

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE HONGOS BASIDIOMICETES SILVESTRES

Blanca Estela Gómez-Luna; Gerardo Vázquez-Marrufo; Carlos Hernán Herrera-Méndez;
Alejandro Hernández-Morales y Víctor Olalde-Portugal
Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 131-141.



e-revist@s

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE HONGOS BASIDIOMICETES SILVESTRES

USE OF MOLECULAR MARKERS FOR THE STUDY OF WILD FUNGUS BASIDIOMYCETES

Blanca Estela **Gómez-Luna**¹, Gerardo **Vázquez-Marrufo**², Carlos Hernán **Herrera-Méndez**¹, Alejandro **Hernández-Morales**¹; Víctor **Olalde-Portugal**³.

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad De Guanajuato. Privada de Arteaga s/n Zona Centro. C.P. 38900. Salvatierra, Guanajuato. ²Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán. ³Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Cinvestav-IPN Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte carretera Irapuato-León. Irapuato, Guanajuato.

RESUMEN

Las técnicas de marcadores moleculares en el estudio de basidiomicetos silvestres, son cada vez más aplicadas a proyectos de ecología, con especial enfoque en análisis de la diversidad genética. Con frecuencia se requieren métodos especializados para la extracción del DNA de organismos de ambientes naturales, debido a los complejos compuestos que los constituyen (polímeros de carbohidratos) y los contaminantes del ambiente (partículas de suelo). Los materiales biológicos utilizados fueron basidiocarpos colectados en el bosque de Santa Rosa, Gto., y micelio aislado de estos basidiocarpos. En este trabajo se utilizó un método de extracción de DNA que permitió la amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción y la hibridación Southern por método no radiactivo. Los resultados que se obtuvieron: La amplificación de la región ITS1 de la unidad ribosomal de las diferentes especies de basidiomicetos. Se logró observar la diversidad genética entre las diferentes especies de basidiomicetos y los micelios. Además los resultados también sugieren diferencias en metilación del DNA entre el micelio vegetativo y el micelio del basidiocarpo. Por último cabe mencionar que no se encontraron trabajos previos sobre la aplicación de métodos de hibridación Southern no radiactivos para el análisis de basidiomicetos silvestres, siendo este trabajo pionero en aplicar esta técnica.

Palabras clave: Hongos, RFLP, Southern.

SUMMARY

Molecular marker techniques in the study of wild basidiomycete, are increasingly applied to ecology projects, with special focus on analysis of genetic diversity. Often require specialized methods for extracting the DNA of organisms of natural environments, because of the complex compounds that are (carbohydrate polymers) and contaminants from the environment (soil particles). Biological materials used were basidiocarps collected in the forest of Santa Rosa, Guanajuato. And mycelium isolated from these basidiocarps. In this work we used a DNA extraction method that allowed the PCR amplification, restriction enzyme digestion and Southern hybridization by non-radioactive method. The results were obtained: Amplification of the ITS1 region of ribosomal unit of the different species of Basidiomycetes. It was possible to observe the genetic diversity among different species of basidiomycetes and the mycelia. Furthermore, the results also suggest differences in DNA methylation between the vegetative mycelium and mycelium of basidiocarpo. Finally it is noteworthy that there were no previous work on the application of methods of non-radioactive Southern hybridization for analysis of wild Basidiomycetes and this pioneering work in applying this technique.

Key words: Fungus, RFLP, Southern.

INTRODUCCIÓN

Los hongos forman parte integral de los diferentes tipos de vegetación en los bosques templados y tropicales, participan en procesos de reciclaje de nutrientes y descomposición de la materia orgánica. Debido a que los hongos carecen de clorofila, su nutrición depende de otros organismos y de acuerdo con la clase de sustancias orgánicas que aprovechen pueden ser, entre otros: saprobios, parásitos o simbioses. Por esto los hongos son muy versátiles y su hábitat es muy amplio y diversificado (Herrera y Ulloa, 1998).

La identificación del micelio vegetativo de macromicetos silvestres aislados de suelo u de otros sustratos presenta algunas dificultades (Rogers y col., 1989) por: i) las características morfológicas y estructurales de los micelios de hongos ectomicorrícicos (EM) no varían grandemente, ii) varias especies de simbioses EM no pueden ser aislados en cultivo puro y iii) muy pocos hongos EM

forman cuerpos fructíferos en cultivo puro. Los estudios por PCR han sido evaluados para la identificación de hongos EM. Esta es una valiosa herramienta en el estudio de evolución molecular y biología poblacional.

La identificación del micelio vegetativo los macromicetos silvestres aislados de suelo u otros sustratos presenta algunas dificultades (Rogers *et al.*, 1989) por: i) las características morfológicas y estructurales de los micelios de hongos ectomicorrícicos (EM) no varían grandemente, ii) varias especies de simbiontes EM no pueden ser aislados en cultivo puro y iii) muy pocos hongos EM forman cuerpos fructíferos en cultivo puro. Los estudios por PCR han sido evaluados para la identificación de hongos EM. El método permite la amplificación de secuencias blanco de DNA. Esta es una valiosa herramienta en el estudio de evolución molecular y biología poblacional.

