
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
ADN DEL GÉNERO *Gymnopilus*”**

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

GLORIA RODRÍGUEZ CANO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre del 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. GLORIA RODRÍGUEZ CANO
PRESENTE.**

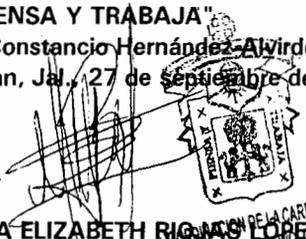
Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título **"COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL GÉNERO *Gymnopilus*"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

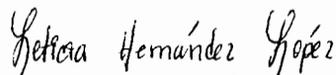
Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS** y como Asesora la **M.C. LAURA GUZMÁN DÁVALOS**.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

"2002, Año Constanco Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 27 de ~~septiembre~~ del 2002


DRA. MÓNICA ELIZABETH RIGAMONTI LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS**.- Director del Trabajo.
c.c.p. **M.C. LAURA GUZMÁN DÁVALOS**.- Asesora del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

PRESENTE

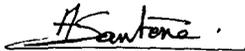
Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante GLORIA RODRÍGUEZ CANO código 698000356 con el título: "COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL GÉNERO *Gymnopilus*", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Aguas, Zapopan, Jal., 08 de Diciembre del 2003

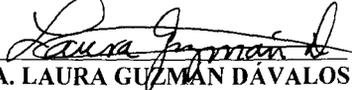
Director



DRA. ANNE SANTERRE LUCAS



Asesor



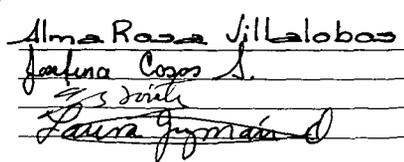
DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

SINODALES

1. Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula
 2. M.C. Josefina Casas Solís
 3. Dr. Carlos Beas Zarate
- Suplente Laura Guzmán Dávalos

pro



El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular y de Micología del Departamento de Botánica y Zoología de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

La investigación fue apoyada por el proyecto CONACYT número 28813-N (asignación 1999), titulado “Aplicación de la técnica de RAPDs al análisis filogénico de los taxa del complejo de *Gymnopilus spectabilis*, subgénero *Annulati* (Fungi, Agaricales)” así como por el Programa de Ayudantía PAY/SNI (número 1201031, 16 julio-15 octubre 2002).

La Tesis fue dirigida por la Dra. Anne Santerre, Departamento de Biología Celular y Molecular y asesorada por la Dra. Laura Guzmán Dávalos, Departamento de Botánica y Zoología.

DEDICATORIA

A mis padres José Guadalupe y Gloria por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana Rosy por ser siempre un ejemplo a seguir y por todo su apoyo

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a:

La Dra. Anne Santerre por la oportunidad de realizar el presente trabajo, sus continuas enseñanzas, paciencia y comprensión.

La Dra. Laura Guzmán por su especial colaboración en la recolecta de las muestras utilizadas en en éste proyecto así como las aportaciones hechas a lo largo de la realización del trabajo.

Al equipo del Laboratorio de genética, especialmente a la M.C. Patricia Castro y la Dra Alma Villalobos por sus aportaciones y consejos.

A mis amigos especialmente a Gloria y Karla por su amistad y gran apoyo.

RESUMEN

El herbario es una fuente muy importante de información, en la que se acumulan datos con un amplio uso en estudios taxonómicos, ecológicos y etnomicológicos. Se ha demostrado que también puede servir como fuente de material para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN), usado exitosamente en análisis filogenéticos a través de la aplicación de marcadores moleculares.

Dentro de la filogenia contemporánea, el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hace posible, la obtención de secuencias génicas a partir de cantidades muy pequeñas de ADN, proporcionando datos complementarios a los fenotípicos o bioquímicos. Para realizar estudios moleculares, es imprescindible contar con ADN de buena calidad y este aspecto es crítico cuando se trabaja con ejemplares herborizados, a veces antiguos y disponibles en cantidades limitadas.

En el presente trabajo nos hemos dedicado a la extracción de ADN de muestras herborizadas, para apoyar al desarrollo de un proyecto que tiene como objetivo el estudio filogenético del género *Gymnopilus* (Fungi, Basidiomicetes, Agaricales), ya que en este género es difícil establecer relaciones filogenéticas basándose solamente en caracteres morfológicos. Se compararon cinco métodos de extracción de material genético; tres basados en el uso de CTAB, de fenol y microondas y dos paquetes comerciales. La calidad y la cantidad del ADN extraído se verificaron por electroforesis y espectrofotometría. La cantidad limitada y el estado de fragmentación del ADN no permitieron su visualización en geles de agarosa, las lecturas espectrofotométricas indicaron la presencia de material genético. Cuando se utilizaron marcadores moleculares como RAPDs (amplificación al azar del ADN polimórfico) y la secuenciación de la región intergénica transcrita (ITS) amplificada por PCR, se observaron productos, lo que indica que el ADN extraído de muestras herborizadas es útil para la obtención de información molecular que apoye a la construcción de árboles filogenéticos.

INDICE

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes	
II.1.	Tradicón taxonómica	3
II.2.	Marcadores moleculares	4
II.3.	Principales marcadores moleculares	4
II.3.1.	Clasificación de los marcadores moleculares	4
II.3.2.	RAPDs	5
II.3.3.	Secuenciación de regiones de ADN	7
II.4.	Purificación del material genético	9
II.5.	Protocolos comunes de extracción del ADN en plantas y hongos	10
II.6.	Extracción de ADN a partir de muestras de herbario	11
II.7.	Limitantes para el éxito del proceso de extracción de ADN de muestras de herbario	12
II.7.1.	Interferencia de macromoléculas	12
II.7.2.	Contaminación de la muestra	12
II.7.3.	Cantidad limitada de material	12
II.7.4.	Edad de la muestra	12
II.8.	El problema concreto de <i>Gymnopilus</i>	13
III.	Justificación	15

VII. Discusión	40
Importancia y perspectivas	44
VIII. Conclusiones	45
IX. Literatura citada	46
X. Anexo	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la técnica de RAPDs.	6
Figura 2: Representación de una repetición de ADNr de plantas y hongos	8
Figura 3: Representación de la unidad repetida de ADNr que incluye los genes 18S, 5.8S y 26S y donde se destacan los ITS1 y ITS2	8
Figura 4: Ejemplares frescos de <i>Gymnopilus</i> spp. (Fotos. E. Fanti)	14
Figura 5: Ejemplares de herbario de <i>Gymnopilus</i> spp. (Fotos L. Guzmán-Dávalos)	14
Figura 6: Gel electroforético de alicuotas del ADN purificado de muestras frescas	32
Figura 7: Gel electroforético de ADN purificado de muestras frescas de hongo	32
Figura 8: Gel electroforético de ADN purificado de muestra fresca de <i>Gymnopilus</i> sp. y herborizada de <i>Gymnopilus spectabilis</i> ,	32
Figura 9: Bando electroforético de RAPDs con el cebador OPA 13	

y dos marcas de polimerasa de ADN	36
Figura 10: Amplificación por PCR	36
Figura 11: RAPDs de ADN de <i>Gymnopilus</i> de herbario (1 μ l)	37

INDICE DE CUADROS

Cuadro I: comparación de cinco métodos de extracción de ADN	19
Cuadro II: Concentraciones finales de los reactivos para PCR	29
Cuadro III: Condiciones de la PCR	29
Cuadro IV: Purificación de material genético con tres métodos seleccionados	34
Cuadro V: Muestras de ADN en las que se secuenció con éxito el ITS Del ADNr	38
Cuadro VI: Edad de las muestras en las que se secuenció con éxito el ITS del ADNr	39

I. INTRODUCCIÓN

La sistemática como rama de la biología tiene como objetivo fundamental generar una referencia histórica confiable entre organismos, que permita el entendimiento de la diversidad biológica, la cual no puede ser producida por ninguna otra disciplina y cuyos resultados tienen además un fuerte impacto en otras áreas de investigación. Los estudios taxonómicos no solamente se abocan a la realización de inventarios y descripción de la biodiversidad, sino también, tomando como base estos conocimientos, proceden a estructurar inferencias sobre la historia de los organismos o su filogenia (Gardes y Bruns, 1993).

Una parte fundamental en el proceso de elaboración de inferencias filogenéticas es el análisis de caracteres informativos, por lo que resulta de vital importancia contar con información confiable y suficiente de los caracteres que formarán la matriz de datos para el análisis cladístico, basado en la presencia o ausencia de caracteres informativos ya sean morfológicos o moleculares (González, 1997).

Dentro de la filogenia contemporánea, el empleo de datos alternativos a los fenotípicos o bioquímicos, como las secuencias génicas, permite la obtención rápida de una gran cantidad de información. Sin embargo, para realizar estudios moleculares, no siempre es posible obtener ejemplares frescos y preservarlos con técnicas específicas; además de la necesidad de adecuar protocolos existentes para el aislamiento del ADN de calidad a partir de ejemplares herborizados y a veces disponibles en cantidades limitadas (Villegas, 1999).

En consecuencia el presente trabajo consistió en la extracción de ADN de muestras de hongos herborizados, con el fin de apoyar el desarrollo de un proyecto que tiene como objetivo la utilización de criterios moleculares (RAPDs y secuencia de ITS) para el análisis filogenético dentro del género *Gymnopilus* (Fungi, Agaricales). La clasificación tradicional del género *Gymnopilus*, basada en caracteres morfológicos, reconoce dos grupos: *Annulati* y *Gymnopilus*, según la presencia o ausencia de un velo parcial (Hesler, 1969). Sin embargo, es difícil establecer relaciones filogenéticas con base solamente en caracteres morfológicos, porque los individuos fenotípicamente pueden ser muy similares, pero genéticamente diferentes.

II. ANTECEDENTES

II.1. Tradición taxonómica

Con su libro “Systema Naturae”, publicado en 1758, Carolus Linnaeus estableció los principios básicos para la organización de las especies, al tomar como base una visión creacionista del mundo que reflejaba una jerarquía establecida por el “Creador”. El sistema era tan práctico que no fue modificado por las visiones evolutivas que presentaron Darwin y sus contemporáneos. Un siglo después y hasta nuestros días, este mismo sistema se sigue utilizando (Niklas, 2001; Pennisi, 2001). Los caracteres clásicos para establecer las relaciones taxonómicas son morfológicos, anatómicos, bioquímicos, fisiológicos, de comportamiento y/o geográficos, es decir, características fenotípicas (De Luna y Mishler, 1997).

Según el sistema tradicional, un taxónomo estudia las características físicas que un grupo de especímenes tiene en común y de ellas selecciona uno como ejemplar Tipo de la especie de interés. Los ejemplares individuales o Tipos son depositados en un herbario para servir de referencia. Los nuevos especímenes, con características similares se encuentran, se comparan con los Tipos y se clasifican dentro de una especie conocida, o como nueva especie. Sin embargo, los criterios empleados por muchos taxónomos, varían considerablemente, pueden ser confusos e insuficientes para establecer relaciones taxonómicas y a menudo las justificaciones metodológicas no son expuestas, de ahí la necesidad de recurrir a marcadores moleculares (Villegas, 1999).

II.2. Marcadores moleculares

Los marcadores de ADN son secuencias genómicas localizadas en un mismo locus pero que difieren en su secuencia nucleotídica, dando polimorfismos moleculares (González, 1999). Estos tienen las ventajas de ofrecer caracteres de clasificación que no son tan directamente sujetos a cambios del ambiente en donde se desarrolla el organismo de estudio. Las propiedades mencionadas los hacen extremadamente útiles, ya que los procesos evolutivos dejan huellas únicas en el ADN y las proteínas que codifican, por lo que es posible usar esta información para reconstruir las relaciones filogenéticas entre organismos (Bruns *et al.*, 1990; Furman, 1997).

El análisis de ADN con fines comparativos se basa en la acción de las enzimas de restricción, la amplificación enzimática del mismo y la secuenciación de regiones específicas, entre otros. Los marcadores genéticos como los RFLPs (polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción), RAPDs (amplificación al azar del ADN polimórfico) y AFLPs (polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción amplificados), se están convirtiendo en herramientas indispensables para los taxónomos. En cualquier técnica elegida, los resultados experimentales se interpretan bajo un mismo criterio: entre más grandes sean las diferencias observadas entre genomas o parte de ellos, más distintas evolutivamente son las muestras de estudio (Valadez y Kahl, 2000).

II.3. Principales marcadores moleculares

II.3.1. Clasificación de los marcadores moleculares

Para obtener marcadores de ADN se pueden utilizar diferentes métodos, los cuales se agrupan convencionalmente en tres categorías según Valadez y Kahl (2000). La primera agrupa los métodos que se basan en la hibridación tipo Southern y tienen el propósito de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos del ADN, ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. En esta categoría encontramos a los RFLP y VNTRs (número variable de repeticiones en tandem). La segunda comprende las técnicas basadas en la PCR que utilizan secuencias de

oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables, generalmente no mayores de 6Kb (Rickwood y Hames, 1995). Estas secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias, semi-aleatorias o específicas. Así, se pueden citar las metodologías que generan los RAPDs, la secuenciación de regiones específicas del genoma, los AP-PCR (PCR-iniciada al azar), los DAF (huellas de ADN amplificadas) y los AFLP (Takamatsu, 1998; Bounou *et al.*, 1999). Por último, se encuentran las metodologías basadas en la combinación de PCR e hibridación tipo Southern, como la técnica de Microsatélites.

En esta tesis se describen con detalle dos de los marcadores antes mencionados, RAPDs y la secuencia, de ADN, que se utilizarán a partir del ADN obtenido en el trabajo, ya que son marcadores relativamente fáciles de usar y por contar con el equipo necesario para su elaboración.

