



Universidad Autónoma de Tlaxcala

División de Ciencias Biológicas

**Análisis comparativo de la región ITS del ADN  
de diferentes cepas de hongos comestibles silvestres  
del género *Agaricus* procedentes de diversas regiones  
de México**

**T e s i s**

para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas  
**P r e s e n t a**

**Bióloga Nelly Lira Franco**

Director de tesis

Dr. Daniel Martínez Carrera

Co- director

Dr. Arturo Estada Torres

Tlaxcala, Tlax.

noviembre 2007

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALTECO DE ESTUDIOS DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
PRESENTE

La presente Tesis se realizó en las instalaciones del Colegio de Posgraduados Campus Puebla bajo la dirección del Doctor Daniel Martínez Carrera y la codirección del Doctor Arturo Estrada Torres. Se contó con la asesoría del Dr. Porfirio Morales Almora, Dra. Guadalupe Martínez Santiago, Dra. Laura Hernández Cuevas y Dra. Mercedes Rodríguez Palma.

Se contó con el financiamiento de CONACYT con el número de beca 180933.

Esta tesis se realizó como parte de la Maestría en Ciencias Biológicas que está registrada en el programa para el fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón de Posgrado (PNP).

Dr. Daniel Martínez Carrera

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Porfirio Morales Almora

Dra. Guadalupe Martínez Santiago

Dra. Mercedes Rodríguez Palma

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXACAL DE BILOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
PRESENTE**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que la C.. **Biól. Nelly Lira Franco** realizada para obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiéndose revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y definida en ele examen correspondiente. El título que llevará es **“Análisis comparativo de la región ITS del ADN de diferentes cepas de hongos comestibles silvestre del género *Agaricus*, procedentes de diversas regiones de México.”**

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

**TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 26 DE 2007**

**Dr. Daniel Martínez Carrera**

**Dr. Arturo Estrada Torres**

**Dt. Porfirio Morales Almora**

**Dra. Laura Hernández Ramírez**

**Dra. Mercedes Rodríguez Palma**

## Resumen

En la actualidad el hongo comestible que indudablemente es el más cultivado es *A. bisporus* (J.E. Lange) Pilát. Hoy en día es solicitado en diversas partes del mundo para ser cultivado, pero a pesar de la gran demanda que tiene este hongo, éste no puede ser cultivado en zonas cálidas y tropicales.

No obstante, existen más de 200 especies del género *Agaricus*, las cuales crecen en diversas partes del mundo y poseen características, como: la resistencia a ciertas enfermedades y el poder fructificar a temperaturas mayores que *A. bisporus*. Por lo que desde 1990 se conformó el proyecto *Agaricus*, el cual tiene el propósito de recolectar, aislar y preservar el germoplasma silvestre, el cual podría ser usado para mejoras genéticas.

En el Colegio de Posgraduados han recolectado ejemplares silvestres de diversas regiones de México, estas cepas ya han sido caracterizadas tentativamente con base a rasgos morfológicos del cuerpo fructífero y evaluadas en el mismo substrato que *A. bisporus*, demostrando tener potencial para su cultivo. Ahora en este estudio se ha empezado a evaluar parte de estas cepas con las nuevas herramientas moleculares, empleado el ADN y aplicando métodos para conocer las distancias genéticas entre las cepas, para en un futuro proponer la formación de híbridos para realizar mejoras genéticas entre ellas y con *A. bisporus* por medio de las nuevas técnicas de transformación genética.

En este estudio se seleccionaron cepas silvestres identificadas tentativamente pertenecientes a 5 especies: CP-54 *A. campestris*, CP-43, 128 y 130 *A. bitorquis*, CP-125 y 83 *A. osecanus*, C.P- 123 *A. subrufescens*, C.P-138 *A. abruptibulbus* y 2 sp. Estas cepas se le aplicó un primer nivel de análisis, en el cual se buscaron las secuencias de las 5 especies más similares a cada una de ellas en la base de datos internacional EBI, además de aplicarles un segundo nivel de análisis, en el cual se compararon las cepas de estudio con cepas que ya habían sido empleadas en estudios filogenéticos moleculares por expertos en el género *Agaricus*.

Para conocer la distancia genética existente entre ellas, se extrajo el ADN el cual fue amplificado en la región ITS del ADNr nuclear. A las secuencias obtenidas se les aplicó el modelo de sustitución de nucleótidos de Tajima-nej y el método agrupación de Neighbor-Joining, el cual generó dendrogramas.

En el dendrograma del primer nivel de análisis se conformaron 2 grandes grupos, en el grupo I se agruparon especies pertenecientes a 2 secciones del género *Agaricus*, las cuales fueron de la sección Duploannulatae y la sección Xanthodermatei, quedando 4 de las cepas de estudio en este grupo, esta agrupación resulto peculiar ya que no coincide con algunas clasificaciones tradicionales morfológicas igual forma la sección Arvenses también presente en este estudio y Xanthodermatei son de la misma sección, sin embargo, quedaron separadas. No obstante esta distancia entre estas secciones Xanthodermatei y Duploannulatae ya se ha reportado en los nuevos estudios moleculares.

En el grupo II del primer nivel de análisis se congregaron especies provenientes de la base de datos pertenecientes a la sección Arvenses, y las cepas de estudio 54, 83, 89, 125, 128 y 130, por lo que se sugiere que estas cepas sean de dicha sección.

En el segundo nivel de análisis las cepas de estudio se anexaron en diversos grupos los cuales pertenecían a diversas secciones las cuales formaron clados en estudios previos, anexándose las cepas 54, 83, 89, 125, 128 y 130 a la sección Arvenses, la cepa 43 a la sección Duplonnulateae y las cepas 123, 138 y 237 a la sección Xanthodermatei, confirmando con estos resultados los resultados del primer nivel de análisis. Con este segundo nivel de análisis se pudo observar que probablemente las cepas 123 y 138 sean una nueva especie de la sección Xanthodermatei, ya que formaron un grupo separado de las otras cepas de este grupo, de igual forma las cepas 54 y 83 pude que sean una nueva especie ya que no se agruparon con cepas conocidas de la sección Arvenses, no obstante también se tendrá que analizar a las cepas 89, 128 y 130 ya que probablemente debido a la distancia con otras cepas de la sección Arvenses pude ser que estas también sean otras nuevas especies o al menos cepas que no estaban presentes sus secuencias en la base de datos internacional EBI.

Con estos métodos además de conocer las distancias genéticas entre las cepas de estudio con otras cepas de la base de datos también nos ayudo a corroborar su identidad como en el caso de *A. bitorquis* CP-43 y la CP. 237, en otros casos como las CP-83, CP-89, oriento al grupo o sección al que pueden pertenecer, de igual forma con otras cepa este estudio nos ayudo a modificar su determinación previa como es el caso de la CP-138, CP-130, CP-128, CP-123, CP-54.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características generales de los tripanos	1
1.1.1 Principales grupos de tripanos	1
1.1.2 Posición de los tripanos en el reino animal	1
1.1.3 Importancia de estos tripanos para el ser humano	1
1.2 El sistema de clasificar a los tripanos	1
1.2.1 El sistema de clasificación de los tripanos	1
1.3 Características morfológicas	1
1.4 Potencial del tripano	1
1.4.1 Potencial de los tripanos	1
1.5 Desarrollo de los tripanos	1
1.6 Diagnóstico de los tripanos	1
1.7 Avances en el diagnóstico de los tripanos	1
1.8 Tratamiento de los tripanos	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 General	3
3.2 Particular	3
4. METODOLOGÍA	4
4.1 Origen del material biológico	4
4.2 Preparación y mantenimiento de las muestras	4
4.3 Preparación de las muestras para el análisis	4
4.4 Preparación de los estándares	4
4.5 Cuantificación del ADN	4
4.6 Amplificación de los tripanos	4
4.7 Preparación de los estándares de PCR	4
4.8 Preparación de las muestras para PCR	4
4.9 Comparación de los resultados de PCR	4

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Características generales de los hongos .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Principales grupos de hongos.....	3
1.1.2 Función de los hongos en la naturaleza .....	4
1.1.3 Importancia del reino <i>Fungi</i> para el hombre.....	5
<b>1.2 El consumo de hongos comestibles cultivados.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 El cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> (J. E. Lange) Pilát .....	8
1.3. Clasificación taxonómica.....	9
1.4 Potencial del género <i>Agaricus</i> .....	12
1.4.1 Potencial de las especies silvestres.....	12
1.5 Desarrollo de técnicas moleculares para el mejoramiento genético .....	14
1.6 Diferentes estudios del género <i>Agaricus</i> que han empleado la región ITS.....	16
1.7 Análisis de similitud con datos moleculares a través de secuencias de ADN .....	18
1.8 Modelos de sustitución de nucleótidos.....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 General.....	23
3.2 Particulares .....	23
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>24</b>
4.1 Obtención del material fúngico .....	24
4.2 Procedencia y especies seleccionadas .....	24
4.3 Procesamiento de las cepas .....	25
4.4 Extracción del ADN .....	26
4.5 Cuantificación del ADN y visualización del gel .....	27
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
4.7 Purificación del producto de PCR.....	29
4.8 Secuenciación del producto del PCR.....	29
4.9 Comparación de las secuencias de estudio con la base de datos EBI.....	30

4.10	Análisis de agrupamiento y modelo de sustitución de nucleótidos.....	30
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1	Extracción del ADN .....	31
5.2	Cuantificación del ADN .....	31
5.3	Protocolo para la region ITS .....	32
5.4	Purificación del producto de PCR.....	35
5.5	Secuenciación del producto del PCR.....	36
5.6	Comparación de las secuencias de estudio en la base de datos EBI.....	37
5.7	Primer nivel de análisis de las especies estudiadas .....	39
5.7.1	<i>A. abruptibulbus</i> Peck.....	39
5.7.2	<i>A. arvensis</i> Schaeff.....	39
5.7.3	<i>A. bisporus</i> (J.E. Lange) Pilát. y <i>A. campestris</i> (F. H. Moller) Pilát.....	40
5.7.4	<i>A. bitorquis</i> (Quél.) Sacc.....	41
5.7.5	<i>A. blazei</i> Murrill, <i>A. brasiliensis</i> Wasser, M. Didukh, <i>A. rufotegulis</i> Nauta, <i>A. subrufescens</i> Peck.....	41
5.7.6	<i>A. dimimutivus</i> Peck.....	42
5.7.7	<i>A. maskae</i> Pilát.....	43
5.7.8	<i>A. moelleri</i> Wasser.....	43
5.7.9	<i>A. osecanus</i> Pilát.....	43
5.7.10	<i>A. pocillator</i> Murrill.....	44
5.7.11	<i>A. romagnesii</i> Wasser.....	44
5.7.12	<i>A. tollocanensis</i> Callac.....	44
5.7.13	<i>A. xanthodermus</i> Genev.....	45
5.7.14	Dendrograma generado del primer nivel de análisis.....	45
5.7.15	Dendrograma generado del segundo nivel de análisis.....	46
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
6.1.	Los dos grandes grupos formados en el dendrograma del primer nivel de análisis.....	51
6.1.1.	Grupo I.....	51
6.1.2.	Grupo II.....	52
6.2.	Segundo nivel de análisis .....	53
6.2.1.	GRUPO I SECCIÓN Arvenses.....	53
6.2.2.	CEPA 125.....	53
6.2.3.	CEPAS 54, 83, 89, 128 Y 130.....	55
6.2.4.	Cepa 54.....	57
6.2.5.	CP- 83.....	58
6.2.6.	CP- 89.....	59
6.2.7.	CP-128.....	59
6.2.8.	CP- 130.....	60
6.2.9.	Discusión general del grupo I.....	61
6.3.	GRUPO II SECCIÓN <i>Campestris</i> .....	63

6.4.	GRUPO III.....	64
6.5.	GRUPO IV SECCIÓN Duploannulatae .....	65
6.5.1	CP-43.....	66
6.6.	GRUPO V.....	67
6.7	GRUPO VI SECCIÓN Xanthodermatei.....	68
6.7.1	CP-123.....	69
6.7.2	CP-138.....	69
6.7.3	CP-237.....	70
7	CONCLUSIONES.....	71
8.	PERSPECTIVAS.....	73
9.	REFERENCIAS.....	75
10.	PÁGINAS DE INTERNET CONSULTADAS.....	81
11.	ANEXOS .....	82



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Características generales de los hongos

Durante mucho tiempo los hongos fueron ubicados en el reino de las plantas, pero éstos tienen características muy específicas por lo que en la clasificación de los seres vivos realizada a partir de 1969 (Whittaker, 1969), fueron ubicados en un reino independiente conocido como Fungi. Estas características fueron vistas durante el siglo XVIII por botánicos que hicieron las primeras observaciones y descripciones microscópicas describiendo hifas y esporas (Carlile y Watkinson, 1996), posteriormente, estudios fisiológicos y químicos permitieron conocer más detalles acerca de las características de este reino; en la actualidad con las modernas técnicas moleculares como las que evidencian las diferencias en secuencias de ADN 18S ribosomal se ha corroborado que el reino Fungi es diferente de las plantas y los animales, siendo incluso más cercano a los animales que a las plantas (Wessels, 2001). Hoy en este reino se ha estimado que en el planeta existen alrededor de 1.5 millones de especies diferentes, de las cuales 64,000 han sido descritas (Oei, 2003).

Entre las características que hacen particular al reino Fungi resalta que son organismos no fotosintéticos que evolucionaron a partir de algas (Stamets y Chilton, 1983), al ser organismos carentes de clorofila, no pueden generar ellos mismos sus nutrientes, por lo que un rasgo que tienen en común es su modo de nutrición la cual es heterótrofa (Moore-Landecker, 1990). Los hongos consumen una gran variedad de organismos, la manera de consumirlos es liberando enzimas digestivas, que simplifican a las moléculas de los organismos consumidos para así poder pasar al interior de la célula los nutrientes por medio de la absorción, siendo este proceso el que los va a diferenciar de otros reinos como los animales que también son heterótrofos y eucariontes. Otra diferencia entre los hongos y los animales es que los animales tienen colesterol en la membrana plasmática y los hongos poseen ergosterol (Carlile y Watkinson, 1996), no obstante, utilizan glucógeno como un polímero de reserva pero no almidón a diferencia de las plantas (Wessels, 2001).

Asimismo, otra particularidad del reino fungi es que casi todos poseen células rodeadas por pared celular, la composición química de las paredes de la célula no es la misma en todos los hongos ya que contienen quitina o celulosa, junto con algunos otros complejos de moléculas orgánicas (Alexopoulos y Mims, 1979), la quitina es un polisacárido presente en la mayoría de los hongos y es mucho más resistente a la degradación por microorganismos que la celulosa y la lignina que constituyen las paredes de las plantas (Solomon y cols. 2001)

La mayoría de las especies de hongos son multicelulares, además generan esporas que pueden germinar y producir un tubo elongado el cual puede desarrollar una hifa que comúnmente es multicelular, en algunas especies el interior de las hifas es continuo (cenocítico) y en otras tiene divisiones celulares llamadas septos (Bryce, 2001). Las hifas cuando tienen un crecimiento colonial son llamadas micelio (Carlile y Watkinson, 1996). El micelio es la fase vegetativa del crecimiento fungal (Elliot, 1985), y tiene funciones importantes en la vida de los hongos: una es la de expandirse, otra es la de transportar nutrimentos y también el desarrollo de estructuras reproductivas (Moore-Landecker, 1990). El micelio puede expandirse de forma variable y formar colonias; algunas especies pueden estar restringidas al interior de un grano de polen y en otros casos ser de gran tamaño, como el famoso clon de miles de años de *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink, el cual se calcula que se extendió aproximadamente sobre 1500 acres del bosque y tiene una biomasa de miles de toneladas (Solomon y cols., 2001).

En algunos de los hongos multicelulares más complejos, se forman estructuras conspicuas llamadas cuerpos fructíferos o esporocarpos. El rol de los cuerpos fructíferos es la producción de un gran número de esporas para la dispersión (Carlile y Watkinson 1996). El esporocarpo es el soporte de esporas y es nutrido por el micelio (Moore-Landecker, 1990).

La mayor parte de los hongos se reproduce por medio de esporas microscópicas que se dispersan por viento, agua o animales (Solomon y cols., 2001). Las esporas además de servir para la dispersión del hongo también tienen el papel de ayudar a la sobrevivencia del hongo, si las condiciones ambientales cambian el hongo puede sobrevivir en una condición de latencia que se presenta en las esporas (Carlile y Watkinson, 1996).

### 1.1.1. Principales grupos de hongos

Aunque el registro fósil es insuficiente, éste muestra que los hongos surgieron en el cámbrico al mismo tiempo que plantas y animales. Las hifas primitivas probablemente vivieron como líquenes en simbiosis con cianobacterias (Wessels, 2001). En la actualidad los hongos están presentes en la mayoría de los habitats. Algunos ejemplos de habitats asociados a los hongos son: suelo, agua (dulce y salada), superficie de plantas y animales incluyendo el hombre, además de ambientes con condiciones extremas que sólo unas pocas especies pueden tolerar (Carlile y Watkinson, 1996).

Existe una gran variabilidad de especies en este reino y hoy se ha incrementado la evidencia molecular de que los hongos constituyen un grupo natural el cual puede ser registrado como los hongos verdaderos.

Los eumycota son denominados hongos verdaderos y hoy en día se asigna a estos organismos 6 fila los cuales son: Chytridiomycota (quitidriomicetes), Zygomycota (zigomicetes), Ascomycota (ascomicetes), Basidiomycota (basidiomicetes), Deuteromycota (deuteromicetes) (Solomon y cols., 2001) y Glomeromycota (Schübler y cols. 2001).

Quitidriomicetes: antes se pensaba que eran protistas fungoides, sin embargo, las comparaciones moleculares con base en secuencias de DNA y RNA han aportado pruebas en más de 750 especies de que éstos son más cercanos a los hongos y no a los protistas. Estos organismos se caracterizan porque tienen gametos flagelados, tienen alternancia de generaciones  $n$  y  $2n$ , talos haploides los cuales forman gametangios en donde se forman los gametos flagelados formando un cigoto diploide. Estos hongos se pueden encontrar principalmente en aguas dulces, ambientes húmedos y marinos, son parásitos y descomponedores, un ejemplo de ellos es el hongo *Allomyces*.

Cigomicetes: forman esporas sexuales llamadas cigosporas, las que protegen al cigoto el cual únicamente va a ser diploide. Casi todos son descomponedores y algunos parásitos, un ejemplo de estos organismos es el moho negro del pan *Rhizopus stolonifer*.

Ascomicetes: hay más de 30 000 especies descritas, 3000 de las cuales son levaduras. Las esporas se producen en sacos microscópicos generalmente formando 8 esporas. Algunos representantes de ellos son las levaduras, mohos verdes y azules, morillas y trufas.

Deuteromicetes: son conocidos como hongos imperfectos porque en muchos de ellos no se ha observado en muchos de ellos la fase sexual en el ciclo de vida. Se reproducen por conidios y se relaciona más con ascomicetes y menos con los basidiomicetes.

Glomeromicetes: incluyen a los hongos formadores de micorriza arbuscular, y uno de sus miembros forma una asociación simbiótica mutualista con cianobacterias, recientemente han sido analizados a través de la pequeña sub unidad del ARN ribosomal encontrando que forman un grupo aparte de los Zigomicetes, por lo que han sido puestos dentro de un nuevo Phylum, el Glomeromycota (Schubler y cols., 2001)

Basidiomicetos: forman basidios que son estructuras microscópicas que a forman las esporas exógenamente y producen en la mayoría de los casos 4 esporas. En este grupo se encuentran los hongos más conocidos por el hombre ya que varios de ellos son empleados como alimento desde la antigüedad como son los casos de los generos: Amanitas, Agaricus, Boletaceos, etc.

### 1.1.2 Función de los hongos en la naturaleza

En el reino fungi se pueden encontrar diversos papeles que realizan las diferentes especies de hongos en la naturaleza, algunos son mutualistas y se asocian con otros organismos, como sucede en las raíces de las plantas, existiendo aproximadamente en el 90% de todas las plantas (Solomon y cols., 2001), otros hongos son parásitos y adquieren sus nutrimentos de organismos vivos, otros son saprotrófos y obtienen sus nutrimentos de organismos muertos (Carlile y Watkinson, 1996).

Los hongos saprotrófos tienen gran importancia ecológica en el planeta, ya que contribuyen en gran medida a guardar el equilibrio ecológico, esto a través de realizar diversas funciones que contribuyen a la reintegración de elementos en los ciclos biológicos. Los hongos son los agentes responsables de mucha de la desintegración de la materia orgánica (Alexopoulos y Mims, 1979), ya que son el principal grupo de organismos responsables de reciclar los componentes de las plantas muertas, la descomposición de los remanentes de animales y microorganismos incluyendo hongos y bacterias (Carlile y Watkinson, 1996) Los hongos al degradar desechos y organismos muertos liberan agua, carbono y componentes

minerales, tales elementos recirculan volviendo a ser útiles para otros organismos (Solomon y cols., 2001). Hoy en día esta característica degradadora de los hongos saprotrófos es empleada para diversos fines, como es el cultivo de hongos en desechos agrícolas, ya que, al mismo tiempo que se contribuye a reciclar desechos agrícolas se obtienen cuerpos fructíferos comestibles.

### 1.1.3 Importancia del reino *Fungi* para el hombre

Los hongos han jugado un papel significativo en el curso de las culturas humanas de todo el mundo (Stamets y Chilton, 1983). Varias culturas han tenido conocimiento de los hongos desde hace cientos de años, como los egipcios, griegos, romanos, grupos étnicos mexicanos y guatemaltecos (Alexopoulos y Mims, 1979). Se tiene conocimiento de diferentes especies de hongos han sido empleados desde la antigüedad, ya que se cuenta con diversas pruebas, como esculturas, pinturas, códices y escritos que hacen referencia a ellos y que confirman sus usos por diferentes culturas. En diferentes partes del mundo se les han dado diversas categorías antropocéntricas como: comestibles, combustibles, forrajeros, herramientas de trabajo, juguetes, uso mágico- religioso o sagrado, medicinales, narcóticos y anestésicos, ornamentales, perfumería y cosmético, pesticidas, pigmentos y colorantes, para la producción de bebidas y alimentos fermentados, tóxicos y vestimenta (Estrada-Torres, 1989).

Varios de estos usos están desapareciendo, pero lo que aún se preservan e incluso se han mejorado en la actualidad por medio de los avances biotecnológicos, son el uso medicinal, el cual ha sido base para estudiar las propiedades tradicionalmente atribuidas a diversas especies de hongos. En algunos estudios hongos medicinales se han agrupado de acuerdo con sus actividades medicinales como: productores de antibióticos y vitaminas, anticancerígenos, purgantes, alucinógenos, antineurálgicos, antituberosos, inmunodepresores, inmunoestimuladores entre otras (Calonge, 1993). Por lo que hoy son usados para obtener sus principios activos para la producción comercial, por ejemplo, en la elaboración de antibióticos como la penicilina y la griseofulvina. Por todo lo anterior, los hongos han sido

blanco de estudios de gran valor químico y también son empleados para estudios genéticos (Carlile y Watkinson, 1996).

Otro ejemplo es el uso para la elaboración de bebidas y alimentos fermentados los cuales han sido empleados desde la antigüedad pero que hoy en día se siguen empleando en un gran número de procesos industriales como la producción de alcohol por medio de levaduras, así como de vino, cerveza, la fermentación de cacao y la preparación de ciertos quesos (Solomon y cols. 2001).

No obstante, hoy en día han surgido nuevas aplicaciones para los hongos, ya que son usados como organismos modelos para la investigación, como por ejemplo, el estudio realizado por Tatum (1940) en Carlile y Watkinson, (1996), en el cual empleó al hongo *Neurospora crassa* y se estableció el concepto de que una enzima es específica de un gen, y los recientes estudios desarrollados en recombinación genética de ADN que han permitido que los hongos sean usados para producir hormonas y vacunas (Carlile y Watkinson, 1996). Por lo que ahora los hongos son un campo no sólo exclusivo de micólogos, sino también de citólogos, genetistas y bioquímicos que han encontrado en ellos una importante herramienta en la investigación en los estudios de procesos biológicos por su rápido crecimiento, además porque requiere poco espacio y equipo para estudiarlos (Alexopoulos y Mims, 1979).

El uso comestible de los hongos ha perdurado a través del tiempo, aunque se carece de registros donde se señale el consumo, pero seguramente el hombre primitivo empezó a consumir hongos silvestres. Posteriormente se tienen registros históricos del consumo de diferentes especies comestibles por diversas culturas del mundo. En la actualidad el consumo de los hongos comestibles se ha incrementado desde que se desarrollaron empíricamente tecnologías rústicas para poder cultivarlos, siendo actualmente una gran industria.

Por lo anterior, los hongos son fundamentales hoy en día como modelos en las investigaciones biológicas, además de la importancia económica que ellos proporcionan como recurso biológico.

## 1.2 El consumo de hongos comestibles cultivados

Se tienen registros muy antiguos del cultivo de diferentes especies de hongos, por ejemplo desde hace más de 2000 años, la gente en Japón cultivaba el hongo *Auricularia*, así como las formas primitivas del cultivo de Shiitake (*Lentinus edodes*) que se reportan por primera vez en China durante los siglos X-XIII d.c. (Martínez-Carrera y cols. 2004).

En la actualidad el cultivo de hongos comestibles es una actividad de importancia económica y social la cual se ha incrementado en todo el mundo. La FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) indicó que hubo un incremento extraordinario en el tonelaje total de la producción de hongos durante el año de 1996 (Whiteford y Thurston, 2000). Hoy en día la producción es de 6.2 millones de toneladas de hongos frescos por año que generan un valor económico de 30 billones de dólares (Martínez-Carrera y cols., 2004).

