

**Informe final\* del Proyecto HB028**  
**Códigos de barras de hongos ectomicorrízicos de localidades selectas del neotrópico mexicano**

**Responsable:** Dr. Roberto Garibay Orijel  
**Institución:** Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biología  
Departamento de Botánica  
Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas  
**Dirección:** Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. C.P. 04510  
**Correo electrónico:** [rgaribay@ibunam2.ibiologia.unam.mx](mailto:rgaribay@ibunam2.ibiologia.unam.mx)  
**Teléfono, fax** 5622 8222 ext. 47836, fax: 55501760  
**Fecha de inicio:** Agosto 31, 2009  
**Fecha de término:** Abril 17, 2013  
**Principales resultados:** Códigos de barras, base de datos, fotografías, informe final.  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Garibay-Orijel, R. 2014. Códigos de barras de hongos ectomicorrízicos de localidades selectas del neotrópico mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto HB028.** México, D.F.

**Resumen:**

Los hongos ectomicorrízicos se asocian principalmente con los árboles de bosques templados, especialmente con los géneros *Pinus*, *Quercus*, *Fagus*, *Populus*, *Arbutus* y *Abies*. En las ectomicorrizas se da una activa transferencia de agua y nutrientes como fósforo y nitrógeno hacia la planta quien, a cambio, otorga al hongo carbohidratos resultado de la fotosíntesis. Como resultado, la presencia de los hongos en las raíces permite que los árboles tengan mayor crecimiento y productividad, tengan menos estrés hídrico y sean más resistentes a parásitos y cambios climáticos. Contrariamente a su importancia forestal, en nuestro país el conocimiento sobre este grupo es limitado. El responsable técnico ha estudiado la diversidad y ecología de estos hongos durante los últimos 10 años, particularmente en el neotrópico (Garibay-Orijel, 2006; Garibay-Orijel et al., en prensa a y b). Durante este tiempo ha constituido una colección considerable de hongos ectomicorrízicos cuyos ejemplares voucher están acompañados de fotografías digitales y geo-referenciación. Ya que se trata de ejemplares relativamente recientes y gracias al método de preservación, el DNA de los ejemplares está suficientemente conservado y es susceptible de ser secuenciado. En los últimos 2 años, hemos realizado estudios sobre la ecología molecular de las micorrizas de la cuenca de Cuitzeo, Michoacán como resultado de un par de estancias posdoctorales en la UC Berkeley y en el CIECO de la UNAM, ambas en laboratorios de genética y biología molecular. El entrenamiento recibido nos ha permitido desarrollar un conjunto de técnicas de extracción de ADN, amplificación y secuenciación que permiten generar un considerable número de secuencias con una relación de tiempo-costo muy favorable. Con estas técnicas hemos producido más de mil secuencias de micorrizas (Garibay-Orijel et al., 2008).

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

# **Informe final del proyecto HB028 “Códigos de barras de hongos ectomicorrízicos de localidades selectas del neotrópico mexicano”**

Dr. Roberto Garibay Orijel

## **Resumen**

México es un país megadiverso, sin embargo mucha de su diversidad es aun desconocida. Se ha estimado que en el país existen 200000 especies de hongos de las cuales no se han descrito mas del 4%. Esta falta de conocimiento sobre nuestra diversidad fúngica está relacionada con escaso número de micólogos taxónomos en el país. La situación es aun mas complicada si se considera que mucho del conocimiento taxonómico está disperso en fuentes de literatura no disponibles para la población en general. Los códigos de barras de la vida son un herramienta nueva que promete contribuir substancialmente al descubrimiento de nuevas especies, la masificación del conocimiento taxonómico y, por lo tanto, incrementar la capacidad de la sociedad para usar su biodiversidad. En este proyecto nos planteamos como objetivo producir códigos de barras de hongos ectomicorrízicos del neotrópico mexicano. Para esto se integró la identificación taxonómica de las especies, su fotografía, sus datos de recolecta y la secuencia de ADN de la región de los interespaciadores ribosomales en una base datos pública. En total produjimos 731 códigos de barras de 368 especies.