La generación de huellas moleculares a partir del DNA de hongos (Rosewich y McDonald, 1994), y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre el taxa coprinoides y otras relacionadas se han basado en los sitios de restricción en los productos de amplificación de la región ITS (Hopple *et al.*, 1994). Se han realizado análisis RFLPs utilizando la región IGS de la Unidad Ribosomal en cultivos del hongo Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae* (Iracabal y Labarére, 1994). El análisis RFLPs de distintas regiones de la UR se ha aplicado en estudios de sistemática molecular del género *Pleurotus* (Iracabal *et al.*, 1995). Los RFLPs se han aplicado en la identificación de hongos EM con el objetivo de conocer la persistencia y distribución de los hongos EM en ecosistemas de bosque (Armstrong *et al.*, 1989). En la identificación y abundancia de *Tylospora fibrillosa*, hongo EM, en una zona forestal (Erland, 1995). Por último, en trabajos de diversidad genética en poblaciones de *Uncinaria necator*, comparando aproximaciones basadas en RFLPs y PCR (Stumer, 2000); diversidad de hongos en suelo por RFLPs - PCR de la región ITS (Viaud, 2000) e identificación de especies por patrones de RFLPs de *Flammulina* y determinación de patrones biogeográficos entre especies (Methven, 2000). Otra aplicación del RFLPs al estudio de macromicetos es en la detección de los niveles de metilación de residuos de citosina del DNA en *Coprinus cinereus* después de la replicación meiótica (Zolan y Pukkila 1986).

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis genético molecular comparativo en micelio vegetativo y tejido del basidiocarpo de diferentes especies de macromicetos silvestres a partir de especímenes colectados en la sierra de Santa Rosa, Gto., por marcadores moleculares e hibridación Southern no radiactivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizan entre 50 y 500 mg de peso húmedo de muestra, tanto micelio vegetativo como fragmentos de himenio del basidiocarpo, de los hongos silvestres de la colección del Laboratorio de Micología Básica de la Universidad de Guanajuato y del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV- IPN U. Irapuato.

Producción de biomasa del micelio vegetativo

Para la obtención de suficiente biomasa de los micelios aislados se resiembran tomando de la orilla de la colonia y se inoculan en emplean en medio PDB. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml a los cuales se les agregaron 25 ml de medio líquido PDB estéril. Con la ayuda de un sacabocados metálico de 0.5 cm de diámetro, se colocan en cada matraz 5 cilindros con inóculo de los micelios provenientes de un precultivo en PDA, todo esto en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Los matraces así inoculados se incuban en una cámara oscura a 24°C y 180 rpm por 8 días dependiendo de la cepa con el fin de obtener el mayor crecimiento de todos los micelios. Después de este tiempo se procede a filtrar al vacío los

micelios con un embudo de Buchner de porcelana y papel filtro (Whatman No. 41), el micelio se desprende del papel con una microespátula limpiada con etanol al 70% y se coloca en una bolsita de plástico etiquetada con el código del micelio, enseguida se coloca en un termo con N₂ líquido para congelarlo. Los micelios se almacenan en un ultracongelador Revco a -70°C para preservar el DNA íntegro en el momento que se requiera su extracción.

Aislamiento de DNA

Extracción del DNA, el tejido se congelo con N₂ líquido y se macero en un mortero. Se agregaron 500 µl de regulador de extracción: TrisHCl pH 8.5, 100 mM, SDS al 2%, EDTA 50 mM pH 8.5 y NaCl 50 mM. Se agregó 500 µl de cloroformo. Se centrifugaron 10 min a 12,000 rpm. Se agregó Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:24:1). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 min, y se precipito el DNA con isopropanol frío.

Digestión del DNA total RFLP

La digestión del DNA se realizó con las enzimas, *Msp* I y *Hpa* II para carpóforo y micelio. Se utilizaron 10 µl de DNA con 1U de enzima y su regulador a un volumen final de 20 µl. Se incubo toda la noche a 37°C.

Obtención de sonda de hibridación

Southern no radioactivo

Para la hibridación se incubo la membrana (con el DNA previamente transferido) durante una noche con la sonda de DNA a 65°C. Para la detección, se sumergio la membrana en Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M. Se bloqueó la membrana en Tris – HCl pH 7.5 0.1 M, NaCl 0.15M, agente bloqueador al 0.5%. Se incubo por 1 h y se colocó en Tri-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M, agente bloqueador al 0.5% y anticuerpo conjugado Antifluoresceína-HRP 1/1000 (v/v). Se incubo 1 h. Se mezcló con volúmenes iguales del kit Enhanced Luminol Nucleic Acid Chemiluminescence Reagent. Se colocó la membrana en un “cassette” de exposición y sobre ella una película de rayos X.

