obtener los primers específicos para amplificar la región ITS del rADN de HECM, ya que mencionan que dicha región presenta una secuencia altamente variable, lo que permite distinguir a las especies de dichos hongos. Utilizaron la PCR-RFLP de la región ITS con tres endonucleasas de restricción que fueron *CfoI*, *Hinf I* y *TaqI* para obtener la identificación a nivel de especie y mencionaron que los primers ITS1F e IT4-B muestran una mayor especificidad para amplificar la región ITS de Basidiomicetos y Ascomicetos. Además identificaron y generaron los patrones de bandeo de 32 especies de HECM. Dentro de las especies identificadas se encuentran 4 especies de *Inocybe* que fueron *I. leiocephala*, *I. calamistrata*, *I. geophylla* e *I. obscura*. En *Suillus brevipes* encontraron un patrón de bandeo de 350, 200 y 100 pb generado con la enzima *HinfI*, de 650 y 550 pb con *CfoI* y de 650 y 590 pb con *TaqI*.

Becerra y cols. (2005) realizaron la identificación molecular de los HECM *Lactarius* aff. *omphaliformis*, *Russula alnijorullensis* y *Cortinarius tucumanensis* que se asocian con *Alnus*

acuminata, mediante la comparación de patrones ITS-RFLP obtenidos de micorriza y cuerpos fructíferos. La región ITS fue amplificada con los primers ITS1 e ITS4 y para el análisis de los RFLP utilizaron las enzimas de restricción *TaqI*, *HinfI* y *EcoRI*. Reportaron que la longitud de los productos individuales ITS-PCR que obtuvieron para las especies *L. omphaliformis* y *R. alnijorullensis* fueron de 700 pb y para *C. tucumanensis* de 600 pb.

Karkouri y cols. (2006) evaluaron la ectomicorriza formada entre *Pinus halepensis* con una cepa de *Suillus collinitus*, utilizando la combinación de tres marcadores moleculares que fueron RFLP usando la región ITS del rADN, la secuencia intersimple repetida (ISSR) y un marcador de secuencia específica de la región caracterizada por amplificación (SCAR). Efectuaron el seguimiento del inóculo durante cuatro años, reportando que persistió después de haber llevado las plantas a campo. Por otro lado, Jany y cols. (2006) utilizaron el marcador molecular simple de secuencia repetida (SSR) o microsatélites para monitorear la cepa de *Laccaria bicolor* en campo y mencionaron que estuvo presente en el sitio más de cuatro años sin que hubiera presencia de recombinación genética.

2.2. Importancia de los HECM en estudio

Suillus es un género que contribuye con la mayor producción de esporomas en los bosques de coníferas. Las especies son de fácil aislamiento y frecuentemente son utilizadas en estudios de fisiología. Las especies de este género son HECM que se asocian exclusivamente con hospederos de la familia Pinaceae. En especial *Suillus brevipes* y *S. glandulosipes* se encuentran en bosques jóvenes, formando ectomicorriza con etapas tempranas de las coníferas. (Bowen 1994, Dahlberg y Finlay 1999, Galindo Flores 2004).

Inocybe pertenece a la familia Cortinariace, este género ha sido reportado como HECM de etapas tempranas (Bowen 1994). El comportamiento *in vitro* de este género es prácticamente desconocido, salvo por el trabajo realizado por Cruz Ulloa (1990) quién reportó las características, en cultivo puro de tres especies del género *Inocybe*, *I. bresadolae*, *I. geophilla* var. *lilacina* e *I. grammata*. La mayor parte de la información encontrada se restringe

básicamente a listados, descripciones de especies y descripción macro y microscópica de las micorrizas encontradas en campo (Hutchinson 1991, Delgado 2004 y Agerer 2006).

Recientemente se han realizado estudios para conocer la ecofisiología de los HECM utilizados en este trabajo, tal es el caso del trabajo elaborado por Alvarado (2008) quien evaluó el crecimiento micelial *in vitro* de tres especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenos (*Suillus brevipes*, *Boletus pinophilus* e *Inocybe aff. splendens*) en diferentes medios nutritivos, pH's y fuentes de carbono. Dicho autor encontró que las cepas presentaron diferentes estrategias de crecimiento de acuerdo a su capacidad de explorar y explotar los recursos nutricionales que tenían en los medios nutritivos, *S. brevipes* presentó los valores más altos de crecimiento en concentraciones altas de glucosa y en los medios BAF y PDA. Para la cepa de *I. aff. splendens* las concentraciones de glucosa no fueron determinantes para su crecimiento, además éste se vio favorecido en medios enriquecidos. En cuanto al pH, *S. brevipes* presentó tendencias acidófilas e *I. aff. splendens* neutras. Por lo que para la selección de cepas para fines de producción de inóculo, inoculación de planta de interés forestal y restauración o rehabilitación de bosques es indiscutible y necesario conocer su fisiología, y de esta manera asegurar el éxito de la reforestación. También realizó la caracterización morfológica macro y microscópica de las colonias miceliales.

Flores (2010) evaluó parámetros ecofisiológicos de plántulas inoculadas con *Suillus brevipes* e *Inocybe aff. splendens* en campo encontrando que existe un efecto positivo de la inoculación en la resistencia estomática, potencial osmótico y CO₂ absorbido con respecto a las plantas no inoculadas. Por su parte, Núñez (2013) evaluó el efecto de la inoculación micelial de HECM, *Suillus brevipes* e *Inocybe aff. splendens* en el crecimiento de plántulas de *Pinus hartwegii* en condiciones de invernadero encontrando que aunque se obtuvieron bajos porcentajes de colonización con ambas especies hubo un incremento en la altura en las plántulas inoculadas.

También se han realizado investigaciones con otras cepas de HECM que pertenecen a los géneros y especies en estudio. Santiago-Martínez (2002) realizó ensayos de inoculación en vivero de *Pinus montezumae* con *Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, ***Inocybe dulcamara***, *I. griseovelata* y ***Suillus glandulosipes***, mencionó que el género *Suillus* toleró más el manejo de laboratorio, recomendando su uso en plantaciones de pinos; Muñoz (2003) evaluó el efecto de la inoculación de *P. montezumae* con *Hebeloma mesophaeum*, ***Inocybe dulcamara***, ***Suillus glandulosipes*** y *S. tomentosus*, observó que *Inocybe dulcamara* y *Suillus glandulosipes* mostraron ser las especies más infectivas. Carrera-Nieva y López (2004) indujo la micorriza de *Pinus patula* y *Pinus greggii* con *Laccaria laccata*, ***Suillus pseudobrevipes***, *S. granulatus*, *Amanita fulva*, *A. caesarea*, *Boletus clavipes* y *Pisolithus tinctorius*, en el caso de las plantas inoculadas con *Suillus pseudobrevipes* presentaron un mayor porcentaje de colonización y desarrollaron un micelio externo abundante. Todos estos trabajos señalan el efecto positivo que tiene la inoculación con los HECM, en especial con las especies de estudio *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, en el crecimiento de las plántulas con respecto a las no inoculadas.

Actualmente, sólo existen estudios de marcadores moleculares de tipo PCR-RFLP realizados con el HECM *Suillus brevipes*, sin embargo, se han generado patrones de bandeo distintos para este hongo, en el caso de la enzima de restricción *Hinf* I en la que coinciden los trabajos de Gomes y cols. (2002) y de Martin y cols. (2005); los ejemplares utilizados en los estudios fueron obtenidos del Laboratorio de micorriza, del departamento de microbiología, de la Universidad Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; y de material fúngico de Oregon, USA. Por lo que es importante generar el marcador molecular de hongos nativos en nuestro país para comparar los resultados obtenidos y verificar si hay coincidencias con los resultados ya reportados. Para el HECM *Inocybe splendens* hasta el momento no se ha generado ningún patrón de bandeo.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios acerca de la asociación ectomicorrízica en México a nivel ecológico, aislamiento y selección de HECM son de gran importancia porque han contribuido a optimizar la producción de plántulas destinadas a programas de reforestación, debido a que se ha observado incremento en la adecuación de la planta (crecimiento, supervivencia y/o reproducción).

Sin embargo, para los estudios de seguimiento en campo de las especies inoculadas y otras presentes de manera natural en los sitios de estudio, la caracterización morfológica tiene desventajas debido a que los morfotipos sólo permiten reconocer a los hongos asociados a nivel de género.

Aunque ya existen algunos marcadores moleculares no los hay de muchas especies nativas de importancia forestal, incluso en algunos casos se presentan conflictos entre los perfiles de bandeado de los marcadores reportados previamente.

Debido a ello, es importante la generación de marcadores genéticos de especies como *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, especies con un alto potencial de uso en la producción de inóculo para la producción de plantas forestales, los cuales servirán como huellas para hacer evaluaciones en el seguimiento de HECM en campo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Los marcadores moleculares del tipo PCR-RFLP de la región ITS de HECM *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* utilizando las enzimas *AluI*, *BsuRI* (*Hae* III) y *HinfI* para la primera y *AluI*, *BsuRI* (*Hae* III) y *EcoRI*, para la segunda, serán adecuados para su uso como marcadores a nivel de especie?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Generar un marcador genético tipo PCR-RFLP de los HECM *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* que permita su identificación a nivel de especie.

5.2. Objetivos específicos.

- Identificar molecularmente a las especies de estudio.
- Generar los marcadores moleculares basados en PCR-RFLP usando la región ITS del rADN de dos especies de HECM.
- Verificar la especificidad de los marcadores moleculares de los HECM de estudio mediante su comparación con los marcadores obtenidos de otras especies del mismo género de HEM usadas como control, con simulaciones de restricción con secuencias de bases de datos y en su caso con los reportados en literatura.

6. METODOLOGÍA

6.1. Elección de los hongos ectomicorrizógenos de estudio

6.1.1 Esporomas

Los HECM que se utilizaron en este estudio fueron recolectados en la Cuenca del Río Magdalena, una de las principales zonas de vegetación en el Distrito Federal, al cual provee de bienes y servicios ecosistémicos, además de ser un área de recreación para sus habitantes. La Cuenca, es una de las principales áreas de excedente hídrico en el Distrito Federal (Mazari 2000), donde existe una buena representación de la vegetación templada del país así como una gran diversidad florística (Ávila-Akerberg 2002).

Los hongos han sido identificados morfológicamente como *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze, proveniente de un bosque de *P. hartwegii*, e *Inocybe splendens* R. Heim, proveniente del bosque de *Abies religiosa*. Los ejemplares de referencia se encuentran depositados en el Herbario TLXM del CICB de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, con los números GF 2162 y GF 2242, respectivamente. Adicionalmente, se utilizaron como controles esporomas de dos especies de HECM recolectados en el Cerro de Tepeticpac, ubicado en el estado de Tlaxcala, identificados morfológicamente como *Suillus* aff. *glandulosipes* Thiers & A. H. Sm. e *Inocybe dulcamara* (Pers.) P. Kumm, dichas especies provenientes de un bosque de *P. cembroides*, depositados en el mismo herbario, con números de registro GF 2324 y GF 2321, respectivamente.