## **Introducción**

Conocer la diversidad de los hongos es un reto, que por su naturaleza, representa un desafío de mayores dimensiones que la diversidad de plantas y animales. En principio, se estima que existen entre 1.5 y 5 millones de especies de hongos (Hawksworth, 1991; O’Brien et al., 2005). De estas, sólo han sido descritas cerca de 99500 (Kirk et al., 2008). Adicionalmente, los hongos son organismos microscópicos de los cuales sólo alrededor del 23% produce alguna estructura macroscópica. Por lo tanto, el reto es mayor pues la gran mayoría no son visibles a simple vista. La cualidad de sus ciclos de vida de tener fases macro y microscópicas tiene una enorme relevancia en nuestra capacidad de muestrearlos, preservarlos y mantenerlos en colecciones científicas. En general, sólo aquellos con esporomas macroscópicos pueden coleccionarse en herbarios. En contraste, aquellos que siempre presentan fases microscópicas se preservan en ceparios y sus ejemplares voucher suelen ser dibujos o preparaciones fijas de las cuales no se puede extraer ADN. Sólo una fracción muy pequeña de los hongos microscópicos se puede cultivar por sus requerimientos metabólicos o por que son simbioses obligados de plantas y animales. Por ejemplo, la colección de cepas mas importante del mundo, la “National Fungus Collection” del Departamento de Agricultura de los EEUU contiene 1,100,000 colecciones de 12,500 taxa incluyendo especies y variedades, es decir ni el 10% de las especies conocidas. En Latinoamérica este panorama es muy lejano pues sólo se conservan alrededor de 400 cepas nativas de hongos cultivables (Martínez-Carrera, 2002). En general se estima que en México se mantienen alrededor de 1000 cepas de hongos en 10 instituciones (Guzmán, 1994). Estos materiales

serían fuentes muy adecuadas de ADN y las colecciones que las mantiene se beneficiarían substancialmente al generar sus códigos de barras y caracterizarlas genéticamente.

En México, se han reportado aproximadamente 2000 especies de hongos microscópicos, incluyendo mohos, levaduras y parásitos. De estos, aproximadamente 1500 se han reportado de plantas, 140 son saprobios del suelo y otros substratos, 100 son parásitos de granos, 70 se han encontrado en bebidas tradicionales, 60 parásitos de plantas y animales. Se han reportado también 4800 especies de macromicetos, divididas en 2400 ascomicetos (incluyendo 1800 líquenes), 2200 basidiomicetos y 200 mixomicetos. Es decir, se han reportado aproximadamente 7000 especies de hongos de las 200,000 que se estima hay en el país (Guzmán, 1998). En el país hay alrededor de diez instituciones en donde se realizan estudios concernientes a la sistemática de los hongos y no existen mas de 30 especialistas. Aproximadamente 20 instituciones mantienen en sus colecciones aproximadamente 220,000 especímenes de macromicetos deshidratados, de las cuales ENCB y XAL contienen aproximadamente el 60% y FCME, IBUG, ITCV, MEXU, TLAX y HEIMI el 35% (Guzmán, 1994).

El conocimiento de la diversidad de los hongos en México es muy heterogéneo en cuanto a su distribución. El estado mejor estudiado es Veracruz, en donde se han reportado 1400 especies de macromicetos, el 29% de los reportados para el país (Guzmán, 1998). Le siguen los estados de Oaxaca, Jalisco y Michoacán y el Estado de México (Frutis y Valenzuela, 2009). Los estados menos recolectados son los del Noroeste (Baja California Norte y Sur, Sonora, Sinaloa y Durango), así como los de la península de Yucatán.

La sociedad mexicana no logrará incorporar a los hongos a su desarrollo económico ni los aprovechará sustentablemente sino hasta que conozca con qué recursos cuenta y cómo puede diferenciarlos. Se ha estimado que, a nivel mundial, con la tasa actual de descubrimiento de especies de hongos nos tardaremos mas de cien años para caracterizar su diversidad (Hawksworth, 1991). Es evidente que la desaparición del hábitat y la extinción son mas aceleradas que esto. Por lo tanto es necesario crear estrategias que permitan al mismo tiempo acelerar el descubrimiento de las especies y la masificación del conocimiento taxonómico. Los códigos de barras de la vida han sido propuestos como una de las alternativas de solución a este problema. Este concepto asume que las todas las especies del planeta tienen una huella genética única y que una sola región del ADN se puede usar para diferenciarlas (Hebert et al., 2003). Originalmente se planteó que la citocromo oxidasa (COI1) serviría como marcador universal, posteriormente se llegó al consenso que para las plantas dos fragmentos del cloroplasto brindaban mejor resolución (rbcL y matK) (Hollingsworth et al., 2009).

## **Antecedentes**

En lo que respecta a la generación de códigos de barras hongos es muy importante mencionar este grupo es el que mayor dificultad generó para encontrar un marcador que fuera útil para todo el reino (Begerow et al., 2010). Por lo tanto, aunque existe un proyecto internacional sobre el tema, este aun no ha comenzado oficialmente. Los marcadores que se propusieron como candidatos para establecer el

código de barras fueron principalmente la región del ITS (Nilsson et al., 2006; Nilsson et al., 2009; Bellemain et al., 2010; Seena et al., 2010; Stockinger et al., 2010; Kelly et al., 2011) y la del COX1 (Xiang y Hickey, 2007; Chen et al., 2009; Gilmore et al., 2009; Santamaria et al., 2009; Vialle et al., 2009). Recientemente se publicó que el mejor marcador para los hongos es la región de los interespaciadores del ADN ribosomal (ITS) (Schoch et al., 2012).