Para la amplificación de DNA diferentes se utilizaron los oligonucleotidos descritos por White *et al.* (1990), ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3', la mezcla para PCR fue de 15 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8.3, 200 µl de MgCl₂, 1 µl de cada uno de los oligonucleotidos y 0.5 U de enzima *Taq* polimerasa. Se utilizaron 25 ng del DNA de *Amanita rubescens* para la sonda de hibridación. El programa fue: 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 45 s, 52°C 1 min 30 s, 72°C 2 min y 72°C 7min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biodiversidad es el resultado de un proceso evolutivo que se manifiesta en los diferentes modos de vida a lo largo de toda la escala de organización de los seres vivos. Así, podemos observar y estudiar una biodiversidad morfológica, fisiológica, bioquímica y genética, en los macromicetos silvestres de la sierra de Santa Rosa, Gto. Dado el gran número de funciones que los hongos desempeñan en las áreas naturales terrestres, particularmente en los bosques templados, el estudio de marcadores genéticos de macromicetos silvestres puede contribuir de una manera sustancial al conocimiento de la dinámica de un ecosistema forestal y de la respuesta de este a factores de perturbación ambiental, ayudando así en proyectos de conservación y restauración de áreas de importancia ecológica, como lo es el bosque de Santa Rosa, en el estado de Guanajuato.

El uso de técnicas de marcaje y detección de fragmentos de DNA sin utilización de radiactividad ha ido estableciéndose de manera cada vez más sólida en los laboratorios de Biología Molecular. Este

tipo de técnicas han ido progresando de tal forma que en la actualidad algunas de ellas poseen una sensibilidad semejante a la detección por medio de radiactividad. Así, se han desarrollado técnicas para la cuantificación de productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando biotina (Atamas y White, 1997) al igual que se han descrito métodos de fotoimmunodetección para el marcaje y detección de fragmentos de DNA con sensibilidades menores a un picogramo en regiones homólogas (Marvik *et al.*, 1997). De la misma forma, el marcaje no radiactivo ha sido aplicado para realizar ensayos de RT-PCR in situ, utilizando iniciadores marcados con fluoresceína (Stein *et al.*, 1997). Además de su gran sensibilidad, muchos de estos métodos son de rápido desarrollo y la gran mayoría resultan más económicos que el marcaje radiactivo. Otras ventajas adicionales de los métodos que no emplean radiactividad para el marcaje y detección de DNA son el menor una mayor facilidad de ejecución y el menor riesgo para el experimentador y los ecosistemas. En el caso particular de los hongos Basidiomycetes la aplicación de técnicas no radiactivas para el estudio de ácidos nucleicos es prácticamente inexistente. En uno de estos escasos estudios se han utilizado sondas de DNA marcadas con biotina para la discriminación de aislados fértiles (heterocariontes) e infértiles (homocariontes) del hongo comestible cultivable *Agaricus bisporus* (Sonnenberg y Zandt-Linders, 1992), conocido popularmente como champiñón.

Al amplificar la región ITS1 se observó un solo producto de amplificación el cual presentó un tamaño 290 de pb para *Amanita rubescens*, el producto de amplificación se utilizó como sonda de hibridación. La sonda del fragmento ITS1 de *A. rubescens* dio una buena definición de los patrones de restricción en los basidiocarpos. Se encuentran claras diferencias entre los tamaños de las bandas generadas para las distintas especies, indicando que la localización de los sitios de corte para las enzimas probadas varió de una especie a otra. En la mayoría de los hongos estudiados se observan bandas de hibridación de carpóforos arriba de las 500 pb, indicando que no existen sitios de corte para las enzimas estudiadas dentro de la región ITS1 de los hongos estudiados. Al comparar los datos de restricción en basidiocarpos con las enzimas *Msp* I y *Hpa* II no se observaron diferencias en los patrones de digestión de los especímenes estudiados, particularmente cuando se utiliza la sonda ITS1 de *A. rubescens*.

Trabajos previos en el estudio de metilación de hongos, particularmente en los casos donde se analizan Basidiomycetes, han utilizado cromatografía de capa fina de DNA marcado con fósforo radiactivo (Antequera y col, 1984), visualización de dobles digestiones de DNA directamente en geles de agarosa (Wilke y Wach, 1993), hibridación tipo Southern con sondas marcadas con fósforo radiactivo (Zolan y Pukkila, 1986; Li y Horgen, 1993) y recientemente la cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC, Binz y col., 1998).

El uso de los genes de la región UR o DNAr de mitocondria en hongos, amplificados por PCR, nos permite hacer estudios de comparaciones de evolución, filogenia, estudios ecológicos (como puede ser la dinámica de poblaciones), detección de polimorfismos para la generación de huellas moleculares y comparaciones en bancos de datos para fines taxonómicos.

No obstante que a la fecha existe una gran cantidad de información respecto al proceso de metilación del DNA en organismos procariotes, los posibles papeles fisiológicos de tal fenómeno en eucariotes en general y en los hongos en particular, aun no es del todo clara. La información al respecto de los niveles de metilación en hongos de la subdivisión Basidiomycotina es particularmente escasa y los resultados, en algunos casos, contradictorios. En este trabajo se estudió la posibilidad de encontrar 5mC dentro de la región ITS1 de macromicetos silvestres debido a que hasta ahora es la única base significativamente metilada encontrada en hongos (Wilke y Wach, 1993) y para esto se escogieron las enzimas isosquisomeras *Msp* I y *Hpa* II que tienen como blanco la secuencia CCGG diferenciando entre 5mC interna o externa (Doerfler, 1983).