6.1.2 Cultivo para obtención de micelio

Para la producción del inóculo micelial, se consideraron los aislamientos provenientes de los cuerpos fructíferos de las dos especies de HECM mencionadas. Ambas cepas se encuentran depositadas en el Cepario del Laboratorio de Micorrizas del CICB de la UATx. *Suillus brevipes* corresponde con la cepa Tlax 62 e *Inocybe splendens* con la cepa Tlax 64.

Las cepas seleccionadas se crecieron en cajas petri adicionadas con el medio de cultivo biotina aneurina ácido fólico (BAF) sólido durante un periodo de tres semanas, en incubación a 25°C (Marx y Bryan 1975, Miller y Allen 1992, Santiago-Martínez y Estrada-Torres 1999).

Para obtener el crecimiento masivo, se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio BAF líquido, a los que se les agregaron fragmentos pequeños de micelio crecido en medio sólido y se mantuvieron en una incubadora de agitación a 150 rpm, a una temperatura de 25°C y en condiciones de oscuridad durante cuatro o cinco semanas aproximadamente (Marx y Bryan 1975, Miller y Allen 1992, Santiago-Martínez y Estrada-Torres 1999).

6.2. Amplificación de la región ITS del rADN

6.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de cuerpo fructífero y micelio de las cepas de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* se realizó utilizando el protocolo de fenol-CIA (Fernández 1997). Para ello, se agregaron 500 µL de tampón de ruptura STET (Sacarosa 8% v/v, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, Tritón X-100 0.5% v/v), 500 µL de fenol neutro y 500 µL de CIA (Cloroformo con alcohol isoamílico 24:1), mezclando suavemente hasta que las muestras quedaron húmedas. Posteriormente, se incubaron en un termo bloque a 50 °C durante 20 minutos. Las muestras se agitaron a los primeros 10 min y se volvieron a colocar hasta cumplir los 20 min. Después se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 min y se extrajo la parte superior de la muestra pasándose a otro tubo eppendorf, se agregaron 500 µL de fenol neutro y 500 µL de CIA mezclándose por un minuto y nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, se tomó nuevamente la parte superior de la muestra y se pasó a otro tubo eppendorf (este paso se realizó 5 veces). Al terminar, se agregó CIA al mismo volumen de la parte superior y se mezcló, nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min y se tomó la parte superior de la muestra para pasarla a un tubo eppendorf agregando 0.7 volúmenes de isopropanol, las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 días. Posteriormente se sacaron las muestras de refrigeración y se centrifugaron nuevamente a 14 000 rpm durante 5 min y se vació el sobrenadante, se agregaron 700 µL de etanol al 70%, se centrifugó durante 5 min y

nuevamente se vació el sobrenadante, se eliminaron los residuos de etanol con una secadora y finalmente se agregaron 50 µL de agua para incorporar la muestra, que se guardó en refrigeración a 4°C.

Para la purificación de ADN, se utilizó el Kit Wizard que contiene todos los reactivos necesarios para limpiar ADN genómico de los HECM. Se colocó la mini columna en un tubo recolector, se agregaron 50 µL de la muestra y 50 µL de Mem Binding Solution dejando incubar durante un minuto. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 min, se retiró el fluido, se agregaron 700 µL de Mem Wash Solution y se centrifugó durante 1 min. Posteriormente se retiró el filtrado agregando posteriormente 500 µL de la solución Mem Wash Solution y se centrifugó durante 5 min. Al terminar se retiró el tubo recolector, se centrifugó 1 min y la mini columna se colocó en un tubo eppendorf agregándose 50 µL de agua libre de nucleasas, dejándose incubar durante 1 min y centrifugándose durante 1 min, al final se retiró la mini columna, se tapó y se etiquetó el tubo eppendorf.

6.2.2. Selección de los primers

Para la amplificación de fragmentos por PCR se utilizó la región ITS (comprende la secuencias de: ITS1/5.8S/ITS2), con el fin de poder tener las secuencias y utilizarlas como materia prima para el marcador de ADN. La reacción de PCR se llevó a cabo con el par de primers ITS1F que presenta una secuencia: 5´cttggcatttagaggaagtaa 3´, e ITS4 con secuencia: 5´ tcctccgcttattgatatgc 3´; que fueron diseñados para amplificar las regiones antes mencionadas correspondientes con basidiomicetos y ascomicetos (Gardes y Bruns 1993).

6.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987) es una técnica de biología molecular utilizada para llevar a cabo replicaciones exponenciales de un fragmento particular de ADN *in vitro*. Para la mezcla de amplificación se agregaron 5 µL de 10 X Taq Buffer con KCl (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, nonidet P40), 4 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1 µL de dNTP's a 10 mM, 27.5 µL de agua bi-destilada, 1 µL del primer ITS1F (dilución 1:20), 1 µL del primer ITS4 (dilución 1:20), 10 µL de muestra y 0.5 µL de Taq Polimerasa y se colocó

en un termociclador My Cycler (Bio-Rad) con las siguientes etapas: para la desnaturalización se realizó el calentamiento de cada una de las muestras para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (durante 1 min.) a 94°C. El templado (o hibridación) consistió en la hibridación de los primers, que al unirse a secuencias de ADN delimitan la región que se desea amplificar, la temperatura usada fue de 45°C.

Finalmente, la elongación (o replicación) es la etapa de amplificación en la que la *Taq* ADN polimerasa elonga los primers a una temperatura de 72°C, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en la dirección 5'-3' a partir del extremo 3'-OH de cada primer, empleando como sustrato los cuatro dNTP's, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience el siguiente ciclo.

6.2.4. Electroforesis y recuperación de los ITS

Esta técnica se utilizó para verificar la presencia de ADN durante la etapa de extracción y para el análisis de los productos amplificados por la PCR, en el caso de estos últimos, con el fin de confirmar el éxito de la amplificación por el tamaño de la banda del amplicón. Se utilizaron geles de agarosa al 0.7% para el ADN total y de 1.5 % para los amplicones. El sistema de tinción fue a base de bromuro de etidio al 10% que tiene la capacidad de intercalarse entre las bases del ADN y que emite una longitud de onda que puede ser vista con la ayuda de luz UV. El producto obtenido se purificó para enviarlo a secuenciar.

6.2.5. Secuenciación

La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en un secuenciador automático ABI-Prism 21.

6.2.6. Análisis en BLAST

Las secuencias de nucleótidos se compararon en la base de datos del Gen Bank por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que se encuentra en la WEB. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de

secuencias que se encuentren en una base de datos y así encontrar las secuencias que tienen mayor porcentaje de similitud con la secuencia problema.

6.3. Obtención de los PCR-RFLP

6.3.1. Selección de las enzimas de restricción

Una vez que se contó con los fragmentos de las regiones ITS de cada hongo, se realizaron pruebas de digestión con varias enzimas de restricción como *AluI*, *HinfI*, *BsuRI* y *EcoRI* para evaluar cual podía ofrecer buenos perfiles de bandeo o polimorfismos. Para las especies estudiadas, las enzimas seleccionadas para realizar el patrón de bandeo fueron: para *Suillus* *AluI*, *BsuRI* (*Hae* III) y *HinfI*, y para *Inocybe* se utilizaron *AluI*, *BsuRI* (*Hae* III) y *EcoRI*, debido a que *HinfI* no realizó cortes en la secuencia de su región ITS.

6.3.2. Digestiones totales

Después de la selección de las enzimas de restricción, se llevó a cabo la digestión de 10 ng de ADN correspondiente con la región ITS, previamente amplificada, considerando las condiciones establecidas por el proveedor para cada enzima.

6.3.3. Análisis de los patrones de bandeo de los RFLP's

Las digestiones de los ITS fueron resueltas en geles de agarosa al 2.5% para verificar los perfiles de bandeo presentes generados con cada una de las enzimas de restricción.

6.4. Simulación de restricción con secuencias de base de datos

Las secuencias de nucleótidos se analizaron con el programa SeqBuilder, para obtener patrones de bandeo teóricos y así se compararon las especies de estudios con otras especies del mismo género. El programa SeqBuilder permite la edición de secuencias basado en el nombre, características, o un fragmento de la secuencia real, en la creación de mapas, así como la clonación teórica.

7. RESULTADOS

7.1. Hongos ectomicorrizógenos

Los ejemplares de referencia de los HECM que se utilizaron en este estudio se observan en la figura 5, *Suillus brevipes* (Fig. 5a) e *Inocybe splendens* (Fig. 5b), así como los HECM que se utilizaron como controles [*Suillus* aff. *glandulosipes* (Fig. 5c) e *Inocybe dulcamara* (Fig. 5d)].



Figura 5. Hongos ectomicorrizógenos seleccionados: a) *Suillus brevipes*, b) *Inocybe splendens*, c) *Suillus* aff. *glandulosipes*, d) *Inocybe dulcamara*.

7.2. Obtención de micelios: Reactivación de cepas

Las cepas utilizadas fueron propagadas inoculando el micelio en cajas petri con medio BAF solidificado, para obtener el crecimiento activo, mediante tres resiembras de las cepas Tlax 62 (*Suillus brevipes*) y Tlax 64 (*Inocybe splendens*) (Fig. 6).

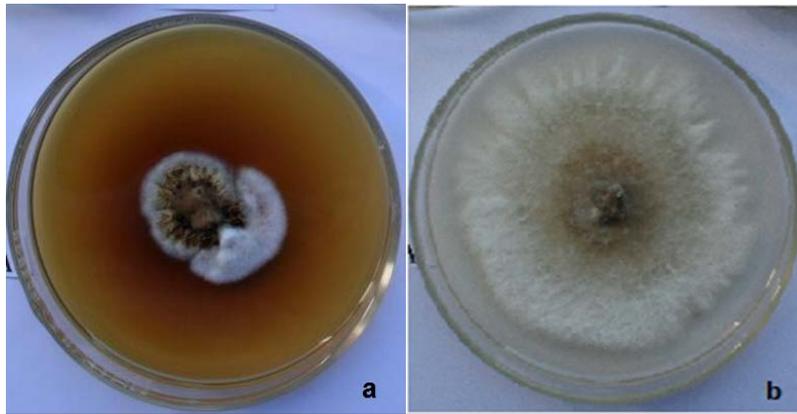


Fig. 6. Resiembras de cepas en medio sólido BAF: a) *Suillus brevipes*, b) *Inocybe splendens*.

Posteriormente se realizó el crecimiento masivo a través del cultivo de las cepas seleccionadas en medio líquido BAF, obteniéndose 10 matraces por cepa, para su posterior uso en los experimentos (Fig. 7).



Fig. 7. Cultivo de las cepas en medio líquido BAF.