El “Consortium for Barcoding of Life” CBOL es un organismo conformado por muchas instituciones de diferentes países y en él se consensan los procedimientos y políticas del proyecto “International Barcoding of Life”. Toda la información de este proyecto está disponible al público en la base de datos BOLD ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)).

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Generar el código de barras para un aproximado de 1000 ejemplares voucher de hongos ectomicorrízicos del neotrópico mexicano y con ello proporcionar una herramienta de identificación taxonómica para este grupo de organismos con tan pocos expertos a nivel nacional y mundial.

### ***Objetivos particulares***

Generar una base de datos con la información taxonómica, geográfica y fotográfica de la colección.

Extraer el DNA de todos los ejemplares voucher.

Generar una colección de DNA de respaldo.

Amplificar la región del ITS para todos los ejemplares.

Enviar a secuenciar los productos de PCR de aquellos materiales que hayan amplificado adecuadamente.

Incorporar a las bases de datos de CONABIO y BOLD los registros completos.

Incorporar todos los ejemplares a la colección de hongos del MEXU

## **Métodos**

En total procesamos 895 ejemplares voucher. Tuvimos un factor de éxito de secuenciación de 81.7% por lo que generamos 731 códigos de barras. Originalmente se consideró procesar aproximadamente 300 especies, generando alrededor de 3 secuencias por especie. Este tamaño de muestra está plenamente justificado pues las zonas de recolecta (eje Neovolcánico, Michoacán y Estado de México) constituyen apenas una fracción de la distribución geográfica de la mayoría de las especies de las que existen muy pocos o nulos registros en la base de datos BOLD.

El proceso de extracción, amplificación y secuenciación siguió el protocolo de Kennedy et al. (2011) con algunas modificaciones.

El ADN se extrajo con el producto XNAP (Signal-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA) que permite extraer en unas horas hasta 100 muestras a un costo razonable. Este método tiene considerables ventajas y es

particularmente eficiente con muestras de macromicetos pues permite extraer el ADN de un hongo de una muestra muy pequeña. Gracias a esto, no hay destrucción de los ejemplares. Adicionalmente los ejemplares de hongos comúnmente están contaminados con larvas de insectos y otros hongos parásitos. Cuando se realiza una extracción tradicional de ADN (usando mucho tejido) este ADN contaminante suele causar problemas durante la PCR. Al usar el método propuesto, es posible seleccionar una fracción muy pequeña de tejido limpio. Otra ventaja es que dado que este método es muy simple y no contiene pasos de centrifugación y decantación, la posibilidad de error es prácticamente cero, por lo aproximadamente el 100% de las extracciones resultan exitosas. Aunque los reactivos empleados son considerablemente más caros que los usados en la extracción común de cloroformo y/o CTAB, la relación costo beneficio es mejor. Posteriormente el código de barras de los hongos se realizó con la región de ADN de los inter espaciadores ribosomales (ITS1-5.8S-ITS2) pues esta región proporciona suficiente poder de resolución para diferenciar las muestras a nivel de especie y además es la más representada en las bases de datos genéticas para este tipo de muestras (Horton y Bruns, 2001). Estas regiones se amplificaron con los iniciadores específicos ITS1F, ITS4 o ITS4B (Gardes y Bruns, 1993). El éxito de la amplificación se revisó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.0%. Los geles se revelaron con Syber Green (Invitrogen). Aunque este pigmento es más caro del bromuro de etidio (usado comúnmente) no es tan dañino a la salud ni tan contaminante por lo que no se expone la salud de quién procesa las muestras y la disposición final de los geles no resulta tan cara pues no requiere de un tratamiento muy especializado.

Los fragmentos amplificados de tamaño adecuado y no contaminados se limpiaron con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA). Este protocolo es mucho más simple que la limpieza por columnas, deja menos posibilidad de error y es igualmente eficiente, de hecho requiere de menor volumen de reacción.

Los fragmentos de PCR limpios se sometieron a la reacción de secuenciación con Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes.

Las muestras se procesaron inicialmente en el Instituto de Biología de la UNAM y posteriormente los fragmentos amplificados y limpios se enviaron a secuenciar al Instituto de la Biodiversidad de Ontario (BIO) de la Universidad de Guelph.