En estudios iniciales de DNA total Antequera *et al.*, (1984) concluyen que los niveles de 5 metil citosina son bajos o inexistentes en *Schizophyllum commune*, al igual que en la mayoría de Deuteromycetes y Ascomycetes estudiados, sin embargo, encuentran que dichos niveles son más significativos en el zigomycete *Phycomyces blakesleeanus*. En contraste, recientemente Binz y col. (1998) concluyen que *Agaricus bisporus* y *Armillaria bulbosa* se encuentran entre los hongos con mayores niveles de 5 metil citosina en DNA total, por encima de los Ascomycetes. Aunque Wilke y Wach (1993) no realizan determinaciones sobre los niveles de metilación de DNA total de *A. bisporus*, estos mencionan que existen ciertos niveles de 5 metil citosina. Por otra parte, cuando se estudian zonas definidas del DNA de Basidiomycetes, los resultados muestran diversos niveles de metilación. En *Coprinus cinereus* se han encontrado niveles significativos de metilación en regiones relacionadas con el centrómero de los cromosomas (Zolan y Pukkila, 1986). En el caso concreto de regiones de DNA relacionadas con la Unidad Ribosomal, se ha encontrado que *Schizophyllum commune* tiene niveles significativos de metilación y que el patrón varía entre distintas cepas (Specht *et al.*, 1982), mientras que no hay evidencia de metilación de citosina en los genes de rRNA mitocondrial de *A. bisporus* (Jin y Horgen, 1992). En el caso del hongo ascomycete *Neurospora crassa* se ha encontrado que la 5 metil citosina está presente principalmente dentro de las regiones interespaciadoras que no se transcriben (Perkins *et al.*, 1986), en contraste a lo observado en *P. blakesleeanus*, en el cual no hay niveles significativos de metilación dentro de la UR. El resultado obtenido para los tejidos de los basidiocarpos estudiados en el presente trabajo muestran que no existen diferencias en el patrón de bandeo cuando se comparan los autorradiogramas de las digestiones de DNA con MspI y HpaII, particularmente al utilizar la sonda ITS1 de *A. rubescens*. Solo en el caso de las muestras 1399 y POG1 parecen modificarse el tamaño de las bandas obtenidas. La mayoría de las regiones ITS1 caracterizadas a la fecha en hongos no excede los 450 pb, presentando un tamaño promedio de 250 pb. Por lo anterior, y debido al tamaño aproximado de las bandas obtenidas en los ensayos de hibridación Southern, es posible suponer que la región ITS1 del micelio de los basidiocarpos de los basidiomycetes silvestres aquí estudiados presenta niveles de 5 metil citosina muy bajos o inexistentes. Al analizar de manera combinada el tamaño de las bandas obtenidas en micelio vegetativo y basidiocarpo para aquellas muestras con las cuales se pudo trabajar con los dos tipos miceliares los resultados son interesantes. El patrón de bandeo del micelio vegetativo de las muestras POG1 con la sonda ITS1 de *I. geophylla* da una banda de aproximadamente 4.2 kb y otra de 800 pb que también aparece con las otras dos sondas ITS1 utilizadas. Dichas bandas no se encuentran presentes cuando se analiza el basidiocarpo, particularmente en los resultados encontrados con la sonda de ITS1 de *A. rubescens*. De la misma forma, los patrones de bandeo de los micelios vegetativos de las muestras 1899, LAC y J, difieren de los patrones encontrados para sus respectivos basidiocarpos. Lo anterior indica que los patrones de metilación entre los tipos miceliares analizados difieren para una misma especie. Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo en el que se estudian los patrones de metilación de basidiocarpos de macromicetos silvestres y se comparan los datos con los patrones de metilación del micelio vegetativo.

A la fecha no se conoce si la presión de las condiciones ambientales tiene alguna influencia sobre los niveles de metilación, aunque se ha reportado la pérdida de sitios de metilación después de prolongados subcultivos y almacenamiento a 4°C del micelio vegetativo de hongos utilizados como modelo de estudio (Zolan y Pukkila, 1986). En otro trabajo se menciona que, en general, no hay relación entre la degeneración de cepas y el aumento o disminución de la metilación, que podría encontrarse en el hongo comercial *A. bisporus*, pero que la metilación del DNA ha sido reportada como un proceso de mutagenésis que pudieran ser por una metilación de novo y transmitirse por meiosis (Zolan y Pukkila, 1986; Binz *et al.*, 1998).

Aunque en este estudio no se estimó el número de copias detectadas en cada una de las muestras analizadas, es posible que la intensidad de las bandas encontradas tenga relación con el número de

copias existentes en cada una de las muestras de basidiocarpo y micelio vegetativo, el cual puede diferir de una muestra a otra. Afortunadamente las membranas utilizadas en este trabajo pueden ser regeneradas e hibridadas de nuevo con las mismas sondas o con otras sondas de interés dentro y fuera de la Unidad Ribosomal. De esta forma es posible optimizar el método de hibridación aquí montado y contestar algunas de las interrogantes surgidas con la presente aportación. Permitirá tener una mejor idea de los cambios en la composición de especies fúngicas ocasionados por diferentes alteraciones en la estructura y función del bosque. Para el estudio de estos cambios será necesario contar con un banco sondas de prueba y marcadores genéticos de los diferentes grupos de hongos, particularmente de las variedades silvestres locales.