7.3. Identificación molecular de las especies de estudio

7.3.1. *Suillus brevipes*

En la base de datos NCIB se encuentran nueve referencias con las secuencias de la región ITS que comprenden la región del gen ribosomal 18S, el espacio transcrito interno 1, el gen ribosomal 5.8S, el espacio transcrito interno 2 y el gen ribosomal 28S de *S. brevipes*, y los tamaños de las secuencias reportadas van de 568 pb a 947 pb (Kretzer y cols. 1996, Ashkannejhad y Horton 2006, Peay y cols. 2007, Kranabetter y cols. 2009, Bruns y cols. 2010, Jones y cols. 2012, Nguyen y cols. 2012, Peay y cols. 2012).

En nuestro estudio, se obtuvieron 2 amplicones para las muestras de esporoma y micelio de *Suillus brevipes*, con los primers específicos (ITSF e ITS4) para amplificar la región ITS, con un tamaño aproximado para el amplicón 1 de 700 pb y para el amplicón 2 de 600 pb (Fig. 8).

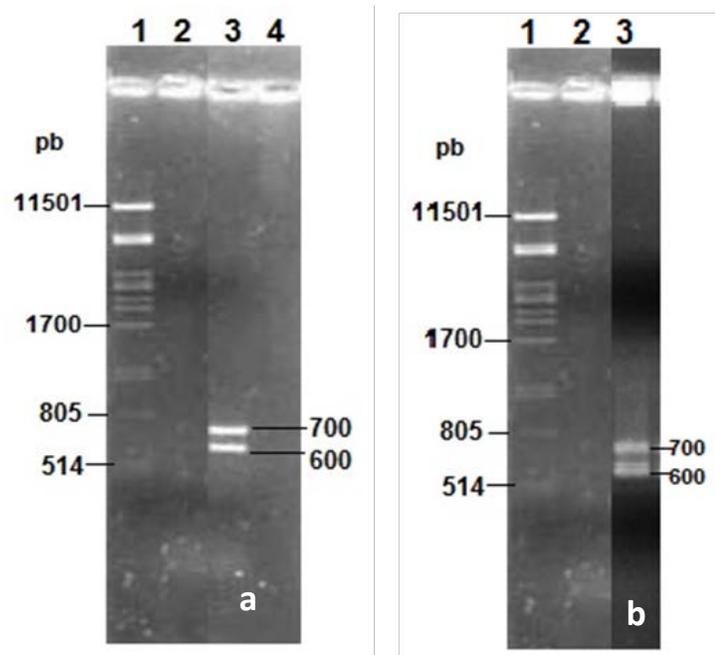


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de la región ITS del rDNA de *Suillus brevipes*: a) extraído de esporoma (carril 3), y b) extraído de micelio (carril 3). Marcador λPst I (carril 1).

Después de obtener los amplicones se realizó la secuenciación y se obtuvo la secuencia del amplicón 1, como se muestra a continuación:

```
5´TCGACTCGATTAGGATGACTGCGGAGGACATTATGAAATTATAATCCGGCGAGGGGAAAGGC
GGAGAGTTGTAGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTGTCTTCCGGACCTTTCGCCGTATGGG
CGCGGGGCGACCCGCGTCTTCATATACCTCTTCGTGTAGAAAGTCTTTGAATGTTTATACAATC
ATCGAGCCGCGCCTTCTAGGAAACGCAATTCTTTGAAACAAAAGTTATTACAACCTTTCGGAAAC
GGATCTCTGGGTTCTCGCATCAATAAAAAACGCGGCAAATCGCGATATGTAAGGGGAATTGCGA
ATCTCCATGGAATCATCAAATCTTTGAACGCACCTGGGGTTCCCTCGGGGTCCGAAGGAGCATGC
TGGTTGGAGGGCAGGAAAATTCTCAACCCCTCTCAATTGCTTTCGGAGCGGGGGCTGGATGGTTG
GAGGCTGCGGAAAAATTGGATTCTCCAAGACTTGGGGTCCCTTTTAATTAATTGGCCCCGCGTC
GACTTTTGACTTGCATGACCAAGCCCTTGGCGTGAATGATCGGCCGTTCCGCCAAGTGAACGA
CAGAATGGGTCCCGTGCCCTATCCCGTCGACGCCCTCTCGGGGGCGTCTTCCTCATTTGACGTT
TGACTTCAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGAAGGAA3´
```

Secuencia 1. Secuencia del amplicón 1 de *Suillus brevipes*.

Posteriormente se realizó el análisis de las secuencias del amplicón secuenciado en BLAST, obteniéndose 96% de similitud con *S. pseudobrevipes* (Fig. 9). Cabe señalar que aunque es la especie con la que más similitud presenta su secuencia ITS, no es tan alta como para declarar contundentemente que es *pseudobrevipes* podemos inferir que se trata de una especie distinta, por lo que se a partir de este momento le llamaremos *Suillus aff. pseudobrevipes*.

Al realizar el análisis de la secuencia del amplicón 2, no se obtuvo ningún resultado de similitud, por lo que sólo se utilizó la secuencia del amplicón 1 para realizar el análisis en BLAST.

Suillus pseudobrevipes isolate DISP3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Sequence ID: [gb|L54107.1|SUIITSAE](#) Length: 645 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 643 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1059	0.0	623/646(96%)	7/646(1%)	Plus/Minus
bits(573)				
Query	16	TTGAGGTC--ACGTC-ATGAGG-AGACGCCCCGGAGAGGCGTCGACGGATTAGAGGCAC		71
Sbjct	643	TTGAGGTCAAACGTCAATGAGGAAGACGCCCCGGAGAGGCGTCGACGCATTAGAGGCAC		584
Query	72	GGGACCATTCTGTCTGTCGACTTCGGCGAACGGCGATCATTATCACGCCAAAGGCCTTGTGTC		131
Sbjct	583	GGGACCATTCTGTCTGTCGACTTCGGCGAACGGCGATCATTATCACGCCAAAGGCCTTGTGTC		524
Query	132	ATGCAAAGTCAAAGTCGACCGCGAGCCGATTCATTTAAGAGGAGCCCGAGTCTGGACG		191
Sbjct	523	ATGCAAAGTCGAAAGTCGACCGCGAGCCGATTCATTTAAGAGGAGCCCGAGTCTGGACG		464
Query	192	AATCCAGTGTCTCCGGCAGCCTCCAACATCCAAGCACCCGCTCGAAGCAAATCGAGAGGG		251
Sbjct	463	AATCCAGTGTCTCCGGCAGCCTCCAACATCCAAGCACCCGCTCGAAGCAAATCGAGAGGG		404
Query	252	GTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGCAAGGT		311
Sbjct	403	GTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGCAAGGT		344
Query	312	GCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCGATTTCG		371
Sbjct	343	GCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCGATTTCG		284
Query	372	CTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATAACTTTT		431
Sbjct	283	CTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATAACTTTT		224
Query	432	GTCTCAAAGAATCGCGTCTCCTAGAAGTCGCGACTCGATGATCGTATAAACATTCAAAGA		491
Sbjct	223	GTCTCAAAGAATCGCGTCTCCTAGAAGTCGCGACTCGATGATCGTATAA-CATTCAAAGA		165
Query	492	CTTTCTACCCGAAAAGGTATATGAAGACGCGGGTGGCCCCGCGCCCTTACGGCGAAGGGC		551
Sbjct	164	CTTTCTACACGAAGAGGTATATGAAGACGCGGGTGGCCCCGCGCCCATACGGCGAAGGGT		105
Query	552	CCGGAAGACAGCGGGCACAATGCCCTAAAGGCCAGCTACAATTCTCCGGCCTTTCCCTC		611
Sbjct	104	CGGGAAGACAGCGTGCACATGCCCTGGAGGCCAGCTACAATTCTCCG-CCTTTCCCTC		46
Query	612	GCCGGATAATAATTTTCATAAAGGATCCTTCCGCAGGGTTCACCTAC	657	
Sbjct	45	GCCGGATTATAATTTTCATTAATGATCCTTCCGCAGG-TTCACCTAC	1	

Fig. 9. Alineamiento de las secuencias de *Suillus brevipes* en BLAST.

7.3.2. *Inocybe splendens*

Se encontraron cinco referencias para *Inocybe splendens* en la base de datos NCIB con la secuencia de la región ITS, que comprende la región del gen ribosomal 18S, el espacio transcrito interno 1, el gen ribosomal 5.8S, el espacio transcrito interno 2 y el gen ribosomal 28S. Los tamaños de las secuencias reportadas van de 358 pb a 730 pb (Bonuso y cols. 2005, Osmundson y cols. 2013, Huiying y Qingzhi 2012). Para *I. splendens* se obtuvo un amplicón, con el par de primers específicos ITS 1F e ITS4, con un tamaño aproximado de 600 pb como se muestra en la figura 10.

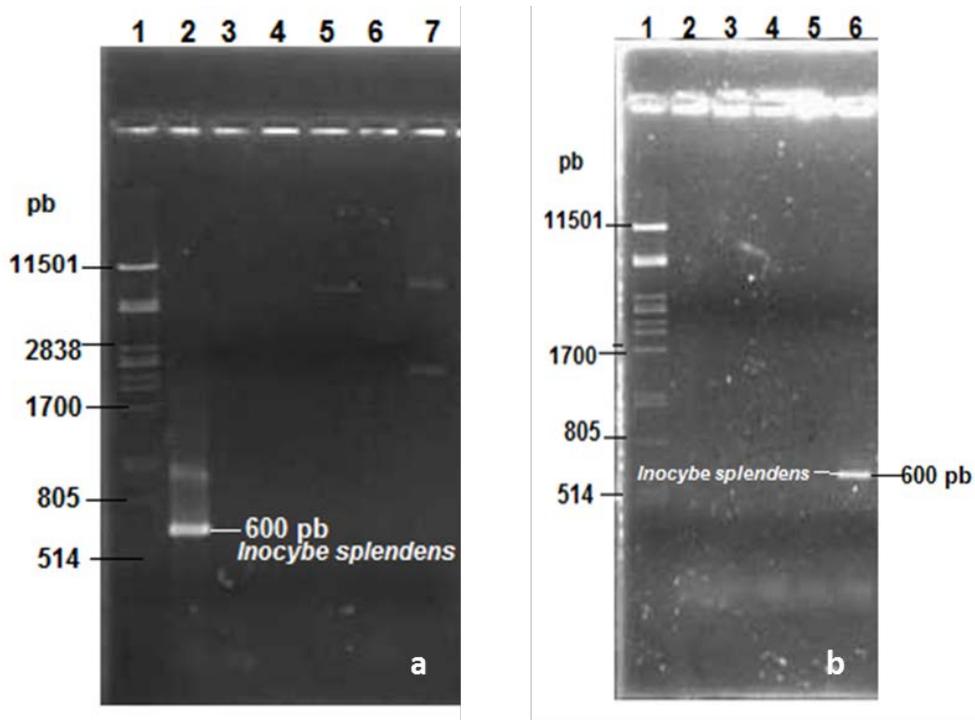


Fig. 10. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA de *Inocybe splendens* a) extraído de micelio (carril 2); y b) extraído de esporoma. Marcador λ Pst I (carril 1).