Los ejemplares forman parte de la colección de hongos ectomicorrízicos del laboratorio de sistemática y ecología de micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM. Una vez procesados se incorporaron a la colección de hongos del herbario MEXU.

Los especímenes se determinaron en el laboratorio, donde observamos y medimos sus características microscópicas (Largent et al., 1984). Para su identificación se usaron claves y monografías especializadas como las de Grund y Harrison (1976), Bigelow (1978), Hesler y Smith (1979), Petersen (1979), Singer et al. (1983 ;1990), Jenkins (1986), Bon (1988), Riva (1988), Methven (1990), Abbott y Currah (1997) y Bessette et al. (2000), entre otras.

Adicionalmente se contrastó la identificación taxonómica convencional con las relaciones filogenéticas de las secuencia de ADN.

Todos los registros incluyendo los datos del espécimen, las secuencias, fotografías del ejemplar voucher y los electroferogramas originales se incorporaron a la base de datos BOLD.

## Resultados

Se procesaron molecularmente 895 recolectas de hongos ectomicorrízicos. Se obtuvieron códigos de barras para 731 especímenes correspondientes con 368 especies (Tabla 1). Las especies de las que se obtuvieron mas códigos de barras fueron *Rhizopogon fallax*, *Laccaria trichodermophora*, *Boletus edulis* s.l., *Morchella elata* s.l., *Tuber separans* s.l., *Amanita novinupta*, *Helvella* c.f. *lacunosa*, *Laccaria laccata*, *Lactarius* c.f. *sanguifluus*, *Sistotrema confluens*, *Amanita calyptroderma* y *Gyromitra infula*.

Tabla 1. Número de códigos de barras obtenidos por especie.

Especie	Códigos de barras		
<i>Rhizopogon fallax</i>	19	<i>Amanita</i> sp. 3	4
<i>Laccaria trichodermophora</i>	17	<i>Boletus</i> sp. 2	4
<i>Boletus edulis</i> s.l.	12	<i>Clavariadelphus</i> sp. 1	4
<i>Morchella elata</i> s.l.	11	<i>Guepinia helvelloides</i>	4
<i>Tuber separans</i> s.l.	11	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	4
<i>Amanita novinupta</i>	10	<i>Hysterangium</i> sp. 2	4
<i>Helvella</i> cf. <i>lacunosa</i>	9	<i>Infundibulicybe</i> sp. 1	4
<i>Laccaria laccata</i>	9	<i>Lycoperdon excipuliformis</i>	4
<i>Lactarius</i> cf. <i>sanguifluus</i>	9	<i>Psathyrella spadicea</i>	4
<i>Sistotrema confluens</i>	8	<i>Ramaria</i> aff. <i>rubribrunnescens</i>	4
<i>Amanita calyptroderma</i>	7	<i>Ramaria</i> sp. 8	4
<i>Gyromitra infula</i>	7	<i>Russula americana</i>	4
<i>Gymnopus dryophilus</i>	6	<i>Russula variata</i>	4
<i>Laccaria vinaceobrunnea</i>	6	<i>Tremellodendron schweinitzii</i>	4
<i>Lactarius chrysorrheus</i>	6	<i>Amanita</i> aff. <i>flavipes</i>	3
<i>Lycoperdon perlatum</i>	6	<i>Amanita tuza</i>	3
<i>Russula</i> cf. <i>chloroides</i>	6	<i>Boletus</i> aff. <i>erythropus</i>	3
<i>Russula</i> sp. 1	6	<i>Boletus</i> cf. <i>aereus</i>	3
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	6	<i>Boletus</i> sp. 1	3
<i>Agaricus</i> cf. <i>subrutilescens</i>	5	<i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>	3
<i>Boletus</i> aff. <i>luridiformis</i>	5	<i>Clavulina</i> sp. 2	3
<i>Infundibulicybe gibba</i>	5	<i>Coltricia confluens</i>	3
<i>Ramaria</i> sp.	5	<i>Gomphus</i> sp. 2	3
<i>Rhizopogon evadens</i>	5	<i>Gomphus</i> sp. 3	3
<i>Rhizopogon pseudorozeolus</i>	5	<i>Gymnomyces</i> aff. <i>xerophilus</i>	3
<i>Sarcodon</i> sp. 1	5	<i>Hydnотrya cerebriformis</i>	3
<i>Sarcosphaera</i> sp. 1	5	<i>Hysterangium</i> sp. 1	3
<i>Tremellodendron pallidum</i>	5	<i>Laccaria</i> aff. <i>vinaceobrunnea</i>	3
<i>Amanita flavoconia</i>	4	<i>Laccaria amethystina</i>	3
<i>Amanita muscaria</i> var. <i>flavivolvata</i>	4	<i>Laccaria</i> sp. 2	3
		<i>Lactarius luculentus</i>	3
		<i>Lyophyllum decastes</i>	3