CONCLUSIONES

El método de marcaje e hibridación tipo Southern sin utilización de sondas radiactivas permite la detección de polimorfismos genéticos relacionados con la metilación del DNA de macromicetos silvestres.

Los resultados de hibridación encontrados en el micelio vegetativo y el micelo de los tejidos del basidiocarpo indicaron que existen diferencias en los niveles de metilación del DNA entre estos dos tipos miceliares, en las especies estudiadas. Pero no en los patrones de metilación.

LITERATURA CITADA

- Antequera, F.; Tamame M.; Villanueva J. R. y Santos T. 1984. **DNA Methylation in the Fungi**. The Journal of Biological Chemistry. 259 (13): 8033-8036.
- Armstrong, J. L.; Fowles, N. L. y Rygiewicz, P. T. 1989. **Restriction length polymorphisms distinguish ectomycorrhizal fungi**. Plant and Soil. 116: 1-7.
- Atamas, S. P. y White, B. 1997. **Nonradioactive method for quantitation of PCR products without hybridization with a specific probe**. BioTechniques. 22: 20- 22.
- Binz, T.; D'Mello, N. y Horgen, P. A. 1998. **A comparison of DNA methylation levels in selected isolates of higher fungi**. Mycologia. 90 (5):785-790.
- Doerfler, W. 1983. **DNA Methylation and Gene Activity**. Ann. Rev. Biochem. 52: 93-124.
- Erland, S. 1995. **Abundance of *Tylospora fibrillosa* ectomycorrhizas in a South Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of PCR-amplified rDNA ITS region**. Mycol. Res. 99(12): 1425-1428.
- Herrera T. y Ulloa M. 1998. **El Reino de los Hongos**. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 364 – 433.
- Hopple, J. S. Jr. y Vilgalys, R. 1994. **Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA**. Mycologia. 86(1): 96-107.
- Iracabal, B.; Zervakis, G. y Labarère, J. 1995. **Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA**. Microbiology. 141:1479-1490.
- Jin , T. y Horgen, P. A. 1992. **Further characterization of a large inverted repeat in the mitochondrial genomes of *Agaricus bisporus* (*A. brunnescens*) and related species**. Curr. Genet. 23: 228-233.
- Marvik, O. J.; Isaksen, M. L.; Roza, L. y Lindqvist, B. H. 1997. **Photoimmunodetection: a nonradioactive labeling and detection method for DNA**. BioTechniques. 23: 892-896.
- Methven, A.; Hughes, K. W. y Petersen, R. H. 2000. ***Flammulina* RFLP patterns identify species and show biogeographical patterns within species**. Mycologia. 92(6): 1064-1070.
- Perkins, D. D.; Metzenberg, R. L.; Raju, N. B.; Selker, E. U. y Barry, E. G. 1986. **Reversal of a *Neurospora crassa* translocation by crossing over involving displayed rDNA, and methylation of the rDNA segments that result from recombination**. Genetics. 114: 791- 817.
- Rogers, S. O.; Rehner S.; Bledsoe, C.; Mueller, G. J. y Ammirati, J. F. 1989. **Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations**. Can. J. Bot. 67: 1235-1243.
- Rosewich, U. L. y McDonald, B. A. 1994. **DNA fingerprinting in Fungi**. Methods in Molecular and Cellular Biology. 5:41-48.
- Sonnenberg , A. S. M. y Zandt-Linders, J. W. C. 1992. **The use of a nonradioactive nucleic acid detection system in the breeding of mushrooms**. Focus. 14: 62- 64.

- Specht, C. A., Novotny, C. P. y Ullrich, R. C. 1982. **Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune***. *Curr. Genet.* 8: 219-222.
- Stein, U.; Walther, W.; Wendt, J. y Scild, T. A. 1997. **In situ RT-PCR using fluorescence –labeled primers**. *BioTechniques.* 23: 194-198.
- Stummer, B. E.; Zanker, T.; Scott, E. S. y Whisson, D. L. 2000. **Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR-based approaches**. *Mycol. Res.* 104(1): 44-52.
- Viaud, M., Pasquier, A. y Brygoo, Y. 2000. **Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS**. *Mycol. Res.* 104(9): 1027-1032.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. M. A. Inns, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds). Academic Press. San Diego California. USA. 315-322.
- Wilke, N. W. y Wach, M. P. 1993. **Detection of Methylated Mushroom DNA by Restriction Enzyme Analysis**. *Mycologia.* 85(4): 585-591.
- Zolan, M. E. y Pukkila, P. J. 1986. **Inheritance of DNA Methylation in *Coprinus cinereus***. *Molecular and Cellular Biology.* Jan:195-200.

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. bgomezl2000@yahoo.com.