II.3.2. RAPDs

La técnica de RAPDs es una de las metodologías más utilizadas para diferentes propósitos; es un método rápido para generar mapas genéticos, analizar poblaciones provenientes de diferentes lugares y estudiar complejos de especies muy relacionadas. No se necesita de conocimientos previos de la secuencia genómica a estudiar, ya que para su aplicación se utilizan pequeños iniciadores (oligonucleótidos) de secuencias aleatorias con un contenido de guanina y citosina mayor al 50%, seleccionándose los que proporcionen fragmentos más informativos. Los iniciadores no contienen secuencias repetidas inversas internas (auto-complementarias) y se unen a distintos sitios del genoma denominados sitios blanco, generando polimorfismos detectados por la presencia o ausencia de bandas en un gel de agarosa. La unión es reconocida por la polimerasa del ADN (*Taq* polimerasa), la cual inicia el alargamiento del iniciador a partir de su extremo 3', produciendo una cadena de ADN complementaria a la cadena molde flanqueada y delimitada por los sitios de unión de un par de estos cebadores en direcciones opuestas y a cadenas complementarias (figura 1) (Williams *et al.*, 1990; Skoch y Nienhuis, 1995, Johns *et al.*, 1997; Dvorack *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000).

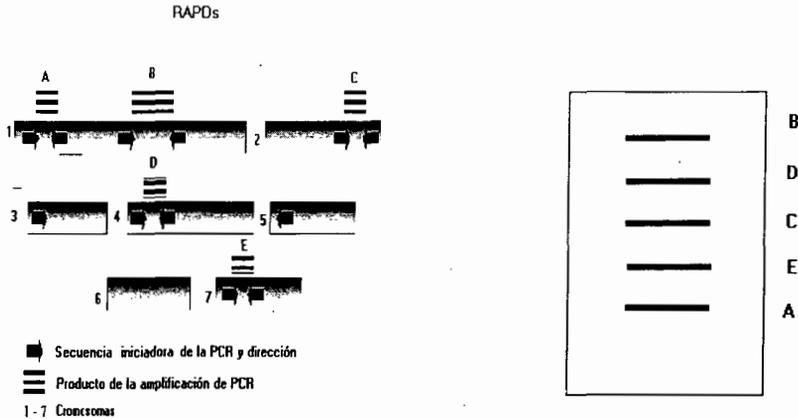


Figura 1. Esquema de la técnica de RAPDs. Muestra la amplificación de una secuencia flanqueada por cebadores. A lado derecho se muestra el corrimiento electroforético de los productos amplificados (A,B,C,D,E) ilustrando el acomodo de las bandas según su peso.(de Suzuki *et al.*, 2000).

Ya que no se pueden predecir los sitios de complementariedad cebador-ADN, dentro del genoma de estudio, no es posible conocer la naturaleza de la secuencia amplificada, además dentro de una misma banda se pueden esconder varios productos distintos de PCR del mismo tamaño, así la implementación de los RFLP y/o la secuenciación del producto de RAPDs-PCR son útiles para identificar fragmentos comigrantes (Valadez y Kahl, 2000).

El uso de temperatura de hibridación baja, que favorece la unión del cebador al ADN durante la PCR, promueve también su unión indeseable a moléculas de ADN contaminantes que fueron co-extraídas con una muestra contaminada o contaminados después del proceso de purificación. Por lo que la calidad del ADN de estudio es particularmente importante, ya que la degradación del mismo puede producir polimorfismos en el tamaño de los productos amplificados por degradación de los sitios de unión o del ADN (Weiland, 1997).

Una de las críticas más graves a los RAPDs es la limitada reproducibilidad de los patrones de bandas, por lo cual es necesario manejar con extrema precaución los

reactivos para evitar problemas de contaminación así como optimizar las concentraciones de los diferentes componentes de la reacción de PCR: ADN de interés, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), iniciadores, desoxirribonucleótidos (dNTPs) y *Taq* polimerasa (Rogers, 1994).

En la práctica los RAPDs son muy útiles, ya que proporcionan rápidamente patrones de bandas, sin conocimiento previo del genoma de interés, en los cuales el investigador identifica polimorfismos. Los polimorfismos obtenidos se detectan por la presencia o ausencia de bandas, consecuencia de las mutaciones tales como inserciones, deleciones, duplicaciones y cambios de nucleótidos, que modifican las distancias entre - y el número de- los sitios de unión del cebador (Williams *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1999; Valadez y Kahl, 2000).

II.3.3. Secuenciación de regiones del ADN

La secuenciación de ADN para propósitos taxonómicos consiste primero en seleccionar un segmento particular del genoma que sea apropiado para el grupo de interés y tener conocimiento previo sobre su tasa de evolución. El segmento puede ser un gen, un intrón o una secuencia espaciadora y puede provenir del ADN nuclear, mitocondrial o del cloroplasto (Soltis *et al.*, 1998).

El ADN total se aísla y purifica del organismo y/o tejido de origen. Después se amplifica por PCR el segmento de interés a partir de iniciadores específicos, los cuales son oligonucleótidos de 20 a 30 bases con una secuencia específica que delimita una región específica del ADN. De esta manera sólo se amplifican las regiones flanqueadas por los iniciadores. El cistrón más secuenciado para inferir relaciones filogenéticas es el ADN ribosomal nuclear (ADNr), debido a su tamaño limitado y su alto número de copias que lo hacen fácil de amplificar por PCR.

En la figura 2 se ilustra la estructura básica de este cistrón, del cual se representa una sola repetición. Como se mencionó, cada unidad se encuentra repetida un número variable de veces, en varios cromosomas y agrupadas en el nucleólo. Se han reportado

hasta miles de copias en la mayoría de los genomas de plantas y pueden llegar a representar hasta el 10% de su genoma.

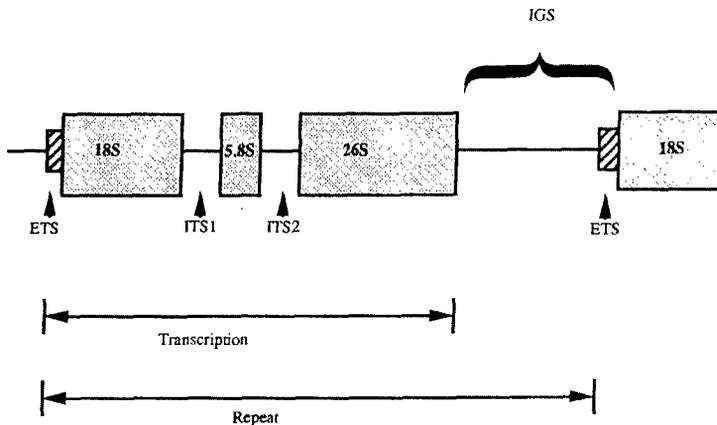


Figura 2. Representación de una repetición de ADN de plantas y hongos (tomada de Soltis *et al.*, 1998).

- genes que codifican para los ARNr 18S, 5.8S y 26S
- regiones internas transcritas (ITS 1 y 2)
- región espaciadora intergénica (IGS)
- región externa transcrita (ETS)

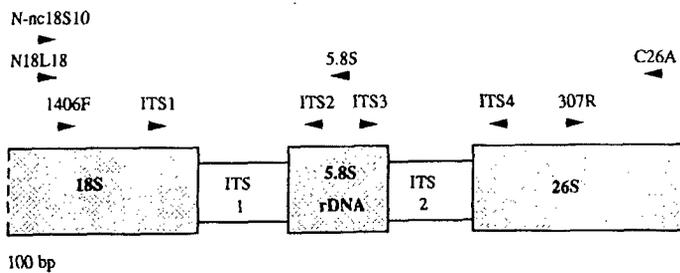


Figura 3. Representación de la unidad repetida de ADN que incluye los genes 18S, 5.8S y 26S y donde se destacan los ITS1 y ITS2. Las flechas indican la ubicación de varios iniciadores útiles en plantas y en hongos (tomada de Soltis *et al.*, 1998).

En la figura 3 se muestra una repetición del ADNr que contiene el gen 18S (de unos 1800 pb en plantas), una región interna transcrita (ITS-1), el gen 5.8S (160 pb en plantas), una segunda región interna transcrita (ITS-2) y finalmente el gen 26S (de unos 3300 pb en plantas).

Los ITS 1 y 2 pertenecen al transcrito de ADNr nuclear pero no se incorporan en los ribosomas. Juegan un papel importante en la maduración del ARNr lo que sugiere que su secuencia nucleotídica y su estructura tengan que encontrarse bajo algunas restricciones evolutivas. Las regiones codificadoras conservadas (ADNr 18S y 26S) son utilizadas para estudiar familias, mientras que las regiones con tasa de mutación más alta, como los ITS 1 y 2, son generalmente útiles para comparar especies o géneros cercanos. Otro aspecto que facilita la amplificación de los ITS, es el hecho que los iniciadores de la PCR son altamente conservados, por ser secuencias que flanquean los genes ADNr 18 y 26 S. Sin embargo, esta misma conservación de las secuencias que reconocen los cebadores, puede provocar la amplificación equivocada de contaminantes. Si fuera el caso, el análisis de la secuencia nucleotídica indicaría la presencia de un contaminante (Soltis *et al.*, 1998). Las regiones ITS proporcionan interesantes datos para las reconstrucciones filogenéticas en hongos (Gardes y Bruns, 1993, Vilgalys y Lin-Sun, 1994; Hibbett *et al.*, 1995, Guzmán-Dávalos *et al.*, 2003).

II.4. Purificación del material genético

Probablemente el procedimiento más básico de la biología molecular es la extracción y purificación del ADN. La obtención de cantidades suficientes de ADN íntegro y puro es imprescindible para que las técnicas moleculares proporcionen los datos filogenéticos esperados y que éstos sean además reproducibles (Doyle y Doyle, 1987 y 1990; Cubero *et al.*, 1999).

Un alto rendimiento en ADN puede ser necesario para realizar algunas técnicas, por ejemplo, para su estudio con enzimas de restricción o para la separación de subfracciones del mismo como ADN nuclear, mitocondrial o ribosomal. Sin embargo, con

la introducción de la PCR, que teóricamente permite la amplificación de una secuencia de ADN de interés a partir de copias únicas del genoma (Suzuki *et al.*, 2000), es posible obtener marcadores moleculares confiables e informativos a partir de muestras pequeñas de material. Por lo anterior los protocolos para la extracción de ADN fueron adaptados a escalas pequeñas, desarrollándose de esta manera los micro-métodos, que además tienen la ventaja de ser menos costosos porque se utiliza una menor cantidad de reactivos (Sytsma, 1994).

II.5. Protocolos comunes de extracción del ADN en plantas y hongos

Las etapas críticas comunes a todos los protocolos de extracción del material genético de células eucarióticas son:

1. Rompimiento de tejidos, de células (lisis celular) y de los núcleos (lisis nuclear).
2. Inhibición de la actividad de nucleasas y otras enzimas.
3. Desnaturalización y remoción de proteínas y otras macromoléculas no deseadas.
4. Precipitación selectiva del ADN (Rogers, 1994).

Históricamente, la extracción de ADN de plantas y hongos siempre ha sido difícil (Sytsma, 1994), en particular si están herborizados (secados, liofilizados o momificados). Un problema asociado con el aislamiento del ADN de plantas y hongos, además de la presencia de nucleasas, es la presencia de otras macromoléculas en cantidades variables (polisacáridos y fenoles) co-extraídas durante el proceso de purificación del material genético. Estas provocan dificultades en la técnica de aislamiento del ADN o en su uso sucesivo en otras técnicas moleculares para la producción de marcadores genéticos. Varios trabajos han descrito procedimientos para la extracción y purificación de ADN de hongos. Muchos de estos son modificaciones del método de CTAB desarrollado originalmente para la extracción de ADN de plantas o utilizan métodos de extracción con solventes orgánicos como medio principal de

desnaturalización y eliminación de proteínas contaminantes (Rogers, 1994). Aun si los métodos con CTAB son considerados como superiores para eliminar carbohidratos no deseados de las soluciones de ADN, los procedimientos con solventes orgánicos agregados directamente al amortiguador de lisis son más rápidos para llevarse a cabo (Murray y Thompson, 1980; Lee y Taylor, 1990; Moller *et al.*, 1992).

La etapa de extracción de las proteínas es muy importante y en general se resuelve por una extracción con mezclas de solventes como fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:C:I). Esto permite desnaturalizar y extraer las proteínas que afectan el rendimiento del ADN cuando se utiliza con otras técnicas. Si no es suficiente, se pueden utilizar además proteasas como la proteinasa K, antes de la etapa de extracción con fenol (Systema, 1994).

II.6. Extracción de ADN a partir de muestras de herbario

La extracción del ADN a partir de muestras de herbario, puede representar una dificultad importante, considerando que muchos de ellos son ejemplares Tipo, de los cuales sólo se puede obtener una muestra mínima. Las características generales de las muestras de herbario están relacionadas con su método de preservación. Las tres técnicas más utilizadas para preservación de los especímenes son, secado con aire tibio (42°C), secado con gel de sílice y liofilización. En los tres casos los especímenes posteriormente se almacenan en un lugar seco, oscuro y fresco. Se han reportado éxitos en la extracción del ADN a partir de los tres principales métodos de preservación, con algo de ventaja cuando se utiliza el secado por liofilización; sin embargo, no es óptimo para preservar las características morfológicas. Cualquiera de los métodos antes mencionados no impide la degradación de la estructura química del ADN, lo ideal sería congelar los especímenes a temperaturas mínimas (-20 o -80°C) siendo esta técnica muy costosa (Mueller, 1999).

II.7. Limitantes para el éxito del proceso de extracción de ADN de muestras de herbario

II.7.1. Interferencia de macromoléculas

La presencia de polisacáridos, compuestos fenólicos, pigmentos y proteínas en el ADN extraído, en ocasiones difíciles de eliminar, pueden inactivar enzimas, tipo endonucleasas o polimerasas de ADN, lo que provoca que no se digiera fácilmente y no sea propicio para la amplificación por PCR (Saghai, 1984).