Una vez que se obtuvieron los amplicones se prosiguió a realizar la secuenciación, sin embargo sólo se logró secuenciar la región ITS del rDNA de micelio obteniéndose la siguiente secuencia:

```
5 ' CCTTACTCGATAGATGACTGCGGAGACATTATCGATGGCCGCGCCGTGAGCGCCCTGGTGCAGGA  
TCGGCCGGCACTGACCACACCCTTACTTTACGAGCACCTTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCCGC  
CGCTGGAACCTCATCAAACCTTTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATAAAAAACAATCGTAAC  
AACTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTG  
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGG  
GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCCGCCTCT  
GCGCGCGGACTCGCCCCAAAGGCATTGGCAGCGGTCCACGGCCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTT  
CTCGAGGCGGCCCGGCCGCATCCACGAAGCCACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA  
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA3 '
```

Secuencia 2. Secuencia del amplicón de micelio de *Inocybe splendens*.

Después de realizar el análisis en BLAST de la secuencia obtenida para *I. splendens* de micelio, se obtuvo un 99 % de similitud con una especie de *Dothideomycete* (Fig. 11). Debido al resultado obtenido al realizar el análisis de la secuencia, se optó por no utilizar dicha información, ya que no corresponde con la especie de HEM que se tiene caracterizada.

Dothideomycetes sp. 11130 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: gb|GQ153104.1|Length: 1098Number of Matches: 1
 Range 1: 1 to 558

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1000	0.0	554/559(99%)	5/559(0%)	Plus/Plus	
bits(541)					
Query	19	TGCGG-A-GA-CATTATCGATGGCCGCGCCGTGAGCGCCCTGGTGCAGGATCGGCCGG-C			74
Sbjct	1	TGCGGAAGGATCATTATCGATGGCCGCGCCGTGAGCGCCCTGGTGCAGGATCGGCCGGCC			60
Query	75	ACTGACCACACCCTTACTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCCGCCG			134
Sbjct	61	ACTGACCACACCCTTACTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCCGCCG			120
Query	135	CTGGAACCTCATCAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATAAAAAACAATC			194
Sbjct	121	CTGGAACCTCATCAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATAAAAAACAATC			180
Query	195	GTAACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG			254
Sbjct	181	GTAACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG			240
Query	255	CGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCG			314
Sbjct	241	CGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCG			300
Query	315	CCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCT			374
Sbjct	301	CCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCT			360
Query	375	TGGTGTGGGGCTCTGTCCCGCCTCTGCGCGGGACTCGCCCCAAAGGCATTGGCAGCGG			434
Sbjct	361	TGGTGTGGGGCTCTGTCCCGCCTCTGCGCGGGACTCGCCCCAAAGGCATTGGCAGCGG			420
Query	435	TCCACGGCCCCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCTCGAGGCGGCCCGGCCGCATCCACG			494
Sbjct	421	TCCACGGCCCCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCTCGAGGCGGCCCGGCCGCATCCACG			480
Query	495	AAGCCCACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCAT			554
Sbjct	481	AAGCCCACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCAT			540
Query	555	ATCAATAAGCCGGAGGAAA 573			
Sbjct	541	ATCAATAAGC-GGAGGAAA 558			

Fig. 11. Alineamiento de la secuencia de *Inocybe splendens* en BLAST.

7.3.3. *Suillus glandulosipes*

Al realizar la búsqueda en la base de datos NCIB, se encontró una sola referencia con la secuencia del rADN y del espacio transcrito interno reportada para *Suillus glandulosipes*, con un tamaño de 644 pb (Kretzer y cols. 1996).

Para la muestra de *Suillus glandulosipes* de esporoma se obtuvo un amplicón de 780 pb (Fig. 12).

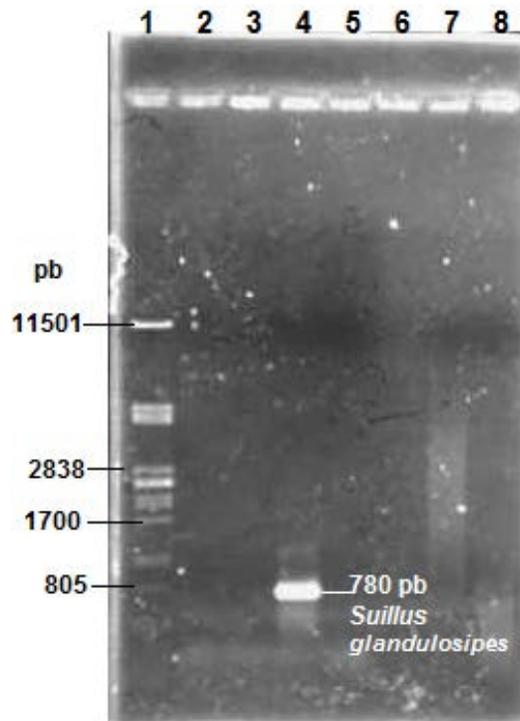


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA extraído de esporoma de *Suillus glandulosipes* (carril 4). Marcador λ Pst I (carril 1).

Posteriormente se obtuvo la secuencia del amplicón de *S. glandulosipes*:

```
5 ' CCTCGCCCTCAGTAGGATGACTGCGGAGGACATTAATGAAATTATAATCCGGCGAGGGAAAGGCG
GAGAGTTGTAGCTGGCCCCCGGGGGATGGGGACCTTCCCCTCCGGGCTTTTCCCCCTATGGGCGCG
GGGGGGCCCCCGTCTTCCTTTTCTCCTTCTCCTGGAAAAAGGCTTTGAATGGTATCCTCCTCCTCCAAT
CCCGGCTTCCAAGAAAACCCATTCTTTGAAAACAAAGTTATTACCACCTTTTACAACCGAACTCTTG
GGTCTTCCCTCCGTGAAAAACCCCGGCAAACCCGATTTGGAATGGGAATTGGCGAACTTCCGTGGAT
CCTCCGATCCTTGAACCCCCCTTGGGCTCCTCCGTGGTCCCAAGAACCTGGCTGGTTGAATGGCCGG
TAATTTCCACCCCTCTCCATTTGCTTCCGGAGGGGGTTGGATGGTGGGGGGTGGCCGAAAACCTGG
GATCCGTCCGGGATCCGGCTTCTTCGAAATGGATCCGGTCCCGGTCCAATTTTGGCTTTGCGCGACA
AGGGCTTTGGCCTTGTAATGGACGCCCTTCGCCGAAGGCGAAAAACGAATGGTTCCTGGGCTTCTAT
GGGTTGAAGGCTTTCGGGGCGTTTCCCTAACGAAGGTTGGACTCCAACAGGTAAGAATACCCCGT
GAAATTAAAGATAACAATAGCGGCGAGGGAA3 '
```

Secuencia 3. Secuencia del amplicón de *Suillus glandulosipes*.

El análisis de la secuencia obtenida para el amplicón de *S. glandulosipes* presentó 77% de similitud con *Suillus pungens*, como se muestra en la figura 13 en el alineamiento de la secuencias en BLAST. Esta fue la especie a la que más se asemeja la secuencia ITS, sin embargo el porcentaje es demasiado bajo, por lo que puede pensarse que es también una especie mexicana aún no descrita. Debido al resultado obtenido de similitud en adelante la llamaremos *Suillus aff. pungens*.

Suillus pungens isolate MHK31 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JQ310819.1](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?seq_id=gb|JQ310819.1) Length: 633 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 627

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
337	1e-88	483/631(77%)	9/631(1%)	Plus/Plus	
bits(182)					
Query	40	AATTATAATCCGGCGAGGGAAAGGCGGAGAGTTGTAGCTGG	ccccccggggg-atgggga	98	
Sbjct	1	AATTATAATCCGGCGAGGGAAAGGCGGAGAGCTGTAGCTGG	CCCCCTGGGGGCATGTGCA	60	
Query	99	ccttccccctccgggcttttccccctatggggcgcgggggggg	ccccGTCTTCCTTTTCCTC	158	
Sbjct	61	CGCTCTCTTCCGGACTTTTCGCCGTATGGGCGCGGGGCG	ACCCGCTCTTCATATACCTC	120	
Query	159	TTCCTGGAAAAAGGCTTTGAATGGTATCCTCCTCCTCCA	ATCCCGGCTTCCAAGAAAAC	218	
Sbjct	121	TTCGTGTAGAAAGTCTTTGAATGTTATCATCATCATCG	AGTCGCGACTTCTAGGAGACGC	180	
Query	219	CATTCTTTGAAAACAAAGTTATTACCACTTTTCA-CA	ACCGAACTCTGGGTCTTCCCTC	277	
Sbjct	181	GATTCTTTGAGACAAAAGTTATTACAACCTTT-CAG	CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATC	239	
Query	278	CGTGAAAAACCCCGCAAACCCGATTGGAATGGGAATT	GGCGAACTTCCGTGGATCCTC	337	
Sbjct	240	GATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATATGTAATGTGA	ATTGCAGATCTACAGTGAATCATC	299	
Query	338	CGATCCTTGAACCCCTTGGGCTCCTCCGTGGTCCCA	AGAACCTGGCTGGTTGAATGGC	397	
Sbjct	300	GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTCGGTGTTCC	GAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGC	359	
Query	398	CGGTAATTTCCCACCCTCTCCATTTGCTTCCGG	AGGGGGTGGATGGTGGGGGTGGC	457	
Sbjct	360	AGTTAATTCTCAACCCCTCTCGATTTGCTTCCG	AGGGTGCCTGGATGTTGGGGCTGCC	419	
Query	458	CGAAAACTGGGATCCGTCCGGGA-TCCGGCTTCT	CGAAATGGATCCGGTCCCGGTCCAA	516	
Sbjct	420	GGAGACCT-GGATTCGTCCAGGACTCGGGCTACT	CTGAAATGAATCGGCTCGCGTTCGAC	478	
Query	517	TTTTGGCTTTGCGCGACAAGGGCTTTGGCCTTG	TAAATGGACGCCCTTCGCCGAAGCGAA	576	
Sbjct	479	TTTCGACTTTGCGCGACAAGGCCTTTGGCGTG	AATGATCGCCGTTCCGCCGAAG-CGCA	537	
Query	577	AAAC-GAATGGTTCCTGGGCTTCT-ATGGGTT	GAAAGGCTTTCGGGGCGTTTTCCCTAACG	634	
Sbjct	538	AGACAGAACGGTCCC-GTGCCTCTAATGCGT	CGACGCCTTCCGGGGCGTCTTCCTTATCG	596	
Query	635	AAGGTTGGACTCCAACAGGTAAGAATACCC	665		
Sbjct	597	ACGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC	627		

Fig. 13. Alineamiento de la secuencia de *Suillus glandulosipes* en BLAST.