En América Latina durante el periodo de 1995-2001 la producción de hongos se incrementó 32%, de 49,975 a 65,951 toneladas por año y en México en el año 2001 se obtuvieron 38,708 toneladas (Martínez-Carrera, 2002). En la actualidad la producción en México genera una estimación anual de 150 millones de dólares y aproximadamente 20,000 empleos directos e indirectos (Martínez-Carrera y cols., 2004).

Este aumento en la producción se ha debido entre otros motivos al mejoramiento de las técnicas de cultivo, al uso de suplementos y al mejoramiento de la composta (Sonnenberg, 2000). También se ha incrementado el cultivo de hongos porque ahora son considerados como una alternativa en la agricultura, ya que con las nuevas técnicas de cultivo se han empleado novedosos y diversos substratos, los cuales eran considerados desperdicios agroindustriales pero ahora se pueden reutilizar para el crecimiento de los hongos y de esta forma lo que antes era considerado un desperdicio actualmente brinda la posibilidad de obtener proteínas de origen no animal. Por este motivo se han llevado a cabo varios proyectos para cultivar hongos en diversas partes del mundo para combatir la pobreza, estos proyectos han tenido un soporte de varias organizaciones internacionales y locales, adecuando los proyectos a cada región, usando métodos o sistemas de acuerdo con cada situación particular (Whe, 2004), por lo que hoy los cultivos de hongos comestibles son considerados para

proyectos productivos alternativos y en algunos casos son los cultivos principales, siendo así una opción importante en la agricultura.

Tradicionalmente el cultivo de hongos se ha llevado a cabo en el sur de Asia, en China y Japón y por otro lado en Europa, Norte América y Australia (Whiteford y Thurston, 2000), pero hoy en día el cultivo de hongos se ha ido esparciendo en todo el mundo, cultivándose diversas especies, siendo las más importantes: *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Pilát, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricula* spp. y *Flamulina velutipes* (Stop y Mooibroek, 1999).

### 1.2.1 El cultivo de *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Pilát

El hongo comestible más importante en las regiones de Europa y Norte América es indudablemente *A. bisporus* (Singer, 1986), el cual es nombrado popularmente como champiñón. Éste comenzó a ser cultivado en Francia y después en otros sitios de Europa, extendiéndose posteriormente a América en donde comenzó a ser cultivado en Estados Unidos en 1880, subsecuentemente en 1912 se cultivó en Canadá en 1912 y se inicia su cultivo en México en 1933 por un inmigrante italiano, el Sr. José Leben Zdravie (Martínez-Carrera y cols., 1997). Después de la segunda guerra mundial el cultivo de *A. bisporus* se disparó rápidamente en todo el mundo (Oei, 2003), aunque las bases genéticas del desarrollo en la reproducción de este hongo fueron elucidadas a principios de los setentas (Fritsche G., 1991), en la actualidad es el hongo cultivado de mayor importancia económica, el más ampliamente conocido y el más vendido a nivel mundial.

En el año de 1997 se produjeron en el mundo seis millones de toneladas de *A. bisporus* (Chang, 1999). Para ese mismo año las estimaciones de producción del champiñón en México fueron de 26,000 toneladas por año con un valor de 70 millones de dólares (Martínez-Carrera y cols., 1997).

A pesar de dicho incremento en la producción de *A. bisporus*, en México la producción estaba limitada al altiplano, porque esta especie fructifica únicamente en regiones templadas, ya que la semilla comercial que se cultiva en México tiene su origen en E. U. y Europa; esta semilla para los cultivos está basada en un pequeño número de cepas híbridas con poca diversidad genética (Loftus y cols., 1998; Kerrigan y cols., 1998 en Whiteford y



Thurston, 2000), derivadas de tan sólo 20 cepas aisladas de Europa (Sonnenberg, 2000), lo que limita su producción en regiones subtropicales y tropicales (Martínez-Carrera y cols., 1997), además, en la actualidad existen pocos trabajos sobre cepas de *Agaricus* que puedan cultivarse en climas cálidos.

### 1.3. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del género *Agaricus* es:

Dominio Eucariota,  
Reino Fungi,  
Phyllum Basidiomycota.

La clasificación de acuerdo con Singer 1986:

Orden Agaricales  
Suborden Agaricineae  
Familia Agaricaceae  
Tribu Agariceae  
Género *Agaricus*

De acuerdo con Capelli (1984), desde Linneo (1753), varios estudios se han realizado al género *Agaricus*, como los de Möller (1950-1952), Pilat (1951), Konrad y Maublanc (1952), Kühner y Romagnesi (1953), Moser (1967-1983), Singer (1975), Heinemann (1978), Wasser (1980), Cappelli (1984). Todos estos autores han considerado diversos rasgos de los hongos por lo que la taxonomía del género *Agaricus* esta basada en macro y micro morfología, basándose los rasgos microscópicos particularmente en las dimensiones de las esporas, además de otras características tales como reacciones químicas, colorimétricas y organolépticas (Evered y cols., 2000).

Los diferentes arreglos del género varían de autor a autor, ya que algunos dependiendo de las características que emplearon algunos los ubican por abajo del género en diversas categorías como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Arreglo taxonómico del género *Agaricus* por diferentes autores empleando criterios básicamente morfológicos.

Autores	Género	Subgénero	Sección	Subsección	Grupo
Willer 1950 1952	<i>Psalliota</i>		Rubescentes		Edulis, Silvatica, Vaporaria, Spissa, Campestris
			Flavescentes	Majores	Augusta, Arvensis, Xanthoderma, Macrosporus
				Minores	
Pilat 1951	<i>Agaricus</i>	<i>Euagaricus</i>	Rufescentes, Flaventes Sanguinolentae		
		<i>Melanophyllum</i>			
Kuntze et Wahlberg 1951	<i>Agaricus</i>		Campestres	Majores	Edulis, Silvaticus, Vaporarius, Spissus, Campester
			Arvenses		Augustus, Arvensis, Xanthodermus, Macrosporus
Willer et Wahlberg 1951	<i>Psalliota</i>		Rubescentes	Minores	Bitorques, Rufescentes, Sanguinolentae
			Flavescentes		Augustae, Silvicolae, Xanthodermae, Minores
Willer 1957-1963	<i>Agaricus</i>		Edules, Rubescentes, Flavescentes Minores, Xanthodermatei		
Willer 1958	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	Agaricus, Sanguinolenti, Arvensis Xanthodermatei		
		<i>Lanagaricus</i>			
		<i>Conioagaricus</i>			

	Género	Subgénero	Sección	Subsección	Grupo
	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i> , <i>Hortenses</i> , <i>Spissicaules</i> , <i>Bitorques</i>	
			<i>Sanguinolenti</i>		
			<i>Arvenses</i>	<i>Minores</i> , <i>Arvenses</i>	
			<i>Xanthodermatei</i>		
			<i>Brunneopicti</i>		
		<i>Lanagaricus</i>			
		<i>Conioagaricus</i>			
	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Rufescentes</i> , <i>Sanguinolentae</i>	
			<i>Duploannulatae</i>		
		<i>Flavoagaricus</i>	<i>Majores</i>	<i>Flavescentes</i> , <i>Vandaeformis</i>	
			<i>Minores</i>		
		<i>Lanagaricus</i>			
		<i>Conioagaricus</i>			
	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Bitorques</i>		<i>Bitorquis</i> , <i>Gennadi</i> , <i>Bisporus</i>
			<i>Agaricus</i>		<i>Campestres</i> , <i>Vaporarius</i>
			<i>Sanguinolenti</i>		<i>Silvaticus</i> , <i>Langei</i> , <i>Altipes</i> <i>Fusco-Fibrillosus</i>
			<i>Arvenses</i>		<i>Arvensis</i> , <i>Spissicaulis</i> , <i>viaticusporus</i> , <i>Silvicola</i> , <i>Aestivalis</i> , <i>Augustus</i>
			<i>Minores</i>		<i>Comtulus</i> , <i>Semotus</i>
			<i>Xanthodermatei</i>		<i>Xanthoderma</i> , <i>Fraternus</i> , <i>Pseudopratis</i>
		<i>Lanagaricus</i>			
		<i>Conioagaricus</i>			

Recientemente, además de la morfología tanto del cuerpo fructífero como de las esporas y las pruebas químicas, también se ha empezado a usar pruebas de infertilidad y técnicas moleculares (Evered y cols., 2000), tales como RAPD, RFLP, LSU rDNA, ITS.

Entre los nuevos métodos moleculares que han empleado al ADN se han realizado algunos estudios que han tratado de ver las relaciones filogenéticas entre varias especies del género, otros han estudiado algunas especies seleccionadas y han visto sus similitudes genéticas con otros grupos dentro del género *Agaricus*, como los trabajos de Challen y cols. 2003, Geml y cols. 2004 a; 2004b y Kerrigan 2005.

#### **1.4 Potencial del género *Agaricus***

El género *Agaricus* ha sido explotado muy poco puesto que solamente se cultivan principalmente las especies *A. bisporus* y *A. bitorquis*, no obstante, se considera que existen cerca de 200 especies del género *Agaricus* alrededor del mundo (Calvo-Bado y cols., 2000 a), aunque algunos especialistas reconocen cerca de 250 especies pero se podría asumir que el total de especies de *Agaricus* podría estar entre 300 y 400 (Bas, 1991), éste cálculo es debido a la amplia distribución que tiene el género, ya que es considerado como cosmopolita.

#### **1.4.1 Potencial de las especies silvestres**

Las especies silvestres del género *Agaricus* tienen un gran potencial ya que son pocas las que son ligeramente tóxicas, éstas se encuentran sólo en la sección *Xanthodermus*, las demás especies son comestibles en un rango de excelentes a pobres en valor nutrimental (Singer, 1986) de igual forma, otras especies contienen propiedades medicinales como *A. bisporus* (Stamets, 2000).

Varias de las especies silvestres del género *Agaricus* tienen demanda en Europa, en varias partes de Asia, Liberia, Indochina, China, Pakistán, Java, Japón, Filipinas y Chile (Singer, 1986).

En México, Gutiérrez (1990), reportó 28 especies del género *Agaricus* en 15 estados de la República, en ese mismo año Gutiérrez y Cifuentes realizaron la descripción de 14 taxones para México, de los cuales siete fueron nuevos registros para el país (Cifuentes y Gutiérrez,

(1990), Bandala y Montoya (1993), realizaron un nuevo registro de una especie para México, Moreno-Fuentes y cols., (1994) realizaron el registro de una especie para Chihuahua, por lo anterior para México se han reportado 39 especies en 19 estados de la República, éstas se muestran en la tabla 2, consumiéndose tradicionalmente varias de estas especies silvestres en diversos estados de la República.

Tabla 2. Diferentes especies reportadas del género *Agaricus* en diversos estados de la República Mexicana.

	Baja California	Chiapas	Chihuahua	D.F.	Durango	Guerrero	Hidalgo	Jalisco	Edo. México	Michoacán	Morales	Nuevo León	Oaxaca	Puebla	Sonora	Tlaxcala	Veracruz	Yucatán	Zacatecas
<i>A. arvensis</i> Schaeff. Ex Fr.																			
<i>A. augustus</i> Fr.																			
<i>A. leucodermis</i> Heinem.																			
<i>A. lamardii</i> (Quel.) Apud. Cke Et Qué!																			
<i>A. ...</i> (Sacc.) Sacc.																			
<i>A. ...</i> (Lévl.) Imbach.																			
<i>A. campestris</i> L. ex Fr.																			
<i>A. ...</i> Fr.																			
<i>A. ...</i> Heinem.																			
<i>A. ...</i> B. & Br.																			
<i>A. ...</i> Bon.																			
<i>A. ...</i> (Rea) Pil.																			
<i>A. ...</i> Schaeff.																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Möll.																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Möll.																			
<i>A. ...</i> Freeman var. <i>praeclaresquamosus</i>																			
<i>A. ...</i> Freeman var. <i>...</i>																			
<i>A. ...</i> Peck																			
<i>A. ...</i> Scop.																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Pilát																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Möll.																			
<i>A. ...</i> Fr.																			
<i>A. ...</i> Peck																			
<i>A. ...</i> (Lévl.) Imbach.																			
<i>A. ...</i> Peck																			
<i>A. ...</i> Heinem.																			
<i>A. ...</i> Schaeff. Ex Fr.																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Pilát																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Möll.																			
<i>A. ...</i> (Müll.) Sacc.																			
<i>A. ...</i> (Müll.) Sacc.																			
<i>A. ...</i> Baker & Dal.																			
<i>A. ...</i> (Möll.) Pilát																			
<i>A. ...</i> Heinem & Goos																			
<i>A. ...</i> (A. Pearson) Heinem.																			
<i>A. ...</i> Gen.																			
<i>A. ...</i> (Müll.) Sacc.																			
<i>A. ...</i> Murr.																			

Se han realizado algunos estudios de especies silvestres de *Agaricus* de diversos sitios del mundo y se han encontrado diversas características genéticas que se desearía que tuviesen

las cepas comerciales de *A. bisporus*, como son: la resistencia a ciertos patógenos como *Fusicillium fungicola* (dry bubble), algunos virus, LIV (Sonnenberg y cols. 1996) y la resistencia natural a cepas agresivas de *Trichoderma* (Kerrigan, 2000; 2004).

Otra ventaja de algunas cepas silvestres son las especies tropicales, como la W19 y W20, ya que pueden crecer en climas tropicales a 28°C siendo la temperatura óptima de las cepas convencionales de 24-25°C (Smith y Love, 1991).

Por las características que tienen estos hongos silvestres se han realizado estudios que han tratado de identificar y utilizar la variación genética de las poblaciones silvestres de *Agaricus* para el mejoramiento de cepas de *A. bisporus* (Anderson y cols. 1984). La disponibilidad del germoplasma silvestre para la reproducción de los hongos ha expandido el horizonte para el desarrollo de cepas nuevas y mejoradas (Khush y cols. 1995). Algunas especies silvestres de este género también tienen un gran potencial económico ya que, se han realizado pruebas y al igual que las cepas comerciales éstas también pueden ser cultivadas en el mismo substrato en que es cultivado *A. bisporus* (Martínez-Carrera y cols., 1997). Esta no ha sido una tarea fácil ya que son contadas las especies del género *Agaricus* que han sido sembradas seriamente debido a la dificultad de aislarlas y cultivarlas (Bas, 1991), así como de una gran infraestructura y de diversas metodologías para satisfacer los requerimientos de cada una de las especies. Este proceso es complejo desde el principio debido a diversos factores como lo son desde la toma de muestra de tejido del cuerpo fructífero que debe ser tomada en condiciones estériles, la cual es principalmente importante para preparar cultivos de cepas de *Agaricus* que no han sido cultivadas previamente como lo son las cepas silvestres (Fritsche, 1981).

Hoy en día debido al potencial que tienen las diferentes especies del género *Agaricus* se siguen realizando diversas pruebas para el mejoramiento de las cepas comerciales, e incluso se han incorporado las nuevas técnicas moleculares para realizar nuevas cepas mejoradas.

### **1.5 Desarrollo de técnicas moleculares para el mejoramiento genético**

Para el mejoramiento genético entre especies se han utilizado técnicas de entrecruzamiento, empleando organismos morfológicamente similares y de preferencia que

tenían un parentesco cercano, el cual ha sido realizado por métodos convencionales empleando los criterios como la morfología, que provee rasgos de valor para su clasificación, además de otros datos como de nutrición, fisiológicos y bioquímicos, pero esto puede ser laborioso, no obstante en cada célula la secuencia de nucleótidos representa una enorme suma de información, por lo que la tecnología del ADN ha empezado a tener un impacto en la identificación, clasificación y filogenia, y está empezando a incrementarse su uso en la taxonomía de hongos (Carlile y Watkinson, 1996). Asimismo, hasta hace poco la clasificación de los hongos tradicionalmente se basaba sobre todo en las características de sus esporas y de los cuerpos fructíferos, pero datos moleculares como los resultados de comparaciones en secuencias de ADN y RNA son cada vez más importantes para determinar las relaciones entre hongos (Solomon y cols., 2001).

Ahora, con el desarrollo de herramientas moleculares para análisis taxonómicos se pueden elucidar los sistemas de reproducción que pueden ayudar en la explotación de especies a través del género (Calvo-Bado y cols., 2000a).

Algunas ventajas de comparar a los organismos por ADN son: que éste contiene cuatro tipos de nucleótidos (A T G C) y pueden ser usados para comparar cualquier grupo de organismos, ya que en los agrupamientos clásicos esto es virtualmente imposible (Nei y Kumar, 2000).

Para poder clonar al ADN la técnica empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se han encontrado aplicaciones extensivas para la PCR en algunos campos de la micología, incluyendo la genética, la sistemática, la ecología, la microbiología del suelo, la patología de plantas, la micología médica y la biotecnología de hongos (Edel, 1999).

La PCR ha podido ampliar el conocimiento acerca de las especies, porque ésta provee un método rápido y sensible para estudios taxonómicos y ecológicos en especies de hongos (Gardes y cols., 1991) y ya ha sido empleado con *A. bisporus* en programas de reproducción (Khashy y cols., 1991).

La PCR puede amplificar diversas secciones del ADN, incluyendo los ITS (Internally Transcribed Spacer). La región ITS ha sido utilizada en varios organismos incluyendo a los hongos, en estos organismos se ha empleado esta región principalmente en especies de interés

forestal, económico, medicinal y alimenticio. Dichos estudios se han usado para diversos fines como estudios filogenéticos, caracterizaciones moleculares, variaciones entre las especies y para determinarlas y para determinar su identidad. En todos estos estudios la región ITS ha dado resultados muy confiables debido a que esta región no codificante esta ubicada dentro del ADNr entre la pequeña subunidad altamente conservada 5.8S y la subunidad larga como se puede apreciar en la figura 1, por esto es ampliamente usada porque evoluciona rápidamente y puede variar entre especies dentro del género o entre poblaciones (White y cols., 1990). Muchas características hacen a esta región un blanco conveniente para la identificación de hongos, porque en éstos la región completa frecuentemente abarca de 600 a 800 pares de bases que pueden ser amplificadas con primers universales, asimismo, muchos estudios demuestran que esta región es con frecuencia altamente variable entre especies filógicas morfológicamente distintas (Gardes y Bruns, 1991), por lo que es ampliamente usada para ver diferencias entre las especies.

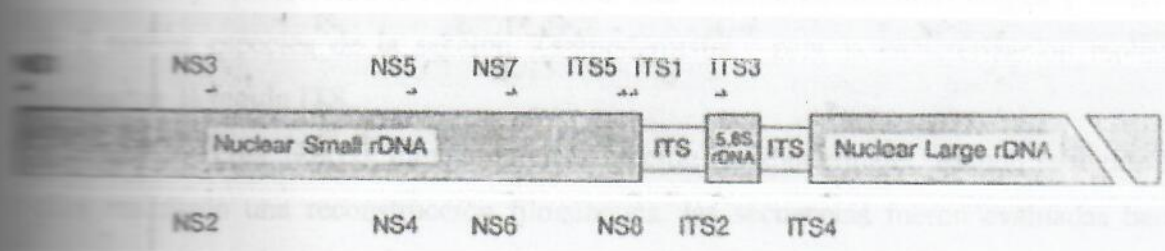


Figura 1. Localización del ADNr y de los diferentes primers empleados (esquema tomado de White y cols., 1990).

### Los Diferentes estudios del género *Agaricus* que han empleado la región ITS

Del género *Agaricus* ya existe un registro en la base de datos de European Bioinformatics Institute (EBI) de 43 especies y 71 secuencias de la especie *A. bisporus* de la región ITS, las cuales se incrementan constantemente ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).



Se han realizado diversos estudios con esta región: como el de Calvo-Bado y cols. (2000 a), quienes realizaron estudios en el género *Agaricus*, empleando la región ITS para confirmar la identidad de las especies.

Calvo-Bado y cols. (2000 b), emplearon la secuencia ITS para determinar la identidad de 12 colecciones silvestres de la sección *Arvenses* del género *Agaricus*, para fines reproductivos.

También se han realizado estudios filogenéticos en el género *Agaricus* a partir de esta región, como el de Challen y cols. (2003), quienes hicieron una reconstrucción de la sección *Diplanulatae* empleando para su evaluación el criterio de máxima parsimonia en el programa de software PAUP.

Otro estudio filogenético del género *Agaricus* a partir de región ITS fue el de Geml y cols. (2004), quienes emplearon esta región para ver las interrelaciones de las especies dentro del género empleando las siguientes metodologías: el programa de software PAUP, que incluye máxima parsimonia y máxima probabilidad.

Callac y Guinberteau (2005), realizaron una caracterización morfológica y molecular de 2 nuevas especies de la sección *Xanthodermatei*, para la caracterización molecular emplearon la región ITS.

Callac y cols. (2005), trabajaron en la sección *Xanthodermatei* usando la región ITS, ellos realizaron una reconstrucción filogenética, las secuencias fueron evaluadas bajo el método de distancia de máxima parsimonia y máxima similitud.

Kerrigan (2005 a), de igual forma empleo la región ITS para determinar la variación entre varias especies consideradas como sinónimos, además con esta información propone la formación de híbridos.

Kerrigan (2005 b), realizó un estudio filogenético en el género *Agaricus* en la sección *Xanthodermatei*, empleado los métodos de máxima parsimonia y máxima probabilidad.

Por lo anterior la región ITS empieza ha ser ampliamente usada para diversos tipos de investigaciones.

## 1.7 Análisis de similitud con datos moleculares a través de secuencias de ADN

La información molecular también puede ser usada para producir clasificaciones y deducir filogenia, también por el método de taxonomía numérica los datos pueden ser procesados para generar un agrupamiento el cual genera un fenograma o un dendrograma que indique parecido (Carlile y Watkinson, 1996).

Para realizar un dendrograma se pueden emplear los 4 nucleótidos del ADN, estos pueden ser las unidades que mediante operaciones matemáticas y la aplicación de modelos de sustitución de nucleótidos se puede generar una matriz básica de datos y así poder ver las similitudes.

## 1.8 Modelos de sustitución de nucleótidos

Para estimar el número de sustituciones de nucleótidos es necesario usar un modelo matemático de sustitución de nucleótidos (Nei y Kumar, 2000). Las distancias entre un par de secuencias usualmente son medidas por el número de nucleótidos y las sustituciones que ocurren entre ellas, para este efecto se han generado diversos modelos de sustitución de nucleótidos los cuales consideran diversos aspectos del ADN, estos se muestran en la tabla

Modelo	Descripción	Referencia
Jukes-Cantor	Modelo más simple que asume igualdad de frecuencias de los cuatro nucleótidos y de las tasas de sustitución entre ellos.	Jukes y Cantor, 1969
Felsenstein	Modelo que considera la frecuencia de los cuatro nucleótidos pero asume igualdad de tasas de sustitución.	Felsenstein, 1981
Kimura	Modelo que considera la frecuencia de los cuatro nucleótidos y distingue entre sustituciones de pares purines por purines y pirimidines por pirimidines.	Kimura, 1981
General	Modelo más complejo que considera la frecuencia de los cuatro nucleótidos y las tasas de sustitución entre ellos.	Nei y Kumar, 2000

Tabla 3. Principales modelos de sustitución de nucleótidos

Modelos para estimar la sustitución de nucleótidos	Características que toma en cuenta	Observaciones
p-distancia	Compara dos secuencias y se obtiene al dividir número de nucleótidos diferentes por el total de nucleótidos comparados.	La estimación del tiempo divergente de dos secuencias no es una buena medida.
Jukes y Cantors	Asume que la sustitución de nucleótidos es la misma en todos los pares de los 4 nucleótidos y se da en cualquier sitio con la misma frecuencia y probabilidad de cambiar por cualquiera de los otros 3 nucleótidos (A T G C).	Cuando el número de nucleótidos examinado es pequeño (menor a 1000), este método tiende a sobre estimar el verdadero número de sustituciones de nucleótidos.
Tajima-Nei	Asume que se tiene una proporción igual en la sustitución entre los sitios con transiciones y transversiones. Este modelo además considera solamente a las parejas de nucleótidos que coinciden y los vacíos son ignorados.	Da una mejor estimación del número de sustitución de nucleótidos que la distancia de Jukes y Cantor, además es aplicable a una gran variedad de casos cuando el número de sustitución de nucleótidos es muy largo.
Kimura	Toma en cuenta las proporciones de sustituciones de las transiciones, las cuales son frecuentemente más altas que las transversiones.	Esta distancia se aplica principalmente en ADN mitocondrial.
Tamura-Nei	Analiza DNA mitocondrial.	Es empleado para realizar inferencias filogenéticas con máxima probabilidad

Después de aplicar un coeficiente de sustitución de nucleótidos y obtener una matriz, existen diversos métodos que nos permiten hacer agrupaciones calculando los coeficientes de distancias genéticas, estos métodos conforman el llamado análisis de agrupamiento, uno

de los métodos más empleados para realizar agrupamientos es el método de NEIGHBOR-JOINING, éste es usado para crear dendógramas, principalmente con secuencias de ADN o secuencia de proteínas, el algoritmo que emplea requiere conocimiento de la distancia entre cada una de las secuencias ya sea de ADN o de aminoácidos (Saitou y Nei, 1987). Después de conocer las distancias genéticas el método de NEIGHBOR-JOINING genera dendógramas en los cuales se elige el que tenga menor cantidad de cambios, esto lo realiza por medio de un algoritmo y puede elegir el dendógrama correcto con alta probabilidad, ya que la virtud de éste es la alta eficiencia que tiene, además, este método es recomendado cuando se realizan alineamientos de múltiples secuencias (Nei y Kumar, 2000).

Con estas nuevas metodologías utilizando ADN ahora se tiene una nueva opción para conocer las similitudes entre las especies del género *Agaricus* que se puede aplicar en un futuro para realizar programas de mejoramiento genético. El estudio con otras especies de *Agaricus* podría ser usado como recurso de variación genética que podría ser introducido en *A. bisporus* (Elliot, 1978).