II.7.2. Contaminación de la muestra

Los especímenes de hongos de herbario, con frecuencia están contaminados con otros hongos microscópicos, que pueden estar presentes sobre la muestra de interés desde el momento de recolecta en el campo o aparecer durante su almacenamiento, en especial si se conservan en condiciones deficientes (como humedad y temperatura alta). Por lo tanto, se puede extraer ADN del contaminante en lugar del de la muestra de interés (Mueller, 1999).

II.7.3. Cantidad limitada de material

Los esporocarpos de muchos grupos de hongos son muy pequeños y además el muestreo es casi siempre destructivo, tanto para los análisis morfológicos que requieren de una disección (por ejemplo para montajes en laminillas para estudio microscópico), como para las extracciones de material genético. Por lo tanto, en algunos casos la cantidad limitada de material disponible en el herbario, tanto para el análisis morfológico como para la extracción del ADN, representan otra dificultad, en particular cuando se tiene que trabajar con materiales Tipo (Mueller, 1999).

II.7.4. Edad de la muestra

La edad se considera a partir del periodo de almacenamiento después de su recolecta. Durante el proceso de secado del material y su almacenamiento en herbario, el ADN será parcialmente destruido (por acción de nucleasas celulares). Lo anterior limita la obtención de ADN íntegro, problema que se agrava con muestras más antiguas. Sin

embargo, se han reportado casos exitosos de extracción de ADN y su uso en varias técnicas moleculares, de muestras de más de 100 años de edad (Adams, 1994).

II.8. El problema concreto de *Gymnopilus*

El género *Gymnopilus* P. Karst. (Fungi, Basidiomicetes, Agaricales) (figuras 4 y 5) está bien definido macro y microscópicamente, aunque a la fecha sólo se cuenta con una monografía para las especies de Norteamérica (Hesler, 1969). *Gymnopilus* se clasifica en dos subgéneros: *Annulati* Hesler y *Gymnopilus*. Este último se divide en 3 secciones: *Microspori* Hesler, *Gymnopilus* y *Macrospori* Guzm.-Dáv. Romagnesi (1942) fue el primero en dividir *Gymnopilus* en dos grupos infragenéricos: *Annulati* y *Cortinati*, de acuerdo a las características del velo. Singer (1986) las consideró secciones y a la segunda la llamó *Gymnopilus*. Hesler (1969) también aceptó estas dos secciones, pero bajo la categoría taxonómica de subgéneros. Posteriormente Guzmán-Dávalos, (1995) propuso una nueva sección: *Macrospori*, para el subgénero *Gymnopilus*. Dentro del subgénero *Annulati* existe el complejo de *G. spectabilis*, formado por varias especies muy relacionadas, que se caracterizan por presentar basidiomas robustos y grandes, anillo membranoso y esporas elipsoides y de gran tamaño.

Los análisis taxonómicos con caracteres morfológicos llevados a cabo a la fecha, destacan que existen problemas de definición de especies dentro del género *Gymnopilus* y en particular en el complejo de *G. spectabilis*, así como la falta de conocimiento de las relaciones filogenéticas entre las especies (Guzmán-Dávalos y Guzmán, 1986, 1991, 1995; Guzmán-Dávalos, 1994, 1995, 1996, 2003). Por lo que surgió la necesidad de un estudio complementario con datos moleculares, utilizando ejemplares de herbario de diversas partes del mundo. Entonces se propuso aplicar los marcadores RAPDs y la secuenciación de la región intergénica transcrita a la investigación sobre este género. Posteriormente en un proyecto global, se combinará la información morfológica, los caracteres moleculares y los polimorfismos obtenidos para dilucidar las relaciones del complejo de *Gymnopilus spectabilis* y establecer las relaciones infragenéricas.



Figura 4: Ejemplares frescos de *Gymnopilus sp.* (Fotos. E. Fanti).

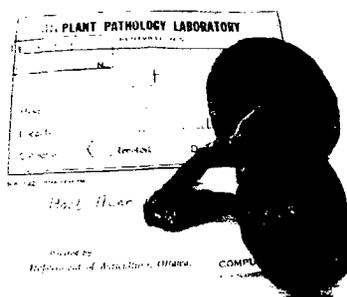
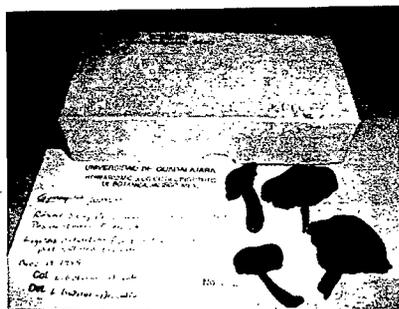


Figura 5: Ejemplares de herbario de *Gymnopilus sp.* (Fotos L. Guzmán-Dávalos).

III. JUSTIFICACIÓN

Con el propósito de resolver problemas de definición de especies en el género *Gymnopilus*, es necesario realizar estudios moleculares, utilizando ejemplares de herbario de diversas partes del mundo, que representan la variación dentro del género.

En este trabajo se pretende evaluar cinco métodos de extracción de ADN con el fin de obtener ADN de buena calidad. Este paso es crítico para cualquier estudio molecular. En el caso de hongos depositados en un herbario, es de esperarse que el material genético obtenido esté degradado, debido a las técnicas utilizadas para su secado y preservación, así como el tiempo prolongado de almacenamiento. Además cuando se extrae ADN de especímenes de herbario, la cantidad de la que se puede disponer para la extracción de ADN es muy limitada, ya que éstos tienen que mantenerse en buenas condiciones para futuros estudios.

Con las limitantes del tipo de muestras, se determinará la calidad del material genético obtenido con dos tipos de marcadores moleculares, RAPDs (cebadores aleatorios) y secuenciación del ITS (cebadores específicos), ambos basados en la aplicación de la técnica de PCR. La experiencia adquirida a lo largo de este proyecto será enriquecedora para futuros proyectos filogenéticos basados en el uso de material herborizado.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Comparar protocolos de extracción de ADN en muestras herborizadas de hongos del género *Gymnopilus*, como un estudio modelo para aplicaciones de marcadores moleculares.

IV.2. Objetivos particulares

- 1) Aplicar varios métodos de extracción de ADN a muestras herborizadas de *Gymnopilus*.
- 2) Determinar la cantidad y calidad del ADN purificado.
- 3) Comprobar la utilidad del ADN purificado a través de la aplicación de dos tipos de marcadores moleculares (RAPDs y secuenciación de ITS).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Recolección de material de herbario

Para la realización del presente proyecto, fue de suma importancia la revisión y las solicitudes de préstamos de material herborizado de diferentes herbarios, tanto nacionales como extranjeros así como la recolección de hongos en campo. El análisis macro y micromorfológico para la determinación de las muestras, se realizó en el Laboratorio de Micología del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA.

Se consultaron importantes herbarios micológicos en Europa y en otras partes del mundo con el fin de seleccionar los especímenes de estudio. Algunas de las muestras de herbario datan de más de 150 años; en la mayoría de los casos fueron secadas lentamente con calor después de su recolección. Cabe mencionar que en el caso de hongos, tanto el análisis morfológico como el molecular son procesos destructivos, por lo que no de todos los ejemplares disponibles en los herbarios se pueden obtener muestras para estos análisis. Cuando se contaba solamente con el material Tipo, fue crítico obtener el permiso del curador del herbario correspondiente para poder disponer de una pequeña muestra del cuerpo fructífero (píleo, contexto y/o láminas del carpóforo). Sin embargo, hay casos en los que no fue posible, ya que el Tipo se encontraba en pésimas condiciones o era escaso. Por este motivo, no todas las especies incluidas en el estudio morfológico se incluyeron en el molecular.

V.2. Extracción y purificación del material genético

V.2.1. Estandarización de diferentes métodos de extracción

Debido a que la cantidad de muestra para obtener el material genético de cada ejemplar era realmente escasa en la mayoría de los casos, fue necesario primero estandarizar varios métodos de extracción en muestras de hongos frescos y en muestras de hongos herborizados (*Gymnopilus spectabilis*), antes de proceder a la extracción del ADN de las muestras de interés.

Tomando en cuenta la infraestructura, herramientas y los reactivos disponibles en el laboratorio, cinco protocolos básicos fueron probados y comparados (ver cuadro I).

CUADRO I. COMPARACIÓN DE CINCO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

MÉTODO Y PASOS	Método con fenol	Método con CTAB	Kit "NUCLEON"	Kit "PLANT DNazol"	Método con MICRO-ONDAS
Referencia	Raeder y Broda, (1985)	Gardes y Bruns, (1993)	Amersham Life Science	Gibco Life Technologies	Ferreira y Glass, (1996)
Amortiguador para la lisis celular	Tris-HCl Na ₂ EDTA SDS NaCl	Tris-HCl Na ₂ EDTA CTAB NaCl PVPP	potasio y SDS Reactivos 1 y 2	guanidinio	TE
Temperatura	ambiente	- 80°C / 65°C	65°C	ambiente	
Extracción de macromoléculas contaminantes	F.C.I. C.I.	cloroformo	cloroformo resina	cloroformo	
Precipitación del material genético	acetato de sodio etanol	isopropanol	cloroformo	etanol	
Lavado del ADN precipitado	etanol 80%	etanol 70%		sol. Plant DNazol- etanol etanol	

V.2.2. Descripción de los métodos utilizados y protocolos detallados

V.2.2.1. Método con fenol

El micro-método de extracción con fenol utilizado es una adaptación del protocolo descrito por Raeder y Broda (1985). Este método ya fue probado con éxito en hongos: (comunicación personal de la Dra. Dolores González, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México).

Principio

El fenol es un solvente orgánico que desnatura con eficacia a las proteínas y que actúa sobre los lípidos, pero no inhibe completamente a las ribonucleasas (ARNasas). En un micro-tubo con la muestra en fase acuosa, se agrega un volumen igual de fenol saturado con TE (Tris, EDTA). La mezcla se agita fuertemente en un vortex y se centrifuga para la separación de las fases. La fase superior acuosa (con el ADN) se transfiere cuidadosamente a un tubo nuevo, dejando atrás (sin tocarla) la interfase así como la fase inferior (fenólica). Enseguida la fase acuosa se somete a dos extracciones con cloroformo para quitar los residuos de fenol, para lo cual se agrega un volumen igual de cloroformo, se mezcla con el vortex y se centrifuga nuevamente para volver a separar las fases. La fase superior se transfiere a un tubo nuevo. Las fases orgánicas se desechan. Después de dos extracciones el ADN se concentra por precipitación.

Precaución: El fenol es altamente corrosivo y puede causar quemaduras. Su manipulación se tiene que hacer en campana de extracción de gases, con ropa protectora, guantes y anteojos.

Procedimiento

Paso 1: Lisis celular

- Macerar el tejido con 500 µl de amortiguador de lisis celular (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Na₂EDTA 10 mM, SDS 1%, NaCl 150 mM).

Paso 2: Extracción

- Adicionar 500 µl de una mezcla fenol-cloroformo-álcool isoamílico (FCI), mezclar, invertir el tubo varias veces, hasta formar una emulsión.
- Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente (TA), invirtiendo la muestra periódicamente para mantener la emulsión.
- Centrifugar a 13,000 rpm, 10-30 minutos (tiempo necesario para obtener un sobrenadante claro), a TA.
- Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y desechar el tubo con los restos celulares.

- [Adicionar 50 µl de RNAsa al tubo e incubar a 37°C por 30 minutos, opcional y no utilizado aqui].
- Adicionar 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (CI) y suavemente invertir el tubo por 1-2 minutos (para eliminar restos proteicos y trazas de fenol disuelto en fase acuosa).
- Centrifugar por 10 minutos (13,000 rpm), a TA.
- Pasar nuevamente la fase acuosa a un tubo limpio.

Paso 3: Precipitación

- Adicionar a la fase acuosa 50 µl de la solución de acetato de sodio 3M, pH 5.2, mezclar y adicionar 1.8 volúmenes de etanol absoluto frío, invertir suavemente (observar la formación de un precipitado blanco).
- Centrifugar 10 minutos, 13,000 rpm, a TA.
- Desechar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado adicionando 100 µl de etanol al 80% frío (-20°C), eliminar lo más posible el alcohol de la muestra.
- Secar el precipitado al aire.

Paso 4: Re-solubilización del ADN

- Resuspender el precipitado de ADN en 25 µl de TE.
- Almacenar al ADN a -20°C o -80°C.

V.2.2.2. Método con CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio)

El método de extracción con CTAB es el propuesto por Gardes y Bruns, (1993), es uno de los métodos más utilizados, ha sido probado con diferentes hongos obteniendo exitosas extracciones.

Principio

El método de CTAB fue desarrollado originalmente para la extracción de ADN de plantas. El CTAB es un detergente utilizado en varios procedimientos de purificación de ADN; se une fuertemente al ADN, desplaza las proteínas del ADN y previene la

degradación. En seguida se remueve mediante extracción con cloroformo y el ADN se queda en fase acuosa listo para su precipitación selectiva con etanol.

Precaución El CTAB es tóxico, corrosivo, hidrosκόpio y se absorbe rápidamente por la piel. Su manipulación se tiene que hacer, con ropa protectora, guantes y anteojos.

Procedimiento

Paso 1: Lisis celular (choque térmico y osmótico)

- Dejar las muestras a - 20° C por toda la noche.
- Agregar 300 µl del amortiguador de lisis 2X CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8, Na₂EDTA 200 mM, CTAB 1%, NaCl 1M, PVP 1%) al microtubo con la muestra.
- Congelar y descongelar tres veces la muestra llevándola del ultracongelador (- 80°C) a baño María a 65°C, durante 15 minutos cada etapa.
- Moler el tejido en el micro-tubo con una varilla de acrílico de punta redonda e incubar otra hora a 65°C, invirtiendo regularmente el tubo.