7.3.4. *Inocybe dulcamara*

Se encontraron reportadas nueve referencias de la región ITS para *Inocybe dulcamara* en la base de datos NCIB, que comprenden la región del gen ribosomal 18S, el espacio transcrito interno 1, el gen ribosomal 5.8S, el espacio transcrito interno 2 y el gen ribosomal 28S. Los tamaños van en un rango de 559 pb a 674 pb (Krpata y cols. 2007, Ryberg y cols. 2008, Geml y cols. 2012).

En nuestro estudio, al realizar la amplificación de la región ITS del rADN de la muestra de esporoma de *Inocybe dulcamara* se obtuvo un amplicón con tamaño de 850 pb, como se puede observar en la figura 14, en el carril número 3.

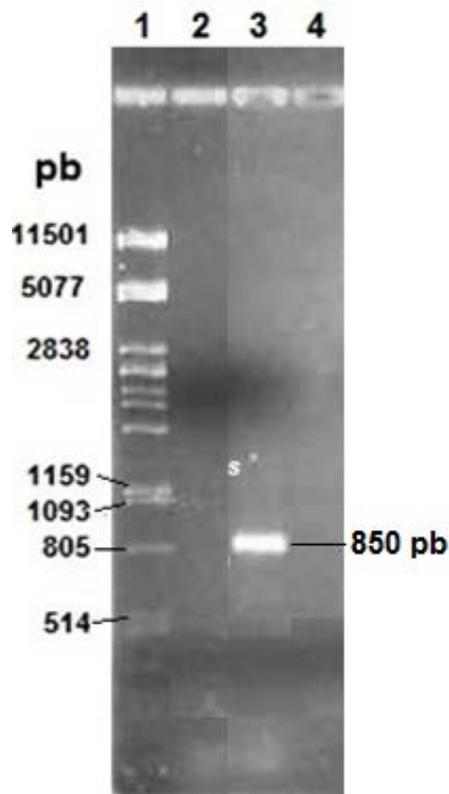


Fig. 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS del rDNA extraído de esporoma de *Inocybe dulcamara* (carril 3). Marcador λPst I (carril 1).

Una vez amplificada la región ITS del rDNA se realizó la secuenciación del amplicón obtenido y se obtuvo la siguiente secuencia:

```
5 ' CGTTCCTTCGTAGGATGACTGCGGAGGACATTATTGAATATAAACCTGGTGTAGACTGATGCTGGT
TCCTCTTGGAGCATGTGCACGTTTATCCTTTTTATTTTTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGGCTTGGTTT
ATAACACTGTTCTGACTTGTCCCTTTTTCTTCCTTTTGGATGGTGGGGGACATAAGAAACATTTTGGGA
CTGCTGTGTTTAAACACATGTTTATCAGCTTTTCTTTTAAATTTTTTCCAAGTCTATGTTTTTTATACA
CACATCAGAGATGTAATAGGATGCTGTACTTTTAGGTCATTTCATACCTATAATAAATCAGTACAACCTTT
CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCTGAGGAGCATGCCTGT
TTGAGTATCATTTAAATTATCAACTGTGTGCCATTCTGGTCACAGATTGGATGTGGGGGATTCTGCAGG
CTTTTTTCTGCTATCTCTTCTCTGAGTTGGGAAAAACAGAAAGAAAAGGCCAGCTCCTCTGAAATGAAT
TAGCAGTGCCCTTTGTTTGGGTGCCTTGGGTGGTGATAAATTATCTATGCCCTTATATATGGGACCCCT
CATTTTGAGGGCCATACAGCGCTTAAAATTGTGTTTTTGGACCCTATCAAACATGATCTCTAATCTGGG
GGGGGTACCCCCCGGTAACCTTATGCATTATCTATATACGGGGGGAAAA3 '
```

Secuencia 4. Secuencia del amplicón de *Inocybe dulcamara*.

Posteriormente se realizó el análisis de la secuencia de la región ITS del rDNA de *I. dulcamara*, la cual reveló 86% de similitud con *Inocybe dulcamara*, como se muestra en la figura 15. Sin embargo, el conocimiento de que la especie *Inocybe dulcamara* constituye un complejo y el bajo porcentaje de similitud con otras secuencias de especies que se han situado dentro de este mismo complejo, nos dan evidencia de que la especie mexicana de estudio se encuentra aún no descrita. Por esta razón en adelante le llamaremos *Inocybe aff. dulcamara*.

7.4. Generación de marcadores moleculares de tipo PCR-RFLP's utilizando la región ITS del rADN de las especies de HECM

7.4.1. Digestiones totales y perfiles de bandeo

7.4.1.1. *Suillus aff. pseudobrevipes*

El fragmento con la región ITS del rADN obtenido de esporoma de *Suillus aff. pseudobrevipes* fue digerida con la enzima de restricción *AluI*, con la que se obtuvieron bandas de 600 y 100 pb, con *HinfI* bandas de 270, 230 y 200 pb, y con *BsuRI* de 500 y 200 pb, que sumadas dan el tamaño aproximado de la región amplificada (Fig. 16).

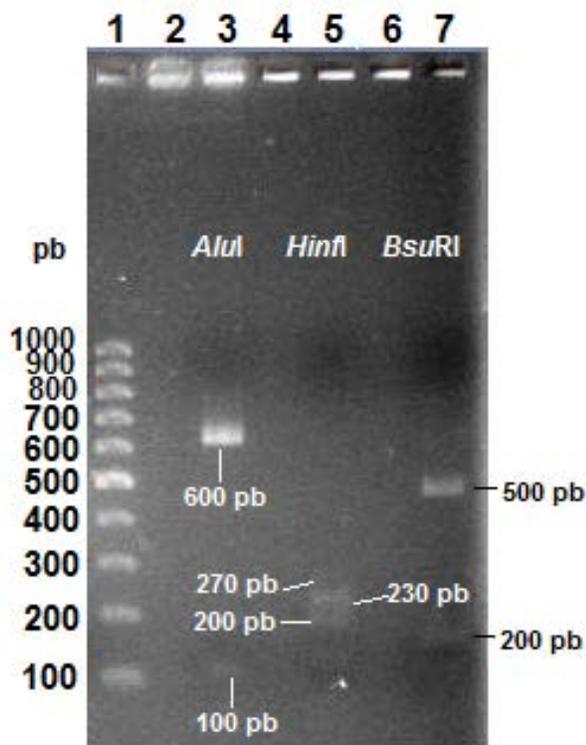


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de *Suillus aff. pseudobrevipes* (esporoma) con las enzimas de restricción *AluI* (carril 3), *HinfI* (carril 5) y *BsuRI* (*Hae III*) (carril 7).

7.4.1.2. *Suillus aff. pungens*

Para *Suillus aff. pungens*, las digestiones se realizaron con las enzimas *AluI*, con la que se obtuvieron bandas de 650 y 130 pb; con *HinfI* las bandas obtenidas fueron de 250, 200, 150, 100 y 80 pb; y con *BsuRI* se obtuvieron tamaños aproximados de 490, 190 y 100 pb (Fig. 17).

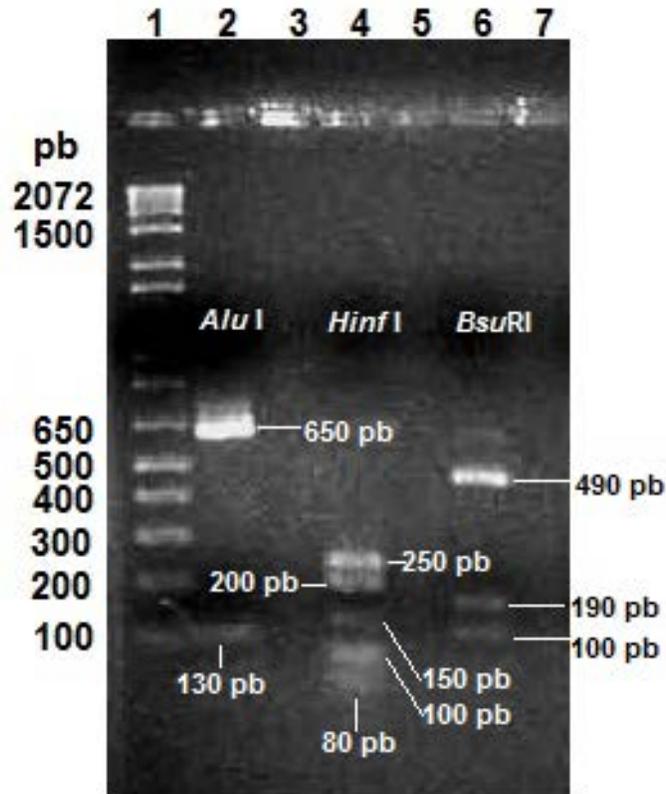


Fig. 17. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de *Suillus aff. pungens* con las enzimas de restricción *AluI* (carril 2), (carril 4) y *BsuRI* (*Hae III*) (carril 6).

7.4.1.3. *Inocybe aff. dulcamara*

Las digestiones realizadas con el fragmento de la región ITS del rADN de la muestra de esporoma de *Inocybe aff. dulcamara* produjeron cortes de tamaños aproximados de 380, 270 y 200 pb con la enzima *AluI* se, que sumados dan el tamaño aproximado de la región amplificada. Para la enzima *BsuRI* los tamaños obtenidos fueron de 650 y 130 pb y para *EcoRI* los tamaños fueron de 460 y 390 pb como se pueden observar en la Fig. 18.

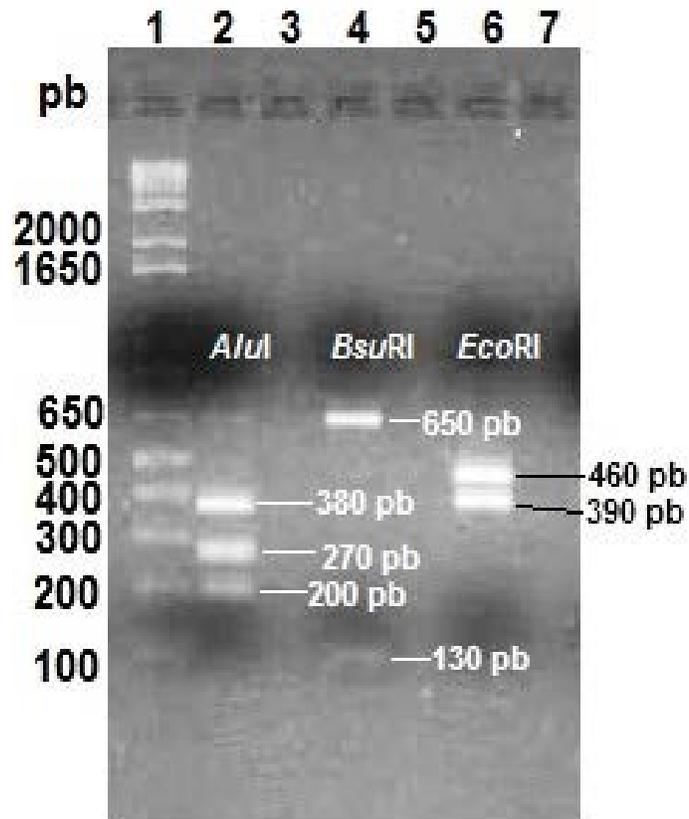


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de *Inocybe* aff. *dulcamara* con las enzimas de restricción *AluI* (carril 2), *BsuRI* (*Hae* III) (carril 4) y *EcoRI* (carril 6).