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo

Profesor-Investigado Titular de Tiempo Completo. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Alejandro Hernández Morales

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Víctor Olalde Portugal

Investigador Titular. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

ANEXOS

| ENZIMA | SONDA ITS1 | MUESTRA | PM (pb) | |
|--------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| <i>Msp I</i> | <i>A. rubescens</i> | GR57-2 | 500 | |
| | | AR | 300 | |
| | | LAC | 750 | |
| | | J | 750 | |
| | | GR57-2 | 500, 750 | |
| | | POG1 | 800, 1500, 1900, 4200 | |
| | | 1899 | 750, 1500 | |
| | | 3599 | 800, 1500 | |
| | | 3799 | 300 | |
| | | 4099 | 400 | |
| | | 6799 | 800, 1900 | |
| | | <i>Trichoderma sp.</i> | GR57-2 | 500, 750 |
| | | | POG1 | 800 |
| | | | | |
| | | <i>Hpa II</i> | <i>A. rubescens</i> | GR57-2 |
| POG1 | 800 | | | |
| 1899 | 750 | | | |
| 3599 | 800 | | | |
| 6799 | 800 | | | |
| <i>I. geophyla</i> | GR57-2 | | | 500, 750 |
| | POG1 | | | 800 |
| | 1899 | | | 750 |
| | 3599 | | | 800 |
| | 6799 | | 800 | |
| | <i>Trichoderma sp.</i> | | AC | 300 |
| | | | AR | 300 |
| | | | LAC | 300 |
| | | | J | 300 |
| GR57-2 | | | 500, 750 | |
| POG1 | | | 800 | |
| 1899 | | | 750 | |
| 3599 | | | 800 | |
| 3799 | | 300 | | |
| 4099 | 400 | | | |
| 6799 | 800 | | | |

Tabla 1. Micelios patrones de restricción e hibridación “Southern”.

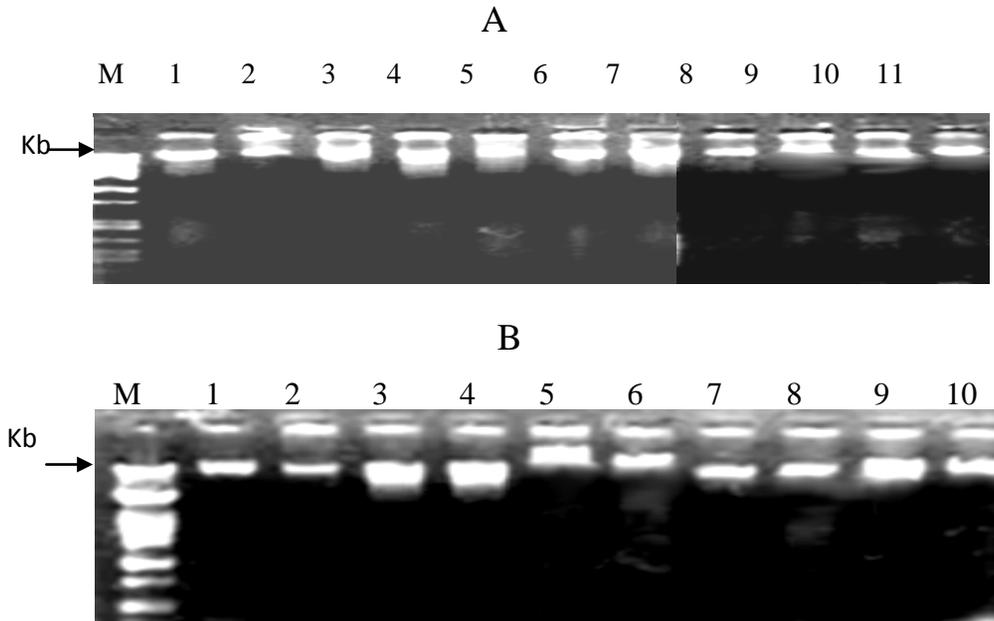


Figura 1. Gel de agarosa al 1% con Br-Et que muestra DNA de basidiocarpos (A) y micelio vegetativo (B) de las especies estudiadas. M marcador λ /Pst.

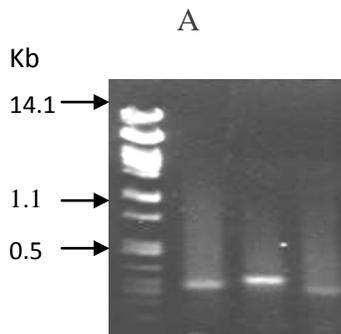


Figura 13. A) Productos de amplificación por PCR de la región ITS 1 de basidiocarpos utilizados como sondas, carriles 1) *Amanita rubescens*, 2) *Trichoderma sp.* y 3) *I. geophyla*. Geles de agarosa al 1% (w/v) con bromuro de etidio, M marcador de peso molecular λ /I.