Paso 2: Extracción

- Agregar 300 µl de cloroformo, mezclar con el vortex.
- Centrifugar (15 minutos a 10,000 rpm), a TA.
- Transferir la fase superior acuosa a un tubo nuevo.

Paso 3: Precipitación

- Agregar 300 µl de isopropanol frío (4°C) y esperar 10 minutos.
- Centrifugar (10 minutos, 10,000 rpm, a TA).
- Desechar el sobrenadante.
- Realizar dos lavado con etanol al 70 %.
- Dejar secar las muestras de ADN al aire por 10 minutos.

Paso 4: Resuspensión del ADN

- Resuspender el ADN en 50 µl de TE 0.1X (1mM Tris-HCl, 0.1M EDTA (pH 8.0)).

V.2.2.3. Paquete comercial “Nucleon, Phytopure for Plant DNA” (Amersham Life Science).

Principio

Según la nota técnica de este paquete de extracción de ADN, fue optimizado para la extracción de ADN de plantas y hongos, asegurando alto rendimiento y pureza (con muestras frescas), además de ser muy corto el tiempo de preparación. El paquete no necesita de la aplicación de fenol o CTAB. La célula es lisada con un reactivo que contiene potasio y SDS (Lauril sulfato de sodio) (no se precisan las concentraciones), formando un complejo con las proteínas y polisacáridos contenidos en la muestra.

Soluciones

El paquete cuenta con dos reactivos: “Reactivo 1” y “Reactivo 2”, así como con una “resina” que apoya a la purificación del ADN de sus contaminantes. Su composición precisa esta protegida por patente y no se divulga.

Procedimiento

Paso 1: Lisis celular

- Macerar el tejido con hielo seco.
- Adicionar 600 µl del “Reactivo 1”.
- Mezclar y agregar 200 µl del “Reactivo 2”.
- Mezclar vigorosamente e incubar a 65°C en baño María por 10 minutos; se puede utilizar la agitación manual durante la incubación.
- Poner las muestras en hielo seco por 20 minutos.

Paso 2: Extracción

- Adicionar 500 µl de cloroformo a -20°C.
- Adicionar 100 µl de “Resina Nucleon PhytoPure”.

Paso 3: Precipitación

- Agitar y dejar reposar por 10 minutos.

- Centrifugar a 1.300 g por 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante y agregar cloroformo a -20°C para que remueva las proteínas y polisacáridos.
- Dejar precipitar.

Paso 4: Re-Solubilización del ADN

- Resuspender en 50 μl de TE.

V.2.2.4. Paquete de extracción de ADN “Plant DNAzol” (Gibco, Life Technologies)

Principio

El “Plant DNAzol” es un reactivo formulado específicamente para el aislamiento de ADN genómico de plantas. El procedimiento está basado en el uso de una solución de lisis que contiene el detergente Guanidinio, mismo que hidroliza al ARN y permite la precipitación selectiva del ADN. Durante este procedimiento la muestra del hongo se pulveriza con nitrógeno líquido y el ADN genómico se extrae del homogenado con la solución de “Plant DNAzol”. Después de la extracción los residuos del hongo se eliminan por centrifugación y el ADN se precipita con etanol. Se realiza un lavado del precipitado resultante y se disuelve. El procedimiento completo se efectúa en 60 minutos y el ADN resultante se puede utilizar en transferencias de tipo Southern, en hibridación dot-blot, PCR, clonación molecular, etc.

Precaución

El “Plant DNAzol” es irritante. Manejar con cuidado, evitar contacto con ojos, proteger ojos y piel.

Soluciones

El paquete cuenta con tres reactivos que apoyan a la purificación del ADN de sus contaminantes. La composición está protegida por patente y no se divulga.

Procedimiento

Paso 1: Lisis celular

- Pulverizar el tejido en nitrógeno líquido en mortero. Agregar nitrógeno 2 a 3 veces más y seguir homogenizando hasta obtener un polvo muy fino.
- Con una espátula transferir el polvo a un microtubo que contiene 300 μ l del reactivo "Plant DNAzol" para 0.1 g de tejido vegetal. Cerrar el tubo. Para este caso, como la muestra era demasiado pequeña, se dejó congelar la muestra durante toda la noche previa a la extracción y se maceró directamente en el microtubo, posteriormente se agregaron 300 μ l de la solución "Plant DNAzol".
- Mezclar invirtiendo el tubo varias veces e incubar 5 minutos a 25°C.

Paso 2: Extracción

- Agregar 300 μ l de cloroformo, mezclar fuertemente, incubar 5 minutos a 25°C con agitación.
- Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo.

Paso 3: Precipitación del ADN

- Agregar a la fase acuosa 225 μ l de etanol al 100%, mezclar invirtiendo el tubo y reposar a TA, 5 minutos.
- Centrifugar a 5,000 rpm durante 4 minutos, a TA.
- Desechar el sobrenadante.

Lavado # 1

- Preparar la solución de lavado mezclando 1 volumen de "PlantDNAzol" con 0.75 volumen de etanol al 100%.
- Realizar un lavado del ADN precipitado con 300 μ l de la solución de lavado (agregar, resuspender ADN con vortex, centrifugar 5,000 rpm, 4 minutos y desechar sobrenadante).

Lavado # 2

- De la misma manera realizar lavado con 300 μ l de etanol al 70%.

Paso 4: Re-Solubilización del ADN

- Desechar el residuo de etanol por decantación y con micropipeta, secar el ADN al aire.
- Redissolver el ADN en 70 μ l de TE, pH 8.

*NOTA: En los 4 métodos antes mencionados, las muestras se congelaron a -80°C una noche antes de ser procesadas

V.2.2.5. Método de tratamiento con horno de micro-ondas (Ferreira y Glass, 1996).

Principio:

El método de irradiación de microondas es una forma inusual de extraer ADN, es de gran utilidad cuando se cuenta con pequeñas cantidades de tejido para la extracción, teniendo resultados satisfactorios con esporas de hongos. Actúa por exposición del ADN normalmente protegido por la estructura celular.

Soluciones:

Amortiguador de lisis: Se utiliza el amortiguador TE.

Procedimiento:

Este método se suele utilizar cuando el material es limitado. Se toman las esporas y se transfieren a un microtubo. Cada tubo se sella y se irradia a 700W por 5 minutos en un horno de micro ondas doméstico. Debe realizarse en presencia de un recipiente con agua durante la irradiación. Se adicionan 30 μ l de TE, se mezclan y se centrifugan de 1-5 minutos a 14,000 rpm. Se extrae el sobrenadante y se transfiere a un tubo limpio. Se utilizan 5 μ l del sobrenadante para la PCR.

V.2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo del material genético purificado

V.2.3.1. Espectrofotometría

El uso de la espectrofotometría para determinar la concentración de ácidos nucleicos se basa en el hecho de que existe una relación entre la absorción de luz ultravioleta y la concentración de ADN y ARN. La absorción máxima del ADN es a 260 nm aproximadamente (promedio de la absorbancia máxima de los 4 nucleótidos que varía entre 256 y 281 nm). Se cuenta con la siguiente fórmula que permite en el caso del ADN de doble cadena, determinar su concentración:

$$50 \times OD_{260} = \text{concentración del ADN } (\mu\text{g/ml})$$

Lo que equivale a decir que una OD_{260} de 1 indica una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Además la relación OD_{260} / OD_{280} es un buen indicador de la calidad del ADN; para una buena preparación de ADN se deben de obtener lecturas de entre 1.8 y 2, datos más altos indican la presencia de proteínas y/o de trazas de fenol en la preparación (Sambrooks *et al.*, 1989).

Para la cuantificación espectrofotométrica del ADN se realizaron entonces lecturas a 260 y 280 nm de una muestra diluida (100 veces) del ADN de interés (5 μl de ADN en 495 μl de H_2O bi-destilada). Después de determinar la concentración del ADN, se ajustó su concentración a 4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ con H_2O bi-destilada.

V.2.3.2. Electroforesis horizontal

Los fragmentos de ADN se pueden visualizar por electroforesis en gel de agarosa. Este proceso permite separar en un campo eléctrico constante a los fragmentos de ADN según su peso molecular (tamaño). Después de la tinción con bromuro de etidio se logra teóricamente visualizar cantidades tan pequeñas como 20 ng de ADN.

Para ADN purificado se utilizó un gel de agarosa (Gibco) a una concentración de 1.0 % en amortiguador TBE 0.5X, 90 volts, durante una hora. Para productos de RAPDs, el material amplificado por PCR se visualizó en gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X, 75 volts, 90 minutos.

V.2.3.3. Por RAPDs:

Al momento de montar la PCR se mezclan los componentes mencionados en el anexo 1, en las siguientes proporciones (se indican las cantidades para una reacción, en la práctica se multiplican dichas cantidades por el número de reacciones de PCR):

H ₂ O	2.28 µl
Amortiguador 5x	2.2 µl
Mezcla dNTPs-MgCl ₂	0.44 µl
Cebador	0.44 µl
Taq Pol.	0.13 µl
	<hr/>
	5.49 µl

Para cada reacción se mezclan:

ADN (4 ng/µl)	5 µl
Mezcla de reacción	5 µl
	<hr/>
	10 µl

Cada reacción de PCR se cubre con una gota de aceite mineral (Sigma).

CUADRO II: CONCENTRACIONES FINALES DE LOS REACTIVOS PARA PCR

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
Material genético	2.5 ng/ μ l
Amortiguador:	
Tris	100 mM
KCl	40 mM
MgCl ₂	2 mM
Suero de Albumina bovina	0.1 %
Ficoll 400	3 %
Xileno cianol	0.02 %
DNTPs	0.2 mM
Cebador	0.5 μ l por reacción
Taq. Pol.	0.1 μ l por reacción

La reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos para PCR (0.2 ml) en un termociclador (MJ Research, modelo PTC-100), aplicando las siguientes condiciones:

CUADRO III. CONDICIONES DE LA PCR

CICLO	TIEMPO (s)	TEMPERATURA (°C)
Primer ciclo		
Desnaturalización inicial	60	91
Alineación	15	42
Crecimiento	70	72
38 siguiente ciclos		
Desnaturalización	15	91
Alineación	15	42
Crecimiento	70	72
Elongación prolongada final	300	72

V.2.3.4. Secuenciación de los ITS

La secuenciación de los ITS se realizó en el Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution en el Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois, EUA, bajo la asesoría del Dr Gregory Mueller. Se amplificaron y secuenciaron los ITS, a partir de varias de las muestras de ADN obtenidas (Guzmán-Dávalos *et al.*, 2002; Guzmán-Dávalos *et al.*, 2003). Por lo tanto, en este trabajo no se detallarán ni las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación específica de las regiones ITS, ni la metodología usada en la secuenciación (Guzmán Dávalos *et al.*, 2003). Así en la sección de resultados sólo se destacarán las muestras de ADN donde fue posible amplificar por PCR y las muestras que pudieron ser secuenciadas y fueron útiles como marcadores moleculares informativos.

VI. RESULTADOS

VI.1. Extracciones preliminares

Como se mencionó, antes de trabajar con las muestras de herbario de interés se realizaron extracciones de ADN de hongos frescos (*Agaricus bisporus*) con los métodos de fenol, CTAB y con el paquete DNAzol. En geles de agarosa se logró visualizar el material extraído así como corroborar su calidad.

Las extracciones indicaron que los métodos con fenol y CTAB funcionan bien cuando se trabaja con 25, 50 y 100 mg (pero no con 10 mg) de muestras frescas. En las figuras 6-8 se puede observar la calidad del ADN extraído (una banda de alto peso molecular). El paquete Plant DNAzol no permitió la obtención de material genético de calidad, por lo que no se utilizó para el procesamiento de muestras herborizadas, por otro lado, la técnica involucra la utilización de nitrógeno líquido para la pulverización de la muestra; al ser aplicado se pierde la muestra al brincar del mortero. Se trató de realizar este paso en microtubos, pero era demasiado peligroso (proyecciones); se intentaron también congelaciones (-80°C) y descongelaciones, pero no resultó. Por lo que debido a tantas complicaciones fue necesario descartar el método.

El método de microondas a pesar de ser sencillo, económico y de requerir una mínima cantidad de muestra (esporas), no fue exitoso ya que no se pudieron obtener lecturas espectrofotométricas ni tampoco visualizar ADN por electroforesis. Por estas razones éste método también se descartó.

Los resultados de la extracción de ADN a partir de una muestra herborizada se muestran en la figura 8, donde se puede apreciar la presencia de material genético, pero de bajo peso molecular (fragmentado).

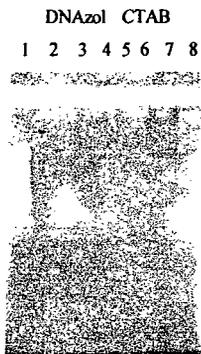


Figura 6: Gel electroforético de alicuotas del ADN purificado de muestras frescas, con el paquete DNAzol, a partir de 100 mg de carpoforo (carriles 2 a 5) y con el método de CTAB, a partir de 25 mg, 50 mg y 100 mg (carriles 6, 7 y 8). Carril 1: marcador.

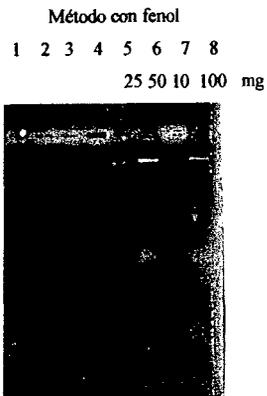


Figura 7: Gel electroforético de ADN purificado de muestras frescas con el método de fenol, a partir de 25, 50, 10, 100 mg en carriles 1, 2, 3 y 4 respectivamente)

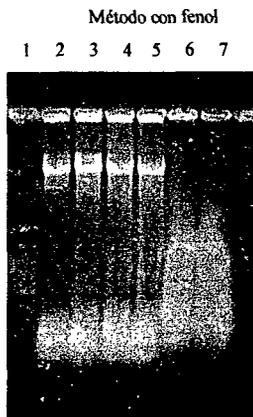


Figura 8: Gel electroforético de ADN purificado con método de fenol a partir de muestra fresca (carriles 2 {50 mg}, 3 y 4{100 mg} y 5 {250 mg}) y herborizada de *Gymnopilus* sp. (carriles 6 y 7 {19 mg})

VI.2. Procesamiento de las muestras de herbario:

Se procesaron un total de 205 muestras: 91 con el método de fenol, 53 con el paquete "Nucleon", 61 con el método de CTAB. En el anexo se listan las muestras procesadas, indicando los ejemplares con los cuales se trabajó, numerados por orden de procesamiento, las especies de interés y su referencia dentro del herbario (colector, número, herbario), la procedencia, fecha y año de recolecta de las muestras, la cantidad (peso en mg) de muestra utilizada para la extracción de ADN, el método utilizado para la extracción así como la relación 260/280.