7.5. Simulación de restricción con secuencias de base de datos

7.5.1. *Suillus*

Se realizó el análisis de los patrones de bandeo teóricos con las enzimas de restricción *AluI*, *HinfI* y *BsuRI* (*Hae* III), usando el programa SeqBuilder para comparar a *Suillus* aff. *pseudobrevipes* y *Suillus* aff. *pungens* con todas las especies incluidas en el clado que contiene a ambas especies, de acuerdo con el análisis de Kretzer y cols. (1996). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Patrones de bandeo de *Suillus*.

Especie	<i>Alu I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>BsuRI (Hae III)</i>
<i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i> ^a (695 pb)	74 y 621 pb	3, 34, 11, 137 y 230 pb	78, 423, 53 y 141 pb
<i>Suillus brevipes</i> TRH 664 ^b (642 pb)	68 y 574 pb	186, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 153 pb	72, 456, 83 y 31 pb
<i>Suillus brevipes</i> MHK37 ^b (676 pb)	110 y 566 pb	227, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 146 pb	114, 455, 82 y 25 pb
<i>Suillus</i> aff. <i>pungens</i> ^a (699 pb)	76 y 623 pb	642 y 57 pb	80, 58, 258, 60, 88 y 155 pb
<i>Suillus pungens</i> ^b (633 pb)	31, 6 y 596 pb	158, 23, 74, 37, 8, 129, 11, 20 y 173 pb	41, 458 y 134 pb
<i>Suillus weaverae</i> ^c (641 pb)	68 y 573 pb	185, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 153 pb	72, 455, 83 y 31 pb
<i>Suillus luteus</i> ^c (555 pb)	555 pb	117, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 135 pb	11, 448 y 96 pb
<i>Suillus</i> <i>pseudobrevipes</i> ^c (640 pb)	69 y 571 pb	188, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 149 pb	73, 457 y 110 pb
<i>Suillus neoalbidipes</i> ^c (644 pb)	69 y 575 pb	189, 23, 74, 37, 8, 130, 11, 20 y 152 pb	73, 458 y 113 pb

^a Especies de estudio. ^b Especies de la base de datos NCIB. ^c Especies incluidas en el clado.

Con el análisis de simulación se pudieron observar los patrones de bandeo teóricos obtenidos con las enzimas seleccionadas que fueron similares entre *Suillus pseudobrevipes* y *Suillus neoalbidipes* así como entre *Suillus brevipes* y *Suillus weaverae*, haciendo prácticamente imposible distinguir una especie de otra en el caso de que ambas se encontraran en el mismo sitio de estudio. Sin embargo, con estos resultados los marcadores moleculares de tipo PCR-RFLP mostraron que es posible al menos distinguir a las especies de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* y *Suillus* aff. *pungens*, de las especies que se encuentran agrupadas en el mismo clado, que incluye a *S. pungens*, *S. glandulosipes*, *S. weaverae*, *S. brevipes*, *S. luteus*, *S. pseudobrevipes* y *S. neoalbidipes*, aunque no se podría saber la efectividad del marcador sin

tomar en cuenta un estudio comparativo con patrones generados de otras especies mexicanas que corroboren el resultado.

Por otro lado es importante señalar que teóricamente hay algunas otras enzimas de restricción que tienen secuencias de reconocimiento dentro de las secuencias obtenidas de la base de datos y las secuencias obtenidas en este estudio, por lo que sería importante realizar más pruebas considerando algunas alternativas.

7.5.2. *Inocybe*

Se realizó la simulación de restricción con el programa SeqBuilder para obtener los patrones de bandeo con las enzimas de restricción *AluI*, *BsuRI* (*Hae III*) y *EcoRI* de *Inocybe* aff. *dulcamara* y de las especies del clado en el que se encuentran las especies del complejo *dulcamara*, de acuerdo con Matheny (2005), es decir, además de *I. dulcamara sensu lato*, *Inocybe agardhii* e *Inocybe malenconii*, y con las especies que se encuentran en la base de datos NCIB. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Patrones de bandeo de *Inocybe*.

Espece	<i>Alu I</i>	<i>BsuRI</i> (<i>Hae III</i>)	<i>EcoRI</i>
<i>Inocybe</i> aff. <i>dulcamara</i> ^a (807 pb)	233, 370 y 204 pb	599, 100 y 108 pb	414 y 393 pb
<i>Inocybe dulcamara</i> ^b EL7804 (671 pb)	530 y 141 pb	33 y 638 pb	358 y 313 pb
<i>Inocybe dulcamara</i> ^b EL304 (674 pb)	183, 343 y 148 pb	674 pb	362 y 312 pb
<i>Inocybe agardhii</i> ^c (837 pb)	576, 252 y 9 pb	837 pb	410 y 427 pb
<i>Inocybe malenconii</i> ^c (628 pb)	33, 463 y 132 pb	628 pb	334 y 294 pb

^a Espece de estudio. ^b Especies de la base de datos NCIB. ^c Especies en el complejo de *dulcamara*.

Al comparar los patrones de bandeos se observó que son diferentes en cada una de las especies, lo que nos permite diferenciar a las especies mexicanas de las especies europeas que son más parecidas en cuanto a la secuencia, sobre todo con las que se han llamado *Inocybe dulcamara*. Estos resultados proporcionan evidencia adicional de que la especie *Inocybe* aff. *dulcamara* es una especie diferente de este complejo. Por lo que podemos decir que los marcadores generados son específicos para cada especie con las que se realizó el análisis de simulación.

8. DISCUSIÓN

Debe tomarse en cuenta que muchas de las especies que se han identificado como lo mismo en diferentes lugares, suelen no serlo, debido a que en muchas regiones del mundo hacen falta aún estudios taxonómicos a fondo, además de que muchas especies estrechamente relacionados pueden presentar morfologías similares. Aunado a lo anterior, es claro ahora que entre los hongos existen muchos complejos de especies crípticas, que presentan la misma morfología pero que han divergido genéticamente, por lo que el uso de los caracteres morfológicos utilizados para la identificación podría no ser suficiente para su circunscripción específica, requiriéndose de otro tipo de información.

El conocimiento de la morfología, fisiología, biogeografía, la variabilidad genética, algunos aspectos sobre su ecología, como la dinámica de sus poblaciones o los procesos sucesionales de los HECM en los ecosistemas, el área de distribución geográfica, rango de hospederos, la diversidad de las etapas del ciclo de vida, son de gran importancia debido a que contribuyen a tener un conocimiento integral de la biología de estos hongos (Osmundson y cols. 2013). Dicho conocimiento permitirá hacer una mejor selección de cepas de HECM útiles en la producción de inoculantes con fines de manejo y conservación de sistemas forestales. También provee las bases para desarrollar estrategias para una selección de especies adecuadas para reforestación o restauración de acuerdo con la zona que se desea reforestar, además de realizar su seguimiento en campo.

Con la aplicación de técnicas moleculares, con el ADN de los organismos se han podido obtener otra serie de conclusiones respecto del tema de la identificación, que sin duda nos permite hacer una discusión basta al respecto. Además estas técnicas han permitido determinar cambios en la estructura de las diferentes comunidades fúngicas (Klamer y cols. 2002, Osmundson y cols. 2013).

Si nos restringimos a las especies de hongos del presente estudio, éstas han sido identificadas morfológicamente como *Suillus brevipes*, *Suillus glandulosipes*, *Inocybe splendens* e *Inocybe*

dulcamara. El análisis que se realizó en BLAST de las secuencias obtenidas de la región ITS del rADN de lo que se consideraba *Inocybe splendens*, no coincidió con dicha especie, por lo que podemos concluir que muy probablemente el micelio de la cepa se encuentra contaminado. En el caso del esporoma no se logró obtener la secuencia, por lo que no se pudo realizar el análisis de similitud.

Ninguna de las tres secuencias restantes tiene porcentajes de similitud cercanos al 100%, aun considerando que se lograron obtener las secuencias de la totalidad del tamaño de los amplicones. Esto puede deberse a que las especies estudiadas fueron aisladas de un ambiente de México y son las primeras en su tipo de especímenes mexicanos, mientras que las secuencias de la base de datos son de otras regiones del mundo, como Estados Unidos, Europa o Australia. Los especímenes mexicanos podrían corresponder con especies aun no descritas, lo que puede explicar las diferencias encontradas.

La secuencia correspondiente con lo que se había llamado *Suillus brevipes* tiene sólo 94% de similitud con la secuencia reportada para esa especie y es más similar a la de *Suillus pseudobrevipes*, con 96% de similitud al comparar 695 pb. Esto no representa mayor problema ya que ambas especies pertenecen al mismo grupo taxonómico y son cercanas desde el punto de vista filogenético, de acuerdo con el análisis realizado por Kretzer y cols. (1996) utilizando secuencias de la región ITS. No obstante, la especie mexicana podría constituir un taxón diferente a ambas.

En el caso de la secuencia obtenida para el material identificado como *Suillus glandulosipes*, ésta tiene mayor similitud con *Suillus pungens*, con un 77%. Nuevamente, ambas especies se encuentran en el mismo clado, según el análisis de Kretzer y cols. (1996), siendo *S. pungens* la especie basal a todo el clado que incluye además de *S. glandulosipes*, a *S. weaverae*, *S. brevipes*, *S. luteus*, *S. pseudobrevipes* y *S. neoalbidipes*. El taxón mexicano seguramente representa una especie no descrita de este complejo de especies, las que frecuentemente son difíciles de distinguir entre ellas si no se tiene una buena caracterización morfológica.

En el caso de la secuencia obtenida para el hongo determinado como *Inocybe dulcamara*, la máxima similitud se obtiene con *Inocybe dulcamara*, pero ésta es tan sólo del 86%. A través del uso de los marcadores RPB1, RPB2 y LSU del rADN en un análisis filogenético, Matheny (2005) demostró que *Inocybe dulcamara* es un complejo de al menos dos especies morfológicamente similares, pero con distinta posición filogenética en el mismo clado al cual pertenecen. La cepa mexicana podría estar relacionada con este complejo, pero constituir una especie.