Dadas las diversas ventajas y potencial económico que tienen las especies silvestres de *Agaricus* es prioritario describirlas desde varios puntos de vista, por ejemplo molecularmente, ya que varias de estas habitan en selvas tropicales y en áreas remotas pudieran desaparecer antes de que la ciencia pueda si quiera descubrirlas por ellos es particularmente importante el rescatar las cepas nativas y depositarlas en colecciones (Oei, 2003). A pesar de la dificultad de rescatar a las cepas silvestres, desde 1990 se conformó el Programa de Recursos de *Agaricus* con el fin de tener acceso a especies silvestres para su reproducción (Stoop y Mooibroek, 1999).

El Colegio de Posgraduados Campus Puebla, también es participante del proyecto del genoma de *Agaricus* (Martínez-Carrera, 2002). Desde 1997 se ha recuperado y preservado el genotipo silvestre de especies de *Agaricus*, los cuales son consumidos en comunidades y mercados (Martínez-Carrera y cols. 2001). Estos ejemplares se han recolectado y aislado de diferentes regiones climáticas de México como: las tropicales, y subtropicales y bosques templados, que pertenecen a diversos estados de la República como Puebla, Tlaxcala y Chiapas, también, se cuenta con varias cepas de diversas partes del mundo. En este proyecto se ha realizado el aislamiento y caracterización empleando técnicas clásicas con el fin de obtener cepas que muestren tolerancia a fructificar en altas temperaturas.

Estos ejemplares fueron identificados tentativamente basándose en la morfología del cuerpo fructífero y además evaluadas comparativamente para probar su desarrollo y eficiencia en el mismo sustrato que es usado para las cepas comerciales. Los resultados demostraron que las cepas silvestres poseen cierta resistencia genética al ataque de *Trichoderma* y que tienen tolerancia para fructificar a altas temperaturas (Martínez-Carrera y cols., 1997). No obstante, no se han realizado caracterizaciones moleculares en estas cepas e incluso no hay estudios moleculares en especies mexicanas silvestres del género *Agaricus*. Por lo que es prioritario determinar molecularmente a estas cepas mexicanas silvestres, evaluando las distancias genéticas y las similitudes que existen entre ellas y las distancias con cepas de otras especies del género. Esto con la idea de desarrollar a futuro un programa de mejoramiento del género *Agaricus*.

Esto por medio de diferentes vías como los métodos clásicos de entrecruzamiento o las técnicas modernas de fusión de protoplastos, la cual ya ha sido empleada en hongos para superar barreras entre poblaciones, especies e incluso entre géneros (Elliott, 1985), esta técnica se ha sido probada con *A. bisporus*, obteniendo híbridos estables (Khush y cols. 1995), e incluso se han obtenido altas frecuencias (30%) de regeneración entre diferentes especies dentro del género *Agaricus* (Fritsche y Sonnenberg, 1988).

Con la formación de nuevas cepas que tuvieran rasgos comercialmente aceptados de *A. bisporus* u otras especies de *Agaricus*, se podrían realizar cultivos en México en zonas especiales.

1. Definir, especificar y seleccionar la región (DZ) del AMPC de origen, además del grupo de cepas, procedentes de diversas partes de México.

2. Determinar la distancia genética entre las cepas de AMPC de la zona de origen, así como su relación a través de un estudio del genotipo.

3. Comparar las cepas de AMPC de la zona de origen con las cepas de AMPC de otras zonas geográficas internacionales y con cepas de otros géneros, así como de otros hongos del género *Agaricus*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Determinar la distancia genética entre cepas silvestres de México del género *Agaricus*, a través de la región ITS del ADN.

#### 3.2 Particulares

1. Aislar, amplificar y secuenciar la región ITS del ADN de cepas silvestres del género *Agaricus*, procedentes de diversas partes de México.

2. Determinar la distancia genética entre las cepas de *Agaricus* seleccionadas, analizando las secuencias a través de un programa computacional.

3. Comparar las secuencias del ADN obtenidas con las secuencias registradas en las bases de datos internacionales y con secuencias de especies empleadas previamente por expertos del género *Agaricus*.





Tabla 4. En esta tabla se muestran las especies seleccionadas para el estudio, el número de cepa al cual corresponden y el lugar de origen de cada una.

CFPA	ESPECIE	LUGAR DE PROCEDENCIA
CP-43	<i>Agaricus bitorquis</i> (Quél)Sacc.	Tailandia
CP-83	(F.H. Moller) Pilát <i>Agaricus osecanus</i> Pilát	Tecali, Puebla El Oasis Valsequillo,
CP-89	<i>Agaricus sp.</i>	Sto. Domingo, Chiapas
CP-122	Peck	
CP-125	<i>Agaricus osecanus</i> Pilát	Col. Romero Vargas, Puebla.
CP-128	<i>Agaricus bitorquis</i> (Quél)Sacc.	Africam Valsequillo
CP-130	<i>Agaricus bitorquis</i> (Quél)Sacc.	Valsequillo Tecali
CP-138	<i>Agaricus abruptibulbus</i> Peck	Xoxtla, Puebla
CP-237	<i>Agaricus sp.</i>	Colegio de Posgraduados. Campus Puebla

#### Procesamiento de las cenizas

Inicialmente las cepas de estudio estaban en medio CYM sólido (CYM líquido: extracto de levadura 2 g.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . 0.5g.  $KH_2PO_4$ . 0.46 g. agua destilada 1000mL y 20 g de agar bacteriológico). Para facilitar la cosecha de estas cepas, éstas tuvieron que ser resembradas en el medio

CYM líquido. Por lo que se elaboró medio completo para levaduras. líquido (CYM con los componentes y proporciones ya señaladas pero sin agar) Este medio fue esterilizado en autoclave a 121° C por 20 minutos, se dejó reposar durante una semana para evitar posibles contaminaciones y fue vertido en cajas de Petri para posterior siembra de las cepas.

Para realizar el proceso de pasar las cepas del medio sólido al medio líquido se utilizó la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, se tomó cada muestra del medio sólido depositada en las cajas de Petri empleando un bobote estéril. el cual fue incrustado en el medio sólido del que se tomó aproximadamente medio centímetro del micelio. Con la ayuda de una aguja estéril cada muestra fue depositada en el medio líquido contenido en las cajas de Petri, previamente rotuladas con la fecha y número de cepa correspondiente. posteriormente estas muestras fueron mantenidas a una temperatura de 22 grados centígrados durante 20 a 30 días aproximadamente.

Para cosechar las cepas Las cepas una vez colonizadas para ello se empleó papel filtro estéril y papel absorbente para agregar en ellos el micelio y quitar el exceso de medio. El medio fue colocado con una espátula estéril fue colocado el micelio en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles. los cuales fueron posteriormente rotulados con la fecha y número de la cepa. posterior depósito en nitrógeno líquido durante algunos minutos, después las muestras fueron colocadas en un refrigerador (REVCO) a una temperatura de -20°C para su posterior liofilización.

Las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador marca Labconco freeze dry system modelo 4.5. La temperatura del colector llegó a -50° y el vacío a  $53 \times 10^3$  milibares, las muestras fueron retiradas 24 horas después y almacenadas en un desecador con sílica gel para su posterior análisis.

#### Extracción del ADN

A las muestras se les aplicó el protocolo de extracción de ADN en hongos filamentosos, propuesto por Challen y cols. (1995). Este método consistió en moler con la

se agregó una varilla de plástico estéril al micelio liofilizado. posteriormente se agregó 650  $\mu$ L de buffer A (anexo 1) y 3  $\mu$ L de ribonucleasa A (SIGMA). La muestra se colocó en baño María (Lindberg/blue) a 70° C por 30 minutos, agitando la muestra cada 15 minutos. A continuación se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf 5415C) a 13000 rpm durante 10 minutos. Al mismo tiempo se prepararon columnas de Qiagen (EUA) y se le agregó 1 mL de buffer de equilibrio QTB (anexo 1), una vez que éste bajó por gravedad se agregó la muestra (sobrenadante) a la columna de Qiagen y por gravedad se dejó que pasara la muestra.

La columna se lavó 4 veces por separado con 1000  $\mu$ L de buffer QC (anexo 1). Posteriormente se le agregó a la columna 700  $\mu$ L de QF (anexo 1), el cual lavó al ADN y se colectó en un tubo de Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se añadió 700  $\mu$ L de isopropanol (100%) y se centrifugó en la microcentrífuga a 13000 rpm durante 20 minutos. Una vez concluido este proceso, sobre un papel absorbente se volteó de manera rápida el tubo Eppendorf para eliminar el isopropanol, quedando del dentro del tubo de Eppendorf la muestra de ADN en un pellet.

Al pellet se le añadió 500  $\mu$ L de etanol (70%) para lavar la muestra, y moviéndose suavemente se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y se colocó en una gradilla en el horno (Lab line) a 32° C durante 30 minutos. Posteriormente, se le añadió 50  $\mu$ L de TE 1X (anexo 1) agitándolo ligeramente y se colocó en baño María a 55° C por 30 minutos agitándolo cada 10 minutos. Una vez pasado los 30 minutos se centrifugó la muestra con un solo pulso.

#### **4.5 Cuantificación del ADN y visualización del gel**

Se preparó un gel de agarosa al 1%, disolviendo 1gr. de agarosa (PROMEGA) en 1X TAE (Tris ácido acético EDTA) (anexo 1) el cual se disolvió en un horno de microondas. A la solución de agarosa se le añadió 2  $\mu$ L de bromuro de etidio (SIGMA) y se vertió en una bandeja con un peine de 15 pozos para que se solidificara. Después de que el gel se solidificó se retiró el peine y el gel fue depositado en el tanque de electroforesis al cual se le agregó el buffer TAE.

#### **4.3 Purificación del producto de PCR**

Después de realizar la PCR de las muestras, éstas fueron purificadas para eliminar residuos del proceso PCR. El producto de PCR se purificó directamente usando el WIZARD SV GEL and PCR CLEAN UP SYSTEM kit (PROMEGA E. U. A.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se agregó 250  $\mu$ L de Buffer PB a la muestra y se agitó suavemente. Posteriormente todas las muestras fueron agregadas a sus respectivas columnas (QIAquick Spin Columns QIAGEN) las cuales fueron previamente rotuladas. Consecutivamente, las columnas con la muestra se centrifugaron en una microcentrifuga (Eppendorf 5415C) durante un minuto a 13000 rpm.

Una vez concluido este proceso se tiró el sobrenadante quedando el ADN en la columna la cual está hecha de una resina de sílica, a la cual se adhiere el ADN, a continuación las columnas fueron lavadas con 750  $\mu$ L de Buffer PE. para después ser centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm, posteriormente fue tirado el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 1 minuto, para después agregarle 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasa y dejar reposar a la muestra por 1 minuto. Para finalizar, la muestra fue centrifugada durante un minuto. se tomó una pequeña cantidad de la muestra para confirmar la presencia de ADN, por lo que se preparó gel de agarosa al 1%, el cual fue corrido con todas las muestras, posteriormente la muestra fue almacenada en un tubo Eppendorf y congelada hasta su secuenciación.

#### **4.4 Secuenciación del producto del PCR**

El primer ITS4 y las muestras purificadas fueron depositadas en tubos de Eppendorf. Estas se enviaron a la compañía SEQRWRIGHT, INC, HOUSTON, TX, USA para su secuenciación.

#### 4.2 Comparación de las secuencias de estudio con la base de datos EBI

Las secuencias obtenidas fueron ingresadas y comparadas en la base de datos EBI (<http://www.ebi.ac.uk>). Asimismo se bajaron las 5 secuencias más parecidas a cada cepa de la base de datos para su comparación con las muestras.

#### 4.3 Análisis de agrupamiento y modelo de sustitución de nucleótidos

El modelo de sustitución de nucleótidos y el método de agrupamiento se llevaron a cabo con el programa DS Gene 1.5 (E. U. A.) en donde se procesaron las secuencias de ADN de las cepas del laboratorio de biotecnología y las secuencias obtenidas de la base de datos. Las secuencias provenientes de la base de datos fueron alineadas y recortadas, seleccionando sólo la región correspondiente ITS para que contaran con el mismo número de nucleótidos que las cepas de estudio de 500-582 nucleótidos (anexo 4), para así llevar a cabo los análisis, también se le introdujo la especie externa *Trichoderma* sp. CP-64 otorgada por el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del Colegio de Posgraduados Campus Puebla, para ser introducida con el fin de separar todas las especies en sus respectivos grupos.

Todas las secuencias fueron alineadas por el programa haciéndolas coincidir en las secuencias de los primers, posteriormente el programa empleó el modelo de sustitución de nucleótidos de Tajima-Nei's obteniendo una matriz, para posteriormente emplear el método de agrupación NEIGHBOR JOINING para obtener los dendrogramas.

#### 4.4 Clasificación del ADN

El programa *DS Gene* emplea el algoritmo de agrupamiento de secuencias de ADN para clasificarlas en grupos basados en su similitud.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extracción del ADN

Extraído el ADN de las muestras éstas fueron corridas en un gel de agarosa al 1%. Una vez concluida la corrida del gel con las muestras de ADN, éste fue sacado de la bandeja de electroforesis y se procedió a colocarlo en el aparato GELDOC 2000 (BIORAD). Por medio del programa gel one se obtuvieron las siguientes imágenes que se muestran en la figura 2.

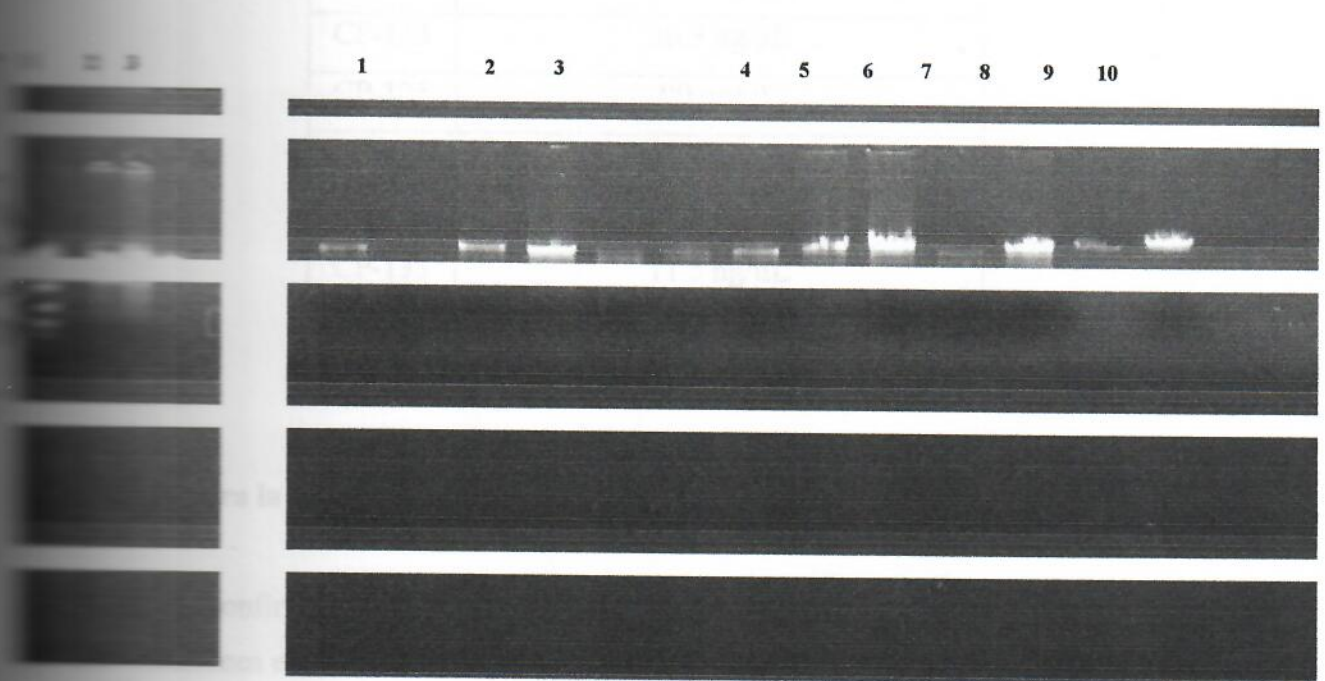


Fig. 2. Gel de agarosa al 1% con las muestras de ADN. Gel de la izquierda: línea 1: DNA Molecular Weight marker (Roche Germany), línea 2: CP- 54, línea 3: CP 125. Gel de la derecha: línea 1 CP43, línea 2: CP-83, línea 3: CP-85, línea 4: CP-123, línea 5: CP-128, línea 6: CP-130, línea 7: CP-138, línea 8: CP-237, línea 9: 1 $\mu$ L de marcador lambda DNA uncut, línea 10 5 $\mu$ L de marcador lambda DNA uncut.

### 5.2 Cuantificación del ADN

El programa gel one cuantificó comparativamente las muestras y las comparó con una cantidad conocida de ADN obteniendo los resultados que se ven en la Tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación de las concentraciones obtenidas de ADN de las cepas

CEPA	CUANTIFICACIÓN DE ADN
CP-42	6.6 ng/ $\mu$ L
CP-54	85 ng/ $\mu$ L
CP-83	86.41 ng/ $\mu$ L
CP-89	54.5 ng/ $\mu$ L
CP-123	20.3 ng/ $\mu$ L
CP-125	60 ng/ $\mu$ L
CP-128	41.4 ng/ $\mu$ L
CP-130	77.9 ng/ $\mu$ L
CP-138	11.5 ng/ $\mu$ L
CP-237	68.4 ng/ $\mu$ L

### Protocolo para la región ITS

Una vez confirmada la extracción de ADN, se llevó a cabo el protocolo para la región ITS. Los volúmenes empleados de ADN y de PCR agua fueron variables dependiendo de la concentración obtenida de la extracción de ADN de cada muestra. Para el PCR master mix y los primers ITS1, ITS4 las cantidades empleadas fueron constantes, la tabla 6 muestra las cantidades empleadas para cada muestra.

Tabla 6 Componentes para la amplificación de ADN en cada muestra estudiada.

	PCR MASTER MIX	PCR AGUA	ITS 1	ITS 4	VOL. TOTAL
	25 $\mu$ L	14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	13 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	14.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	13 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	25 $\mu$ L	14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	50 $\mu$ L



Una vez realizado la PCR se tomaron las muestras del producto de PCR. estas fueron sembradas en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un aparato GELDOC 2000 (BIORAD), obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 3.

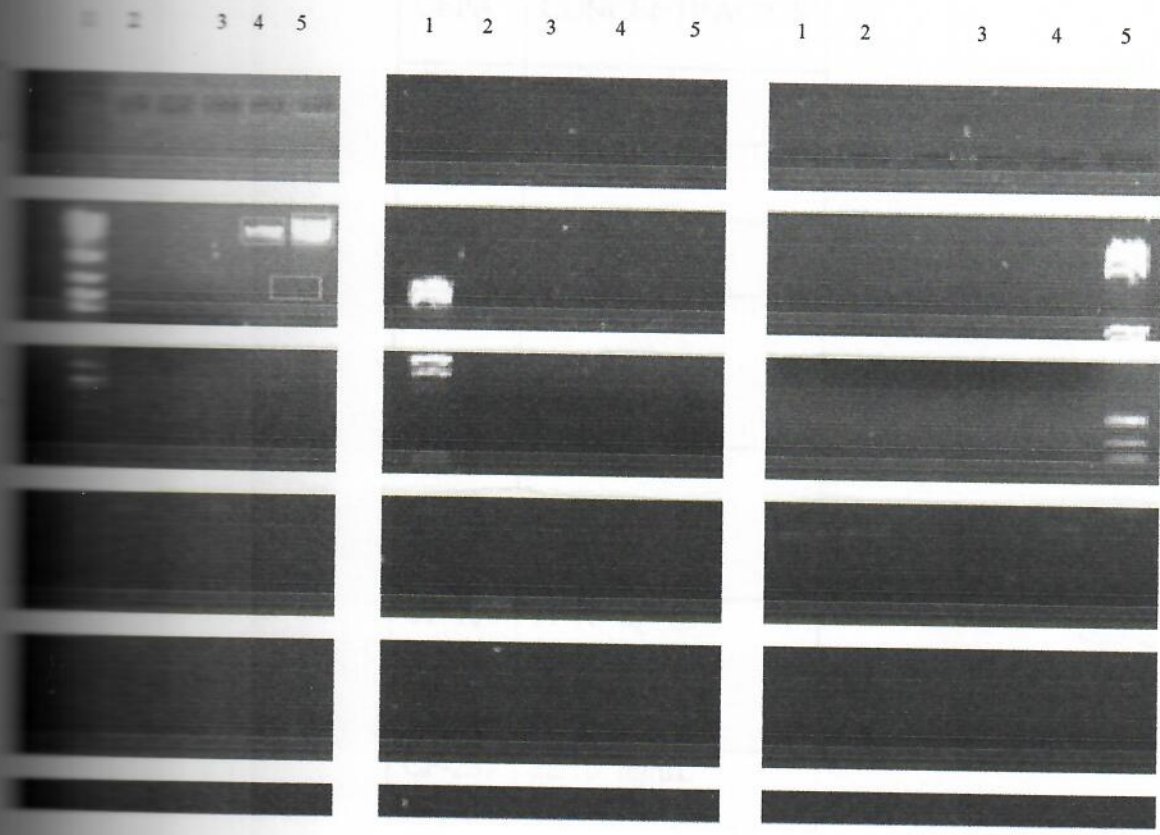


Figura 3. Gel de agarosa al 1% con las muestras de ADN. Gel de la izquierda: línea 1: DNA Molecular Weight market III (Roche Germany), línea 2: CP- 54, línea 3: CP 125. Gel de en medio: línea 1: DNA Molecular Weight market III (Roche Germany), línea 2: CP-89, línea 3: 123, línea 4: 130, línea 5: CP-138. Gel de la derecha: línea 1: CP-45, línea 2: CP-83, línea 3: CP-128, línea 4: CP-237, línea 5: DNA Molecular Weight market III (Roche Germany).

Se cuantificó el producto de PCR por medio del programa gel one. Las concentraciones obtenidas de la purificación del PCR se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración obtenida del producto de PCR de las muestras.

CEPA	CONCENTRACIÓN
CP-48	11.11 ng/μL
CP-54	10.67 ng/μL
CP-89	12.67 ng/μL
CP-125	11.63 ng/μL
CP-128	2.36 ng/μL
CP-130	17.10 ng/μL
CP-138	1 ng/μL
CP-237	22.10 ng/μL

### Purificación del producto de PCR

Una vez confirmada la presencia del ADN, se procedió a purificar las muestras. Por otro lado para corroborar la presencia de ADN en las muestras purificadas, se preparó un gel de agarosa al 1%, con el cual se confirmó la presencia del ADN, el gel es mostrado en la figura 4.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

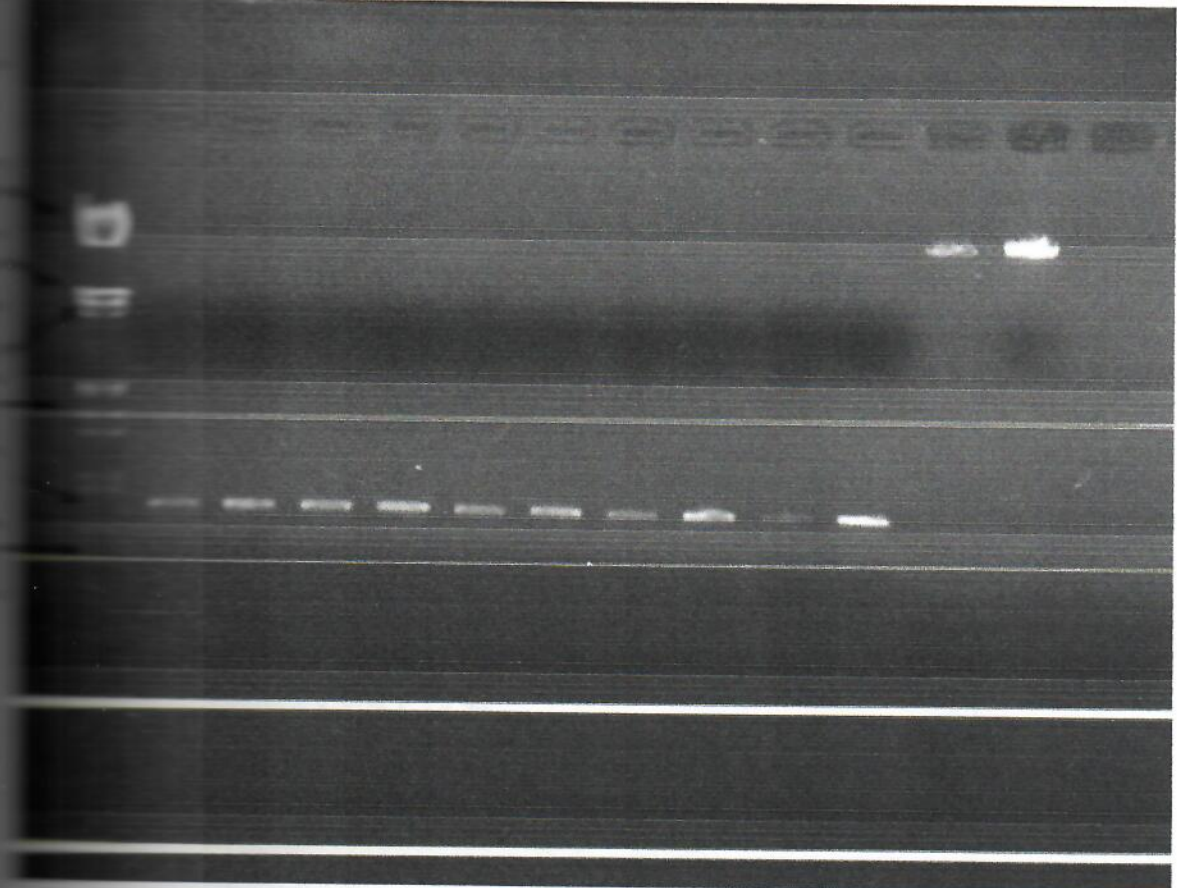


Figura 4. Gel de agarosa al 1% que corrobora la presencia de ADN en las muestras ya purificadas. Línea 1: DNA Molecular Weight market III (Roche Germany), línea 2: CP- 43, línea 3: CP 54, línea 4: CP- 83, Línea 5: CP-10, línea 6: CP123, línea 7: CP 125, línea 8: CP 128, línea 9: CP-130, línea 10: CP-138, línea 11: CP-237, línea 12: 1µL de marcador lamda DNA uncut, línea 13: 5µL de marcador lamda DNA uncut.