De acuerdo a las extracciones preliminares, los métodos útiles para el procesamiento de las muestras de nuestro interés fueron CTAB, fenol y el paquete comercial Nucleon. En el Cuadro IV se detallan para cuatro muestras herborizadas (disponibles en cantidades suficientes para realizar las pruebas) y una fresca, los resultados obtenidos con los tres métodos de extracción seleccionados.

**CUADRO IV: PURIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO CON TRES
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

# de extracción (ver tabla del anexo 3)	especie	Cantidad de muestra (mg)	Método de Extracción	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	260/280	Rendimiento ng/ul
24	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	5	Fenol	0.156	0.129	1.212	390
		10	CTAB	0.281	0.259	1.086	702
		10	Nucleon	0.038	0.024	1.588	95
43	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	5	Fenol	0.221	0.169	1.308	552
		10	CTAB	0.188	0.183	1.031	470
		10	Nucleon	0.088	0.051	1.720	220
48	<i>Gymnopilus luteofolius</i>	5	Fenol	0.059	0.043	1.375	147
		10	CTAB	0.303	0.255	1.189	825
		10	Nucleon	0.036	0.021	1.721	90
41	<i>Gymnopilus armillatus</i>	5	Fenol	0.428	0.320	1.338	1070
		10	CTAB	0.265	0.222	1.196	662
		10	Nucleon	0.055	0.044	1.264	137
31	<i>Gymnopilus cerasinus</i>	5	Fenol	0.171	0.149	1.144	427
		10	CTAB	0.169	0.174	1.089	422
		10	Nucleon	0.112	0.073	1.540	280
68	<i>Gymnopilus sp fresco</i>		Fenol	0.210	0.136	1.548	525
		6	CTAB	0.187	0.180	1.036	467
		6	Nucleon	0.013	0.010	1.348	32

Como se puede observar en el cuadro IV, los métodos con fenol y CTAB proporcionan los mejores rendimientos (OD_{260} y en $ng/\mu l$). Sin embargo, cabe mencionar que las lecturas a 280 nm son también altas, sugiriendo que co-precipitaron moléculas contaminantes. Esto lo refleja también la relación 260/280 (valores bajos, en particular con CTAB). Por otro lado, el paquete Nucleon presenta rendimientos más bajos pero con mejores relaciones 260/280 (entre 1.2 y 1.7), que indicaron mejor calidad del ADN purificado.

VI.3. Electroforesis

En los estudios preliminares, con 19 mg de muestra herborizada, fue posible visualizar cantidades apreciables de ADN (aún fragmentado) (figura 8). Sin embargo, la electroforesis de una alícuota (5 μl) del material purificado a partir de las muestras de interés no permitió la visualización de ADN. Por lo tanto se decidió no realizar corrimiento electroforético para no desperdiciar el material genético y conservarlo para la PCR.

VI.4. RAPDs

La aplicación de la técnica de RAPDs involucró en una primera etapa la determinación de las condiciones de amplificación, las cuales se reportaron en la sección de metodología. Después se procedió a la amplificación de las muestras de interés por PCR.

La figura 9 presenta el corrimiento electroforético de una PCR realizada con diferentes muestras de ADN de hongos frescos, hongos de herbario y testigos negativos (agua bidestilada); se utilizó el cebador OPA 13 y *Taq* polimerasa de dos marcas, Gibco y Perkin Elmer.

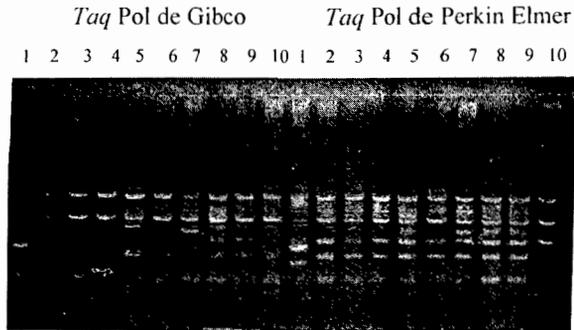


Figura 9: Bando electroforético de RAPDs con el cebador OPA 13 y dos marcas de *Taq* polimerasa (*Taq* pol) de ADN Se utilizaron muestra de hongo fresco (carril 1), muestra de hongo de herbario (carril 2-8) y testigos negativos (carril 9-10).

Se observó una amplificación de dos a tres bandas intensas, utilizando *Taq* pol de Gibco y de 4 a 5 bandas intensas aplicando la *Taq* pol de la marca Perkin Elmer. Ambos patrones de amplificación son similares, pero la *Taq* polimerasa de Perkin Elmer proporcionó mas marcadores, por lo que se trabajó con esta última marca.

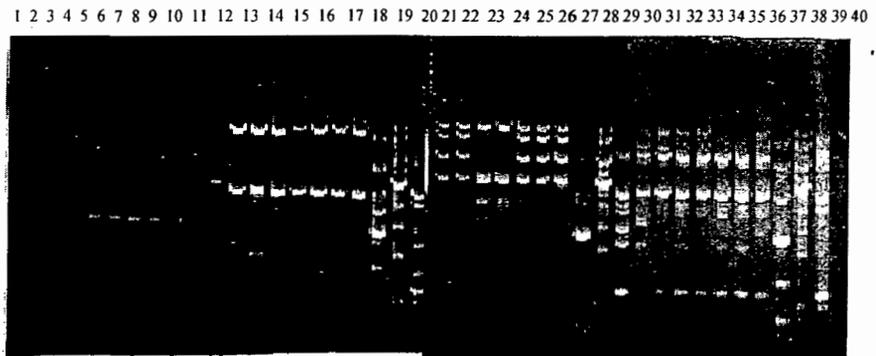


Figura 10: Amplificación por PCR con los cebadores OPA 1 (carril 1-10), OPA 2 (carril 11-20), OPA 3 (carril 21-30) y OPA 13 (carril 31-40). Testigos (carril 3-10, 13-20, 23-30, 33-40), material genético de *Gymnophilus* spp. (carriles 1 y 2, 11 y 12, 21 y 22, 31 y 32).

En la figura 10 se destaca que cada cebador proporciona un patrón propio de bandeo: una banda tenue con OPA 1, 2 bandas intensas con OPA 2, 3-4 bandas intensas con OPA 3 y 3 bandas intensas con OPA 13. No se observan polimorfismos, sólo en los carriles 23 y 24 (ausencia de una banda).

Después se realizó otra PCR-RAPD, con las mismas condiciones pero utilizando más material genético: 1 µl de solución no diluida, lo cual representa 1/25 parte del material disponible para el proyecto en general. Se observa en la figura 11 que una de las cinco muestras de ADN de hongo (carril 9) presentó un patrón aceptable de bandas; además no se observan bandas en el carril testigo negativo no mostrado.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

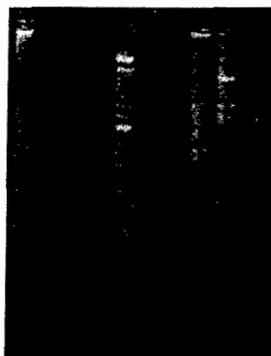


Figura 11: RAPDs de ADN de *Gymnopus* de herbario (1 µl), carriles 1-5: con cebador OP B7, carril 6: marcador, carriles 7 a-11 con cebador OPA 13

VI.5. Secuenciación

A la par del estudio por RAPDs, la calidad de las mismas muestras de ADN fue analizada en el Field Museum de Chicago a través de la obtención de secuencias nucleotídicas de los ITS del ADNr. Para ello primero se realizó una amplificación

selectiva por PCR y después la secuenciación de los productos amplificados. En el cuadro V se muestra el número de muestras secuenciadas en relación al número total de muestras extraídas.

CUADRO V : MUESTRAS DE ADN EN LAS QUE SE SECUENCIÓ CON ÉXITO EL ITS DEL ADN_r

Método utilizado	Número de muestras procesadas	Número de muestras amplificadas y secuenciadas exitosamente	Muestras de ADN útiles para la obtención del marcador molecular ITS (en porcentaje)
Fenol	91	27	30 %
CTAB	61	10	16 %
Nucleon	53	16	30 %
Total	191	53	26 %

Se destaca que las muestras de material genético que mejor se amplificaron y secuenciaron fueron las obtenidas con los métodos de fenol (30 %) y Nucleon (30 %). El material genético obtenido por el método de CTAB no se amplificó tan exitosamente (16 %), por lo cual no se pudo secuenciar con tanta facilidad.

VI.6. Edad de la muestra y calidad del material genético

En el cuadro VI se observa el número de muestras amplificadas (ITS) y secuenciadas exitosamente, organizadas por intervalos de año de colecta. Es importante señalar que se logró secuenciar ADN obtenido de muestras herborizadas que fueron recolectadas hace más de 100 años. De los especímenes recolectados en la última década (1990-1999), que fueron los más abundantes en los herbarios consultados, se obtuvo el mejor material genético para la amplificación y secuenciación de los ITS.

CUADRO VI: EDAD DE LAS MUESTRAS EN LAS QUE SE SECUENCIÓ CON ÉXITO EL ITS DEL ADN

Año de colecta	Secuencias de ITS
1897	1
1920-1929	1
1940-1949	1
1960-1969	3
1970-1979	5
1980-1989	6
1990-1999	36
Total	53

VII. DISCUSIÓN

La obtención de ADN de buena calidad es el paso crítico para cualquier estudio molecular. Sin embargo, en el caso de muestras de herbario es de esperarse que el material genético esté fragmentado y contaminado antes de su extracción y purificación, debido a las técnicas de secado y preservación y a los tiempos prolongados de almacenamiento. A pesar de tales limitantes, fue posible extraer material genético de muestras herborizadas de *Gymnopilus* (aplicando diferentes métodos de extracción de ADN) útil para la amplificación de regiones específicas cortas (ITS) seguida de su secuenciación.

De los cinco protocolos inicialmente seleccionados, solamente tres (método con fenol, con CTAB y paquete comercial Nucleon), resultaron adecuados para el procesamiento de las muestras pequeñas (4 mg) o muy pequeñas (0.2-1 mg) y antiguas a veces (hasta 150 años) que se usaron.

Las extracciones preliminares con mayor cantidad de material herborizado (19 mg) indicaron que el ADN se encuentra fragmentado en hongos herborizados. Con muestras más pequeñas no fue posible visualizar el ADN. Por lo tanto, las lecturas espectrofotométricas, fueron muy útiles para confirmar la presencia de material genético, así como su concentración. Las relaciones OD_{260}/OD_{280} fueron generalmente inferiores a las recomendadas (1.8 a 2), debido probablemente a la presencia de macromoléculas co-extraídas con el material genético como sales y proteínas, además de pigmentos presentes en grandes cantidades. Estos pigmentos pertenecen al grupo de los esterilpironas, sus longitudes de absorción máximas son similares a las utilizadas para el ADN (Gill y Steglich 1987). Cabe mencionar que muchas de las alícuotas de ADN re-disuelto en TE presentaron un color café claro a más oscuro. Es muy probable que dichos compuestos hallan interferido en la determinación de la concentración del ADN

presente en las muestras por espectrofotometría (sobre estimación). Sin embargo, es difícil determinar en que proporción. Con base en la relación OD_{260}/OD_{280} , como un indicador de la calidad del material genético extraído, se puede decir que el paquete Nucleon proporcionó ADN de mejor calidad, seguido por el método de fenol; el método con CTAB proporcionó los cocientes más bajos (cuadro IV). No obstante, el valor de este cociente, aun cerca del óptimo, no aseguró el éxito de la reacción de PCR ni tampoco de la secuenciación de los fragmentos (ITS) amplificados.

En general con los cebadores utilizados para RAPDs se observaron patrones de bandeo similares de una muestra a otra, lo cual indica que la amplificación fue exitosa, aunque el patrón de bandeo no permitió diferenciar a las muestras.

Por otro lado, se observaron amplificaciones en los carriles que corresponden a los testigos negativos. Este problema de contaminación se logró resolver parcialmente repitiendo la PCR con agua de calidad biología molecular (MilliQ). Sin embargo, la contaminación persistió en algunos casos, lo cual destaca la importancia de los testigos negativos y la disponibilidad de material genético de calidad.

Únicamente son útiles e interpretables las bandas amplificadas a partir de ADN de hongos que muestren un patrón diferente a las observadas en los testigos negativos. Se consideraron los siguientes posibles causantes de la presencia o ausencia de bandas:

- 1) Degradación del ADN extraído (por la edad y las condiciones de preservación en herbario).
- 2) Cantidad limitada de material genético (muestras de hongo pequeñas).
- 3) Sobre-estimación de la concentración del ADN por espectrofotometría (presencia de pigmentos que co-absorbían en el intervalo del UV).
- 4) Dilución del ADN antes de la PCR (a 50 ng/ μ l) que ocasionó una cantidad muy pobre de ADN (por la sobre-estimación) y una fuente de contaminación.

- 5) Contaminación de los reactivos de PCR al momento de hacer la mezcla de reacción.
- 6) Además el uso de cebadores de secuencia corta (10 bases), inespecífica (aleatoria), favorece su hibridación a casi cualquier secuencia, tanto ADN de interés como ADN contaminante. Lo anterior se ve exacerbado cuando la cantidad de ADN blanco se encuentra muy limitada y degradada.