Lyophyllum shimeji	3
Melanoleuca melaleuca	3
Morchella sp. 1	3
Ramaria abietina	3
Ramaria apiculata	3
Ramaria aurantiisiccescens	3
Ramaria sp. 6	3
Ramaria sp. 7	3
Russula aff. betularum	3
Russula xerampelina	3
Suillus sp.	3
Thelephora terrestris	3
Tricholoma aff. populinum	3
Tricholoma saponaceum	3
Albatrellus subrubescens	2
Aleuria aurantia	2
Amanita multisquamosa	2
Amanita sp.	2
Amanita sp. 1	2
Amanita sp. 7	2
Astraeus hygrometricus	2
Boletellus projectellus	2
Boletus luridus	2
Boletus projectellus	2
Cantharellus cf. cibarius	2
Cantharellus cf. subalbidus	2
Cantharellus cibarius	2
Cantharellus subalbidus	2
Clavulina cf. rugosa	2
Clavulina sp. 1	2
Coltricia sp. 1	2
Elaphomyces sp. 1	2
Endogone sp.	2
Flammulina mexicana	2
Gastrum aff. fimbriatum	2
Gomphus sp. 1	2
Helvella albella	2
Helvella lacunosa	2
Inocybe sp. 2	2
Laccaria sp. 1	2
Lactarius aff. uvidus	2
Lactarius cf. indigo	2
Lactarius deterrimus	2
Lactarius indigo	2
Lactarius salmonicolor	2
Lactarius scrobiculatus	2
Pseudohydnum sp.	2
Ramaria aurea	2
Ramaria cf. abietina	2
Ramaria cf. rubribrunnescens	2
Ramaria sanguinea	2
Ramaria sp. 1	2
Ramaria sp. 2	2

Ramaria sp. 3	2
Ramaria sp. 4	2
Ramaria sp. 5	2
Rhizopogon aff. fallax	2
Rhizopogon aff. succosus	2
Rhizopogon guzmanii	2
Rhodocollybia butyracea	2
Russula aff. cremoricolor	2
Russula albonigra	2
Russula brevipes complex sp. 1	2
Russula sp.	2
Schenella simplex	2
Scleroderma areolatum	2
Sebacina sp. 1	2
Thelephora cf. anthocephala	2
Thelephora sp. 1	2
Thelephora sp. 6	2
Tomentella aff. pilosa	2
Tomentella atramentaria	2
Tomentella sp. 1	2
Tricholoma aff. equestre	2
Tricholoma equestre	2
Tuber sp. 1	2
Tuber sp. 2	2
Agaricus augustus	1
Agaricus cf. nivescens	1
Agaricus moelleri	1
Agaricus pseudopratinensis	1
Agaricus sp.	1
Agaricus sp. 1	1
Albatrellus cf. ellisii	1
Albatrellus cf. flettii	1
Albatrellus sp. 1	1
Amanita aff. albocreata	1
Amanita aff. velosa	1
Amanita aff. virosa	1
Amanita atkinsoniana	1
Amanita caesarea	1
Amanita caesarea s.l.	1
Amanita cokeri	1
Amanita gemmata	1
Amanita jacksonii	1
Amanita pachycolea	1
Amanita pantherina	1
Amanita rubescens	1
Amanita sp. 4	1
Amanita sp. 5	1
Amanita sp. 6	1
Amanita verna	1
Amanita xylinvolve	1
Amphinema sp.	1
Ampulloclitocybe clavipes	1
Armillaria aff. luteovirens	1

Boletus pinophilus	1
Boletus sp. 3	1
Boletus sp. 4	1
Boletus sp. 5	1
Bovista aff. graveolens	1
Chroogomphus jamaicensis	1
Chroogomphus sp. 1	1
Chroogomphus sp. 2	1
Clavariadelphus pistillaris	1
Clavariadelphus subfastigiatus	1
Clavariadelphus truncatus	1
Clavulina cinerea	1
Clavulina sp. 3	1
Clavulina sp. 4	1
Clavulina sp. 5	1
Climacocystis borealis	1
Clitocybe squamulosa	1
Coltricia sp.	1
Coltricia sp. 2	1
Cortinarius illibatus	1
Cortinarius sp.	1
Cortinarius sp. 1	1
Cortinarius sp. 2	1
Dermocybe cf. semisanguinea	1
Dermocybe semisanguinea	1
Elaphomyces aff. decipiens	1
Endogone sp. 1	1
Entoloma aff. sinuatum	1
Gautieria sp. 1	1
Gautieria sp. 2	1
Gautieria sp. 3	1
Geastrum sp. 1	1
Genea aff. arenaria	1
Gomphus sp.	1
Gymnomyces fallax	1
Gyromitra cf. infula	1
Helvella cf. elastica	1
Helvella chinensis	1
Helvella compressa	1
Helvella crispa	1
Helvella maculata	1
Helvella sp. 1	1
Helvella sp. 2	1
Helvella sp. 3	1
Humaria hemisphaerica	1
Humaria sp. 1	1
Hydnellum aff. suaveolens	1
Hydnellum caeruleum	1
Hydnellum concrescens	1
Hydnellum geogenium	1
Hydnellum sp. 1	1
Hydnellum sp. 2	1
Hydnopolyporus sp.	1