### Secuenciación del producto del PCR

El resultado de la secuenciación de las cepas fue enviado vía internet, mostrando el resultado de las secuencias con los cromatogramas (anexo 2) de cada muestra de ADN, obteniendo tamaños variables de 500 a 582 pares de bases.

### Comparación de las secuencias de estudio en la base de datos EBI

Las secuencias de estudio fueron capturadas y comparadas en la base de datos EBI, obteniendo las 5 cepas más parecidas a cada una de ellas, las cuales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Las cepas de estudio comparadas con las 5 cepas a las que fueron más parecidas en la base de datos EBI, también se muestra el nombre de la especie a la cual pertenece, el número de acceso que tiene en la base de datos EBI y el % de parecido entre de la secuencias de ADN de ambas.

Cepas del cepario/especies	Número de acceso en la base de datos EBI
<b>Cepa CP-43</b> <i>A. bitorquis</i> (Quél.) Sacc.	
<i>A. bitorquis</i>	AJ301620
<i>A. bitorquis</i>	AF432898
<i>A. bitorquis</i>	AJ884648
<i>A. bisporus</i> ( J.E. Lange ) Pilát	AJ301619
<i>A. bisporus</i>	AY484696
<b>Cepa CP- 54</b> <i>A. campestris</i> (F. H. Moeller) Pilát	
<i>A. diminutivus</i> Peck	AY84681
<i>A. romagnesii</i> Wasser	AJ884640
<i>A. maskae</i> Pilát	AJ884642
<i>A. arvensis</i> Schaeff.	AJ887993
<i>A. abruptibulbus</i> Peck	Y484673
<b>Cepa CP-83</b> <i>A. osecanus</i> Pilát	
<i>A. diminutivus</i>	AY484681
<i>A. romagnesii</i>	AJ884640
<i>A. arvensis</i>	AJ887993
<i>A. maskae</i>	AJ884642
<i>A. abruptibulbus</i>	AY484673
<b>Cepa CP-89</b> <i>Agaricus</i> spp.	
<i>A. diminutivus</i>	Y484681
<i>A. romagnesii</i>	AJ884640

<b>Cepas del cepario/especies</b>	<b>Número de acceso en la base de datos EBI</b>
<i>A. maskae</i>	AJ884642
<i>A. arvensis</i>	AJ887993
<i>A. abruptibulbus</i>	AY484673
<b>Cepa CP-123</b> <i>A. subrufescens</i> Peck	
<i>A. moelleri</i> Wasser	AY899264
<i>A. moelleri</i>	AY899263
<i>A. xanthodermus</i> Genev.	AY484689
<i>A. tolloacanensis</i>	AY703913
<i>A. tolloacanensis</i>	AY703912
<b>Cepa CP-125</b> <i>A. osecanus</i>	
<i>A. rufotegulis</i> Nauta	Y818649
<i>A. subrufescens</i>	AY818660
<i>A. blazei</i> Murrill	AY484697
<i>A. brasiliensis</i> Wasser.	AY818650
<i>A. blazei</i>	AF161013
<b>Cepa CP-128</b> <i>A. bitorquis</i>	
<i>A. diminutivus</i>	AY484681
<i>A. maskae</i>	AJ884642
<i>A. romagnesii</i>	AJ884640
<i>A. arvensis</i>	AJ887993
<b>Cepa CP-130</b> <i>A. bitorquis</i>	
<i>A. diminutivus</i>	Y484681
<i>A. romagnesii</i>	AJ884640
<i>A. maskae</i>	AJ884642
<i>A. arvensis</i>	AJ887993
<b>Cepa CP-138</b> <i>A. abruptibulbus</i>	
<i>A. moelleri</i>	AY899264
<i>A. moelleri</i>	AY899263
<i>A. xanthodermus</i>	AY484689
<i>A. tolloacanensis</i>	AY703913
<i>A. tolloacanensis</i>	AY703912
<b>Cepa CP-237 Agaricus</b> <b>spp.</b>	
<i>A. tolloacanensis</i>	Y703913
<i>A. tolloacanensis</i>	AY703912

Cepas del cepario/especies	Número de acceso en la base de datos EBI
<i>A. pocillator</i>	U85308
<i>A. moelleri</i>	AY899264
<i>A. moelleri</i>	AY899263

### Nivel de análisis de las especies estudiadas

En este primer nivel de análisis se incluyeron un total de 32 cepas, las cuales corresponden a 18 especies y 2 sin determinar, de las cuales 5 especies y 2 cepas corresponden son del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles del Colegio de Post-Graduados Campus Puebla y las otras 11 de la base de datos, estas especies corresponden a continuación.

#### *Psaliota abruptibalbus* Peck

Esta especie se cuenta con 2 cepas en este estudio, una del cepario, la CP-138 y otra correspondiente de la base de datos con el número de acceso AY484673.

*Psaliota abruptibalbus*, tiene varios sinónimos entre los cuales se encuentran: *Psaliota abruptibalbus* Peck, *Psaliota arvensis* var. *silvicola* (Vitt.), *P. silvicola* (Vitt.), (Gutiérrez, 1990).

Capelli (1984) la ubica dentro de la sección Flavescentes, en la subsección Arvensis y en la subespecie *arvensis*.

**Comestibilidad:** esta especie es reportada de acuerdo con Capelli (1984) como comestible, aunque es rechazada por algunos debido a la confusión morfológica con *Amanita* e incluso con especies venenosas del género *Amanita*, por lo que debe manejarse con precaución (Lincoff y cols. 1989).

#### *Psaliota arvensis* Schaeff.

Esta especie estuvo representada por una cepa, la cual tiene el número de acceso AY484673, esta se incluyó de la base de datos por su parecido con las secuencias de ADN

esta cepa del COLPOS. Tiene un sinónimo, que es *A. osecanus* Pilát ([www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp)). Según la clasificación realizada por Capelli (1984), esta especie pertenece a la sección Flavescentes, subsección Arvenses, grupo Arvensis. En esta clasificación varía como el de Didukh y cols. (2005) en el cual lo ubica en la sección *Psalliota*.

Dentro del género *Agaricus* esta especie es la tercera más cultivada después de *A. bisporus* y *A. hortensis* y se ha observado que tiene cierta resistencia a fructificar a altas temperaturas (Frische y Sonnenberg, 1988).

**Comestibilidad:** Es considerado como exquisito en Norte América en donde es nombrado comúnmente como Horse Mushroom (Lincoff y cols., 1989), también es recolectado tradicionalmente en España para su consumo, entre los nombres comunes que tiene se le conoce como bola de nieve, su sabor es considerado como a nuez con un fuerte olor a nuez, también es vendido enlatado y congelado.

[www.micovallarta.com/micovaldorba2/setas/agaricus\\_arvensis\\_champiñon\\_bolade\\_nieve.html](http://www.micovallarta.com/micovaldorba2/setas/agaricus_arvensis_champiñon_bolade_nieve.html)

#### ***Psalliota* (J.E. Lange) Pilát y *A. campestris* (F. H. Moller) Pilát**

Estas especies están representadas en este estudio por la cepa 54 del cepario que fue denominada como *A. campestris*, *A. bisporus* esta representada por 2 cepas que tienen los números de acceso AJ301620 y AJ301619, ambas provenientes de la base de datos.

Estas especies son consideradas como sinónimos, así como también *A. campestris* (J.E. Lange) Pilát, *A. bisporus* L., *A. brunnescens* Peck., *A. campestris* sensu Peck, *A. hortensis* (Cooke) Pilát, *Psalliota bispora* (J.E. Lange) F. H. Möller y Jul. Schäff, *Psalliota hortensis* (Cooke) y *Psalliota bispora* J.E. Lange, ([www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp)).

Möller (1950) en Capelli (1984), ubica a *A. campestris* en el género: *Psalliota*, sección *Psalliota* y Capelli (1984) en la sección Rubescentes, subsección *Agaricus*, grupo *Agaricus*.

**Comestibilidad:** Esta especie según la descripción realizada por Capelli (1984), pertenece a la sección *Agaricus*, en el cual todas las especies que pertenecen a ella son comestibles tradicionalmente y apreciadas. En Norte América es considerada como exquisita y

es el hongo más recolectado en época de lluvias, además de ser cultivada (Lincoff y  
1989).

*A. bisporus* ha sido agrupado por Capelli (1984), en la sección Rubescentes,  
subsección Bitorques, grupo Bisporus.

Comestibilidad: esta especie dentro del género *Agaricus* fue la primera que se cultivo,  
dentro de los hongos comestibles cultivados es la especie más vendida en todo el  
mundo y es altamente apreciada por su sabor.

#### ***Agaricus bitorquis* (Quéll.) Sacc.**

De la especie *A. bitorquis* se cuenta con 6 cepas en este estudio, de las cuales, 3 cepas  
de estudio (CP 43, CP, 128, CP 130), además de tres cepas provenientes de la base de  
datos, las cuales resultaron genéticamente similares a una cepa de estudio (AJ884648,  
AF484696).

*A. bitorquis* según la clasificación de Cappelli (1984) pertenece a la sección  
Rubescentes, subsección Bitorquis grupo Bitorquis

Dentro de la sección Bitorquis se encuentran ubicadas las especies más cultivadas  
dentro de la especie *A. bisporus* y *A. bitorquis*. También se le conoce con los siguientes sinónimos  
*Agaricus bitorques* (Moller) sensu Moser 1967 *Duploannulatae* 1976.

Comestibilidad: La especie *A. bitorquis* es considerada comestible y es la segunda  
especie más cultivada del género *Agaricus* desde 1973, esta especie es ya desarrollada  
comercialmente en climas cálidos ofreciendo una alternativa para *A. bisporus* (Elliot, 1978).  
Esta especie es resistente a virus y resiste más tiempo fresco por un tiempo prolongado (Fritsche y  
1988).

#### ***Agaricus blazei* Murrill, *A. brasiliensis* Wasser, M. Didukh, *A. rufotegulis* Nauta, *A. subrufescens* Peck.**

La cepa 123 fue determinada tentativamente como *A. subrufescens*, esta  
especie pertenece a la sección Arvenses, así mismo estas cepas *A. blazei*, *A. brasiliensis*, *A.*  
*rufotegulis* y *A. subrufescens* fueron cepas provenientes de la base de datos las cuales fueron  
similares a algunas un cepa de estudio.



Un estudio empleando ADN realizado por Kerrigan (2005), sugieren que *A. blazei*, de Sudamérica, *A. brasiliensis* Wasser, *A. rufotegulis* Nauta y *A. subrufescens* son genéticamente idénticas; estas especies son consideradas con propiedades medicinales.

Particularmente *A. blazei*, ha sido parte de cuantiosos estudios que al parecer demuestran que esta especie tiene un potente efecto anticancerígeno, antitumoral y inmunomodulador, también posee 9% de beta glucanos, los cuales se ha comprobado que promueven la proliferación natural de las células killer, las cuales son selectivamente citotóxicas en células tumorales, por lo que se han aislado para tratamientos del cáncer.

Asimismo, se han realizado pruebas químicas con el micelio el cual produce compuestos antitumorales e incrementa la apoptosis en células cancerosas, además de estimular la respuesta inmune y también tener metabolitos con propiedades bactericidas.

Esta especie ha sido cultivada desde el año 1800 para alimento y hoy en día debido a sus propiedades medicinales además es cultivada para, obtener productos como: extractos, té, comprimidos, hongos deshidratados y en polvo etc., alcanzando un valor de \$0.50 - \$1.00 por gramo, por lo que cuando se inicio su cultivo sólo era cultivada en Japón, pero se ha extendido ahora a China, Brasil y actualmente en Estados Unidos.

Comestibilidad: este hongo es comestible y tiene un agradable sabor y olor almendrado, ha sido consumido tradicionalmente en Sudamérica y es reconocido por su calidad gastronómica, en donde es llamado popularmente como cogumelo del sol, cogumelo rey. En otros sitios es nombrado almond portobello, royal agaricus, King agaricus y en Japón Hime matsutake (Stamets, 2000).

*A. subrufescens* posee olor y sabor almendrado cuando es cocinado ([www.mushroomexpert.com/agaricus\\_subrufescens.html](http://www.mushroomexpert.com/agaricus_subrufescens.html)).

#### *A. diminutivus* Peck

Esta especie provino de la base de datos y corresponde a número de acceso AY484681. Esta cepa fue de las 5 más similares con algunas cepas del cepario. *A. diminutivus* esta ubicada en Saccardo (1977) in Capelli (1984), en la sección Arvenses, al igual que Kerrigan (1986) la ubica en el grupo Arvenses.

Comestibilidad: esta especie es comestible pero al ser pequeña es de poco valor culinario.

([www. Mykoweb.com/CAF/species/Agaricus\\_diminutivus,html.](http://www.Mykoweb.com/CAF/species/Agaricus_diminutivus.html))

#### 5.7.7 *A. maskae* Pilát

Esta especie provino de la base de datos y corresponde al número de acceso AJ884642.

Sinónimos: *Agaricus litorales* (Wakef. & A. Pearson ) Pilát

Capelli en 1984 la clasifico en el género *Agaricus*, sección Flavescentes, subsección Arvenses, grupo Spissicaulis.

Comestibilidad: Esta especie se ubica en la sección en donde se reportan especies que son comestibles.

#### 5.7.8 *A. moelleri* Wasser

En el estudio la especie *A. moelleri* cuenta con 2 cepas ambas provenientes de la base de datos con los siguientes números de accesos: AY899263 y AY899264. Esta especie tiene los siguientes sinónimos: *Psalliota meleagris* var. *oscurata* (Maire) Möll., *Agaricus meleagris* var. *Oscuratus* (Maire) Heinem., *Psalliota melagris* var. *terricolor* Moll. Friesia, *Agaricus glacomycetes* var. *terricolor* (Moll.) Moser., *Agaricus praedaresquamosus* var. *Terricolor* Freeman (Moll.) Bon et Capelli. Se ubica en la sección Xantodermatei

Comestibilidad: se menciona como probablemente tóxica, porque se ubica en la sección Xantodermatei (Callac y Guinberteau, 2005).

#### 5.7.9 *A. osecanus* Pilát

Las cepas 83 y 125 del cepario fueron determinadas como *A. osecanus*, esta especie cuenta con el siguiente sinónimo: *A. nivescens* var. *parkensis* (F.H. Möller)

([www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp))

Según Capelli 1984, esta especie pertenece al subgénero *Agaricus*, sección Flavescentes, subsección Arvenses, grupo Nivescens.

Comestibilidad: esta especie se registra como comestible.

### 12218 *A. pocillator* Murrill

De esta especie se cuenta con una cepa, que tiene el número de acceso U85308, proveniente de las de base de datos.

Similares: *Agaricus placomyces* Peck, *Agaricus meleagris* With, *Agaricus muscilarisquamosus* A. E. Freman, *A. moelleri* Wasser. *A. pocillator*, fue clasificado en la sección *Arvenses* por Singer en 1986.

En esta sección se ubican hongos considerados comestibles, no obstante algunos autores no recomiendan como comestible a esta especie por su color amarillento

([www.mushroomexpert.com/agaricus\\_placomyces.html](http://www.mushroomexpert.com/agaricus_placomyces.html))

Otros autores lo catalogan dentro de la sección *Xanthodermatei* ([www.livivo.gen.chicago.il.us/Taxa/Agariplaco6.html](http://www.livivo.gen.chicago.il.us/Taxa/Agariplaco6.html))

### 12219 *A. mmagnesii* Wasser

Esta especie esta representada por una cepa con el número de acceso AJ884640, se incluyo en la base de datos por su parecido con las secuencias de ADN con algunas cepas del cepario.

*A. mmagnesii* es ubicado dentro del género *Agaricus* como perteneciente a la sección: *Pluvioscentes*, subsección *Xanthodermatei*, grupo: *Pseudopratis* (Capelli, 1984).

Comestibilidad: no es comestible porque pertenece a la sección *Xanthodermatei*, en donde se han ubicado a las especies tóxicas del género *Agaricus*.

### 12220 *A. ullocanensis* Callac

Esta cepa con el número de acceso AY703912 provino de la base de datos y es una de las 5 más similares con algunas cepas del cepario.

Esta especie es reportada por Callac y Mata (2004 en prensa), como nuevas especies de la sección *Xanthodermatei* encontradas en México.

Comestibilidad: no es comestible ya que en este grupo se ubican las especies tóxicas del género *Agaricus*.

### **ITS1 de *xanthodermus* Genev.**

De esta especie se contó con una cepa proveniente de la base de datos, la cual tiene el siguiente acceso AY484689, se incluyó de la base de datos por su parecido con las secuencias de ITS1 con algunas cepas del cepario. Tiene varios sinónimos según algunos autores como:

*Agaricus xanthodermus*

([www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/guia\\_de\\_hongos/agaricus\\_xanthodermus/defavit.htm](http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/guia_de_hongos/agaricus_xanthodermus/defavit.htm))

*Agaricus xanthodermus*

([www.iberitas.com/agaricus.xanthodermus.htm](http://www.iberitas.com/agaricus.xanthodermus.htm))

**Comestibilidad:** Esta especie al pertenecer a la sección Xanthodermatei es considerada tóxica, su ingestión ocasiona un síndrome gastrointestinal produciendo vómitos, diarrea y dolores abdominales, aunque se han reportado personas inmunes a las toxinas de este hongo. Esta sección Xanthodermatei se caracteriza por su olor a fenol y su color amarillento al crecer (Lincoff y cols., 1989).

### **ITS1. Dendrograma generado del primer nivel de análisis**

Con las secuencias obtenidas de la base de datos de la región ITS del ADNr de otras especies más las 10 cepas de estudio se procedió aplicarles el método de NEIGHBOR JOINING con el modelo de sustitución de nucleótidos de Tajima-Nei se formó el dendrograma que se muestra en la figura 5.

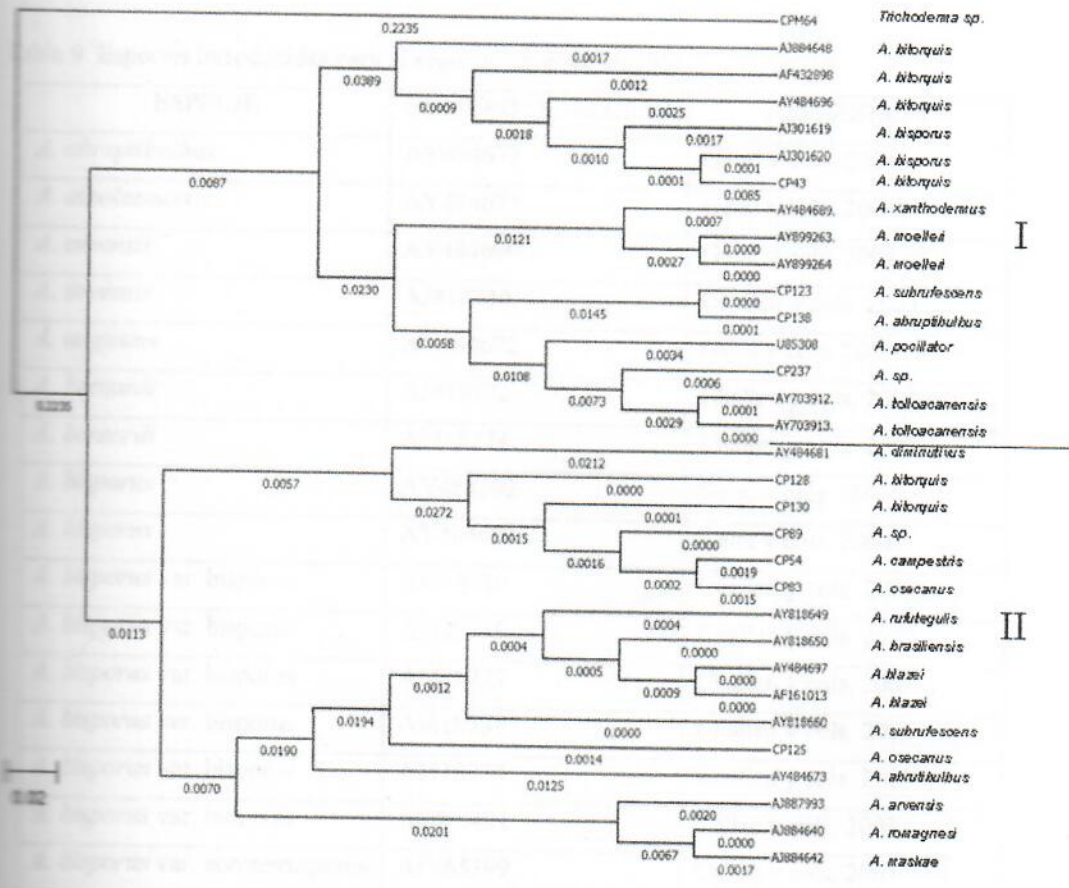


Fig. 1. Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento de NEIGHBOR JOINING empleando el modelo de sustitución de nucleótidos de Tajima-Nei, usando la región ITS en 10 cepas de *Agaricus* provenientes del mundo, las cepas provenientes de la base de datos y la cepa externa CPM-64 *Trichoderma agresivum*, en este dendrograma se muestran los 2 principales agrupamientos que se formaron en números romanos.

**Fig. 2. Dendrograma generado del segundo nivel de análisis**

Se empleó un segundo nivel de análisis en este estudio, el cual consistió en la combinación de secuencias de la base de datos del género *Agaricus* que ya habían sido parte de otros estudios filogenéticos y evolutivos como los de Challen y cols., 2003, Geml y cols., 2004 a, 2004 b, Mitchell y Bresinsky, 1999, los cuales también emplearon la región ITS del rDNA, estas nuevas cepas introducidas se pueden observar en la tabla 9.

Tabla 9. Especies introducidas para el segundo nivel de análisis.

ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO	REFERENCIA
<i>A. draptulbalbus</i>	AY484673	Geml y cols. 2004b
<i>A. ablutescens</i>	AY484675	Geml y cols. 2004b
<i>A. amensis</i>	AY484690	Geml y cols. 2004b
<i>A. amensis</i>	AJ418744	Challen y cols. 2003
<i>A. agustus</i>	AY484672	Geml y cols. 2004b
<i>A. lemanii</i>	AJ418772	Challen y cols. 2003
<i>A. lemanii</i>	AJ418774	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i>	AY484692	Geml y cols. 2004b
<i>A. ligatus</i>	AY484693	Geml y cols. 2004b
<i>A. ligatus</i> var. <i>bisporus</i>	AJ418716	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>bisporus</i>	AJ418719	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>bisporus</i>	AJ418727	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>bisporus</i>	AJ418731	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>bisporus</i>	AJ418734	Challen y cols. 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>burnettii</i>	AF465401	Callac y cols, 2003
<i>A. ligatus</i> var. <i>eurotetrasporus</i>	AF465399	Callac y cols, 2003
<i>A. longipetio</i>	AY484695	Geml y cols. 2004b
<i>A. longipetio</i>	AJ418759	Challen y cols. 2003
<i>A. longipetio</i>	AY484697	Challen y cols. 2003
<i>A. californicus</i>	AF482830	Vellinga y cols. 2003
<i>A. californicus</i>	AY484679	Geml y cols. 2004b
<i>A. longipetio</i>	AJ418775	Challen y cols. 2003
<i>A. longipetio</i>	U85307	Johnson y Vilgalys, 1999.
<i>A. agrostiformis</i>	AY484680	Geml y cols. 2004b
<i>A. agrostiformis</i>	AF432904	Kerrigan. UP.
<i>A. agrostiformis</i>	AJ418755	Challen y cols. 2003
<i>A. agrostiformis</i>	AJ418754	Challen y cols. 2003
<i>A. agrostiformis</i>	AY484681	Geml y cols. 2004b
<i>A. agrostiformis</i>	AY484682	Geml y cols. 2004b
<i>A. agrostiformis</i>	AY484683	Geml y cols. 2004b

ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO	REFERENCIA
<i>A. gemnadii</i>	AF432881	Kerrigan. UP.
<i>A. liliceps</i>	AY484676	Geml y cols. 2004b
<i>A. macrocarpus</i>	AY484686	Geml y cols. 2004b
<i>A. macrosporus</i>	AY484687	Geml y cols. 2004b
<i>A. moelleri</i>	AY899263	Callac y Guinberteau, 2005
<i>A. nivescens</i>	AY484670	Geml. y cols. 2004b
<i>A. placomyces</i>	AF432879	Kerrigan. UP.
<i>A. semotus</i>	AJ133390	Huang. U.P.
<i>A. subfloccosus</i>	AF432887	Kerrigan. UP.
<i>A. subfloccosus</i>	AJ418738	Challen y cols. 2003
<i>A. subfloccosus</i>	AJ418743	Challen y cols. 2003
<i>A. subfloccosus</i>	AY484697	Challen y cols. 2003
<i>A. subperonatus</i>	AF432889	Kerrigan. UP.
<i>A. subrafescens</i>	AY484674	Geml y cols. 2004b
<i>A. subratilascens</i>	AY484688	Geml y cols. 2004b
<i>A. tillocanensis</i>	AY703912	Callac y Mata, 2004
<i>A. vaporarius</i>	AF432902	Kerrigan. UP.
<i>A. xanthodermulus</i>	AY899273	Callac y Guinberteau, 2005
<i>A. xanthodermus</i>	AJ418776	Challen y cols. 2003
<i>A. xanthodermus</i>	AY484689	Geml y cols. 2004b

Varias de estas especies formaron diferentes clados en los estudios previos ya mencionados, al integrar diversas especies se pudo confirmar si alguna de las especies de estudio se agrupaba con alguna de estas, y con esto, se pudieron definir y corroborar los clados a los cuales pertenecen las cepas de estudio. Para esto se empleo el criterio de los clados filogenéticos antes mencionados como se muestra a continuación en la siguiente figura 6. De igual forma que en el primer nivel de análisis se les aplicó el método de agrupamiento de NEIGHBOR JOINING empleando el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura-Nei, usando la región ITS, anexando al grupo externo *Chlorophyllum sp.*





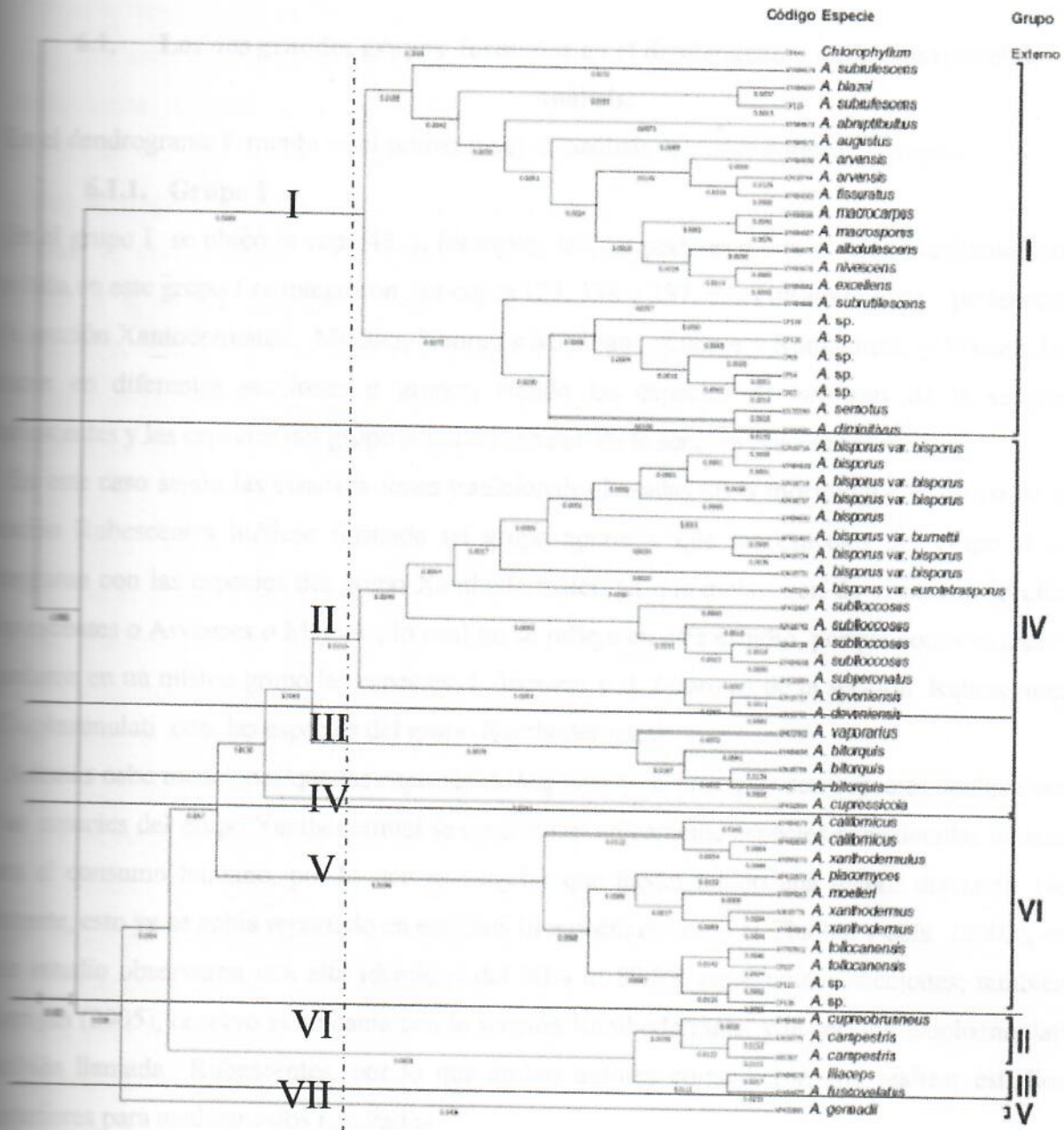


Fig. 7. En este dendrograma se muestran los 7 agrupamientos que se formaron al hacer el corte basándose en el primer grupo I grupo Arvenses.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Los dos grandes grupos formados en el dendrograma del primer nivel de análisis.

En el dendrograma formado en el primer nivel de análisis se puede apreciar 2 grupos.

#### 6.1.1. Grupo I

En el grupo I se ubicó la cepa 43 *A. bitorquis*, la cual pertenece a la sección Duploannulati, también en este grupo I se integraron las cepas 123, 138 y 237, estas últimas cepas pertenecen a la sección Xanthodermatei. Möeller, Konrad y Maublanc, Kühner y Romagnesi, y Wasser, las ubican en diferentes secciones o grupos, siendo las especies *A. bitorquis* de la sección Rubescentes y las especies del grupo Xanthodermatei de la sección Flavescentes.

En este caso según las clasificaciones tradicionales basadas en la morfología el grupo de la sección Rubescentes hubiese formado un grupo aparte y que las especies del grupo II se integraran con las especies del grupo Xanthodermatei, ya que ambas son de la misma sección Flavescentes o Arvenses o Majores, lo cual no se reflejó en este estudio, porque como se indicó quedaron en un mismo grupo las especies *A. bisporus* y *A. bitorquis* de la sección Rubescentes y Duploannulati con las especies del grupo Xanthodermatei.

Además cabe mencionar que las especies *A. bisporus* y *A. bitorquis* son especies comestibles y las especies del grupo Xanthodermatei se encuentran únicamente especies consideradas tóxicas para el consumo humano, por lo que es singular que hayan tenido una menor distancia. No obstante, esto ya se había reportado en estudios filogenéticos como el Challen y cols. (2003), en este estudio observaron una alta identidad del 90% al 89.8% entre ambas secciones; también Kerrigan (2005), observó la cercanía con la sección Xanthodermatei y la sección Duploannulati también llamada Rubescentes, por lo que ambos autores coincidieron con realizar estudios posteriores para analizar estos resultados.

Por lo anterior no se recomendaría la formación de híbridos entre la cepa 43 y las cepas 123, 138 y 237 aunque quedaron en el mismo grupo, dada la posible toxicidad de éstas 3 cepas, sólo se recomendaría la formación de híbridos entre la cepa 43 y las cepas a las que resultó similares provenientes de la base de datos, principalmente la realización de pruebas para la formación de híbridos con la cepa AJ301620 *A. bisporus*, porque de resultar un híbrido exitoso de ellas, se

tendría un híbrido con los rasgos comerciales deseados de *A. bisporus* y la resistencia a fructificar en temperaturas altas de *A. bitorquis*.

En este grupo existió un agrupamiento que no coincide con los arreglos clásicos morfológicos, porque cuando se busco las cepas más parecidas en la base de datos a la cepa 237 la cual se agrupo en la sección Xanthodermatei, fue similar a ella la cepa proveniente de la base de datos *A. pocillator* con número de acceso U85308 y esta se agrupo a una distancia cercana en el dendograma. No obstante, *A. pocillator* fue clasificada por Singer en 1986 dentro de la sección Arvenses, y aquí se ubico cercana a la sección Xanthodermatei. Este resultado coincide con el estudio filogenético realizado por Geml y cols. (2004), realizado con métodos moleculares, ya que esta especie también se ubicó dentro del grupo Xanthodermatei, por lo que posiblemente sea tóxica.

#### 6.1.2. Grupo II

En el grupo II se ubicaron las cepas de estudio 54, 83, 89, 125, 128 y 130 y diversas cepas provenientes de la base de datos, todas estas especies pertenecen según las clasificaciones tradicionales al sección Arvenses, con excepción de *A. romagnesii*, que es una cepa proveniente de la base de datos, esta cepa fue similar a las cepas 130, 128, 54, 83 y 89.

*A. romagnesii* pertenece según la clasificación de Capelli (1984) a la sección Xanthodermatei, a diferencia del resto de las cepas de este grupo.

Konrad y Maublanc (1952), ubican a las cepas de este grupo II en la sección Arvenses pero dentro de diferentes grupos el Arvensis y a *A. romagnesii* en el grupo Xanthodermus.

También Möller (1950-1952), las ubica dentro del género *Psalliota*, sección Flavescens, subsección Majores, pero en diferente grupo, el grupo Arvensis y a *A. romagnesii* en el grupo Xanthoderma.

En la sección Arvenses se encuentran especies consideradas como comestibles e incluso la especie *A. arvensis* es una especie que se cultiva y ocupa el tercer lugar de cultivo dentro del género *Agaricus*, no así la sección Xanthoderma la cual es considerada tóxica.

No obstante, no coincide *A. romagnesii* con estas clasificaciones, por lo que se tendrá que revisar estos resultados en estudios posteriores.

En cuanto a las otras cepas 54, 83, 89, 128 y 130 todas ellas se agruparon cuando se usó el método de NEIGHBOR JOINING en el grupo II, estas cepas ya ha sido confirmado su comestibilidad en el laboratorio, con excepción de la cepa 89, pero dado la poca distancia genética entre estas y su vez el parecido de éstas con cepas de la base de datos que pertenecen a la sección Arvensis, la cual es comestible, por lo que es muy probable que la cepa 89 también lo sea.

Al haber demostrado estas cepas tener poca distancia genética entre ellas, estas cepas ser propuestas para la formación de híbridos, asimismo aunque la cepa 125 fue más cercana con otras cepas de la base de datos, esta cepa también se propondrían el entrecruzamiento entre ellas e incluso la formación por fusión de protoplastos ya que la cepa 125 es deseable porque posiblemente posee características medicinales, ya que se agrupó muy cercanamente con cepas provenientes de la base de datos, que además de ser comestibles también son reconocidas como medicinales, como lo son *A. blazei*, *A. rufutugulis*, *A. brasiliensis* y *A. ...*

## 6.2. Segundo nivel de análisis

### 6.2.1. GRUPO I SECCIÓN Arvenses

En el grupo I se introdujeron especies que pertenecen a la sección Arvenses, en este grupo se congregaron las siguientes cepas del cepario: 128, 130, 89, 54, 83, y 125, no obstante la cepa 125 se congregó muy independiente de las otras cepas del cepario ya mencionadas.

### 6.2.2. CEPA 125

La cepa 125 a nivel de especie se congregó con la cepa proveniente de la base de datos *A. blazei* con el número de acceso AY434697, si tomamos como referencia el nivel de especie de la misma especie, estas 2 cepas serían la misma especie como se muestra en la siguiente figura 8.



La cepa 125 en el primer nivel análisis tuvo una distancia corta con las especies de la base de datos: *A. blazei* y *A. subrufescens*, *A. brasiliensis* y *A. rufutegulis*, que como ya se ha señalado son consideradas como sinónimos de acuerdo con Kerrigan (2005), pero en el primer nivel de análisis no se vio claramente en el dendrograma con cual de estas especies tenía menor distancia, no obstante con el segundo nivel de análisis con las cepas seleccionadas surge que es con *A. blazei*, por lo que la cepa 125 puede ser esta especie, de cualquier forma para corroborarlo se recomienda realizar más estudios moleculares y llevarla a fructificación para su determinación morfológica.

Por lo anterior confirmamos que la cepa 125 no es *A. osecanus*, aunque esta sea de la misma sección Arvenses.

La cepa 125 tiene un gran potencial porque además de haber sido ya comprobada su comestibilidad en el laboratorio, se tiene el registro de *A. blazei* y de las otras especies que son consideradas como sinónimos son comestibles y que además tienen propiedades medicinales, por lo que se le tendría que realizar un estudio a futuro para comprobar si la cepa 125 posee las sustancias químicas que le dan el carácter de medicinal, asimismo se podría sugerir la formación de híbridos para mejoras genéticas dependiendo el patrón de sexualidad entre esta cepa 125 y las otras poblaciones de *A. blazei*.

### 6.2.3. CEPAS 54, 83, 89, 128 Y 130

El agrupamiento de las cepas 54, 83, 89, 128 y 130 coincidió tanto en el primer nivel de análisis como en el segundo nivel de análisis, solo que en el primer nivel de análisis únicamente se contaba con *A. diminitivus* proveniente de la base de datos y en el segundo nivel de análisis además de esta especie se añadieron 2 cepas más provenientes de la base de datos, las cuales formaron un subgrupo junto con las cepas del laboratorio, estas dos especies fueron *A. semotus* y *A. subrutilescens*.

La distancia basándonos a nivel de corte de especie nos indica que las cepas 54 y 83 pertenecen a la misma especie, lo cual coincide con los resultados del primer nivel de análisis, pero si tomamos de referencia el corte a nivel de especie tomando como referencia a *A. bisporus* como se muestra en la figura 9, entonces posiblemente estaríamos hablando de que estas 5

probablemente sean una sola especie, pero de diferentes variedades, por lo que tendrán que ser revisadas mediante morfología y con otros análisis moleculares.

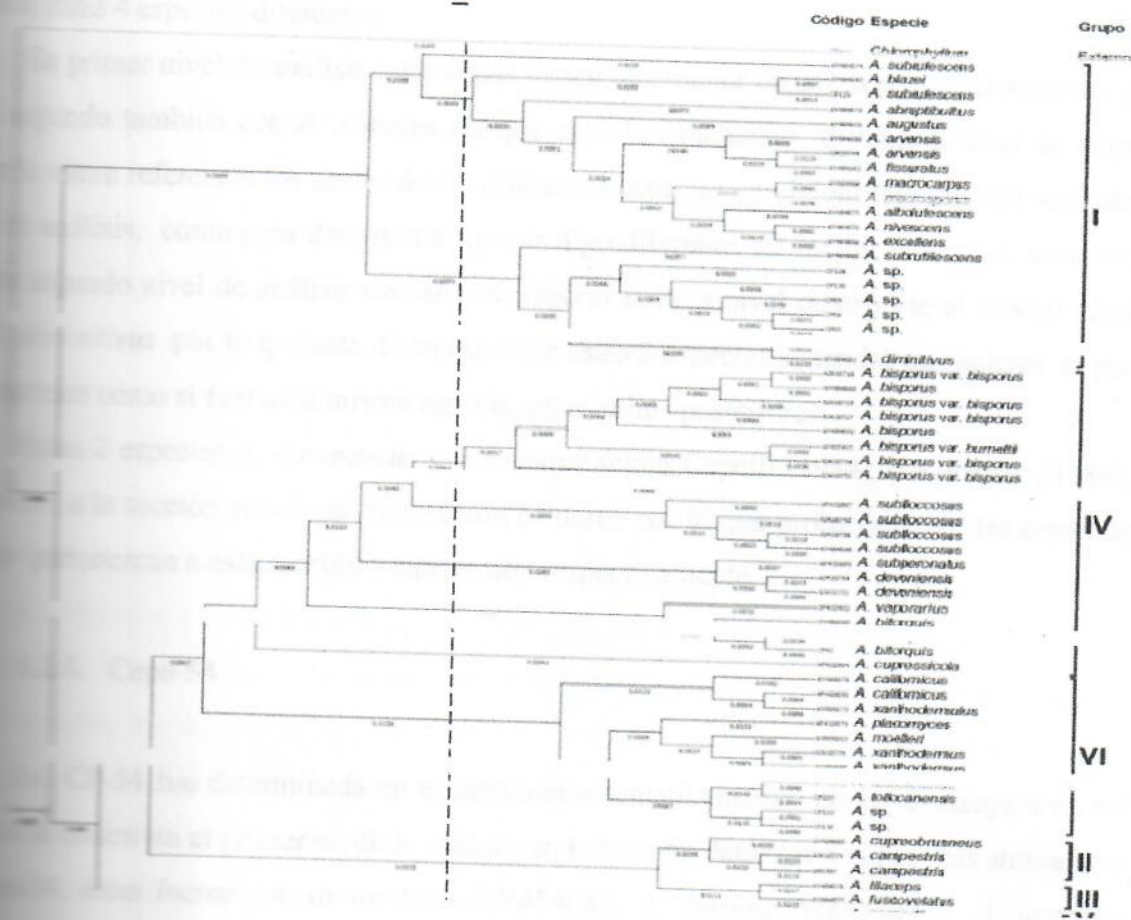


Fig. 3. En este dendrograma se aprecia el corte a nivel de la especie *A. bisporus*

De cualquier modo, este grupo de cepas 54, 83, 89, 128 y 130, no salio a nivel de especie en el dendrograma parecida con ninguna de las cepas registradas de la base de datos, por lo que probablemente sea una nueva especie, lo cual se tendrán que comprobar en estudios posteriores realizando la fructificación de estas e identificándolas por medio de la morfología, por lo que se tendría primero que corroborar si las cepas 54 y 83 son la misma especie y si el resto de las cepas de este subgrupo, la 89, 130 y 128, también lo son o si son otras 4 especies diferentes.

En primer nivel de análisis estas cepas tienen una menor distancia con *A. diminitivus* y en el segundo también con *A. semotus* aunque es suficientemente distante a nivel de corte cuando como referencia los cortes de las diferentes especies en el dendrograma del segundo nivel de análisis, como para determinar que es algo diferente. Al incluir la cepa *A. semotus*, en el segundo nivel de análisis esta se congrego al corte a nivel de especie al mismo nivel que *A. diminitivus* por lo que esta distancia entre estas 2 especies se tendrá que aclarar el por venir como si fueran la misma especie, en estudios posteriores.

Estas 2 especies *A. diminitivus* y *A. semotus* según Capelli (1984), y Kerrigan (1986), pertenecen a la sección Arvenses subsección Menores por lo que probablemente las cepas de estudio pertenezcan a esta sección y subsección respectivamente.

#### 6.2.4. Cepa 54

La CP-54 fue determinada en el laboratorio tentativamente como *A. campestris*, no cuando al buscar en el primer nivel de análisis en la base de datos las 5 cepas más similares a la cepa 54, éstas fueron *A. diminitivus* AY484681, *A. maskae* AJ88846442, *A. arvensis* AJ88846443, *A. romagnesii* AJ8884640y *A. abruptibulbus* AY484673, en el segundo nivel de análisis se volvió a congregar con cepas provenientes previamente de la base de datos las cuales ya habían sido empleadas en estudios por expertos en el género *Agaricus* y todas pertenecen a la sección Arvenses, por lo que no corresponde la cepa 54 a la especie *A. campestris* como había sido descrita tentativamente, porque esta especie según las clasificaciones tradicionales pertenece a la sección Campestris, la cual esta presente en el



grupo II, y en este estudio la cepa 54 se ubico en el grupo I, en el cual están las especies de la sección Arvenses.

Möller (1950-1952), ubica a *A. campestris* en la sección Rubescentes grupo Campestris mientras que a las otras especies en la sección Flavecentes grupo Arvensis, Konrad et al. (1952), ubicaron a *A. campestris* en la sección Campester en el grupo Campestris, mientras que las otras especies las ubican en la sección Arvenses grupo Arvensis, Singer (1975), la ubica en mismo subgénero pero en diferente sección, a *A. campestris* en la sección Agaricus y las otras especies en cuestión a la sección Arvenses.

Wasser (1980), ubica a *A. campestris* en el subgénero Agaricus, sección Agaricus y a las otras especies de la sección Arvenses en el subgénero Flavoagaricus sección Majores, Capelli (1984), ubica a *A. campestris* en la sección Rubescentes subsección Campestris grupo Agaricus y a las otras especies en la sección Flavescentes subsección Arvenses, Heineman (1977) y Kerrigan (1986) ubican a *A. campestris* y a las otras especies en diferentes secciones Agaricus y Arvenses respectivamente.

Al ser distinguida la especie *A. campestris* y las diferentes especies de la sección Arvenses por varios autores como pertenecientes a diferentes secciones y subsecciones y al no haberse congregado la cepa 54 con *A. campestris* en el primer nivel, así como en el segundo nivel de análisis, en la cual además se introdujeron dos cepas con los números de acceso U85307 y U85307 de la especie *A. campestris*, y las cuales nuevamente no se congregaron con la cepa 54, ya que ésta se congregó como ya se menciona en el grupo I y las otras 2 cepas con el grupo II Campestris y en el grupo IV de acuerdo al corte basándose a nivel sección, confirma que definitivamente la cepa 54 no es de la especie *A. campestris*.

Aunque no se determino que especie es la cepa 54, si se pudo orientar a que sección pertenece y ésta tiene un gran potencial como cepa comestible porque se ha confirmado la comestibilidad de esta cepa en el laboratorio, así como también se menciona en la literatura que es comestible a todas las especies de la sección Arvenses.

#### 6.2.5. CP- 83

La cepa 83 fue determinada tentativamente como *A. osecanus*, al igual que la cepa 125, ya que la cepa 125 se congregó en un grupo aparte de la cepa 83.

Aunque la cepa 83 fue determinada como *A. osecanus* y esta especie pertenece a la sección Arvenses y se ubico en esta misma sección , no se cuenta en la base de datos con un registro de la secuencia ADN de la sección ITS de esta especie por lo que no podemos asegurar o confirmar si esta cepa es dicha especie, por lo que se sugiere realizar una determinación morfológica de esta cepa para confirmar la identidad de esta especie, que seguramente será la misma que la cepa 54 debido a que según los resultados de este estudio estas cepas son a nivel de corte del dendrograma la misma especie.

#### 6.2.6. CP- 89

La cepa 89 *A. sp.* no ha sido determinada ni confirmada su comestibilidad en el laboratorio, no obstante al comparar su secuencia de ADN en la base de datos en el primer nivel de análisis fue similar a 4 cepas de la base de datos las cuales son: *A. romagnesii* AJ884640, *A. maskae* AJ884642, *A. arvensis* AJ887993 *A. diminutivus* AY484681 y *A. angustifolius* AY484673, las cuales son especies que se reportan como comestibles con excepción de *A. romagnesii* la cual ya fue discutida, asimismo en el segundo nivel de análisis corroboró este resultado porque se volvió a agrupar con especies de la sección Arvenses, e incluso se introdujeron más especies de esta sección, además su cercana distancia genética con las cepas del cepario 54, 83, 128 y 130 las cuales ya ha sido confirmada su comestibilidad nos demuestra que la cepa 89 pertenece a la sección Arvenses y que también es comestible, por lo tanto la cepa 89 tiene un gran potencial como hongo comestible. Se recomendaría llevar a fructificación en estudios posteriores a la cepa 89 para complementar su determinación a través de sus rasgos morfológicos y por otros métodos moleculares.

#### 6.2.7. CP-128

En el primer nivel de análisis las cepas más parecidas a la cepa 128 provenientes de la base de datos fueron: *A. maskae* AJ884642, *A. romagnesii* AJ884640, *A. arvensis* AJ887993 y *A. diminutivus*. De igual forma en el segundo nivel de análisis la cepa 128 se concentro en el grupo II, en donde se seleccionaron cepas de la sección Arvenses confirmando así que esta cepa 128 pertenece a esta sección.

Por lo tanto de acuerdo a estos resultados la cepa 128 que fue determinada inicialmente como *A. bitorquis*, no pertenece a esta especie, porque *A. bitorquis* en base en las clasificaciones tradicionales realizadas por varios autores es ubicada en la sección

Rubescentes de acuerdo a Möller (1950), Kühner y Romagnesi (1953) y Capelli (1984), de acuerdo a Konrad y Maublanc (1952) en la sección Campestris, de acuerdo a Singer (1975) y Heinemann (1978) la ubican en la sección Agaricus, y Wasser (1980) en la sección Duploanulatae. Esta sección es definitivamente otra diferente a la sección Arvenses en donde se ubico la cepa 128.

Aunado a lo anterior y para comprobar que la cepa 128 no es *A. bitorquis* en el segundo nivel de análisis se añadieron 2 cepas provenientes de la base de datos, las cuales son de la especie *A. bitorquis* con los números de acceso AJ418759 y AY484695, que además ya han sido empleadas en diversos estudios moleculares por lo que esta demostrado que si son la especie mencionada; estas cepas se congregaron en un grupo diferente a la cepa 128 que se ubico en el grupo I y las otras cepas se congregaron en los grupos IV y en el grupo III de acuerdo al corte, por lo que esto también confirma que la cepa 128 no es la especie *A. bitorquis* y es una especie de la sección Arvenses.

#### 6.2.8. CP- 130

En el primer nivel de análisis cuando se realizó la búsqueda en la base de datos de las 50 las cepas más parecidas a la cepa 130 estas fueron las siguientes *A. diminutivus* AY484681, *A. romagnesii* AJ884640, *A. maskae* AJ884642, *A. arvensis* AJ887993 y *A. subrutilescens* AJ8843973, este resultado coincidió también con el segundo nivel de análisis en donde se incorporaron cepas conocidas de la sección Arvenses.

De acuerdo a los resultados obtenidos la cepa 130 no es *A. bitorquis*, porque *A. bitorquis* pertenece a otra sección Agaricus y en el grupo en el que se ubico se congregaron especies de la sección Arvenses. Al igual que la cepa 128 la cepa 130 no es *A. bitorquis*, no obstante se recomendaría revisarla en estudios posteriores para determinarla por métodos clásicos morfológicos.

De cualquier forma en base al parecido con las otras cepas con las que se congregó, la cepa 130 demuestra que goza de un gran potencial porque es similar a especies que son comestibles tanto de la base de datos, como del cepario y esta confirmada su comestibilidad, por lo que se pueden llevar acabo para futuro pruebas para realizar entrecruzamientos ya que se conservó en el laboratorio en estudios previos que es tetraesporica.