Para limitar los problemas relacionados con la unión inespecífica de tales cebadores, es necesario aumentar la cantidad de ADN de interés. Sin embargo, no se contaba con la suficiente cantidad de material genético (menos de 25 μ l) para pasar al siguiente paso de los RAPDs, que es el rastreo de cebadores útiles para el estudio genético de *Gymnopilus*. Además parte del material genético fue destinado a la amplificación por PCR y secuenciación de los ITS.

En el caso de la secuenciación la PCR con cebadores específicos para la amplificación de los ITS de hongos y su secuenciación, permitió, confirmar la presencia de ADN de *Gymnopilus*, útil para la producción de datos moleculares, confirmando el éxito de su extracción.

Cabe destacar que la amplificación específica de los ITS a partir de muestras herborizadas se encuentra favorecida por:

- 1) el uso de cebadores específicos del reino de los hongos (evita algunos problemas de contaminaciones)
- 2) el hecho de que los ITS son regiones repetidas a lo largo del genoma (aumenta cantidad de ADN blanco)
- 3) la amplificación de segmentos cortos de ADN (espacio corto que separa a los iniciadores que flanquean la región a amplificar : menos de 600 bp).

La amplificación exitosa de tales regiones indica que se contaba con fragmentos de ADN de más de 600 bp de largo y/o al menos de 300 bp, ya que en muchos casos se

amplificaron y secuenciaron por separado el ITS 1 y el ITS 2. Sin embargo, no todas las muestras se pudieron amplificar, o se amplificaron pero no se lograron secuenciar, lo cual puede estar relacionado con el estado de degradación del ADN (de los sitios de unión ADN genómico-iniciador y/o las secuencias ITS que yacen entre éstos), además de la posible presencia de sustancias inhibitorias de la PCR en la muestra de ADN.

La secuenciación de los ITS reveló la presencia de varios contaminantes genómicos en las muestras de herbario, tales como el hongo microscópico *Penicillium* y el *Mus musculus* (el ratón). Lo anterior no es demasiado sorprendente, ya que tradicionalmente las muestras de herbario “no se lavan” (menos los hongos) antes de su secado o de la toma de la muestra para su extracción, por lo cual pueden encontrarse contaminadas por trazas de otros materiales orgánicos. Se pueden encontrar contaminadas por otros hongos microscópicos presentes dentro o encima del hongo, desde el momento de su recolecta o que se adquirieron durante el proceso de secado o almacenamiento en el herbario. Además en el herbario los materiales de se manipulan sin guantes, lo cual podría conllevar a contaminaciones al momento de las consultas repetidas al herbario.

Es importante señalar que la amplificación y secuenciación de los ITS fue finalmente muy informativa, ya que fue posible establecer un árbol filogenético para el género *Gymnopilus* (Guzmán-Dávalos *et al.*, 2003). Finalmente, el haber logrado la secuenciación de varias muestras antiguas de ADN (hasta 150 años de edad), confirma lo comentado por Mueller (1999), quien reportó resultados muy variables acerca del éxito de la extracción del ADN en relación con la edad de la muestra herborizada; algunos investigadores lograron trabajar con material de hasta 100 años, otros sólo con muestras de 10-25 años, mientras que otros sólo lo lograron con material fresco.

Importancia y perspectivas

Además de contribuir a la resolución de la problemática propia del género *Gymnopilus*, es posible hoy compartir la experiencia adquirida con otros taxónomos que necesiten datos moleculares para complementar los estudios morfológicos de valiosas colecciones herborizadas.

La experiencia indica que para trabajar con material herborizado es realmente importante contar con cantidad suficiente de muestra para obtener el material genético necesario. Así, para futuras colecciones destinadas tanto al análisis morfológico como molecular se sugiere considerar los siguientes pasos:

- seleccionar, limpiar y etiquetar el material fresco
- almacenar en bolsas de papel y trasladar lo más rápidamente posible al laboratorio donde se almacenará una alícuota del material a -20°C o mejor a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN

Varios herbarios han mencionado la necesidad de planear con tiempo la preservación de ADN de especímenes Tipos. Como alternativa se ha propuesto también el desarrollo de colecciones especialmente reservadas a estudios moleculares con condiciones adecuadas de almacenamiento para preservar la calidad del ADN por extraerse (Mueller, 1999).

VIII. CONCLUSIONES

Con tres de los cinco protocolos contemplados se logró obtener material genético útil para la producción de marcadores genéticos a partir de muestras mínimas y herborizadas de hongo del género *Gymnopilus*. El método de fenol es el más recomendable, seguido del paquete Nucleon (Amersham Life Science) y del método con CTAB.

El análisis cualitativo y cuantitativo del material genético extraído se realizó por espectrofotometría, ya que no se logró visualizar el ADN por electroforesis.

En relación con la naturaleza de las muestras, no fueron exitosos los marcadores RAPDs, sin embargo, la amplificación y la secuenciación de los ITS fue muy informativa, ya que funcionó como un indicador del éxito de la extracción del ADN y sobre todo permitió establecer un árbol filogenético del género *Gymnopilus*.

IX. LITERATURA CITADA

Adams, R.P., Watterson, R., Smouse, M. (1994). Conservation of plant genes II: utilization of ancient and modern DNA. Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden, 48.

Bounou, S., Jabaji-Hare, S.H., Hogue, R., Charest, P.M. (1999). Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates. Mycol. Res. 103: 1-8.

Bruns, T.D., Fogel, R. y Taylor, J.W. (1990). Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia 82: 175-184.

Cubero, O.F., Crespo, A., Fatehi, J, Bridge, P.D. (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Plant Systematics and Evolution 216: 243-249.

Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Dvorack, W.S., Jordon, A.P., Hodge, G.R., Romero, J.L. (2000). Assessing evolutionary relationships of pine in the *Oocarpae* and *Australiae* subsections using RAPDs markers. New Forests 20: 163-192.

Ferreira, A. y Glass, N.L. (1996). PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Newsletter* 43: 16-17

Furman, B.J. (1997). Phylogenetically informative markers as diagnostic tools to identify species, hybrids and introgression in Central American and Mexican pines. Ph.D. dissertation. North Carolina State University, Raleigh.

Gardes, M. y Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

Gill, M. y Steglich, W. (1987). Pigments of fungi (Macromycetes). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer-Verlag, Nueva York.

González, D.L. (1997). El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60: 137-157.

Guzmán-Dávalos, L. (1994). New species of *Gymnopilus* (Agaricales, Cortinariaceae) from México. *Mycotaxon* 50: 333-348.

Guzmán-Dávalos, L. (1995). Further investigations on *Gymnopilus* (Agaricales, Cortinariaceae). A new section and a new species from Mexico. *Mycotaxon* 54: 117-124.

Guzmán-Dávalos, L. (1996). New records of the genus *Gymnopilus* (Agaricales, Cortinariaceae) from Mexico. *Mycotaxon* 59: 61-78.

Guzmán-Dávalos, L. (2003) Type studies of *Gymnopilus* (Agaricales) I. *Mycotaxon*, 86:395-423.

Guzmán-Dávalos, L. y Guzmán, G. (1986). Hongos del Estado de Jalisco, VII. El género *Gymnopilus* (Cortinariaceae). Rev. Mex. Mic. 2: 157-185.

Guzmán-Dávalos, L. y Guzmán, G. (1991). Additions to the genus *Gymnopilus* (Agaricales, Cortinariaceae) from Mexico. Mycotaxon 41: 43-56.

Guzmán-Dávalos, L. y Guzmán, G. (1995). Toward a monograph of the genus *Gymnopilus* (Cortinariaceae) in México. Doc. Mycologiques (Francia) 25 (98-100): 197-212.

Guzmán-Dávalos, L., Santerre, A., Rodríguez Cano, G., Villand, J. y Villalobos A.R., 2002. Obtención de secuencias génicas a partir de ejemplares herborizados: El caso de *Gymnopilus*. In: Guzmán, G. y Mata, G. (ed). Estudios sobre los hongos Latinoamericanos. Nanacatepec. Universidad Veracruzana, Xalapa.

Guzmán-Dávalos, L., Mueller, G.M., Cifuentes, J., Miller, A.N., Santerre, A. (2003). Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* (Agaricales) are not supported by ribosomal DNA sequence data. 95(6): en prensa.

Hesler, 1969. North American species of *Gymnopilus*. Myc. Mem. 3. Hafner, Nueva York.

Hibbett, D.S., Fukumasa-Nakai, Y., Tsuneda, A. Donoghue, M.J. (1995). Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. Mycologia 87: 618-638.

Johns, M.A., Skroch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G., Muñoz-Schick, G. (1997). Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morfological data. Crop Science 37: 605-613.

Lee, S.B. y Taylor, J.W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Nueva York.

Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger H.H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.

Mueller, G.M. (1999). A new challenge for mycological herbaria: destructive sampling of specimens for molecular data. In: Metsger, D.A. y Byers S.C. (ed). *Managing the modern herbarium. Soc. Preserv. Nat. Hist. Collections and Royal Ontario Museum, Vancouver.*

Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.

Niklas, K.J. (2001). Taxing debate for taxonomists. *Science* 292: 2249.

Pennisi, E. (2001). Linnaeus's last stand ? *Science* 291: 2304-2307.

Raeder, U. y Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiol.* 1: 17-20.

Rickwood, D. y Hames, B.D. (1995). PCR essential data series. Academic Press, Nueva York.

Rogers, S.O. (1994). Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA. In: Adams, R.P., Miller, J.S., Golenberg, E.M. y Adams, J.E. (eds). *Conservation of plant genes II: utilization of ancient and modern DNA. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 48: 1-276.

- Rodríguez, J.M., Berke, T., Engle, L., Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 147-156.
- Romagnesi, H. (1942). Quelques points de taxonomie. *Bull. Soc. Mycol. France* 58: 81-89.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. y Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. USA* 81: 8014-8018.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Nueva York.
- Singer, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz, Koenigstein (4 Ed.)
- Sytsma, K. (1994). DNA extraction from recalcitrant plants: long, pure and simple ? In: Adams, R.P., Miller, J.S., Golenberg, E.M. y Adams, J.E. (ed). *Conservation of plant genes II: utilization of ancient and modern DNA*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 48:1-276.
- Skoch, P.W. y Nienhuis, J. (1995). Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theor. App. Genet.* 91: 1078-1085.
- Soltis, D.E, Soltis, P.S. y Doyle, J.J. Eds. (1998). *Molecular systematics of plants II, DNA sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- Suzuki, D.T., Griffiths, A.J.F., Miller, J.H. y Lewontin, R.C. (2000). *Introducción al análisis genético*. Interamericana-McGraw-Hill, Los Angeles.

Takamatsu, S. (1998). PCR applications in fungal phylogeny. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. (ed). Applications of PCR in Mycology. CAB International, Wallingford.

Valadez, E. y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa y Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Villegas, M.C. y Cifuentes, J. (1999). La sistemática filogenética de macromicetos. Ciencias. México, 70: 339.

Vilgalys, R. y Lin Sun, B. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 4599-4603.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Weiland, J.J. (1997). Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. Fungal Genetics Newsletter 44: 60-63.

X. ANEXOS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS Y DE TRABAJO COMUNES EN LOS VARIOS PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN SELECCIONADOS

Método con fenol

Amortiguador de lisis:

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM Na₂EDTA

1% SDS

0.15 M NaCl

Otros reactivos necesarios: fenol, cloroformo, etanol 100%, frío (- 20°C), Acetato de sodio (3M, pH 5.2), amortiguador TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8

Método con CTAB

Amortiguador de lisis:

100 mM tris-HCl, pH 8

200 mM Na₂EDTA

2X CTAB

1M NaCl

1% PVPP (polivinil pirrolidona)

Acetato de sodio, 3 M, pH 5.2

Para preparar 100 ml: disolver 40.81 g de acetato de sodio. 3 H₂O en 80 ml de agua desionizada estéril. Ajustar el pH con ácido acético glacial. Pasar la solución a un matraz volumétrico de 100 ml para aforar.

Acetato de sodio, 3 M, pH 5.2

Para preparar 100 ml: disolver 40.81 g de acetato de sodio, 3 H₂O en 80 ml de agua desionizada estéril. Ajustar el pH con ácido acético glacial. Pasar la solución a un matraz volumétrico de 100 ml para aforar.

Bromuro de etidioPrecauciones:

El mayor riesgo con el bromuro de etidio es la inhalación del polvo durante la preparación de la solución stock o concentrada por lo que se necesita trabajar en campana de extracción de humos, con guantes y cubre boca. Cabe mencionar que se encuentran a la venta pastillas pre-pesadas (de 10 mg) para diluir directamente en agua. Finalmente la etiqueta del frasco ámbar tendrá la siguiente leyenda: **“PRECAUCIÓN, Bromuro de etidio, SUSTANCIA MUTAGÉNICA Y CARCINOGENICA”**

Preparación de la solución de trabajo. Se agregan 20 µl de la solución stock (10 mg/ml) a una botella ámbar que contiene 200 ml de agua desionizada.

C.I. (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1)

Para preparar 25 ml: mezclar al momento de usarlo 24 ml de cloroformo con 1 ml de alcohol isoamílico, conservar en botella ámbar.

Etanol al 70 %

Para preparar 100 ml, mezclar 70 ml de etanol absoluto con 30 ml de agua desionizada estéril en una probeta graduada.

F.C.I. (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1)

Para preparar 50 ml: mezclar 25 ml de fenol equilibrado, con 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico al momento de usarlo, agitar para formar una emulsión.

PREPARACIÓN DEL FENOL

Para usarlo, es necesario equilibrar el fenol a un pH de 7.8 ya que el DNA pasaría en la fase orgánica a un pH demasiado ácido.