Es importante entonces, realizar en el futuro una revisión sistemática más detallada de las especies mexicanas estudiadas en el presente trabajo, que permita definir con mayor certeza su identidad, así como incorporarlas en análisis filogenéticos que permitan conocer a ciencia cierta sus afinidades con otras especies similares.

De acuerdo con los diferentes tamaños obtenidos de las regiones amplificadas para los diferentes hongos utilizados en este estudio, para *Suillus brevipes* en donde ya se han realizado dos estudios previos, con correspondencia con lo reportado por Gomes y cols. (2002) y por Martin y cols. (2005), en el sentido que dicho hongo presenta dos amplicones al realizar la amplificación de la región ITS del rADN. Sin embargo, los perfiles de bandeo para la enzima de restricción *Hinf*I que reportan dichos autores no coinciden con los tamaños de las bandas que se obtuvieron en este estudio. Para *Suillus glandulosipes* e *Inocybe dulcamara* hasta el momento no hay estudios realizados con estas especies por lo que no se han generado ningún patrón de bandeo con el cual se pueda realizar alguna comparación.

Al realizar la comparación de los patrones de bandeo obtenidos mediante el análisis de simulación, para las especies de *Suillus* se observó que fueron similares entre *Suillus pseudobrevipes* y *Suillus neoalbidipes* así como entre *Suillus brevipes* y *Suillus weaverae*, haciendo imposible distinguir una especie de otra, sin embargo, los patrones de bandeo teóricos mostraron que es posible al menos distinguir a las especies *Suillus* aff. *pseudobrevipes*, *Suillus* aff. *pungens* y *Suillus luteus*, por lo que es importante utilizar diferentes enzimas para poder obtener buenos perfiles de bandeo que nos permitan poder identificar a las diferentes especies de HECM,

así como también realizar un estudio comparativo con patrones generados de otras especies mexicanas que corroboren el resultado.

En el caso de las especies de *Inocybe* los patrones de bandeo teóricos que se obtuvieron fueron diferentes, por lo que los marcadores moleculares de tipo PCR-RFLP mostraron ser específicos para cada especie, estos resultados nos permite diferenciar a las especies mexicanas de las especies europeas que se han llamado *Inocybe dulcamara* y que son más parecidas en cuanto a la secuencia. De acuerdo con lo mencionado por Nilsson y cols. (2008) y Osmundson y cols. (2013), este tipo de marcador molecular es ampliamente utilizado para la identificación de especies de HECM debido al grado de polimorfismo que se puede detectar.

9. CONCLUSIONES

1. El análisis de la secuencia de la región amplificada del micelio de *Inocybe splendens* corresponde con un género diferente, por lo seguramente los cultivos utilizados de dicha cepa se encontraban contaminados.
2. El mayor porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas para las cepas identificadas a través de morfología como *Suillus brevipes* y *Suillus glandulosipes* no corresponde con las secuencias de dichas especies reportadas en los bancos de datos. La primera es más parecida a *S. pseudobrevipes*, en tanto la segunda es más cercana a *S. pungens*.
3. La mayor similitud de la secuencia de la cepa determinada como *Inocybe dulcamara* corresponde con la de dicha especie reportada en los bancos de datos. No obstante, el porcentaje de similitud es relativamente bajo, dando evidencia de que podría tratarse de una especie aún no descrita.
4. Las especies que al principio de este estudio considerábamos como *Suillus brevipes* y *Suillus glandulocipes*, en los reportes de estudios filogenéticos muestran que pertenecen al mismo grupo taxonómico y son cercanas desde el punto de vista filogenético a las especies con las que presentaron mayor porcentaje de similitud en el análisis molecular, *Suillus pseudobrevipes* y *Suillus pungens*. Por lo que en este trabajo las llamamos finalmente como *Suillus* aff. *pseudobrevipes* y *Suillus* aff. *pungens*, de las que hará falta confirmar la especie.
5. Por su parte, la especie mexicana determinada como *Inocybe* aff. *dulcamara* podría ser una especie diferente de las ya descritas, ya que se ha demostrado que *I. dulcamara* es un complejo de al menos dos especies morfológicamente similares pero con distinta posición filogenética en el mismo clado.

6. Se obtuvieron perfiles de bandeo para *Suillus* aff. *pseudobrevipes* y *Suillus* aff. *pungens* e *Inocybe dulcamara* con las enzimas de restricción *AluI*, *HinfI*, *BsuRI* y *AluI*, *BsuRI* y *EcoRI*, respectivamente. Para cada una de las especies dichos perfiles fueron diferentes entre sí, pero también con relación a lo reportado en la bibliografía y a los resultados de la simulación de restricción, por lo que los marcadores generados son específicos para cada una de las especies de estudio. Cabe mencionar que la contundencia en la efectividad de este marcador se podrá demostrar en cuanto se tengan estudios comparativos con otras especies mexicanas. Además de que para determinar que es un marcador para identificación sólo a nivel específico, hace falta concretar la especie de los hongos de estudio así como ejemplares de la misma especie de diferentes poblaciones o regiones para corroborar el perfil de bandeo.

7. La información obtenida de las secuencias y la generación de los marcadores de las especies nos permitirán su utilización para posteriores estudios de seguimiento de la ectomicorriza en campo, siempre y cuando el sitio de introducción no cuente con esta especie de manera natural.

10. PERSPECTIVAS

- La generación de la secuencia de la región ITS del rADN del esporoma de *Inocybe splendens* será de gran importancia para realizar el análisis de similitud y complementar la identificación de dicha especie.
- Determinar la especie a la que corresponden los hongos de este estudio, con el fin de confirmar, con la recolección de especímenes de la misma especie de otras localidades, cepas o poblaciones, que el marcador de tipo PCR-RFLP, sólo permite la identificación a nivel de especie y no a nivel de cepa o a nivel individual.
- Realizar ensayos de introducción de plantas con estas especies de HECM, para verificar la eficacia en estudios de persistencia.
- La información obtenida de las secuencias y la generación de los marcadores de las especies nos permitirán su utilización para posteriores estudios de seguimiento de la ectomicorriza en campo, siempre y cuando el sitio de introducción no cuente con esta especie de manera natural. Además, es necesario aplicar esta técnica a otras especies mexicanas relacionadas con las incluidas en este estudio, que permita verificar que los patrones de bandeo son específicos para el reconocimiento de cada especie.
- Se recomienda realizar análisis filogenéticos para poder determinar la posición sistemática de las especies mexicanas.
- Revalorar los caracteres morfológicos de las especies identificadas para realizar su adecuada identificación y, en su caso, descripción como entidades diferentes de las especies previamente descritas.

- Existe la necesidad de obtener las secuencias para todas las especies mexicanas que crecen en la misma región que las especies de este estudio, sobretodo de las más cercanas filogenéticamente a las especies estudiadas, para poder concluir contundentemente que la herramienta es lo suficientemente poderosa para distinguir especies.
- Es necesario seguir trabajando con otras especies mexicanas del mismo complejo, para poder concluir enfáticamente si ésta es una herramienta que permita diferenciar cosas parecidas o filogenéticamente cercanas que se encuentren creciendo en la misma área geográfica)

11. LITERATURA CITADA

- Agerer R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67-107
- Alvarado I. 2008. Crecimiento y caracterización micelial *in vitro* de tres cepas de hongos potencialmente ectomicorrizógenos de la Cuenca del Río Magdalena. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 104 pp.
- Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G, Potenza L y Stocchi V. 1998. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol. Ecol* 7: 273-277.
- Arnolds E. 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosys and Environ* 35: 209-244.
- Ashkannejhad S y Horton TR. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytol* 169(2): 345-354.
- Ávila-Akerberg V. 2002. La vegetación en la Cuenca del Río Magdalena: un enfoque florístico, fitosociológico y estructural. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. 86 pp.
- Becerra A, Beenken L, Pritsch K, Daniele G, Schloter M y Agerer R. 2005. Anatomical and molecular characterization of *Lactarius* aff. *omphaliformis*, *Russula alnijorullensis* y *Cortinarius tucumanensis* ectomycorrhizae on *Alnus acuminata*. *Mycol.* 97(5): 1047-1057.

- Bertini L, Agostini D, Potenza L, Rossi I, Zeppa S, Zambonelli A y Stocchi V. 1998. Molecular markers for the identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytol* 139: 565-570.
- Bonuso E, Iotti M, y Zambonelli A. 2005. *Inocybe* spp. collected in cultivated truffieres. Unpublished. NCIB
- Bowen G. 1994. The ecology of the ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil*. 159: 61-67.
- Boyd R, Furkbank RT y Read DJ. 1986. Ectomicorrhizae and water relation of trees. En: Gianinazzi-Pearson V y Gianinazzi S (eds.). *Physiological and Genetical Aspect of Mycorrhizae: Proceedings of the 1st. European Symposium an Mycorrhizae*, July 1-5, 1985, Dijon, France. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Bruns TD y Gardes M. 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi: taxón-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Molec. Ecol.* 2: 233-242.
- Bruns TD, Grubisha LC, Trappe JM, Kerekes JF y Vellinga EC. 2010. *Suillus quiescens*, a new species commonly found in the spore bank in California and Oregon. *Mycol* 102(2): 438-446
- Carrera-Nieva A y López RGF. 2004. Manejo y evaluación de Ectomicorizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo México.10: 93-98.
- Castellano MA y Bougher NL. 1993. Delimitation *Hymenogaster sensu stricto* and four new segregate gene. *Mycología* 85: 273-293.

- Cruz-Ulloa BS. 1990. Cultivo *in vitro* y caracterización de micelios de basidiomicetos ectomicorrizógenos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Dahlberg A y Finlay RD. 1999. *Suillus*. En: *Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile*. Ed. By J.G.W. Cairney y Chambers. Springer, Heidelberg.
- Deacon JW y Fleming LV. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. En Allen MJ. (Ed). Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process. Chapman y Hall. New York.
- Débaud JC, Marmeisse R, Hooykaas JJ y Beijersbergen AGM. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotech* 16: 839-842.
- Delgado MR. 2004. Los hongos ectomicorrízicos como herramienta para la recuperación de la cubierta forestal de ecosistemas perturbados. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental, Restauración Ecológica). Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
- Dighton J y Mason PA. 1985. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. En: Moore D. L. A. Casselton, D. A. Wood y J. C. Frankland (Eds.) *Developmental Biology of Higher Fungi*. Cambridge University Press.
- Erland S, Henrion B, Martin F, Glover LA y Alexander IJ. 1994. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. *New Phytol* 126: 525-532.
- Farmer DJ y Sylvia DM. 1998. Variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycol Res* 102: 859-865.