### 6.2.9. Discusión general del grupo I

En el grupo I se ubicaron diversas especies de diferentes subsecciones de la sección Arvenses como: *A. diminitivus* que es ubicada por Heineman (1977), en la subsección Minores, al igual que *A. semotus*. Por Capelli son ubicadas en la subsección Minores y en el grupo Semotus.

*A. subrutilescens* es ubicado por Kerrigan (1986), al grupo Subrutilescens, *A. augustus* es ubicada por Heineman (1977) en la subsección Augusti y por Capelli en el grupo Augustus; *A. macrocarpus* es ubicada por Heineman en la subsección Sylvicolae; *A. excellens* es ubicada por Heineman en la subsección Arvenses pero por Capelli en el grupo Minores.

El resto de las especies pertenecen a la subsección Arvenses, no obstante se puede notar existen 2 subgrupos como se muestra en la figura 10.

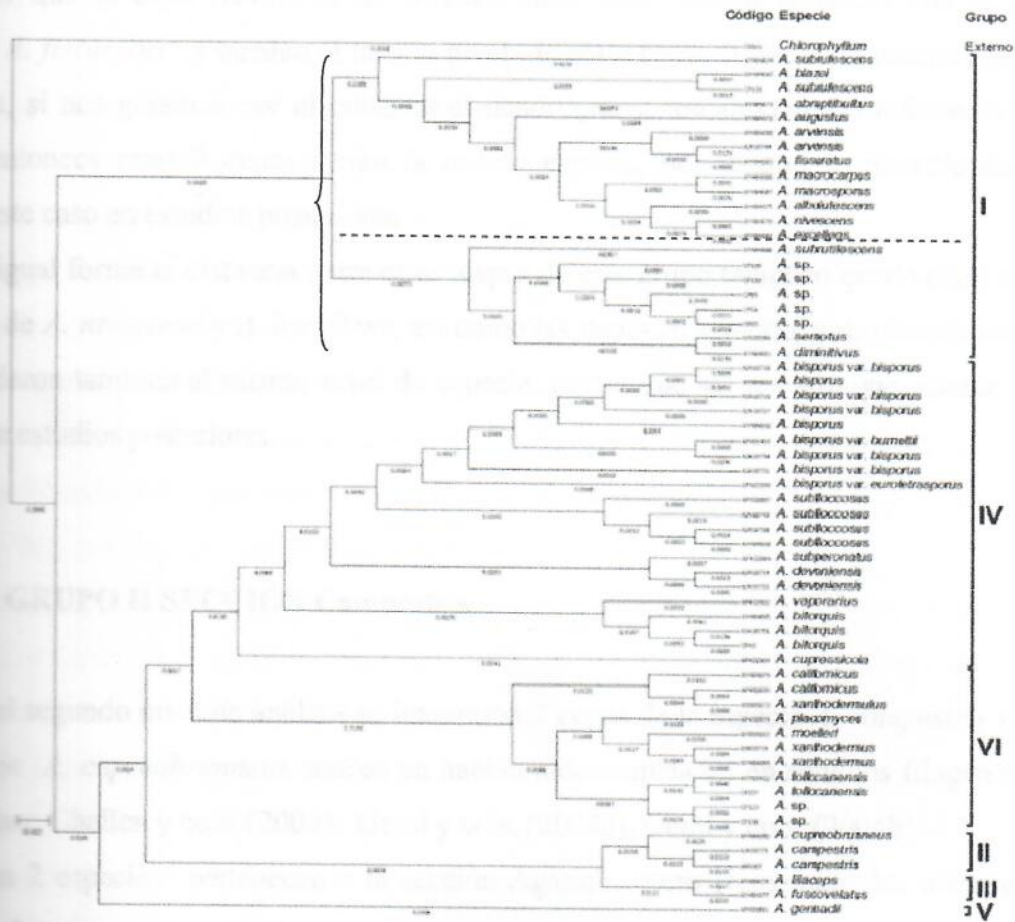


Fig 10. En este dendrograma se aprecia una subdivisión en el grupo I.

Se puede notar que *A. subrutilescens*, *A. semotus* y *A. diminitivus* quedan agrupadas del lado izquierdo porque son de diferentes secciones, no obstante *A. augusti*, *A. macrocarpus* y *A. rufescens*, que también son de diferentes subsecciones o grupos de la sección Arvenses, si se agrupan junto con cepas de la subsección Arveses, indicando en este estudio que estas subsecciones tiene menor distancia genética porque se agruparon en la sección Arvenses.

Asimismo en este grupo I no quedaron claras las distancias entre 2 cepas provenientes de diferentes bases de datos, las cuales son: *A. arvensis*, con número de acceso AY484690 tomada de Challen y colaboradores (2004 b), y *A. arvensis* con número de acceso AJ418744 tomada de Challen y colaboradores (2005), ya que aunque han sido empleadas por expertos en el género *Agaricus*, estas cepas en este estudio y basándonos a nivel de corte a nivel de especie no sería la misma.

especie, por que la cepa AJ418744 *A. arvensis* tiene una menor distancia con la cepa AF44683 *A. fissuratus* y quedan al mismo nivel de corte como si fuesen la misma especie, no obstante, si nos guiamos por el corte en el dendrograma tomando como referencia a *A. nivescens*, entonces estas 3 cepas serian la misma especie, por lo que se recomienda sea analizado este caso en estudios posteriores.

De igual forma la distancia entre otras cepas de este grupo tampoco quedo clara como fue el caso de *A. nivescens* y *A. excellens*, así como las cepas *A. semotus* y *A. diminitivus*, las cuales quedaron también al mismo nivel de especie, por lo que se tendrán que aclarar este resultado en estudios posteriores.

### 6.3 GRUPO II SECCIÓN *Campestris*

En el segundo nivel de análisis se integraron 2 cepas de la especie *A. campestris* y una de la especie *A. cupreobrunneus*, ambas ya habían sido empleadas en estudios filogenéticos realizados por: Challen y cols. (2003), Geml y cols. (2004a), Geml y cols. (2004b).

Estas 2 especies pertenecen a la sección *Agaricus*, pero Heineman las ubica en la subsección *Agaricus* y Capelli al grupo *Campestris*. Asimismo en clasificaciones realizadas empleando al ADN estas especies se han agrupado en el grupo *Agaricus* como el trabajo de Sengupta (1986), quien observo que estas especies constituyen un clado diferente dentro del género *Agaricus*.

En el presente estudio estas cepas también formaron un grupo independiente del resto, formando en este segundo nivel de análisis el grupo II y a nivel de corte basados en sección el grupo VI.

Con este resultado podemos confirmar que ninguna de las cepas de estudio es de esta sección ya que ninguna se agrupó en este grupo, tal como se había confirmado en el primer nivel de análisis, además con la inclusión de estas especies debidamente determinadas se confirma que la cepa 54 no es la especie *A. campestris*.

#### 6.4. GRUPO III

Para el segundo nivel de análisis se tomaron especies que en estudios previos pertenecieron a otros clados diferentes a los ya presentes en el primer nivel de análisis, esto con el objeto de descartar si alguna de las cepas de estudio se unía a este grupo III, no obstante, ninguna de las cepas de estudio se agrupo aquí.

Para la conformación de este grupo se introdujo a la especie *A. liliceps*, la cual según la clasificación realizada por Heineman (1977), pertenece a la sección Arvenses, subsección Augusti, esta especie en un estudio realizado por Kerrigan (1986), se agrupo en el grupo Spissicaules. También en este grupo III se incorporo la especie *A. fuscovelatus* que según Kerrigan (1986), pertenece al grupo Sanguinolenti.

Ambas especies se congregaron en el grupo III coincidiendo con el trabajo de Geml y cols. (2004a) y Gem y cols. (2004b), en donde ambas especies *A. liliceps* y *A. fuscovelatus* se congregan en un clado.

En el segundo nivel de análisis también se introdujo la especie *A. augustus*, la cual según Heineman (1977) y Capelli (1984), la ubican tanto en la misma sección como en la misma subsección que *A. liliceps*, sin embargo, en el presente estudio *A. augustus* se agrupo en el grupo I con especies de la sección Arvenses, y *A. liliceps* se congregó en el grupo III junto con *A. fuscovelatus*.

Basándonos a nivel de corte del dendrograma a nivel de sección se puede apreciar *A. liliceps* y *A. fuscovelatus* forman el subgrupo VI, el cual incluye al grupo II por lo que en el presente trabajo con los índices usados, se ve que hay menor distancia entre estos 2 grupos, por lo que se tendrá que analizar esta cercanía en estudios posteriores.

## 6.5. GRUPO IV SECCIÓN Duploannulatae

En el primer nivel de análisis se integraron la cepa 43 *A. bitorquis* y 3 cepas más de esta especie provenientes de la base de datos (AF432898, AJ884648 y AY484696), además de 2 cepas de *A. bisporus* (AJ301619 y AJ301620).

En el segundo nivel de análisis la cepa 43 *A. bitorquis* se congrego en el grupo IV, la cual al haberse congregado en el grupo IV *Duploannulatae*, se corrobora que pertenece a esta subsección y que es dicha especie. El que se hayan agrupado estas 2 especies en un mismo grupo coincide con las agrupaciones clásicas por morfología, debido a que ambas especies pertenecen a la misma sección, por lo que con esta metodología de ADN ribosomal de esta sección ITS si coincide con los arreglos taxonómicos clásicos basados en morfología, no obstante, es llamada de diversas maneras dependiendo el autor.

El nombre Duploannulatae fue mencionada por Waser (1980), quien se baso en rasgos morfológicos, asimismo este nombre es retomado por otros investigadores que trabajaron con estas especies de esta sección pero que emplearon características moleculares para realizar estudios filogenético, dichos estudios además han coincidido con los arreglos tradicionales, como el de Geml y cols (2004b), los autores emplearon métodos de máxima parsimonia y máxima probabilidad, en dicho estudio *A. bitorquis* se congrega junto con otras especies al clado Duploannulatae y este clado a su vez tuvo subdivisiones, en donde *A. bitorquis* es más cercano con la especie *A. vaporarios* que con *A. bisporus* y *A. subfloccosus* y a su vez *A. devonienses* con *A. subperonatus* y aparte se agrupa *A. cupresicola*, aunque en el presente estudio no se emplearon estos métodos, los resultados coinciden con el estudio de Geml y cols. (2004b), porque al realizare el corte de dendrograma se forma un subgrupo dentro del grupo IV, el cual al corte es el grupo III y ahí se congrega *A. bitorquis* junto con *A. vaporarius* y en un subgrupo independiente el IV *A. cupresicola*, no obstante en el subgrupo III se congregan *A. subfloccosus*, *A. bisporus*, *A. subperonatus* y *A. devoniensis* lo cual no coincide con los subrupos de Geml y cols. 2004 b, porque como ya se menciono el subdivide a *A. bisporus* con *A. subfloccosus* y por su parte *A. devonienseis* con *A. subperonatus*.

Igualmente en otro estudio realizado por Challen y cols., 2003, en donde únicamente se trabajó con especies de la sección Duploannulatae y también emplearon el criterio de máxima



parsimonia, también *A. bitorquis* resulto más cercano a *A. vaporarius* y *A. bisporus* con *A. subfloccosus* y *A. devonienses* en otro en otro subgrupo aparte.

Por lo anterior los subcortes empleados en el dendrograma de los subgrupos II, III y IV los cuales corresponden al grupo VI coinciden con trabajos anteriores y corroboran que los cortes estuvieron bien aplicados.

### 6.5.1 CP-43

En los dendrogramas tanto en el primer nivel de análisis como en el segundo nivel de análisis la cepa CP-43 *A. bitorquis*, no se agrupó con las otras cepas del cepario CP-128 y CP-130, también determinadas tentativamente como *A. bitorquis*; ya que en el primer nivel de análisis quedaron las cepas 128 y 130 en el grupo II y la cepa 43 en el grupo I. En el segundo nivel de análisis las cepas 128 y 130 quedaron en el grupo I y la cepa 43 en el grupo IV tanto a nivel de corte como a nivel de sección.

No obstante la cepa CP-43 en el primer nivel de análisis al ser comparada su secuencia en la base de datos EBI fue un 99% parecida genéticamente con *A. bisporus* AJ301620, no así con AJ301619 también de *A. bisporus* la cual fue similar un 98%, al igual que con las otras 3 cepas de la especie *A. bitorquis* con el número de acceso AF432898, AJ884648 y AY484696, esto fue singular, puesto que en la base de datos existen otros 15 registros de otras cepas de *A. bitorquis* de esta misma región ITS del ADNr y sin embargo, solamente 3 cepas de *A. bitorquis* resultaran similares a la cepa 43 y 2 cepas de *A. bisporus*, aunque esta sea de la misma sección por lo que tendrá que ser analizado en estudios posteriores porque de corroborarse este resultado este parecido tiene una gran aportación para fines reproductivos, porque se han realizado intentos de formar híbridos entre las especies de *A. bisporus* y *A. bitorquis* para obtener la característica que posee *A. bitorquis* de fructificar a mayor temperatura que *A. bisporus* y así poder sembrarlas en lugares de climas cálidos y tropicales, sin embargo han sido escasos los híbridos exitosos que se han obtenido por métodos de cruzamiento clásico y aún son pocos los híbridos exitosos por el método de fusión de protoplastos entre estas especies.

Por lo que este parecido que se pudo observar entre estas cepas podría dar pie a futuras investigaciones para la formación de estos híbridos específicamente entre estas cepas.

En el segundo nivel de análisis cuando se agregaron cepas de la especie *A. bitorquis* y cepas de *A. bisporus* que ya habían sido empleadas en estudios por expertos en el género *Agaricus*, entonces la cepa 43 si se ubicó a nivel de corte de especie junto con otra cepa de *A. bitorquis* con número de acceso AJ418759 y un poco mas distante a la otra cepa de *A. bitorquis* AY484695, pero definitivamente más distantes y en grupo diferente a nivel de corte del dendrograma a las cepas de la especie *A. bisporus*, ya que estas se agruparon en el grupo II y las cepas de la especie *A. bitorquis* en el grupo IV.

A nivel de grupo Duploannulatae tanto *A. bisporus* como *A. bitorquis* si se agruparon en el grupo IV, siendo este conformado por especies de esta sección, por lo que se corrobora la determinación de la cepa 43 como *A. bitorquis*.

#### 6.6. GRUPO V

Se anexo al segundo nivel de análisis la especie *A. gennadii*, la cual en un estudio realizado por Geml y cols. (2004b), conformo un clado diferente, esta especie en el presente estudio únicamente formo un grupo, el V y tomando de referencia el corte del dendrograma el grupo VI. Ninguna de las cepas de estudio del cepario se anexo a este grupo V o subgrupo VI.

*A. gennadii* según las clasificaciones tradicionales como la de Heineman (1977), pertenece a la sección *Agaricus* subsección *Bitorquis* y según Capelli (1984), pertenece a la sección *Bitorques* grupo *Gennadii*, no obstante en este estudio no se congregó con especies de esta sección, las cuales estuvieron incluidas en este segundo nivel de análisis representadas por las especies *A. bitorquis* y *A. bisporus* y *A. devonienses*, este resultado coincide con el estudio realizado por Geml y cols, (2004b).

## 6.7 GRUPO VI SECCIÓN *Xanthodermatei*

El primer nivel de análisis coincidió con el segundo nivel de análisis, porque también se concentraron las cepas 123, 138 y 237 muy próximas a especies de esta sección *Xanthodermatei*, no obstante, la excepción como ya se mencionó fue la especie *A. pocillator* proveniente de la base de datos del primer nivel de análisis. En el segundo nivel de análisis estas tres cepas la 123, 138 y 237 se ubicaron en el grupo VI y en el grupo V de acuerdo al corte tomando de referencia la sección, la cual la conforman cepas de la sección *Xanthodermatei* por lo que se confirma que estas cepas son pertenecen a esta sección. De igual forma el primer nivel de análisis coincide con el segundo en que las cepas 123 y 128 son la misma especie, ya que con el segundo nivel de análisis se puede corroborar este resultado porque a nivel de corte del dendrograma quedaron en el mismo nivel de especie, además la cepa 123 es proveniente de la ciudad de Puebla y la cepa 138 de una localidad cercana a Puebla y quizá sean diferentes poblaciones, por lo que en estudios posteriores se tendrán que realizar pruebas con otros métodos moleculares para confirmarlo..

La cepa 237 al realizar el corte del dendrograma se puede observar que posiblemente es la misma especie que *A. tolloacanensis*, ya que en el mismo grupo VI hay 2 cepas de la base de datos *A. xanthodermus* las cuales si las tomamos como referencia al nivel de corte se puede observar que son la misma especie, por lo que se puede observar que quedan al mismo nivel que la cepa 237 y la cepa con número de acceso AY703912 *A. tolloacanensis*, por lo que muy probablemente sea la misma especie estas 2 cepas.

Dada su cercanía con la cepa 237 y AY703912 *A. tolloacanensis* es probable que sea una nueva especie, ya que comparando la distancia con estas cepas anteriores es probable que sea una especie nueva o al menos una especie no registrada en la base de datos aún, porque *A. tolloacanensis* es una especie prácticamente recién descrita y las cepas 123 y 138 tienen poca distancia con esta especie y no con otras cepas al menos de la base de datos, por lo que se deberán de realizarse estudio morfológicos y moleculares para corroborar esto.

Otras dos especies provenientes de la base de datos se agruparon en el grupo VI, las cuales fueron *A. californicus* con 2 cepas *A. xanthodermulus*, no obstante una cepa de *A. californicus* tuvo menor distancia con la cepa de *A. xanthodermulus* que con la otra cepa de *A.*

*californicus*. Por lo que se tendrá que revisar este resultado en estudios posteriores para corroborar por métodos morfológicos la identidad de estas tres cepas

### 6.7.1 CP-123

La cepa 123 fue determinada tentativamente como *A. subrufescens*, pero en el primer nivel de análisis también hubo otra cepa de esta especie proveniente de la base de datos, la cepa AY818660, las cuales tuvieron quedaron en un grupos totalmente alejados, ya que la cepa 43 quedo en el grupo I y *A. subrufescens* en el grupo II, además esta cepa AY818660 no fue de las 5 especies mas parecidas en la base de datos a la cepa 123, ya que la cepa 123 fue similar con otras cepas provenientes de la base de datos las cuales fueron: *A. moelleri* AY899264 y AY899263, *A. xanthodermus* AY484689, *A. tolloacanensis* AY703913 y AY703912, por lo que la determinación previa de esta cepa como *A. subrufescens* no corresponde al grupo al cual resulto similar, e incluso las clasificaciones tradicionales las agrupan en la sección Flavescentes pero en diferentes subsecciones la Arvenses y la sección Xantodermatei respectivamente.

En el segundo nivel de análisis se corrobora este resultado anterior, ya que la cepa 123 se ubico en el grupo VI y en el Grupo V de acuerdo al corte, en este grupo se introdujeron especies de la sección Xanthodermatei, asimismo se introdujo una cepa proveniente de la base de datos con el número de acceso AY484674, la cual es la especie *A. subrufescens*, y esta quedo ubicada en el grupo I, por lo que definitivamente no es la identidad de la cepa 123 *A. subrufescens* ya que esta especie es de otra sección, la sección Arvenses.

### 6.7.2 CP-138

La cepa 138 fue determinada como *A. abruptibulbus*, en el primer nivel de análisis se integro otra cepa de la base de datos perteneciente a esta misma especie, la cual tiene el numero de acceso AY484673, no obstante, en la búsqueda de las 5 especies más similares genéticamente a la cepa 138 la cepa anterior no fue de las 5 más parecidas genéticamente, además esta cepa de la base de datos se ubicó con mucha distancia genética cuando se aplicó el método de NEIGHBOR JOINING, de igual forma en el segundo nivel de análisis se volvió a integrar esta cepa proveniente de la base datos y esta se ubico en el grupo I y la cepa 138 en

el grupo VI y en el grupo V de acuerdo con el corte del dendograma a nivel de sección por lo que podemos confirmar que la cepa 138 no es la especie *A. abruptibulbus*.

En el primer nivel de análisis las 5 especies más similares con la cepa 138, obtenidas de la base de datos fueron las siguientes: *A. moelleri*, AY899264 y AY899263, *A. xanthodermus*, AY484689 y *A. tolloacanensis* AY703913 y AY703912, por lo que la cepa 130 pertenece a esta sección, por ello se deberá llevar a fructificar para corroborar su identidad con métodos clásicos y moleculares, ya que esta cepa ya había sido confirmada su comestibilidad en el laboratorio y se agrupa en una sección que es considerada tóxica.

### 6.7.3 CP-237

La cepa 237 no había sido determinada en el laboratorio por métodos clásicos morfológicos, ni confirmada su comestibilidad, pero cuando fue comparada su secuencia de ADN en la base de datos en el primer nivel de análisis, esta fue similar a especies de la sección Xanthodermatei como *A. moelleri*, *A. pocillator*, no obstante, fue más similar a la especie *A. tolloacanensis* de las cuales fueron 2 cepas provenientes de la base de datos con los números de accesos AY703913 y AY703912.

En el segundo nivel de análisis también se introdujo la cepa AY703912 *A. tolloacanensis* y de igual forma la cepa 237 se agrupó con esta a nivel de especie en el corte del dendograma por lo que es muy probable que sea esta especie la cepa 237, por lo tanto se recomendaría aplicarles otros métodos moleculares, así como llevar a fructificación el micelio de esta cepa para así observar sus rasgos morfológicos y complementar con esto su determinación.

La especie *A. tolloacanensis* ha sido reportada por Callac y Mata (2004), en México no obstante, todavía no se ha publicado este estudio por lo que se desconoce la ubicación geográfica de esta especie, pero la cepa 237 al provenir de Puebla posiblemente sea alguna población de esta especie, esta especie forma parte de la sección Xantodermatei.

## 7 CONCLUSIONES

En este estudio se analizó la secuencia de la región ITS del ADNr de cepas nativas mexicanas y se pudo determinar la distancia genética entre las cepas de estudio, así como la existente con otras cepas de la base de datos internacional y con otras cepas previamente seleccionadas que ya habían sido empleadas en diversos estudios del género *Agaricus*.

Las cepas que habían sido identificadas tentativamente con base en la morfología, en algunos de los casos nos ayudó a corroborar su identidad como es el caso de la cepa 43 *A. bitorquis* y en otros nos guió a la sección y subsección o grupo a que pertenecen dentro del género *Agaricus*, como fueron las cepas como las CP-83, CP-89, de igual forma con otras cepa este estudio nos ayudo a modificar su determinación previa y nos oriento al grupo que pertenecen, como es el caso de la CP-138, CP-130, CP-128, CP-123, CP-54 ya que con el segundo nivel de análisis se introdujeron especies las cuales ya habían sido empleadas para la realización de análisis moleculares filogenéticos y las cuales formaron clados, integrándose las cepas de estudio a los grupos correspondientes.

Con base en los resultados obtenidos también se pudo comprobar en varios de los casos que coincide y refuerza las clasificaciones tradicionales como fue con *A. bisporus* y *A. bitorquis*, en otros casos no coincide con los arreglos clásicos como fue el caso del *A. romagnesii* y *A. pocillator* y como es el caso del segundo nivel de análisis de *A. gennadii*, y *A. lilaceps*. De igual forma no coincide con los arreglos tradicionales por morfología la cercanía de la sección Rubescentes con especies del grupo Xanthodermatei, no obstante, coincidió con estudios posteriores que han empleado la región ITS como fue la cercanía que mostró la sección Duploanulati con la sección Xanthodermatei, por lo que se tendrán que revisar en estudios posteriores para conocer más acerca de esto. Asimismo el presente trabajo coincide con otros estudios moleculares que han empleado la región ITS en cuanto a la formación de grupos, aunque las metodologías empleadas hayan sido diferentes.

En el segundo nivel de análisis se pudo corroborar que posiblemente se cuente con nuevos registros de especies como es el caso de 2 cepas las cuales al parecer son la misma especie, las cuales son las cepas 123 y 138, porque estas dos cepas no resultaron cercanas con

ninguna de las otras cepas que fueron introducidas de la sección Xanthodermatei, pero tuvieron una distancia corta con respecto a la cepa 237, la cual resultó la misma especie que *A. tolloacansis*, la cual es un registro reciente, por lo que probablemente estas cepas sean una nueva especie.

De igual forma las cepas 54, 83, 89, 128 y 130, no tuvieron una distancia corta con ninguna de las cepas seleccionadas de la base de datos, por lo que se tendrán que revisar nuevamente mediante rasgos morfológicos para corroborar que no son especies ya descritas pero que no estaban presentes sus secuencias en la base de datos, de corroborarse lo anterior cabría la posibilidad que fueran 4 nuevas especies, ya que son 5 cepas de las cuales 2 de ellas la 54 y la 83, por los resultados obtenidos al parecer son la misma especie.

Al conocer y disponer ya de las secuencias de ADN ribosomal de las cepas del cepario, estas pueden ser puestas a disposición en las bases de datos para utilizarlas en estudios similares y en otro tipo de estudios como sistemáticos, filogenéticos y evolutivos.

El conocimiento de esta región ITS del ADN de estos hongos silvestres de México nos proporcionó nuevas opciones para futuros programas de mejoras genéticas del género *Agaricus*, esto tiene un gran potencial porque podrían ser nuevas propuestas a futuro para cepas comerciales, dado que en el país se tiene una buena aceptación por el consumo de especies silvestres de género *Agaricus*, así como para futuros entrecruzamientos con las cepas a las que resultaron similares de la base de datos y principalmente para mejoramiento de *A. bisporus*.

Con la información obtenida se puede sugerir la formación de híbridos por métodos clásicos, analizando el primeramente el patrón de sexualidad de la especie, ya que es corta la distancia que mostraron algunas cepas, en el caso de las cepas menos parecidas se propone la fusión de protoplastos ya que algunas de ellas tienen algunas características deseables y que se quisiera introducir para futuras mejoras genéticas.