Hydnum aff. rufescens	1
Hydnum albomagnum	1
Hydnum sp. 1	1
Hydnum sp. 2	1
Hydnum sp. 3	1
Hydnum sp. 4	1
Hygrophorus aff. pudorinus	1
Hygrophorus aff. russula	1
Hygrophorus chrysodon	1
Hygrophorus sp.	1
Hypsizygus marmoreus	1
Hysterangium sp.	1
Hysterangium sp. 3	1
Inocybe geophylla	1
Inocybe mixtilis	1
Inocybe sp.	1
Inocybe sp. 1	1
Inonotus tomentosus	1
Laccaria aff. bicolor	1
Laccaria aff. trichodermophora	1
Laccaria sp. 3	1
Lacrymaria velutina	1
Lactarius aff. deceptivus	1
Lactarius aff. pubescens	1
Lactarius aff. yazooensis	1
Lactarius fuscomarginatus	1
Lactarius miniatosporus	1
Lactarius resimus	1
Lactarius sp. 1	1
Lactarius sp. 2	1
Lactarius volemus	1
Leccinum sp. 1	1
Lepista nuda	1
Leucogaster sp. 1	1
Lycoperdon ericaeum	1
Lycoperdon nigrescens	1
Lycoperdon sp. 1	1
Lyophyllum fumosum	1
Marasmius sp. 1	1
Melanogaster sp. 1	1
Morchella sp.	1
Otidea cf. bufonia	1
Pachyphloeus aff. carneus	1
Pachyphloeus carneus	1
Peziza limnaea	1
Phaeocollybia redheadii	1
Phellodon sp. 1	1
Phellodon sp. 2	1
Pholiota castanea	1
Pseudocraterellus sp.	1
Radiigera sp. 1	1
Ramaria aff. apiculata	1
Ramaria aff. cyaneigranosa	1



Ramaria aff. formosa	1
Ramaria aff. rubripermanens	1
Ramaria aff. sanguinea	1
Ramaria aff. thiersii	1
Ramaria gracilis	1
Ramaria rubribrunnescens	1
Ramaria rubripermanens	1
Ramaria sp. 10	1
Ramaria sp. 11	1
Ramaria sp. 12	1
Ramaria sp. 13	1
Ramaria sp. 14	1
Ramaria sp. 15	1
Ramaria sp. 16	1
Ramaria sp. 17	1
Ramaria sp. 9	1
Ramaria stricta	1
Rhizopogon fusciorubens	1
Rhizopogon salebrosus s.l.	1
Russula aff. brevipes	1
Russula aff. cyanoxantha	1
Russula aff. flavisiccans	1
Russula aff. illota	1
Russula aff. parazurea	1
Russula aff. perlactea	1
Russula aff. silvicola	1
Russula brevipes complex sp. 2	1
Russula cf. densifolia	1
Russula cyanoxantha	1
Russula emetica	1
Russula flavida	1
Russula laurocerasi	1
Russula sp. 3	1
Russula sp. 6	1
Russula sp. 7	1
Russula sp. 8	1
Russula virescens	1
Sarcodon scabrosus	1
Schenella sp. 1	1
Scleroderma sp. 1	1
Scutellinia aff. colensoi	1
Sebacina aff. incrustans	1
Sebacina sp. 2	1
Sebacina sp. 3	1
Sepedonium sp.	1
Sistotrema sp.	1

NCB: Número de códigos de barras.