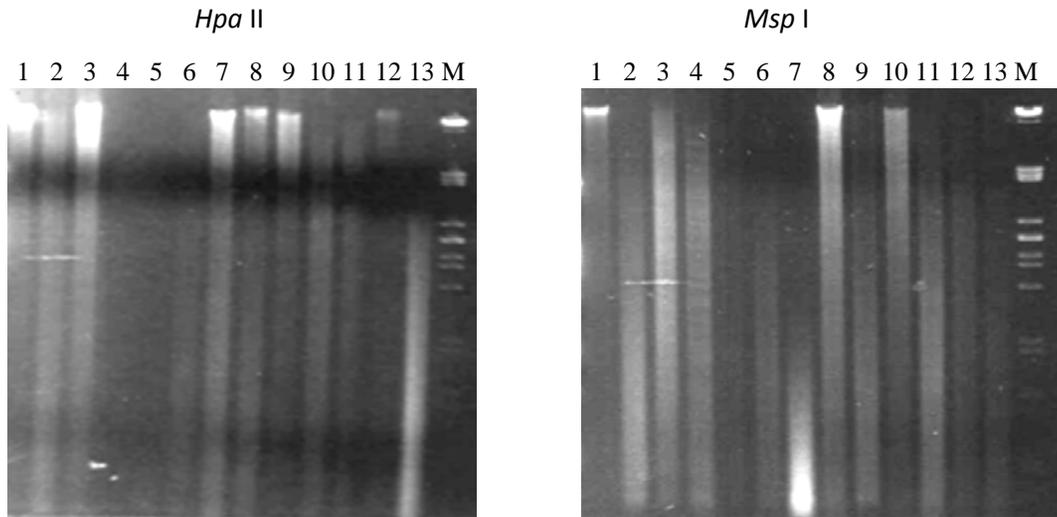


Figura 14. Productos de digestión del DNA aislado de basidiocarpos de macromicetos silvestres. Gel de agarosa 1% (w/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: *Hpa* II 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) Libre, 5) 16, 6) POG1, 7) 0799, 8) 0999, 9) 1199, 10) 1399, 11) 1899, 12) 5099, 13) 9099. *Msp* I 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) 44244, 5) 16, 6) POG1, 7) 9099, 8) 0799, 9) 0999, 10) 1199, 11) 1399, 12) 1899. M marcador de peso molecular \square /Pst I.

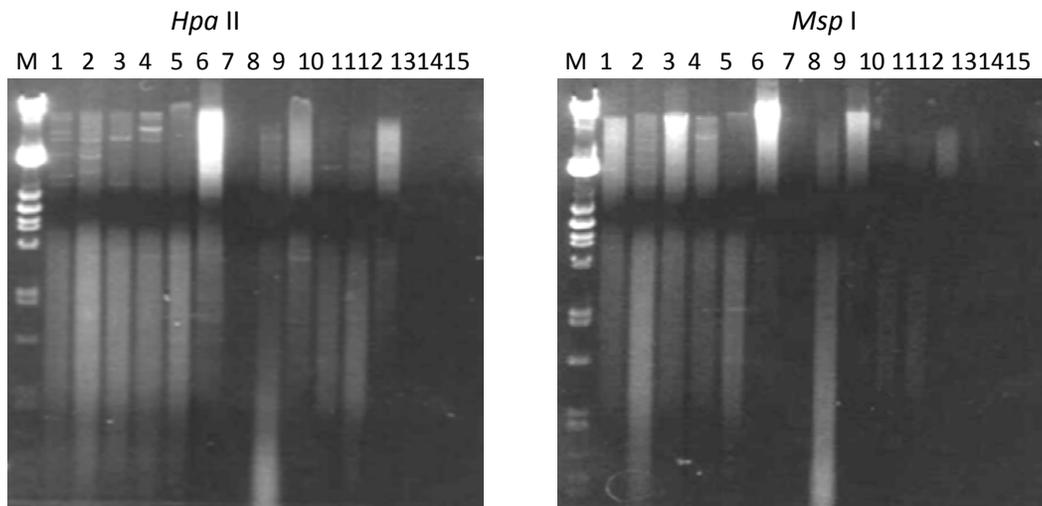


Figura 15. Productos de digestión del DNA aislado de micelio de macromicetos silvestres. Gel de agarosa 1% (w/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) AC, 2) AR, 3) LAC, 4) J, 5) GR57-2, 6) POG1, 7) R057, 8) 1899, 9) 3599, 10) 3799, 11) 4099, 12) 6799, 13) ITS1 *A. rubescens*, 14) ITS1 *I. geophyla*, 15) ITS1 *Trichoderma* sp. M marcador de peso molecular \square /Pst I.