## 8. PERSPECTIVAS

El parecido que demostró tener la cepa 43 *A. bitorquis* con 2 cepas de *A. bisporus* en el primer nivel de análisis tiene una gran aportación para fines reproductivos, porque se han realizado intensos esfuerzos para formar híbridos entre las especies, sin embargo han sido escasos los híbridos exitosos entre estas especies. Por lo que estos resultados dan pie a futuras investigaciones con otras regiones del ADN y otros métodos moleculares empleando diversos modelos de sustitución de nucleótidos y otros métodos de agrupamiento, porque de confirmarse con otros métodos se podrían realizar pruebas para la formación de estos híbridos específicamente entre estas cepas.

La cepa 125 tiene mucho potencial, ya que no solo puede ser cultivada como alimento. De comprobarse en estudios posteriores si posee además las propiedades medicinales que le atribuyen al conjunto de especies a las que probablemente pertenece, podría promoverse como un hongo funcional.

Dado el parecido genético entre las cepas 54, 83, 89, 128 y 130, también se propondrían para llevar a cabo un programa de mejoramiento entre ellas con la cepa 125, a la que también fueron similares, para así obtener cepas comestibles y, de comprobarse las propiedades de la cepa 125, también medicinales.

Se recomienda la revisión de las cepas 128 y 130 por métodos clásicos morfológicos para corroborar su identidad, aunque es muy probable que de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio ambas especies pertenezcan a la sección *Arvenses*. De confirmarse que correspondiesen a *A. bitorquis*, como fueron descritas tentativamente, entonces es probable que el aislamiento geográfico juegue un papel determinante por que la cepa 43 proviene de Tailandia y las cepas 128 y 130 son de México Puebla.

En el grupo 1 del primer nivel de análisis, se congregaron las cepas 43, 123, 138 y 237 aunque se dispone en el laboratorio de ellas, obviamente no se recomendaría la formación de híbridos entre ellas debido a que la cepa 123, 138 y 237 pertenecen al grupo *Xantodermatei* y por ende es posible la toxicidad de estas cepas, solo se propondría la formación de híbridos entre la cepa 43 y con las cepas a las que resulto parecidas provenientes de la base de datos.



Se recomiendan análisis adicionales de otras regiones del ADN tanto nuclear como mitocondrial, así como el empleo de otros métodos de análisis filogenéticos y otros programas para comparar y complementar el estudio del género *Agaricus*.

Anderson, R., & D. M. Paulsen. 1998. The genus *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in the United States. *Mycol. Prog.* 17: 1-10.

Bardola, M., M. L. Montoya, & J. L. Ramírez. 2004. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 77: 1-10.

Bas, C. 1971. A short introduction to the ecology, taxonomy and nomenclature of the genus *Agaricus*. *Agaricus: Its Origin and Breeding of Agaricus*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1-10.

Byers, K. 2001. *Agaricus* and the genus *Agaricus*. *Agaricomycetes* (Basidiomycota) in the United States. *Mycol. Prog.* 20: 1-10.

Calonge, P. D. 1993. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 66: 1-10.

Calvo-Rodríguez, P., C. Calvo, & J. L. Ramírez. 2004. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 77: 1-10.

Calvo-Rodríguez, P., C. Calvo, & J. L. Ramírez. 2004. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 77: 1-10.

Calvo, P., C. Calvo. 2004. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 77: 1-10.

Calvo, P., J. L. Ramírez. 2002. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 75: 1-10.

Calvo, P., J. L. Ramírez, M. P. Ochoa, & J. L. Ramírez. 2004. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) in Mexico. *Rev. Mex. Bot.* 77: 1-10.

Cappelli, A. 1974. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes). *Saccardo*, pp. 147.

Carls, M. 1975. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes). *Agaricomycetes* (Basidiomycota) in the United States. *Mycol. Prog.* 14: 1-10.

Carls, M. 1975. *Agaricus* (Basidiomycota, Agaricomycetes). *Agaricomycetes* (Basidiomycota) in the United States. *Mycol. Prog.* 14: 1-10.

## 9. Referencias

- Alexopoulos, C. J., C. M. Mims. 1979. *Introductory mycology*. John Wiley y Sons. Inc. pp 632.
- Anderson, B. J., D. M. Petsche, F. B. Herr, P. A. Horgen. 1984. Breeding relationships among several species of *Agaricus*. *Can. J. Bot.* 62: 1884-1889.
- Bandala V. M. y L. Montoya. 1993. Nuevos registros de hongos del Estado de Veracruz, V. Nuevos Aphyllophorales y Agaricales. *Rev. Mex. Mic.* 9:85-118.
- Bas, C. 1991. A short introduction to the ecology, taxonomy and nomenclature of the genus *Agaricus*. In *Genetics and breeding of Agaricus*. Van Griensven (ed.) editorial Pudoc Wageningen.
- Bryce, K. 2001. Fungi and the history of mycology. *Encyclopedia of life science*. Nature publishing group.
- Calonge, F. D., 1993. Hongos medicinales. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 18: 179-188.
- Calvo-Bado, L., M. P. Challen, T. J. Elliott. 2000a. Breeding biology and species relationships in the genus, *Agaricus*. *Mushroom Science* 15:311-316.
- Calvo-Bado, L., R. Noble, M. Challen, A. Dobrovin-Pennington, and T. Elliot. 2000b. Sexuality and Genetic identity in the *Agaricus* section *Arvenses*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66 (2): 728-734.
- Callac, P., G. Mata. 2004. *Agaricus tollocanensis* a new species of the class *Xanthodermatei* found in Mexico. *In press*
- Callac, P., J. Guinberteau. 2005. Morphological and molecular characterization of two novel species of *Agaricus* section *Xanthodermati*. *Mycologia* 92 (2): 416-424.
- Callac, P., J. Guinberteau, M. P. Challen, L. A. Parra. 2005. *Agaricus* section *Xanthodermatei*: a phylogenetic reconstruction with commentary on taxa. *Mycologia*, 97 (6): 1292-1315.
- Cappelli, A. 1984. *Agaricus*. Biella Giovanna. Saronno. pp 537.
- Carlile, M. J., S. Watkinson. 1996. *The fungi*. (ed.) Academic press. pp.482
- Challen, M. P., A. J. Moore y D. Martínez-Carrera. 1995. Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *Bio Techniques* 18: 975-978.

- Challen, M. P., R. W. Kerrigan, P. Callac. 2003. A phylogenetic reconstruction and emendation of *Agaricus* section *Duploannulatae*. *Mycologia* 95 (1): 61-73.
- Chang, 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk). Sing in China. *Int. J. Med* 1: 291-300.
- Didukh, M. Y., R. Vilgays, R. Wasser, S. P. Isikhuemhen, O. S. Nevo. 2005. Notes on *Agaricus* section *Dulpoannulati* using molecular and morphological data. *Mycological Research* 109:729-740.
- Edel V. 1998. Polimerase chain reaction in mycology: an overview. Applications of PCR in Mycology. Ed. P.D. Bridge. CAB INTERNACIONAL.
- Evered, C. E., R. Noble, C. M. Clay. R. Li. 2000. Observation and measurement of spores of different *Agaricus* species in a scanning electron microscope. *Science and cultivation of edible fungi*. Ed. Van Griensven. Balkema Rotterdam.
- Elliot, T. J. 1978. Comparative sexuality in *Agaricus* species. *Journal of general Microbiology* 107: 113-122.
- Elliot, T. J. 1985. The genetics and Breeding of species of *Agaricus*. En: The biology and technology of the cultivated mushroom. Flegg, P.B., D. A. Spencer, P. A. Wood (eds.). John Wiley y Sons Ltd. pp. 111-129.
- Estrada-Torres, A. 1989. La etnomicología: Avances, problemas y perspectivas. Examen predoctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México D.F.
- Fritsche. G. 1991. A personal view on mushroom breeding from 1957-1991. *In Genetics and breeding of Agaricus*. Van Griensven (ed.) editor Pudoc Wageningen.
- Fritsche, G., A. S. M. Sonnenberg. 1988. Mushroom strains. *In The cultivation of mushrooms*. (E.D.) Van Griensven. Cap 5. pp. 101 – 121.
- Gardes, M., D. Bruns. 1999. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology* (2), 113-118.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J. A., Bruns, T. D., And Taylor, J. W. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69:180-190.

- Geml, J., D. M. Geiser, D. J. Royse. 2004a. Molecular phylogeny of *Agaricus species*. Science and cultivation of edible and medicinal fungi. (eds) Rinker y Royse pp. 165-173.
- Geml, J., D. M. Geiser, D. J. Royse. 2004. Molecular evolution of *Agaricus species* base don ITS and LSU rDNA sequences. *Mycological Progres* 3 (2):157-176.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Gutiérrez. R. J., J. Cifuentes. 1990. Contribución al conocimiento del género *Agaricus* subgénero *Agaricus* en México. *Revista Mexicana de Micología* 6: 151-177.
- Gutiérrez, R. J. 1990. Contribución del género *Agaricus* subgénero *agaricus*, del estado de Guerrero México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México DF.
- Hammond, P.M. 1992. Species inventory. In: G. Groombridge (ed) Global Biodiversity. Status of the earths living resources. Chapman and Hall, Londres, pp. 17-39.
- Horton, T. R. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and soil* 244: 29-39.
- Kerrigan, R. W. 2000. A brief history of marker assisted selection in *Agaricus bisporus*. Science and cultivation of Edible Fungi. Van Griensver (ed.) Balkema Rotterdam.
- Kerrigan, R. W. 2004. Trait diversity in wild *Agaricus bisporus*. Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Romaine, Keil, Rinker y Royse.
- Kerrigan, R. W., P. Callac, J. Guintenbergteau, M. P. Challen, L.A. Parra 2005. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, 97 (1): 12-24.
- Kerrigan, R. W. 2005. *Agaricus* section *Xanthodermatei*: a phylogenetic reconstruction with commentary on taxa. *Mycologia* 97(6): 1292-1315.
- Kush R. S., L. Morgan, E. Becker, M. Wach. 1991. Use of the polymerase chain reaction (PCR) in *Agaricus bisporus* breeding programs. *Genetics and Breeding of Agaricus*. Pudoc: Wageningen.
- Kush, R.S., M. P. Wach, P. A.Horgen. 1995. Molecular strategies for *Agaricus* breeding. En: Kuck(Ed.). *The Mycota II*. Springer Verlag, Berlin.

- Lincoff, G. H. , A. A. Knopf, C. Nehring. 1989. *The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms*. Chanticleer Press Edition.
- Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* 14 (2): 61-74.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal and M. Bonilla. 1997. Germoplasm preservation and genetic improvement of wild *Agaricus* species in México. *Micol. Neotrop. Apl.* 10:21-31.
- Martínez-Carrera, D., M. Bonilla, M. Sobal, A. Aguilar, W. Martínez and Larque –Saavedra. 1999. A Culture collection of edible mushrooms and ITS significance for germoplasm preservation, breeding, and the development of mushroom cultivation in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 4:75-81.
- Martínez-Carrera, D., M. Bonilla, W. Martínez, M. Sobal, A. Aguilar, and E. Pellicer-González. 2001. Characterisation and cultivation of wild *Agaricus* species from México. *Micología Aplicada Internacional* 13 (1): 9-24.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez, Y. Mayett. 2004. Los hongos comestibles, propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El shiitake. Colegio de Posgraduados *Campus Puebla*.
- Martínez-Carrera D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez. 2006. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción consumo de los hongos comestibles *In: El cultivo de Pleurotus en México*. ECOSUR- IE- UNAM-COLPOS, México D. F.
- Mitchell, A. D., A. Bresinsky. 1999. Phylogenetic relationships of *Agaricus* especies based on ITS-2 and 28S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91 (5): 811-819.
- Moore, A. J., M. P. Challen, P. J. Warner, T. J. Elliot. 2001. RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 55: 742-749.
- Moore-Landecker, E. 1990. *Fundamental of the fungi*. Prentice Hall.
- Moreno-Fuentes, A., E. Aguirre-Acosta, M. Villegas, J. Cifuentes. 1994. Estudio fungístico de los macromicetos en el Municipio de Bocoyna, Chihuahua, México. *Re. Mex. Mic:* 10:63-76.
- Nei, S., S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford.

- Oei, P. 2003. *Mushroom cultivation. Appropriate technology for mushroom growers.* Backhuys publishers, Leiden Netherlands. pp.429.
- Perez-Silva, E., M. Esqueda, T. Herrera, M. Coronado. 2006. New records of Agaricales from Sonora, México. *Rev. Mex. Biodiv.* Vol. 7, no. 1.
- Saituo N. M., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schubler A., D. Schwarzott, C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105 (12): 1413-1421.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy.* Koeltz scientific books. Germany.
- Smith, J. F., M. E. Love. 1991. *Identification of environmental requirements for the commercial culture of a tropical Agaricus strain. Science and cultivation of edible fungi.* Maher (ed.) Balkema Rotterdam.
- Solomon, E. P., L. Berg, D.W. Martin. 2001. *Biologia.* Mc Graw Hill.
- Sonnenberg, A. S. M., P. W. J. de Groot, P. J. Schaap, J. J.P. Baars, J. Visser, and L. J. L.. 1996. Isolation of expressed sequence tags of *Agaricus bisporus* and their assignment to chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4542-4547.
- Sonnenberg A. S. M. 2000. *Genetics and breeding of Agaricus bisporus. Science and cultivation of edible fungi.* (ed.) Van Griensven. Balkema Róterdam.
- Stamets, P., J. S. Chilton. 1983. *The mushroom cultivator a practical guide to growing mushrooms.* (ed.) Agarikon
- Stamets, P. 2000. *Growing gourmet and medicinal mushrooms.* Third edition. Berkeley California.
- Stoop, J. M. H., H. Mooibroek. 1999. Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 474-487.
- Villareal, L. y J. Pérez-Moreno,. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micol. Neotrop. Apl.*, 2: 77-114.
- Wessels, J. G. H. 2001. *Fungal physiology. Encyclopedia of life science.* Nature publishing group.

- Wha C. K. 2004 Mushroom Growing for a Living worldwide. Mushroom project in Swaziland. Chapter 2 Mushroom Growers Handbook.
- Whiteford, J. R., C. F. Thurston. 2000. *The molecular genetics of cultivated mushrooms. Advances in microbial physiology.* 42:1-23.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organism. *Science* 163:150-161.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis M. A., D. H. Coelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. PCR protocol. A Guide to methods and applications.* Academi press. Inc.

## 10. Páginas de Internet consultadas

[www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)

[www.expobrazil.com/sp/categorias.php?catId=70ycatdesc=Agaricus%20ycatUp=66](http://www.expobrazil.com/sp/categorias.php?catId=70ycatdesc=Agaricus%20ycatUp=66)

[www.ilmyco.gen.chicago.il.us/.Taxa/Agariplaco6.html](http://www.ilmyco.gen.chicago.il.us/.Taxa/Agariplaco6.html)

[www.Indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.Indexfungorum.org/Names/Names.asp)

[www.indexfungorum.org/Names/Namesrecord.asp?RecordID=254947](http://www.indexfungorum.org/Names/Namesrecord.asp?RecordID=254947)

[www-mcnair.Berkeley.edu/98journal/dsantillano](http://www-mcnair.Berkeley.edu/98journal/dsantillano)

[www.Mykoweb.com/CAF/species/Agaricus\\_diminutivus.html](http://www.Mykoweb.com/CAF/species/Agaricus_diminutivus.html)

[www.mushroomexpert.com/agaricus\\_placomycetes.html](http://www.mushroomexpert.com/agaricus_placomycetes.html)

[www.mushroomexpert.com./agaricus\\_subrufescens.html](http://www.mushroomexpert.com./agaricus_subrufescens.html)

[www.mushroomexpert.com./agaricus\\_subrufescens.html](http://www.mushroomexpert.com./agaricus_subrufescens.html)

[www.valdorba.or/micovaldorba2/setas/agaricus\\_arvensis\\_champiñon\\_bolade\\_nieve\\_larriuso.html](http://www.valdorba.or/micovaldorba2/setas/agaricus_arvensis_champiñon_bolade_nieve_larriuso.html)



## 11. ANEXOS

### ANEXO 1

#### SOLUCIONES Y COMPONENTES DE LOS DIFERENTES BUFFER EMPLEADOS

##### Extracción de ADN

Buffer A: KCL 1M, EDTA 0.5M, 20%, Triton X-100 (Bio-Rad), agua destilada estéril.

Buffer QTB (buffer de equilibrio): 750mM NaCl, 50mM NOPS, Ph 7.0, 15% isopropanol, 0.15 y Triton X-100 (Bio-Rad).

Buffer QC (buffer de lavado): 1.0M NaCl, 50mM MOPS, ph 7.0, 15 % isopropanol.

Buffer QF: 1.25 MNacl, 50mM tris-Cl, ph 8.5, 15% isopropanol.

TE Buffer. 10mM Tris-Cl ph 8.0 (fluka), 1mM EDTA.

##### Cuantificación de ADN (electroforesis)

IX TAE Buffer : Tris 0.04M, Ácido acético 0.02 M, EDTA (Bio-Rad), disodio 0.001M.

ix Loading Buffer Dye: 0.09% bromofenol azul, 0.09% xylene cyanol FF, 60y Glycerol.

ix TE Buffer: 1mm Tris-Cl, ph 8,0; 1.1m M EDTA

##### Amplification de PCR

PCR mastermix : deoxynucleotidos trifosfatos (d ATP, d CTP, d GTP, dTTP) *Taq* DNA polimerasa, PCR agua, PCR buffer (500mM KCL, 100mM tris-HCL-ph 8.4 at 20 grados centigrados, 15mM MgCl, 1mg/ml gelatin)

PCR Purificaciòn

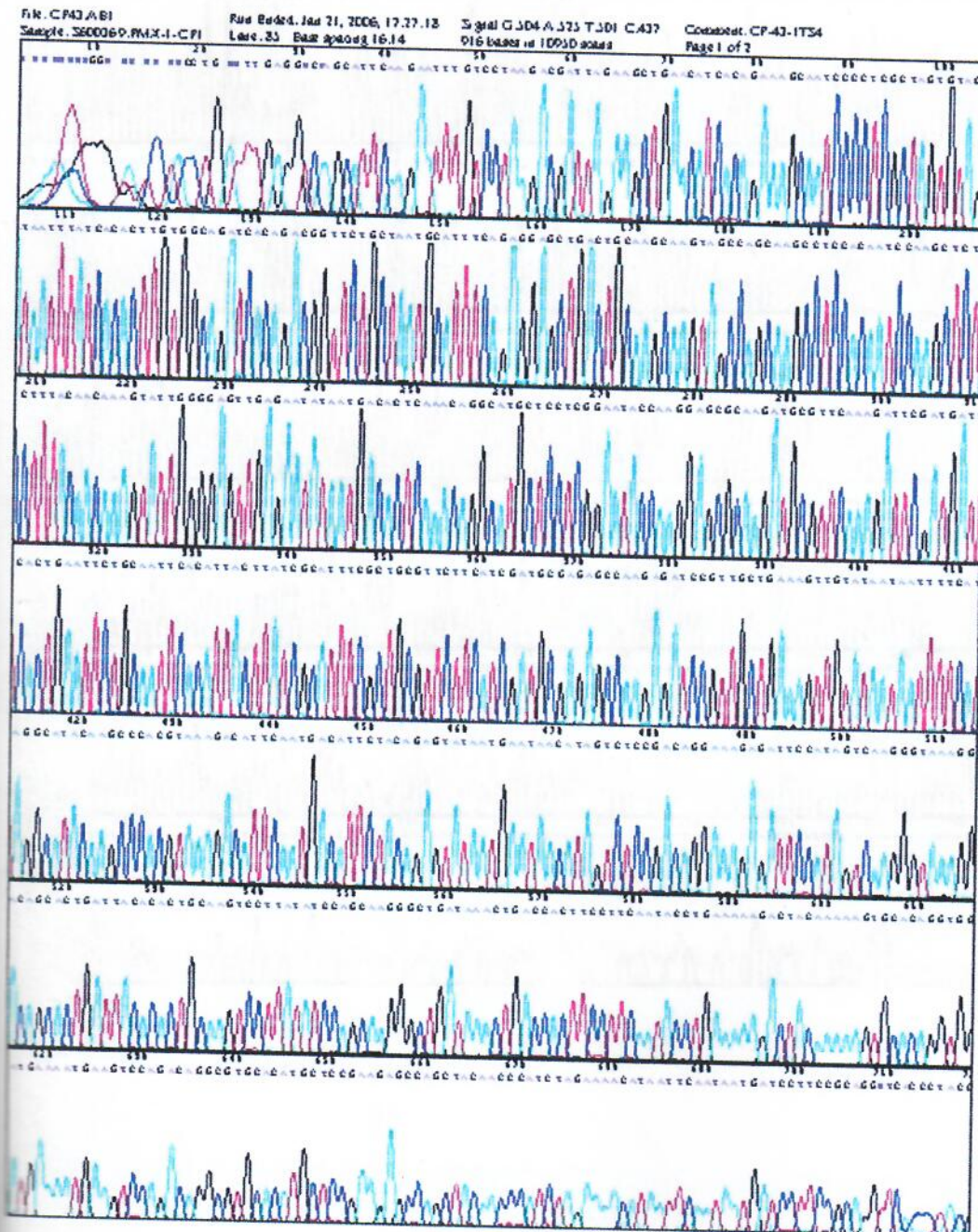
Buffer PB: buffer péptido con guanidina hidrociorada e isopropanol.

Buffer PE: Qiagen derechos reservados de los componentes.