Sparassis crispa	1
Strobilomyces floccopus	1
Strobilomyces sp. 1	1
Suillus bovinus	1
Suillus pungens	1
Suillus sp. 1	1
Suillus subluteus	1
Tarzetta sp. 1	1
Thanatephorus sp. 1	1
Thelephora caryophyllea	1
Thelephora sp. 2	1
Thelephora sp. 3	1
Thelephora sp. 4	1
Thelephora sp. 5	1
Thelephora sp. 7	1
Thelephora sp. 8	1
Tomentella ellisii	1
Tomentella sp.	1
Tomentella sp. 10	1
Tomentella sp. 11	1
Tomentella sp. 2	1
Tomentella sp. 3	1
Tomentella sp. 4	1
Tomentella sp. 5	1
Tomentella sp. 6	1
Tomentella sp. 7	1
Tomentella sp. 8	1
Tomentella sp. 9	1
Tomentella stuposa	1
Tomentellopsis aff. zygoesmoides	1
Trametopsis cervina	1
Tremellodendron sp. 1	1
Tricholoma caligatum	1
Tricholoma focale	1
Tricholoma imbricatum	1
Tricholoma moseri	1
Tricholoma sp.	1
Tricholoma sp. 1	1
Tricholomopsis rutilans	1
Tuber sp. 3	1
Tylopilus porphyrosporus	1
Wilcoxina sp. 1	1
Xerocomus sp. 1	1
Xerocomus sp. 2	1

Las mayoría de los códigos de barras pertenecen al phylum Basidiomycota con 643 registros, le siguen los Ascomycota con 85 registros y 3 Zigomycota. Se trata de 643 Agaricomycetes, 81 Pezizomycetes, 3 Eurotiomycetes, 3 Mucoromycotina y 1 Sordariomycete. Se obtuvieron códigos de

barras para 18 órdenes, los mejor representados fueron los Agaricales, Boletales, Russulales, Gomphales y Pezizales (Tabla 2). Se obtuvieron códigos de barras para 54 familias, las mejor representadas fueron Russulaceae, Tricholomataceae, Gomphaceae, Amanitaceae, Thelephoraceae, Boletaceae y Rhizopogonaceae (Tabla 3).

Tabla 2. Número de códigos de barras por orden.

Orden	NCB
Agaricales	207
Boletales	110
Russulales	100
Gomphales	84
Pezizales	81
Thelephorales	50
Cantharellales	30
Sebacinales	15
Corticiales	10

NCB: Número de códigos de barras.

Hysterangiales	9
Hymenochaetales	8
Geastrales	7
Auriculariales	6
Polyporales	4
Atheliales	3
Endogonales	3
Eurotiales	3
Hypocreales	1

Tabla 3. Códigos de barras por familia.

Familia	NCB
Russulaceae	95
Tricholomataceae	86
Gomphaceae	74
Amanitaceae	60
Thelephoraceae	48
Boletaceae	46
Rhizopogonaceae	37
Helvellaceae	21
Tuberaceae	16
Morchellaceae	15
Sebacinaceae	15
Clavulinaceae	14
Lycoperdaceae	14
Suillaceae	13
Agaricaceae	12
Discinaceae	11
Corticaceae	9
Hysterangiaceae	9
Pezizaceae	9
Pyronemataceae	9
Cantharellaceae	8
Hymenochaetaceae	8
Lyophyllaceae	8
Clavariadelphaceae	7
Cortinariaceae	7
Geastraceae	7
Hydnaceae	6

NCB: Número de códigos de barras.

Inocybaceae	6
Albatrellaceae	5
Exidiaceae	4
Hygrophoraceae	4
Hygrophoropsidaceae	4
Psathyrellaceae	4
Elaphomycetaceae	3
Endogonaceae	3
Gautieriaceae	3
Gomphidiaceae	3
Physalacriaceae	3
Sclerodermataceae	3
Astraeaceae	2
Atheliaceae	2
Bankeraceae	2
Hapalopilaceae	2
Hyaloriaceae	2
Cantharellales_family_incertae_sedis	1
Ceratobasidiaceae	1
Entolomataceae	1
Hypocreaceae	1
Leucogastraceae	1
Marasmiaceae	1
Melanogastraceae	1
Meripilaceae	1
Sparassidaceae	1
Strophariaceae	1

Para generar códigos de barras las secuencias deben ser de calidad y respaldadas por sus correspondientes electroferogramas. Las secuencias que integran nuestros códigos de barras cumplen con éstos parámetros, el 93.6% tiene menos de 1% de bases ambiguas (Figura 1).

Quality Stats					
Sequence Quality Stats					
	High ( <b>&lt;1% Ns</b> )	Medium ( <b>&lt;2% Ns</b> )	Low ( <b>&lt;4% Ns</b> )	Unreliable ( <b>&gt;4% Ns</b> )	
ITS	93.58	5.19	0.96	0.27	
Trace Quality Stats					
	High(%)	Medium(%)	Low(%)	Failed(%)	Total
ITS	58.77	8.44	6.09	26.7	2251

Figura 1. Calidad de las secuencias impreso del sistema BOLD.