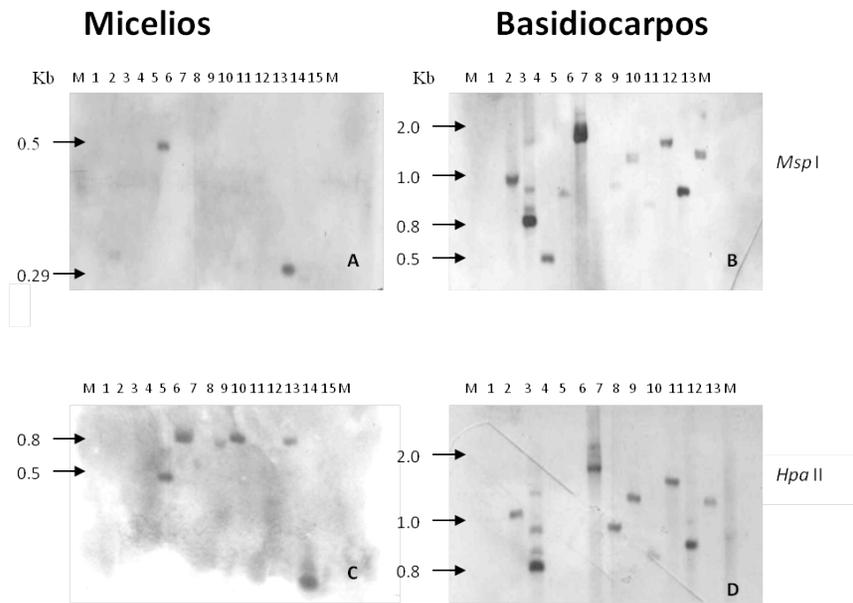


Figura 1. Hibridación Southern de las diferentes especies de macromicetos silvestres con la sonda ITS1 *A. rubescens*. A) Micelios con Msp I, B) Basidiocarpos con Msp I, C) Micelios con Hpa II, y D) Basidiocarpos Hpa II.

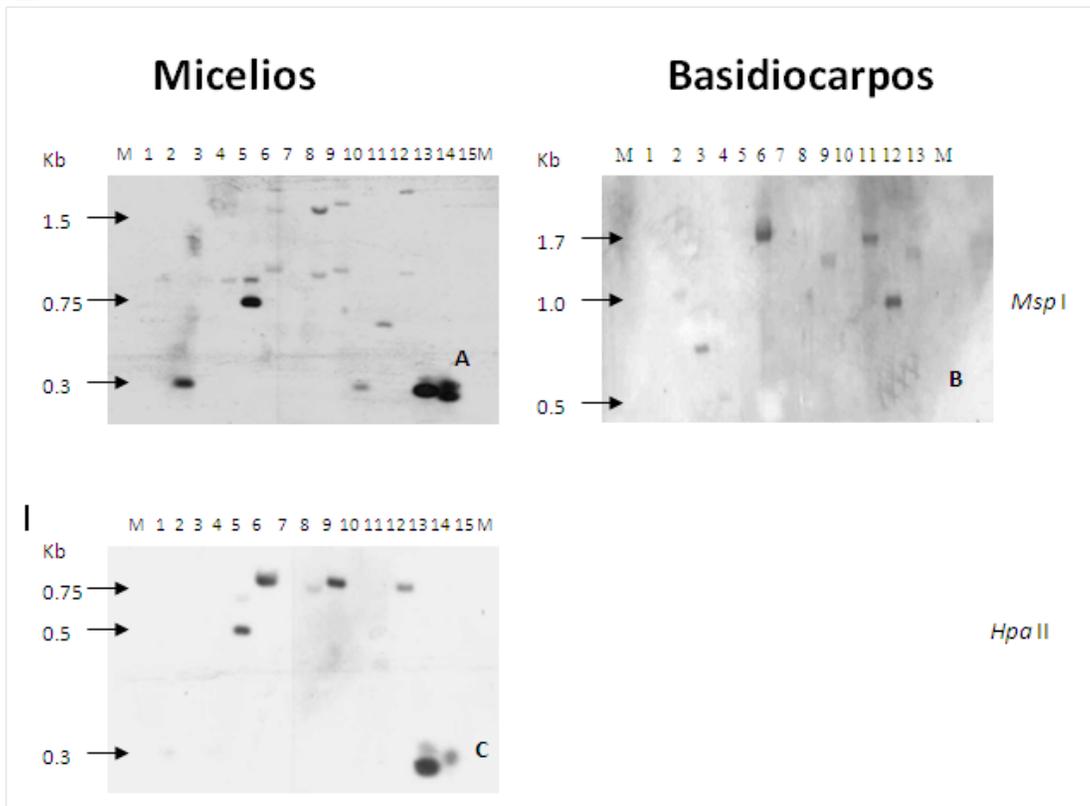


Figura 17. Autorradiografía que muestra los patrones de hibridación “Southern” de las diferentes especies de macromicetos silvestres estudiados utilizando como sonda el fragmento ITS1 obtenido por PCR del basidiocarpo de *I. geophyla*. A y C) Carriles: 1) AC, 2) AR, 3) LAC, 4) J, 5) GR57-2, 6) POG1, 7) RO57, 8) 1899, 9) 3599, 10) 3799, 11) 4099, 12) 6799, 13) ITS1 *A. rubescens*, 14) ITS1 *I. geophyla*, 15) ITS1 *Trichoderma sp.* B) Carriles: 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) 44244, 5) 16, 6) POG1, 7) 9099, 8) 0799, 9) 0999, 10) 1199, 11) 1399, 12) 1899, 13) 5099. M marcador de peso molecular. El I se transfirió el cual no hibrida con la sonda utilizada funcionando como control negativo.