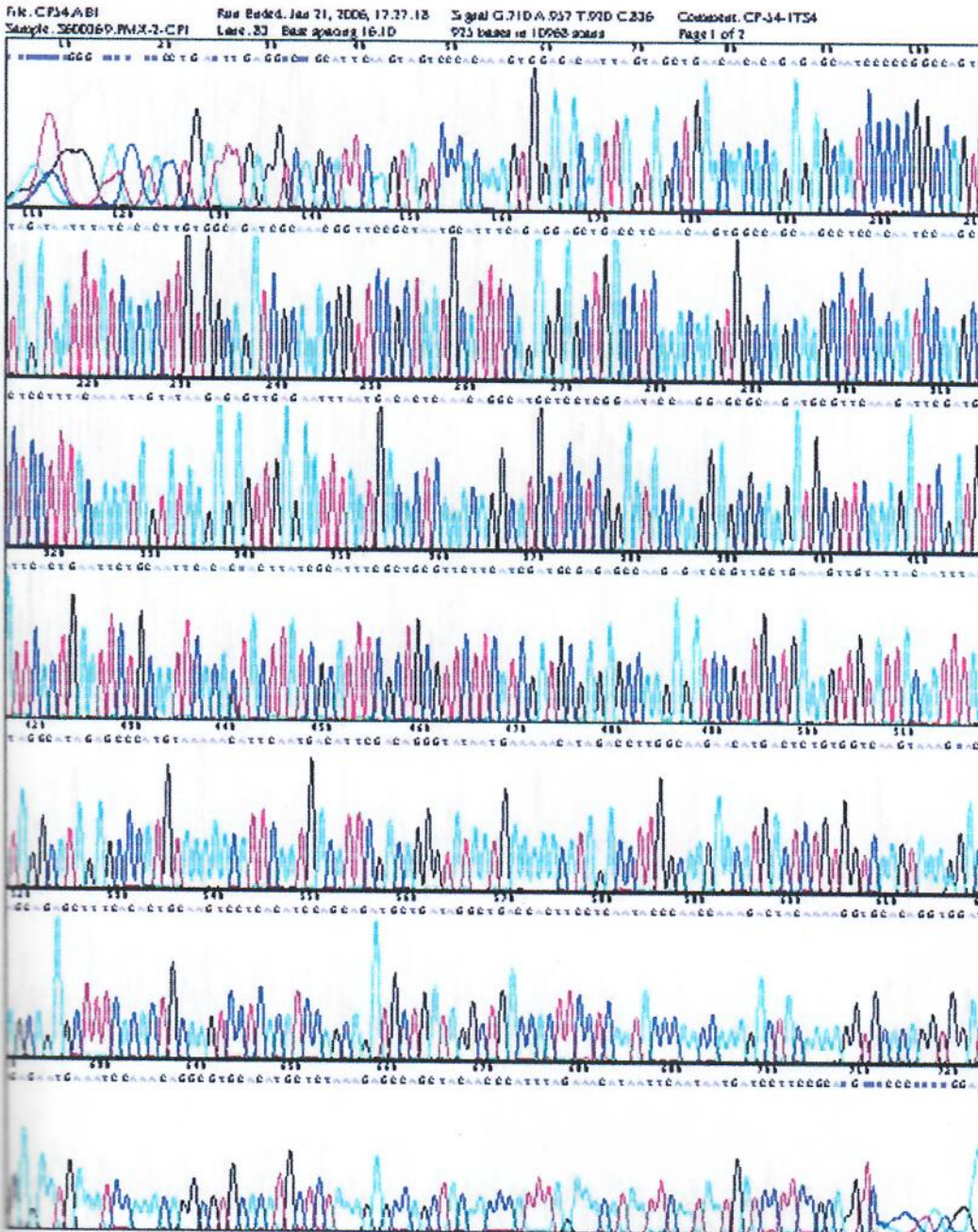
## ANEXO 2

### Cromatogramas de las 10 cepas de estudio.

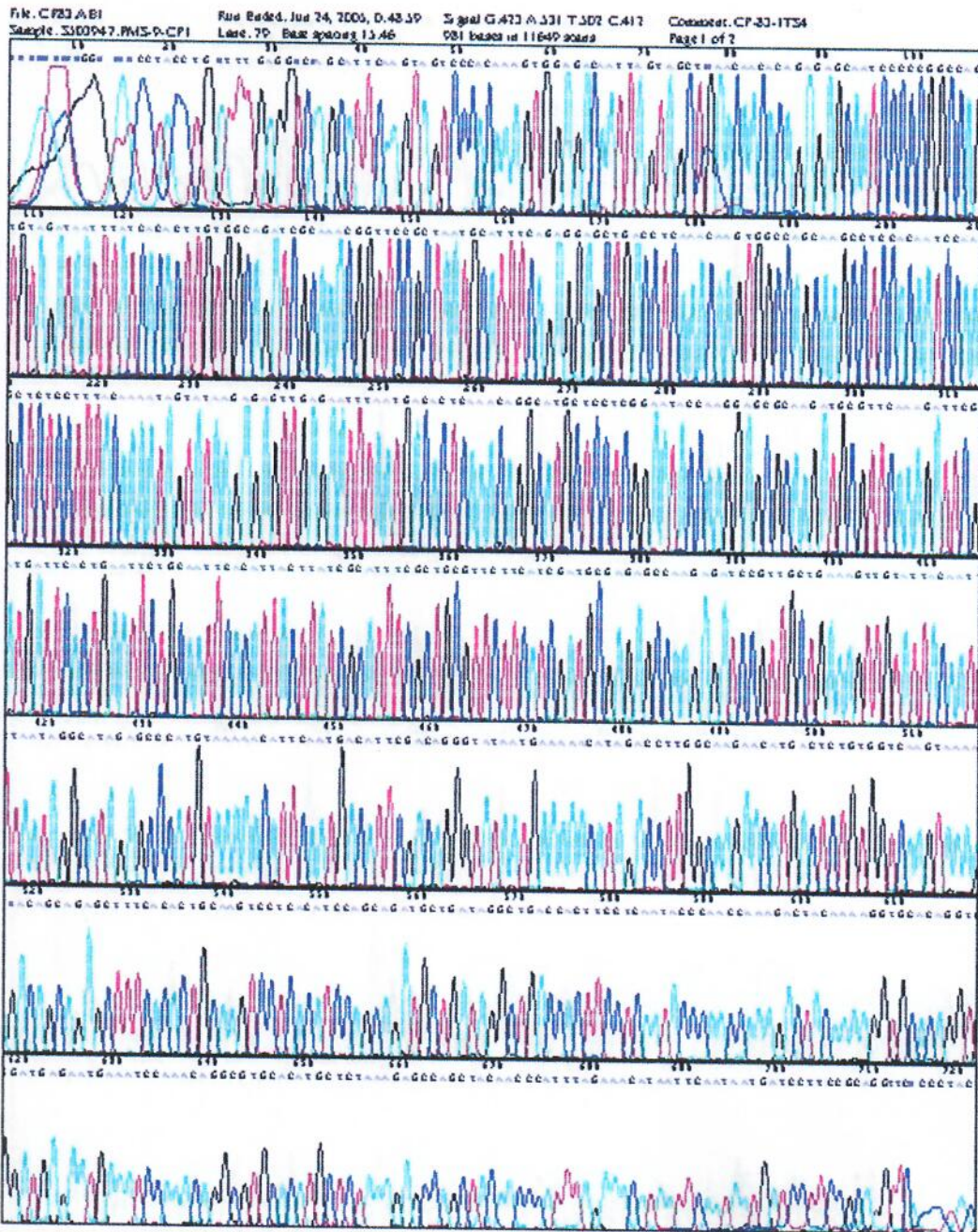
CP-43



CP-54



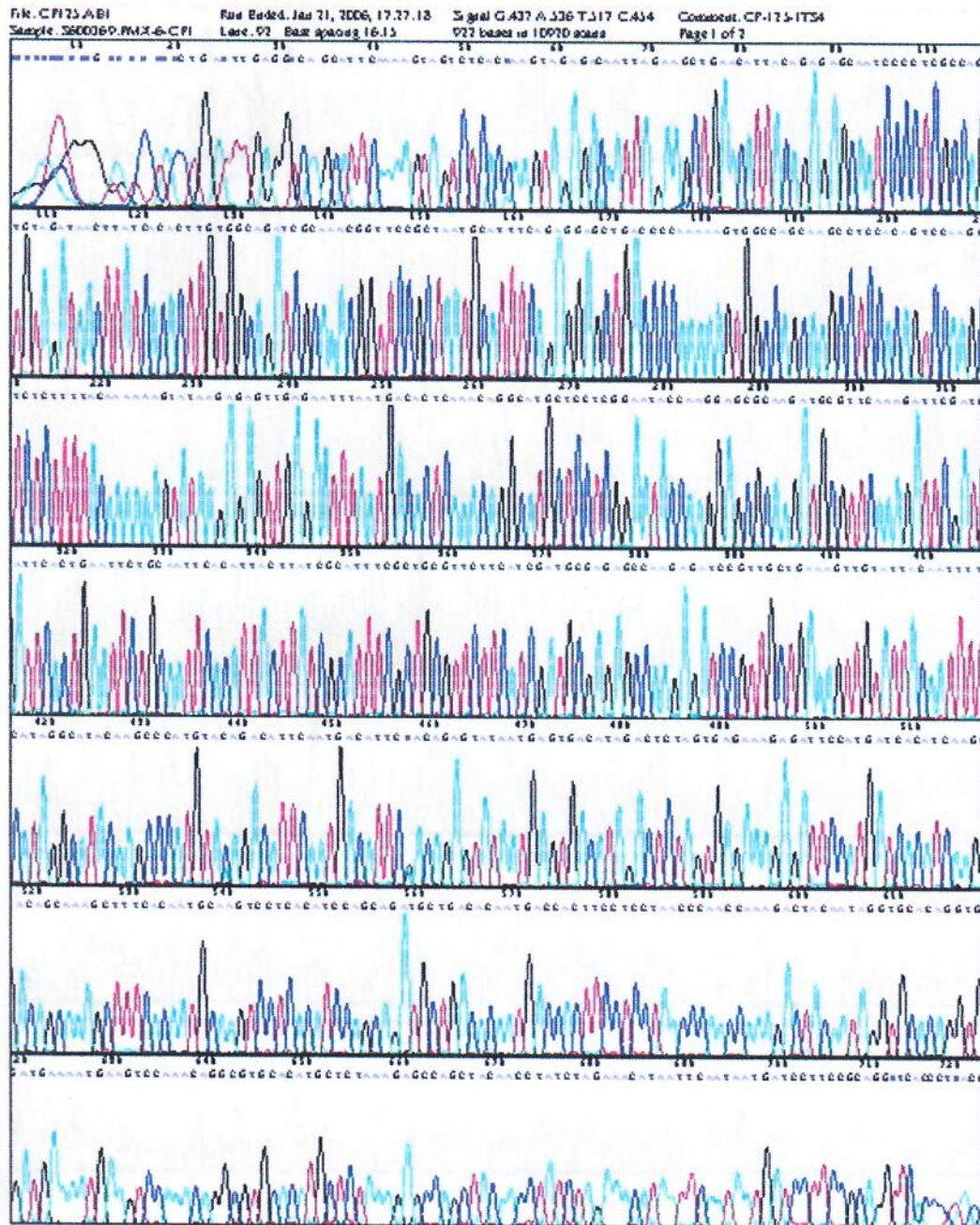
CP-83







CP-125

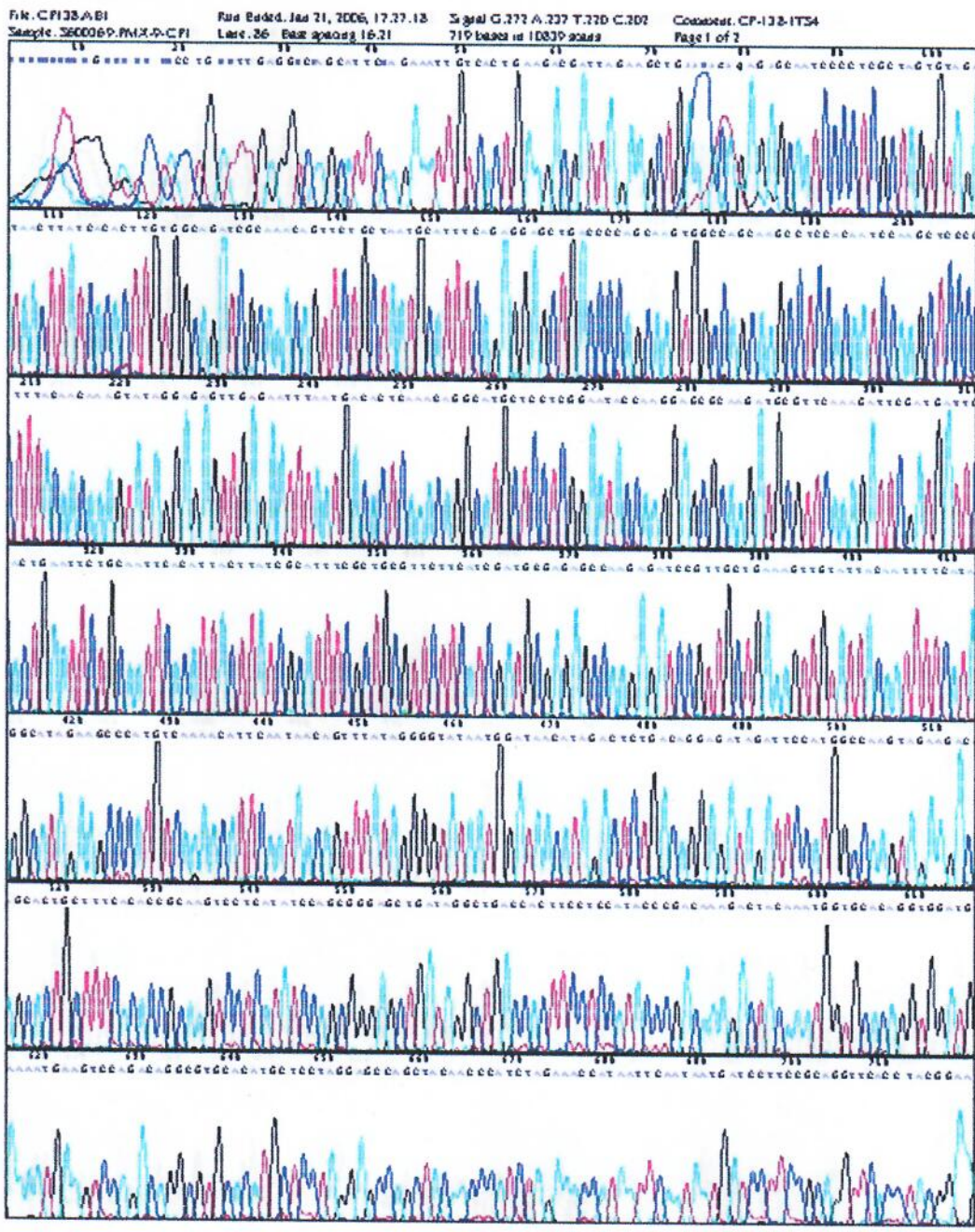








CP-138





### ANEXO 3

## COMPARACIÓN DE CEPAS DEL CP. Y CEPAS DE LA BASE DATOS

### cepa 43

gi|16943643|emb|AJ301620.1|ABI301620 *Agaricus bisporus* 18S rRNA gene  
(partial), 5.8S rRNA gene, 28S  
rRNA gene (partial), ITS 1 and ITS 2, isolate B3  
Length=677

Score = 1114 bits (562), Expect = 0.0  
Identities = 577/582 (99%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|23394892|gb|AF432898.1| *Agaricus bitorquis* strain RWK1462 18S  
ribosomal RNA gene, partial  
sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal  
RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence;  
and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=708

Score = 1106 bits (558), Expect = 0.0  
Identities = 576/582 (98%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|16943642|emb|AJ301619.1|ABI301619 *Agaricus bisporus* 18S rRNA gene  
(partial), 5.8S rRNA gene, 28S  
rRNA gene (partial), ITS 1 and ITS 2, isolate A1  
Length=677

Score = 1106 bits (558), Expect = 0.0  
Identities = 576/582 (98%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|66862759|emb|AJ884648.1| *Agaricus bitorquis* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, specimen voucher  
HAI herbarium 0261  
Length=689

Score = 1106 bits (558), Expect = 0.0  
Identities = 576/582 (98%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|45443788|gb|AY484696.1| *Agaricus bitorquis* strain B91 internal  
transcribed spacer 1,  
partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence  
Length=1258

Score = 1098 bits (554), Expect = 0.0  
Identities = 575/582 (98%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

## **cepa 54**

gi|66862751|emb|AJ884640.1| *Agaricus romagnesii* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 791  
Length=695

Score = 837 bits (422), Expect = 0.0  
Identities = 542/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|66862753|emb|AJ884642.1| *Agaricus maskae* ITS1, 5.8S rRNA gene and  
ITS2, strain 816

Length=693

Score = 829 bits (418), Expect = 0.0

Identities = 541/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|66862770|emb|AJ887993.1| *Agaricus arvensis* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 15

Length=694

Score = 827 bits (417), Expect = 0.0

Identities = 540/579 (93%), Gaps = 2/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

gi|45443765|gb|AY484673.1| *Agaricus abruptibulbus* strain WC771  
internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal  
transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit  
ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1280

Score = 807 bits (407), Expect = 0.0

Identities = 538/580 (92%), Gaps = 2/580 (0%)

Strand=Plus/Plus

gi|45443773|gb|AY484681.1| *Agaricus dimmutivus* strain WC912 internal  
transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence

Length=1291

Score = 856 bits (432), Expect = 0.0  
Identities = 541/576 (93%), Gaps = 2/576 (0%)  
Strand=Plus/Plus

## cepa 83

gi|66862751|emb|AJ884640.1| *Agaricus romagnesii* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 791  
Length=695

Score = 789 bits (398), Expect = 0.0  
Identities = 507/541 (93%), Gaps = 2/541 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|66862753|emb|AJ884642.1| *Agaricus maskae* ITS1, 5.8S rRNA gene and  
ITS2, strain 816  
Length=693

Score = 781 bits (394), Expect = 0.0  
Identities = 506/541 (93%), Gaps = 2/541 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|66862770|emb|AJ887993.1| *Agaricus arvensis* ITS1, 5.8S rRNA gene and  
ITS2, strain 15  
Length=694

Score = 781 bits (394), Expect = 0.0  
Identities = 506/541 (93%), Gaps = 2/541 (0%)  
Strand=Plus/Plus



gi|45443765|gb|AY484673.1| *Agaricus abruptibulbus* strain WC771

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1280

Score = 759 bits (383), Expect = 0.0

Identities = 503/541 (92%), Gaps = 2/541 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|45443773|gb|AY484681.1| *Agaricus diminutivus* strain WC912 internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1291

Score = 809 bits (408), Expect = 0.0

Identities = 506/537 (94%), Gaps = 2/537 (0%)

Strand=Plus/Plus

## cepa 89

>gi|45443765|gb|AY484673.1| *Agaricus abruptibulbus* strain WC771

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1280

Score = 827 bits (417), Expect = 0.0  
Identities = 541/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|66862751|emb|AJ884640.1| *Agaricus romagnesii* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 791  
Length=695

Score = 856 bits (432), Expect = 0.0  
Identities = 545/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|66862753|emb|AJ884642.1| *Agaricus maskae* ITS1, 5.8S rRNA gene and  
ITS2, strain 816  
Length=693

Score = 848 bits (428), Expect = 0.0  
Identities = 544/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|66862770|emb|AJ887993.1| *Agaricus arvensis* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 15  
Length=694

Score = 846 bits (427), Expect = 0.0  
Identities = 543/579 (93%), Gaps = 2/579 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|45443773|gb|AY484681.1| *Agaricus diminutivus* strain WC912 internal  
transcribed spacer  
1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed

spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence

Length=1291

Score = 876 bits (442), Expect = 0.0

Identities = 544/576 (94%), Gaps = 2/576 (0%)

Strand=Plus/Plus

## cepa 123

>gi|45443781|gb|AY484689.1| *Agaricus xanthodermus* strain WC918

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal  
transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence

Length=1332

Score = 973 bits (491), Expect = 0.0

Identities = 558/579 (96%), Gaps = 1/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|52352582|gb|AY703912.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA229 INRA

internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence

Length=653

Score = 963 bits (486), Expect = 0.0

Identities = 559/580 (96%), Gaps = 3/580 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|52352583|gb|AY703913.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA235 INRA  
internal transcribed  
spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence  
Length=653

Score = 967 bits (488), Expect = 0.0  
Identities = 560/580 (96%), Gaps = 3/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Score = 975 bits (492), Expect = 0.0  
Identities = 560/580 (96%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|62870105|gb|AY899264.1| *Agaricus moelleri* strain CA156 INRA  
internal transcribed spacer  
1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;  
and internal transcribed spacer 2, partial sequence  
Length=654

Score = 975 bits (492), Expect = 0.0  
Identities = 560/580 (96%), Gaps = 2/580 (0%)  
Strand=Plus/Plus

## cepa 125

>gi|5353766|gb|AF161013.1|AF161013 *Agaricus blazei* internal

transcribed spacer 1, partial sequence;  
5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal  
transcribed spacer 2, partial sequence  
Length=731

Score = 1118 bits (564), Expect = 0.0  
Identities = 575/579 (99%), Gaps = 0/579 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|45443789|gb|AY484697.1| *Agaricus blazei* strain WC837 internal  
transcribed spacer 1, partial  
sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence  
Length=1284

Score = 1118 bits (564), Expect = 0.0  
Identities = 575/579 (99%), Gaps = 0/579 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|57169105|gb|AY818649.1| *Agaricus rufotegulis* 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  
Length=711

Score = 1126 bits (568), Expect = 0.0  
Identities = 576/579 (99%), Gaps = 0/579 (0%)  
Strand=Plus/Plus

gi|57169106|gb|AY818650.1| *Agaricus brasiliensis* 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

Length=711

Score = 1118 bits (564), Expect = 0.0

Identities = 573/579 (98%), Gaps = 0/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|57169116|gb|AY818660.1| *Agaricus subrufescens* isolate I\_101\_S1 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

Length=711

Score = 1122 bits (566), Expect = 0.0

Identities = 574/579 (99%), Gaps = 0/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

## cepa128

gi|66862751|emb|AJ884640.1| *Agaricus romagnesii* ITS1, 5.8S rRNA gene

and ITS2, strain 791

Length=695

Score = 737 bits (372), Expect = 0.0

Identities = 469/499 (93%), Gaps = 2/499 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|66862753|emb|AJ884642.1| *Agaricus maskae* ITS1, 5.8S rRNA gene and

ITS2, strain 816

Length=693

Score = 737 bits (372), Expect = 0.0

Identities = 469/499 (93%), Gaps = 2/499 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|66862770|emb|AJ887993.1| *Agaricus arvensis* ITS1, 5.8S rRNA gene  
and ITS2, strain 15

Length=694

Score = 741 bits (374), Expect = 0.0

Identities = 471/501 (94%), Gaps = 2/501 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|45443773|gb|AY484681.1| *Agaricus diminutivus* strain WC912 internal  
transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence

Length=1291

Score = 771 bits (389), Expect = 0.0

Identities = 475/502 (94%), Gaps = 2/502 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|62868799|gb|AY943973.1| *Agaricus subrutilescens* isolate RWK1940  
internal transcribed

spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete  
sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Length=714

Score = 714 bits (360), Expect = 0.0

Identities = 470/503 (93%), Gaps = 3/503 (0%)

Strand=Plus/Plus

## cepa130

>gi|66862751|emb|AJ884640.1| *Agaricus romagnesii* ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain 791

Length=695

Score = 866 bits (437), Expect = 0.0

Identities = 546/580 (94%), Gaps = 2/580 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|66862753|emb|AJ884642.1| *Agaricus maskae* ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain 816

Length=693

Score = 858 bits (433), Expect = 0.0

Identities = 545/580 (93%), Gaps = 2/580 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|66862770|emb|AJ887993.1| *Agaricus arvensis* ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain 15

Length=694

Score = 848 bits (428), Expect = 0.0

Identities = 543/579 (93%), Gaps = 2/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|45443773|gb|AY484681.1| *Agaricus diminutivus* strain WC912 internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed



spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence  
Length=1291

Score = 886 bits (447), Expect = 0.0  
Identities = 545/576 (94%), Gaps = 2/576 (0%)  
Strand=Plus/Plus

>gi|62868799|gb|AY943973.1| *Agaricus subrutilescens* isolate RWK1940  
internal transcribed  
spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete  
sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence  
Length=714

Score = 821 bits (414), Expect = 0.0  
Identities = 542/581 (93%), Gaps = 3/581 (0%)  
Strand=Plus/Plus

## **cepa 138**

>gi|45443781|gb|AY484689.1| *Agaricus xanthodermus* strain WC918  
internal transcribed spacer  
1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal  
transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal  
RNA gene, partial sequence  
Length=1332

Score = 957 bits (483), Expect = 0.0

Identities = 550/571 (96%), Gaps = 1/571 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|52352582|gb|AY703912.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA229 INRA

internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed

spacer 2, complete sequence

Length=653

Score = 950 bits (479), Expect = 0.0

Identities = 549/569 (96%), Gaps = 3/569 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|52352583|gb|AY703913.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA235 INRA

internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed

spacer 2, complete sequence

Length=653

Score = 954 bits (481), Expect = 0.0

Identities = 550/569 (96%), Gaps = 3/569 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|62870104|gb|AY899263.1| *Agaricus moelleri* strain CA31 INRA

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;

and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Length=654

Score = 959 bits (484), Expect = 0.0

Identities = 552/572 (96%), Gaps = 2/572 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|62870105|gb|AY899264.1| *Agaricus moelleri* strain CA156 INRA  
internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;  
and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Length=654

Score = 959 bits (484), Expect = 0.0

Identities = 552/572 (96%), Gaps = 2/572 (0%)

Strand=Plus/Plus

## **cepa 237**

>gi|52352582|gb|AY703912.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA229 INRA  
internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence

Length=653

Score = 1110 bits (560), Expect = 0.0

Identities = 574/578 (99%), Gaps = 1/578 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|52352583|gb|AY703913.1| *Agaricus tollocanensis* strain CA235 INRA  
internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed  
spacer 2, complete sequence

Length=653

Score = 1114 bits (562), Expect = 0.0

Identities = 575/578 (99%), Gaps = 1/578 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|62870104|gb|AY899263.1| *Agaricus moelleri* strain CA31 INRA

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;  
and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Length=654

Score = 957 bits (483), Expect = 0.0

Identities = 557/579 (96%), Gaps = 2/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|62870105|gb|AY899264.1| *Agaricus moelleri* strain CA156 INRA

internal transcribed spacer

1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;  
and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Length=654

Score = 957 bits (483), Expect = 0.0

Identities = 557/579 (96%), Gaps = 2/579 (0%)

Strand=Plus/Plus

>gi|2351591|gb|U85308.1|APU85308 *Agaricus pocillator* internal

transcribed spacer 1, partial sequence,

5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal  
transcribed spacer 2, partial sequence

Length=719

Score = 1023 bits (516), Expect = 0.0

Identities = 564/575 (98%), Gaps = 5/575 (0%)

Strand=Plus/Plus

# ANEXO 4. MATRIZ

Phylogeny Summary	AF432898	AF432898	AJ301619	AJ301620	AJ884640	AJ884642	AJ887993	AY484681	AY484689	AY484697	AY703912	AY703913	AY818649	AY899263	AY899264	U85308
CPM64	0.4859															
Neighbor Joining	0.4975															
Outgroup Rooted	0.0052	0.0017														
Tajima's D	0.4874	0.1075														
Systematic correction	0.4877	0.1086														
N/A	0.1114	0.1133														
Best Tree	0.1054	0.1054														
Distributed	0.0814	0.0773														
proportional	0.1052	0.1113														
y	0.0914	0.0872														
Distance Matrix	0.0813	0.087														
	0.1031	0.1092														
	0.0814	0.0773														
	0.0818	0.0776														
	0.0853	0.0813														
	0.0999	0.1013														
	0.0946	0.1015														
	0.1014	0.1075														
	0.0863	0.0821														
	0.0872	0.0871														
	0.1014	0.1014														
	0.1036	0.1097														
	0.1011	0.1072														
	0.1034	0.1096														
	0.4943	0.0089														
	0.5107	0.0689														
	0.4903	0.0052														
	0.1015	0.1077														
	0.1052	0.1113														
	0.1018	0.1079														

CP123	CP125	CP128	CP130	CP138	CP237	CP43	CP54	CP89	CP83	AJ884648	AY484673	AY484696	AY818660	AF161013
0.1081														
0.093	0.0816													
0.0978	0.0815	0												
0	0.1073	0.0942	0.0989											
0.0302	0.1139	0.0972	0.0996	0.0305										
0.0894	0.1139	0.109	0.1141	0.0904	0.0954									
0.1021	0.0856	0.002	0.0035	0.1032	0.1039	0.1163								
0.0996	0.0833	0	0.0017	0.1007	0.1014	0.1138	0.0017							
0.0977	0.0955	0.002	0.0035	0.0988	0.0995	0.1162	0.0035	0.0017						
0.0633	0.1013	0.0969	0.1014	0.0643	0.0993	0.1010	0.1036	0.1011	0.1034					
0.1017	0.0338	0.068	0.0697	0.1028	0.0972	0.1012	0.0718	0.0696	0.0697	0.0889				
0.0852	0.1054	0.0992	0.1055	0.0862	0.087	0.0122	0.1077	0.1052	0.1075	0.0087	0.0929			
0.1085	0.0017	0.0797	0.0799	0.1077	0.1143	0.1143	0.094	0.0817	0.0839	0.1016	0.0321	0.1057		
0.1121	0.0052	0.0639	0.0834	0.1113	0.1179	0.1179	0.0876	0.0852	0.0874	0.1052	0.0356	0.1093	0	
0.1087	0.0017	0.0799	0.08	0.1079	0.1145	0.1145	0.0842	0.0818	0.084	0.1018	0.0322	0.1059	0	0