El método que se usa para preparar el fenol equilibrado es el siguiente:

1. A 100 g de fenol agregar 100 ml de agua desionizada estéril
2. Mezclar hasta disolver el fenol
3. A la solución agregar 100 ml de Tris 1 M
4. Mezclar hasta formar la emulsión, reposar para separar las fases acuosas (superior) y orgánicas (inferior)
5. Eliminar la fase superior
6. Agregar 100 ml de T.E., mezclar hasta formar la emulsión, reposar para que se separen las fases acuosas (superior) y orgánicas (inferior)
7. Eliminar la fase superior y repetir el paso 6, hasta que el pH de la fase superior sea superior a 7.8.
8. En este momento el fenol esta listo para su uso en el protocolo de la practica. Se almacena a 4°C en frasco ámbar, con una capa de T.E. de 1 ml

Solución de almacenamiento de Tris, pH 8, 1M

Para preparar un litro: disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua desionizada y estéril, ajustar el pH con 42 ml de HCl concentrado, verificar el pH con el potenciómetro. Pasar la solución a un matraz volumétrico y aforar a 1 litro. Esterilizar y almacenar bajo refrigeración.

Solución de trabajo de Tris, pH 8, 10 mM

Para preparar 100 ml: mezclar 99 ml de agua desionizada estéril y 1 ml de la solución 1M, pH 8 en una probeta de 100 ml. Esterilizar y almacenar bajo refrigeración.

Condiciones de PCR

Amortiguador 5x (casero): para preparar 100 ml

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris (1M, pH 8.5)	25 ml	250 mM
KCl (1M)	10 ml	100 mM
MgCl ₂ (1M)	500 µl	5 mM
Suero de Albumina bovina	0.25 g	0.25 %
Ficoll 400	7.5 g	7.5 %
Xileno cyanole	0.05 g	0.05 %
Agua bi – destilada	Aforar a 100 ml	

El ficoll 400 se agrega al final al amortiguador tibio (en baño María) hasta que se disuelva.

Mezcla dNTPs – MgCl₂:

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
dNTP (Gibco, 100 mM)	25 µl de cada uno	2.5 mM
MgCl ₂ (1M)	25 µl	25 mM
Agua bi – destilada	875 µl	

ANEXO 3: LISTADO DE LAS MUESTRAS PROCESADAS							
No	Especie	Colector, número, herbario	Localidad	Año	ext.	mét.	260/280
					mg		
1	<i>G. lepidotus</i>	G. Guzmán 30374 (XAL)	Veracruz	1991	2.5	fenol	1.411
2	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán- Dávalos 8196 (IBUG)	Suiza	1999	2	fenol	1.788
3	<i>Pholiota lenta</i>	R. Tuomikoski s.n. (H)	Finlandia	1974	3	fenol	1.707
4	<i>Dermocybe phoenicea</i>	M. L. Fierros 743 (IBUG)	Jalisco	1994	5	fenol	1.544
5	<i>G. subpurpuratus</i>	L. Guzmán- Dávalos 5303 (IBUG)	Jalisco	1991	1	fenol	1.31
6	<i>G. lepidotus</i>	L. Guzmán- Dávalos 7868 (IBUG)	Veracruz	1999	1	fenol	1.014
	repetición			1999		fenol	1.177
7	<i>G. robustus</i>	C. Ovrebø 3751	Panamá	1999	2	fenol	1.76
8	<i>G. junonius</i>	S. Hansen (Reg. J. Vesterholt 93- 329)	Dinamarca	1993	2	fenol	-0.352
9	<i>G. spectabilis</i>	O. Andersson s.n.	Suecia	1950	3	fenol	1.435
10	<i>G. dilepis</i>	R. Treu s.n. IMI- 370901	Malasia	1996	0.5	fenol	1.406
11	<i>G. trailii</i>	K (M) 75208 Tipo	Brasil	1874	0.2	fenol	1.32
12	<i>G. crocians</i>	K (M) 75185 Tipo	Sri Lanka	1869	0.2	fenol	1.43
13	<i>G. filiceus</i>	K (M) 75215 Cotipo?	Inglaterra	1870	2	fenol	1.218
14	<i>G. sp. (no crocians)</i>	K (M) 75158	Borneo	1985	3	fenol	1.224
15	<i>G. chrysites</i>	K (M) 75180 Tipo Herb. Berk. 74	India	sin fecha	1	fenol	1.411
16	<i>G. hispidus</i>	K(M) 75188 Tipo	St Vincent	1872	2	fenol	1.217
17	<i>G. oxylepis</i>	K (M) 22429	Christmas Island	1993	4	fenol	1.519
18	<i>G. cf. palmicola</i>	K (M) 75214	Nigeria	1968	5	fenol	1.508
19	<i>G. rufopunctatus</i>	K (M) 75165	Brasil	1969	2.5	fenol	1.152
20	<i>G. hispidus</i>	K (M) 75211	Dominica	1977	1	fenol	1.323
21	<i>G. cf. rugulosus</i>	K (M) 75159	India	1984	5	fenol	1.298
	repetición					fenol	

	22	<i>G. luteofolius</i>	Hesler & Ford DAOM 80626 (dupl. TENN 15085)	EUA	1942	5	fenol	1.298
	23	<i>G. areolatus</i>	Earle 36 (NY) Tipo	Cuba	1904	5	fenol	1.337
	24	<i>G. spectabilis</i>	L. Guzmán- Dávalos 8221 (IBUG)	Francia	1999	5	fenol	1.212
	24	repetición				10	CTAB	1.086
	24	repetición				10	Nucleon	1.588
	25	<i>G. penetrans</i>	Kytövuori 96-006 (H)	Finlandia	1996	5	fenol	1.252
	26	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán- Dávalos 8223 (IBUG)	Francia	1999	4	fenol	1.427
	27	<i>G. luteofolius</i>	S. Spasoff s.n. DAOM-179158	Canadá	1980	5	fenol	1.281
	28	<i>G. junonius</i>	L. Guzmán- Dávalos 8220 (IBUG)	Francia	1999	5	fenol	1.319
	29	<i>G. imperialis</i>	J. Puiggari s.n. LPS-211865 Tipo	Brasil	1888	5	fenol	1.136
	30	<i>G. spectabilis</i>	L. Guzmán- Dávalos 8222 (IBUG)	Francia	1999	5	fenol	1.251
	31	<i>G. cerasinus</i>	Herb. E. A. Burt (S)		1897	5	fenol	1.144
		repetición					CTAB	1.089
		repetición					Nucleon	1.54
	32	<i>G. spectabilis</i>	A. Dobel s.n. BAFC 32.911	Argentina	1992	5	fenol	1.228
	33	<i>Galerina sp</i>	E. West s.n. F- 721516 (FLA)	Florida	1931	5	fenol	1.317
	34	<i>G. junonius</i>	Wei Bing-gang 310	China	1981	5	fenol	1.189
	35	<i>G. filiceus</i>	R. T. Guerrero 47 BAFC 50.205	Argentina	1960	0.5	fenol	1.117
	36	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán- Dávalos 8219 (IBUG)	Francia	1999	6	fenol	1.322
	37	<i>G. aeruginosus</i>	P. Kroeger 1336 DAOM-210322	Canadá	1988	5	fenol	1.212
	38	<i>G. tuxtense</i>	G. Guzmán 19830 (XAL) Paratipo	Veracruz	1981	5	fenol	1.282
	39	<i>G. dilepis</i>	R. Treu (IMI- 370900)	Malasia	1996	0.5	fenol	1.452
	40	<i>G. peiloepis</i>	J. Puiggari 87 LPS-18270 Tipo	Brasil	1889	2	fenol	1.164
	41	<i>G. armillatus</i>	A. S. Rhoads s.n. F-15731 (FLA)	Florida	1932	5	fenol	1.338

		repetición				10	CTAB	1.196
		repetición				10	Nucleon	1.264
42	<i>Pyrrhuglossum</i>	G. Guzmán 23003 (ENCB)	Brasil	1982	5	fenol		1.327
43	<i>G. spectabilis</i>	S. Sede s.n. BAFC-34.141	Argentina	1994	5	fenol		1.308
					10	CTAB		1.031
					10	Nucleon		1.72
44	<i>G. aeruginosus</i>	FKOB-2567 (WTU)		sin fecha	5	fenol		1.258
45	<i>G. cf. hispidellus</i>	S. García s.n. (ENCB)	Tabasco	1962	4	fenol		1.345
46	<i>G. purpuratus</i>	R. Singer M- 7080 (SGO- 92549) Tipo	Chile	1967	6	fenol		1.32
47	<i>G. pampeanus</i>	J. H. Ross 3975 MEL-2035632	Australia	1996	5	fenol		1.395
48	<i>G. cf. luteofolius</i>	M. Evers & D. Sieger (L. Norvell 92-04.20- 1)(WTU)	EUA	1992	5	fenol		1.375
		repetición				10	CTAB	
		repetición				10	Nucleon	
49	<i>G. pampeanus</i>	S. H. Lewis 401 MEL-204638	Australia	1998	6	fenol		1.303
50	<i>G. spectabilis</i>	E. Albertó s.n. BAFC-32.321	Argentina	1991	5	fenol		1.28
51	<i>G. braendlei</i>	L. O. Overholts 1173 (S)	EUA	1913	2	fenol		1.284
52	<i>G. sapineus</i>	I. Kytövuori 90- 2488 (H)	Finlandia	1990	5	fenol		1.404
53	<i>G. suberis</i>	M. A. Pérez-de- Gregorio s.n.	España	1999	5	fenol		1.343
54	<i>G. spectabilis</i>	J. Ginns 6360 DAOM-180876	Canadá	1981	2	fenol		1.326
55	<i>G. junonius</i>	A. Orton s.n. MEL-1054690	Australia	1968	2	fenol		1.368
56	<i>G. peliolepis</i>	D. Christie s.n. BAFC-30.818	Argentina	1986	4	fenol		1.221
57	<i>G. aeruginosus</i>	J. H. Ginns 8924 DAOM-197282	Canadá	1987	5	fenol		1.367
58	<i>Pyrrhuglossum</i>	R. Singer M- 8007	Veracruz	1969	3	fenol		1.249
59	<i>G. palmicola</i>	Underwood & Earle 1134 (NY) Tipo	Cuba	1903	4	fenol		1.345
60	<i>G. aeruginosus</i>	SAR-88/431 (WTU)	EUA	1988	3	fenol		1.302
61	<i>G. aculeatus</i>	C. Gómez s.n. BAFC-50.211	Argentina	1964	5	fenol		1.496
62	<i>G. spectabilis</i>	E. Albertó 204 BAFC-50.122	Argentina	1995	5	fenol		1.32

63	<i>G. aeruginosus</i>	L. R. Hesler & H. Ford TENN-15085	EUA	1942	5	fenol	1.31
64	<i>G. pholiotoides</i>	J. Deschamps s.n. BAFC-50.203	Argentina	1972	5	fenol	1.379
65	<i>G. imperialis</i>	Rossini s.n. BAFC-50-227	Argentina	1963	5	fenol	1.293
66	<i>G. purpuratus</i>	R. Singer & Lazo PU-42 SGO-92552	Chile	1996	5	fenol	1.185
67	<i>G. hybridus</i>	M. Bon 51112	Francia	1965	5	fenol	1.201
68	<i>G. sp. (fresco)</i>	L. Guzmán-Dávalos 8233 (IBUG)	México	2000	10	fenol	1.548
	repetición				6	CTAB	1.036
	repetición				6	Nucleon	1.348
69	<i>G. luteocarneus</i>	H.D. Thiers 11815 (SFSC) Tipo	EUA	1964	3	fenol	1.218
70	<i>G. praefloccosus</i>	W.A. Murrill F15620	EUA	####	3	fenol	1.495
70	repetición				4	Nucleon	1.819
71	<i>G. aeruginosus</i>	F.M. Brigham s.n. DAOM-137158	Canadá	1971	4	fenol	1.371
72	<i>G. aff. bellulus</i>	Suárez s.n.	Argentina	1990	4	fenol	1.154
73	<i>G. subbellulus</i>	R. Singer M1587 BAFC-50209	México	1957	4	fenol	1.164
73	repetición				4	Nucleon	1.583
74	<i>G. acystidiatus</i>	L. Guzmán-Dávalos 3361 (IBUG) Tipo	Jalisco	1986	4	fenol	1.251
75	<i>G. medius</i>	J. García-Franco s.n. (XAL) Tipo	Veracruz	1990	3	fenol	1.098
76	<i>G. subviridis</i>	M. McKenny s.n. Tipo	EUA	1914	6	fenol	1.068
76	repetición				2	Nucleon	1.289
77	<i>G. microsporus</i>	A. Rocabrana 11736 F-1091130	España	1989	3	fenol	1.232
78	<i>G. bellulus</i>	R. Singer N90 F-1095551	EUA	1953	1	fenol	1.239
79	<i>G. chrysopellus</i>	R. Singer B7258 F-1017956	Ecuador	1973	2	fenol	1.385
80	<i>G. luteoviridis</i>	D.P. Lewis 1520 F-1122411	EUA	1978	2	fenol	1.289
81	<i>G. tuxtlense</i>	C.L. Ovrebo 1182A	Venezuela	1980	3	fenol	1.301