- Fernández Perrino F.J. 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: reacción enzimática, catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis de Doctorado. Universidad de León, España.
- Flores RDY. 2010. El efecto de los hongos ectomicorrizógenos en las condiciones ecofisiológicas de plántulas de *Pinus hartwegii* Lind. y *Abies religiosa* (Kunth. Schlttdl. Et Cham.): un enfoque para el análisis de la restauración de ambientes deteriorados en la Cuenca del Río Magdalena, D.F. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
- Galindo-Flores G, García CF, Monjaraz GG y Chávez AVM. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* flous, a partir de embriones maduros. Investigación para el desarrollo regional. Ed. SEP-CONACYT, México D.F. ISBN 968-823-274-2
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD y Taylor JW. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can J Bot* 69: 180-190.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW. 1991. Intraespecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. *In: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. A. Varma, B Hock (Eds). Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Gardes M, y TD Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of ectomycorrhizae and rusts. *Molec. Ecol.* 2: 113-118.
- Geml J, Timling I, Robinson CH, Lennon N, Nusbaum HC, Brochmann C, Noordeloos ME y Taylo DL. 2012. An arctic community of symbiotic fungi assembled by long-distance dispersers: phylogenetic diversity of ectomycorrhizal basidiomycetes in Svalbard based on soil and sporocarp DNA. *J. Biogeogr.* 39(1): 74-88.

- Glen M, Tommerup IC, Bougher NL y O'Brien PA. 2001. Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycol Res* 105: 843-858.
- Gomes EA, Barros EG, Kasuya MCM y Araújo EF. 1999. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. *Mycorrhiza* 8: 197-202.
- Gomes EA, Kasuya MCM, de Barros EG, Borges AC y Araújo EF. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Gen and Mol Biol* 25(4): 477-483.
- Gryta H, Debaud JC y Marmeisse MR. 2000. Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity* 84: 294-302.
- Herion B, Le Tacon F, Martin F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122: 289-298.
- Herion B, Chevalier G, Martin F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacer. *Mycol. Res.* 98: 37-43.
- Hillis DM y Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev of Biol* 66(4): 411-453.
- Hopp E. 2010. Curso de agrobiotecnología. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Horton TR. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil*. 244: 29-39.
- Huiying Z y Qingzhi Y. 2012. Morpho-anatomical characteristic and Molecular Identification of Ectomycorrhiza of *Ostryopsis davidiana* in Inner Mongolia Area. Unpublished. NCBI
- Hutchinson L. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Micotaxon* 42: 387-504
- Jany JL, Bousquet J, Gagné A y Khasa SP. 2006. Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. *Mycological Res*. 110: 51-59.
- Jones MD, Phillips LA, Treu R, Ward V y Berch S. 2012. Functional responses of ectomycorrhizal fungal communities to long-term fertilization of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. var. *latifolia* Engelm.) Stands in central British Columbia. *Agric Ecosyst Environ Appl Soil Ecol*. 60: 29-40.
- Karkouri K, Selosse MA y Mousain D. 2006. Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. *FEMS Microbial Ecol*. 55:146-158.
- Klamer A, Edwards KJ, Bruford S, Funk B, Vosman M y Morgante O. 2002. Molecular technologies form biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol* 15: 625-628.

- Kong-Luz A. 2003. Clasificación de los hongos ectomicorizógenos. En: Estrada-Torres A y Santiago-Martínez MG. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Kranabetter JM, Friesen J, Gamiel S y Kroeger P. 2009. Epigeous fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi as indicators of soil fertility and associated nitrogen status of boreal forests. *Mycorrhiza*. 19(8): 535-48.
- Kretzer A, Li Y, Szaro T y Bruns TD. 1996. Internal Transcribed Spacer Sequences from 38 Recognized Species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and Taxonomic Implications. *Mycol* 88(5): 776-785.
- Krpata D, Muehlmann O, Kuhnert R, Ladurner H, Goebel F y Peintner U. 2007. High diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos uva-ursi* in subalpine and alpine zones: Potential inoculum for afforestation. *For Ecol Manage* 250(3): 167-175.
- Louie M, Louie L y Simor AE. 2000. The role of ADN amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 163(3): 301-309.
- Martín F, Delaruelle C, Ivory M. 1998b. Genetic variability in intergenic spacer of ribosomal DNA in *Pisolithus tinctorius* associated with pine, *Eucalyptus* and *Azalia* in lowland Kenyan forest. *New Phytol*. 139: 341-352.
- Martin K y Rygiewicz PT. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. 5: 28.
- Marx DH y Bryan WC. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci*. 21: 245-254.

- Matheny PB. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Mol Phylogen and Evol* 35: 1–20.
- Mazari M. 2000. Dualidad Población-Agua: Inicio del Tercer Milenio. El Colegio Nacional, México D. F.
- Mello A, Garnero L y Bonafante P. 1999. Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. *New Phytol* 141: 511-516.
- Miller SL y Allen EB. 1992. Mycorrhizae nutrient translocation and interaction between plants. En: Allen MF. (Ed.) *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall. New York.
- Mullis KB y Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-50.
- Muñoz G JC. 2003. Inoculación esporal en *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae* con diferentes hongos ectomicorrizógenos, bajo condiciones de vivero. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Tlaxcala, Tlax.
- Nava G. y Hernández L. 2003. Aspectos generales de la asociación micorrízica. En: Estrada-Torres A y Santiago-Martínez G. 2003. *Avances en el estudio de la ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México*. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, Méx.
- Nguyen NH, Hynson NA y Bruns TD. 2012. Staying alive: survival of mycorrhizal fungal propagules from 6-yr-old forest soil. *Fungal Ecol* 5 (6): 741-746.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N y Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online* 4: 193–201.

- Núñez E. 2013. Efecto de la inoculación con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos (HEM) provenientes de la Cuenca del Río Magdalena D. F., sobre el crecimiento y supervivencia de *Pinus hartwegii*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Osmundson TW, Robert VA, Schoch CL, Baker LJ, Smith A, Robich G, Mizzan L, y Garbelotto MM. 2013. Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project. PLoS ONE 8(4)
- Pate JS. 1994. The mycorrhizal association: just one of many nutrient acquiring specializations in natural ecosystems. En: Robson AD, Abbott LK y Malajczuk N (eds.). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 1-10.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE y Garbelotto M. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. Ecol Lett 10(6): 470-80.
- Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH y Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. Mol Ecol. 21(16): 4122-36.
- Pennanen T, Heiskanen J, y Korkama T. 2005. Dynamics of ectomycorrhizal fungi and growth of Norway spruce seedlings after planting on a mounded forest clearcut. Forest Ecol and Management. 213: 243-252.
- Pérez-Moreno J, Martínez RM, y García RL. 2011. Hongos silvestres: Amigos de los bosques y manjares divinos. Ciencia y Desarrollo microorganismos y vida. 237(252): 35-39.

- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cásarez B, y Valdés M. 2004. Ecología Molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Rev. Fitotec. Mex.* 27(3):267-278.
- Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Topel M, Jacobsson S, y Larsson E. 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *Evol. Biol.* 8: 50.
- Santiago-Martínez G y Estrada-Torres A. 1999. Técnicas de producción de inóculo esporal de hongos ectomicorrizógenos. En: *Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal*. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, Méx. Pp.16-20.
- Santiago-Martínez, G. 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación controlada con esporas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
- Sylvia DM. 1999. Mycorrhizal simbiosis. En: Sylvia DW, Fuhrmann JJ, Hartel PG y Zuberer DA (eds.). *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, New Jersey, p. 408-426.
- Valadez E y Kahl G. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V. 1999. PCR in studies of arbuscular mycorrhizal fungi: from primers to application. En: *Mycorrhiza Manual*. A. Varma (ed) Springer, Berlin. Pp: 387-399.

Walker JF, Miller Jr OK, Horton JL. 2005. Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Mol Ecol* 14: 829-838.

Weber J, Díez J, Selosse MA, Tagu D y Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Myco* 12: 19-27.

12. PUBLICACIONES

**REVista INTERNacional
de
CONTAMinación
AMBIEntal**

volumen 29, suplemento 4, 2013

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

MEMORIAS

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013

A 100 años de la creación del Primer Mapa Genético de un Cromosoma
A 10 años de la culminación del Proyecto Genoma Humano

SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA

Editores

**JUANA SÁNCHEZ-ALARCÓN
RAFAEL VALENCIA-QUINTANA
SANDRA GÓMEZ-ARROYO
RAFAEL VILLALOBOS-PIETRINI
CLAUDIO AMESCUA-GARCÍA**

GENERACIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR TIPO PCR-RFLP PARA HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS *Suillus brevipes* E *Inocybe dulcamara*

Meza-Meneses Y^{1,2}, Galindo-Flores G¹, Quiroz A^{1,2}, Martínez y Pérez JL, Estrada-Torres A¹, Alarcón A³ y Montiel-González AM^{1*}

¹Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas y Postgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Aut. San Martín Texmelucan-Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla 90120, Tlaxcala

²Maestría en Ciencias Biológicas, UATx

³Postgrado en Edafología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México

amonicamg@yahoo.com

Los hongos ectomicorrizógenos tienen gran importancia forestal debido a su potencial para producir plantas útiles en la recuperación de suelos. No obstante, no se puede asumir el éxito de su establecimiento por la posibilidad de desplazamiento por otros hongos presentes en el suelo y la dificultad para identificarlos sólo por medio de la morfología de la ectomicorriza, por lo que es necesario monitorear con otros medios a las especies introducidas. Una alternativa es a través de marcadores moleculares como los PCR-RFLP, que permiten la generación de huellas génicas. En este trabajo se generaron marcadores de este tipo para la identificación a nivel específico de *Suillus brevipes* e *Inocybe dulcamara*. A ejemplares del Herbario TLXM (CICB, UAT), se les extrajo el ADN, del cual se amplificó la región ITS del rDNA usando los primers ITS1F e ITS4. Los amplicones se secuenciaron y las secuencias fueron comparadas en la base de datos de NCBI mediante BLAST. Los RFLP se generaron mediante la digestión de los fragmentos ITS con las enzimas de restricción *AluI*, *HinfI*, *BsuRI* y *EcoRI*. Los amplicones y RFLP se verificaron con electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y 2% respectivamente. Se obtuvieron 2 amplicones para *Suillus brevipes* con pesos moleculares de 700 (amplicón 1) y 600 pb (amplicón 2), presentando un 94% de similitud con *S. brevipes*. Los RFLP para el amplicón 1 presentaron bandas anchas de 400 pb con *AluI*, 390 y 290 pb con *HinfI*, 400 y 300 pb con *BsuRI*. El amplicón 2 generó bandas de 430 y 220 pb con *AluI*, 490 y 300 pb con *HinfI*, y 400 pb con *BsuRI*. El amplicón de *Inocybe dulcamara* tuvo 850 pb, con 92% de similitud para esa especie. Los RFLP mostraron bandas de 380, 270 y 200 pb con *AluI*, 650 y 130 pb con *BsuRI*, 460 y 390 pb con *EcoRI*. Otras especies de estos géneros se utilizaron como controles de comparación, presentando patrones de RFLP distintos, por tanto los marcadores generados, en conjunto con los resultados del BLAST, indican que son adecuados para definir a nivel específico a los HEM de este estudio.