82	<i>G. sp.</i>	E. Horak 6129 (ZT)	Puerto Rico	1996	5	fenol	1.23
83	<i>G. sp.</i>	E. Horak 8046 (ZT)	Jamaica	1999	4	fenol	1.088
84	<i>G. sp.</i>	E. Horak 5759 (ZT)	Puerto Rico	1996	1	fenol	1.231
85	<i>G. subaculeatus</i>	K. P. Dumont et al. 1312 F-1019042	Colombia	1974	4	fenol	1.527
86	<i>G. hispidellus</i>	Prance et al. 21550 F-1037028	Brasil	1974	3	fenol	1.309
87	<i>G. spectabilis</i>	R. Singer B399 F-1095561	Uruguay	1952	5	fenol	1.476
88	<i>G. harmoge</i>	Bartelli 200 F-1116741	USA	1960	5	fenol	1.368
89	<i>G. hispidellus</i>	Standley 53856 F-1112036	Honduras	1928	2	fenol	1.414
90	<i>G. luteoviridis</i>	Lewis 4358 F-1110616		1990	4	fenol	1.564
91	<i>G. crassitunicatus</i>	G. Mueller 4025 F-1098582 Tipo	Costa Rica	1989	2	fenol	1.449
92	<i>G. subearlei</i>	L. Guzmán-Dávalos 7878 (IBUG)	Veracruz	1999		fenol	1.814
93	<i>G. rugulosus</i>	L. Varela 328 (ENCB)	Hidalgo	1978		fenol	0.894
94	<i>G. subpurpuratus</i>	L. Guzmán-Dávalos 4775 (IBUG)	Jalisco	1989		fenol	1710
95	<i>G. cf. spectabilis</i>	G. Guzmán 12334 (ENCB)	Morelos	1975		fenol	1.65
95	repetición				5	Nucleon	1.939
96	<i>G. aff. junonius</i>	R. Valenzuela 670 (ENCB)		1982		fenol	-0.165
97	<i>G. aff. fulvosquamulosus</i>	X. Madrigal 1597 (ENCB)	Campeche	1965		fenol	1.478
98	<i>G. rugulosus</i>	C. Téllez 279 (IBUG)	Jalisco	1985		fenol	1.622
99	<i>G. robustus</i>	C.L. Ovrebo 3125 (USJ)	Costa Rica	1991		fenol	1.387
100	<i>G. junonius</i>	T. Ahti 42093 (H)	Finlandia	1990		fenol	1.324
101	<i>G. lepidotus</i>	G. Guzmán 30602 (XAL)	Veracruz	1991		fenol	1.687
102	<i>G. peliolepis</i>	O. Rölin 89-16 (IBUG)	Suiza	1989		fenol	1.538
103	<i>G. subspectabilis</i>	G. Guzmán 24342 (ENCB)	BCN	1984		fenol	1.072
103	repetición				9	Nucleon	1.589
104	<i>G. picreus</i>	T. Ahti 52192 (H)	Finlandia	1994		fenol	1.677
105	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán-Dávalos 5701 (IBUG)	Jalisco	1992		fenol	1.601

106	<i>G. tuxtense</i>	J. Pérez-Ortiz 636 (ENCB)	Veracruz	1977		fenol	1.29
	repetición					fenol	1.283
	repetición					fenol	1.325
107	<i>G. ventricosus</i>	C.F.B. 122 (PC) Tipo	California, EU	1901	6	Nucleon	1.701
108	<i>G. spectabilis</i>	L. Guzmán- Dávalos 8216 (IBUG)	Bélgica	1999	6	Nucleon	1.816
109	<i>G. spectabilis</i>	L. Guzmán- Dávalos 8206 (IBUG)	Holanda	1999	8	Nucleon	1.953
109	repetición					fenol	1.413
110	<i>G. spectabilis</i>	M. A. Pérez de Gregorio s.n.	España	1999	7	Nucleon	1.55
111	<i>G. junonius</i>	R. Watling s.n.	Reino Unido	1988		Nucleon	1.738
112	<i>G. spectabilis</i>	B. W. Pedersen s.n.	Dinamarca	1999		CTAB	1.631
113	<i>G. robustus</i>	C. L. Ovrebo 3528	Panamá	1997		Nucleon	1.619
114	<i>G. robustus</i>	C. L. Ovrebo 3509	Panamá	1997		Nucleon	1.833
115	<i>G. purpureosquamulosus</i>	L. Ryvarden & K. Høiland G-24 (O- 72839) Tipo	Zimbabwe	1992	4	CTAB	1.823
116	<i>G. ochraceus</i>	L. Ryvarden & K. Høiland G-23 (O- 72838) TIPO	Zimbabwe	1992		Nucleon	1.72
117	<i>G. cf. Flavidellus</i>	J. Murphy 2452 (F-1116344)	EUA	1996	5	Nucleon	1.814
118	<i>G. imperialis</i>	R. Singer B- 14087 (F- 1072131)	Costa Rica	1983	10	CTAB	1.717
119	<i>G. imperialis</i>	Gómez 18197 (F- 1051880)	Costa Rica	1982	8	CTAB	1.569
120	<i>G. rugulosus</i>	C. Mora 22 (INBIO)	Costa Rica	2000	10	Nucleon	1.699
121	<i>G. rugulosus</i>	A. I. Rodríguez s.n. (XAL)	Veracruz	1983		Nucleon	1.88
122	<i>G. validipes</i>	A. H. Smith 87285 (dupl. MICH, probable dupl. ENCB)	EUA	1976		CTAB	1.733
123	<i>G. ventricosus</i>	H. D. Thiers 40227 (SFSC)	EUA	1979	9	Nucleon	1.876
124	<i>G. pacificus</i>	H. D. Thiers 6268 (SFSC)	EUA	1959		Nucleon	1.957
125	<i>G. luteocameus</i>	H. D. Thiers 33314 (SFSC)	EUA	1974	4	Nucleon	1.618
126	<i>G. chrysothrichoides</i>	Earle 270 (NY) Tipo	Cuba	1904	7	CTAB	1.193
127	<i>G. subearlei</i>	Guzmán 11648- A (ENCB) Tipo	Jalisco	1974	10	CTAB	1.598
128	<i>G. palmicola</i>	Singer s.n. (FH)	Oaxaca	1946		Nucleon	1.525

	129	<i>G. subpurpuratus</i>	L. Guzmán-Dávalos 4773 (IBUG) TIPO	Jalisco	1989		Nucleon	1.578
	130	<i>G. subpurpuratus</i>	L. Guzmán-Dávalos 5274 (IBUG)	Jalisco	1991	10	CTAB	1.577
	131	<i>G. maramioides</i>	B. Lowy 375 (BAFC-50-220)	Perú	1958		Nucleon	1.708
	132	<i>G. peliolepis</i>	R. Singer T-2964 (BAFC-50-210)	Argentina		5	CTAB	1.572
	133	<i>G. peliolepis</i>	J. Deschamps s.n. (BAFC-29.292)	Argentina	1980		Nucleon	1.629
	134	<i>G. imperialis</i>	J. Puiggari s.n. (Fungi Puiggariani 66) (S-21865) Tipo	Brasil	1988		Nucleon	1.311
	135	<i>G. peliolepis</i>	J. Puiggari 87 (LPS-18.270) Tipo	Brasil	1989		CTAB	1.311
	136	<i>G. spectabilis</i>	PSMS-meeting (WTU-14863)	EUA	1968	10	Nucleon	1.859
	137	<i>G. junonius</i>	Bing-gang Wei 310 (HMAS 42360)	China	1981	9	Nucleon	1.475
	138	<i>G. validipes</i>	M. A. Vincent 6403 (XAL)	EUA	1993	6	Nucleon	1.822
	139	<i>G. aff. rufopunctatus</i>	G. Guzmán 22945	Brasil	1982		Nucleon	1.655
	140	<i>Pyrhulglosom</i>	L. Guzmán-Dávalos 8075 (IBUG)	Venezuela	1999	8	Nucleon	0.945
	141	<i>G. tuxtense</i>	G. Guzmán 19830 (XAL, dupl. IBUG)	Veracruz	1981	4	Nucleon	1.733
	142	<i>Dermocybe anthracina</i>	L. Guzmán-Dávalos 8191 (IBUG)	Suiza	1999	4	Nucleon	1.495
	143	<i>Dermocybe phoenicea</i>	M. L. Fierros 768 (IBUG)	Jalisco	1994	6	Nucleon	1.696
	144	<i>Galerina autumnalis</i>	L. Guzmán-Dávalos 5246 (IBUG)	Jalisco	1990		Nucleon	1.378
	145	<i>Galerina clavata</i>	L. Guzmán-Dávalos 8227 (IBUG)	Gran Bretaña	1999		Nucleon	1.895
	146	<i>Phaeocollybia</i>	L. Guzmán-Dávalos 2521 (IBUG)	Jalisco	1985	10	Nucleon	1.877
	147	<i>Phaeocollybia</i>	O. Rodríguez 396 (IBUG)	Jalisco	1986	4	Nucleon	1.762
	148	<i>Phaeocollybia</i>	A. Tamayo y R. González-Tamayo 1-A (IBUG)	Jalisco	1984	4	Nucleon	1.816

149	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán-Dávalos 8184 (IBUG)	Francia	1999		Nucleon	1.721
150	<i>G. penetrans</i>	L. Guzmán-Dávalos 8215 (IBUG)	Holanda	1999	6	Nucleon	1.75
	repetición					fenol	1.841
151		L. Guzmán-Dávalos 6248 (IBUG)	Guatemala	1992	9	CTAB	1.499
152	<i>G. medius</i>	J. García-Franco s.n. (XAL)(IBUG-Isotipo)	Veracruz	1990	4	Nucleon	1.542
153	<i>G. navedense</i>	M. L. Fierros 568 (IBUG)	Jalisco	1994	4	Nucleon	1.782
154	<i>G. aeruginosus</i>	Malloch 28	EUA	1963	6	Nucleon	1.827
155	<i>Macrocybe</i>	R. Barba & R. Ramírez-Delgadillo 845 (IBUG)	Jalisco	1999	8	Nucleon	1.743
156	<i>Macrocybe titans</i>	P. Carrillo-Reyes 255 (IBUG)	Jalisco	1997	10	Nucleon	1.875
157	<i>Macrocybe</i>	L. Guzmán-Dávalos 7191 (IBUG)	Jalisco		10	Nucleon	1.836
158	<i>G. sordidostipes</i>	L. Guzmán-Dávalos 4235 (IBUG)	Jalisco	1988	10	Nucleon	1.316
159	<i>Psilocybe cubensis</i>	L. Guzmán-Dávalos 5864 (IBUG)	Jalisco	1994	8	Nucleon	1.84
160	<i>Hypoloma fasciculare</i>	L. Guzmán-Dávalos 3238 (IBUG)	Jalisco	1986	14	Nucleon	1.614
161	<i>G. purpuratus</i>	J. Daams AS-WA-41 (L-0109677)	Australia	1982	8	CTAB	1.49
162	<i>G. purpuratus</i>	H. Reis s.n. (L-0109669)	Alemania	1988	9	CTAB	1.945
163	<i>G. parvulus</i>	W. A. Murrill & W. Harris 952 (dupl-NY)	Jamaica	1909	4	CTAB	1.608
164	<i>G. dryophilus</i>	Murrill s.n. F-716271 (dupl-NY)	EUA	1939	9	CTAB	1.733
165	<i>G. nashii</i>	G. V. Nash 79 (NY) Tipo	Cuba	1903	8	CTAB	1.473
166	<i>G. vindans</i>	W. A. Murrill s.n. 657 (NY) Tipo	EUA	1911	10	CTAB	1.382
167	<i>G. echinuliflorus</i>	W. A. Murrill 939 (NY) Paratipo	EUA	1911	6	CTAB	1.581
168	<i>G. tenuis</i>	Underwood & Earle 1136 (NY) Paratipo	Cuba	1903		CTAB	1.353

	169	<i>G. flavidellus</i>	W. A. Murrill s.n (NY) Tipo	EUA	1911		CTAB	0.576
	170	<i>G. subpenetrans</i>	Earle 526 (NY) TIPO	Cuba	1906	4	CTAB	1.315
	171	<i>G. oregonensis</i>	W. A. Murrill 836 (NY)	EUA	1911		CTAB	1.391
	172	<i>G. subarlei</i>	L. Guzmán-Dávalos 7438 (IBUG) (cepa 1)	Jalisco	1998		Nucleon	
	174	<i>G. sordidostipes</i>	A. H. Smith 55808 (MICH-10992) Tipo	EUA	1956		CTAB	
	175	<i>G. fulvosquamulosus</i>	P. Harding 433 (MICH-42154)	EUA	1950		CTAB	
	176	<i>G. validipes</i>	A. H. Smith 87285 (MICH-42153)	EUA	1976		CTAB	
	177	<i>G. fulvosquamulosus</i>	P. Harding 441 (MICH-42156)	EUA	1951		CTAB	
	178	<i>G. fulvosquamulosus</i>	D. Guravich 220 (MICH-42155)	EUA	1972		CTAB	
	179	<i>G. terrestris</i>	A. H. Smith 40156 (MICH-10996) Tipo	EUA	1952		CTAB	
	180	<i>G. rufescens</i>	A. H. Smith 56468 (MICH-10990) Tipo	EUA	1956		CTAB	
	181	<i>G. bellulus</i>	A. H. Smith 56924 (MICH-42157)	EUA	1956		CTAB	
	182	<i>G. subspectabilis</i>	A. H. Smith 64755 (MICH-10995) Tipo	EUA	1961		CTAB	
	183	<i>G. bellulus</i>	A. H. Smith 56507 (MICH-42158)	EUA	1956		CTAB	
	184	<i>G. subspectabilis</i>	A. H. Smith 68785 (MICH-42161)	EUA		9	CTAB	
	185	<i>G. fulvosquamulosus</i>	A. H. Smith 72586 (MICH-10984) TIPO	EUA	1965		CTAB	
	186	<i>G. subspectabilis</i>	H. D. Thiers 21275 (dupl. SFSC)(MICH-42160)	EUA	1967	10	CTAB	
	187	<i>G. subtropicus</i>	Bessey 497 (MICH-42152)	EUA	1940		CTAB	
	188	<i>G. bellulus</i>	A. H. Smith & H. E. Bigelow 47324 (MICH-42159)	EUA	1956		CTAB	
	189	<i>G. junonius</i>	M. Korhonen 12858 (H)	Finlandia	1999	10	CTAB	
	190	<i>G. penetrans</i>	U. Nummela-Salo & P. Salo 3405 (H)	Finlandia	1996		CTAB	