Otro aspecto importante para que las secuencias sean consideradas adecuadas para integrar códigos de barras es su número de pares de bases, pues esto determina el grado de confianza al realizar un análisis de similitud genética. Para el ITS se considera que un largo de mas de 450 pares de bases otorga suficiente resolución para identificar a nivel de especie. Nuestras secuencias tuvieron un largo promedio de 646 pares de bases con un mínimo de 147, un máximo de 1197 y una desviación estándar de 103.91 pares de bases (Figura 2a). Su distribución de frecuencias demuestra que tuvieron una distribución normal y que la gran mayoría está en un rango de largo que las hace adecuadas para códigos de barras (Figura 2b).

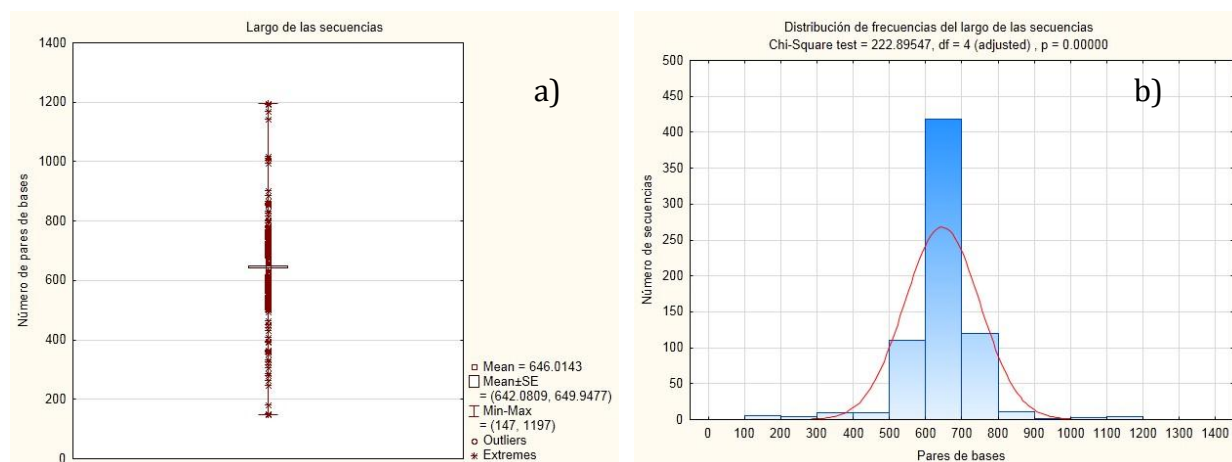


Figura 2. a) Diagrama de caja del largo de las secuencias, b) Distribución de frecuencias de las secuencias.

Los ejemplares para los que se produjeron los códigos de barras generados se recolectaron en ocho estados, siendo el mejor representado el Estado de México con 511, seguido por Michoacán con 103, Tlaxcala con 38, Veracruz con 22, Puebla con 19, Distrito federal con 17, Jalisco con 13 y Morelos

Oaxaca con cada uno 3. Los ejemplares provienen de 38 municipios, siendo los mejor representados Temascaltepec, Amanalco, Zinacantepec y Morelia (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplares con códigos de barras por municipio.

Municipio	NCB		
TEMASCALTEPEC	145	AMECAMECA	7
AMANALCO	133	TENANGO DEL VALLE	7
ZINACANTEPEC	122	CHALCHICOMULA DE SESMA	6
MORELIA	49	SAN FELIPE DEL PROGRESO	6
COATEPEC HARINAS	29	SAN NICOLAS DE LOS RANCHOS	6
TLALMANALCO	21	TEXHUACAN	6
SAN SIMON DE GUERRERO	19	SOLTEPEC	5
HUAMANTLA	17	SAN JOSE DEL RINCON	4
TLALPAN	17	TOLUCA	4
TUXPAN	15	ZINAPECUARO	4
TANGANCICUARO	14	HUITZILAC	3
HIDALGO	12	VALLE DE BRAVO	3
ATLAUTLA	11	ACAJETE	2
EL CARMEN	10	MARIANO ESCOBEDO	2
TEQUEXQUITLA		SAN JOSE TEACALCO	2
HUIRAMBA	10	IXTLAN DE JUAREZ	1
LA PERLA	10	MARAVATIO	1
QUERENDARO	9	TANETZE DE ZARAGOZA	1
SAN FRANCISCO TETLANOHCAN	9	VILLA TALEA DE CASTRO	1
LOS REYES	8		

NCB: Número de códigos de barras.

Se recolectaron los hongos en un total de 92 localidades distribuidas en el neotrópico mexicano, particularmente en el Eje Neovolcánico Transversal (Figura 3).

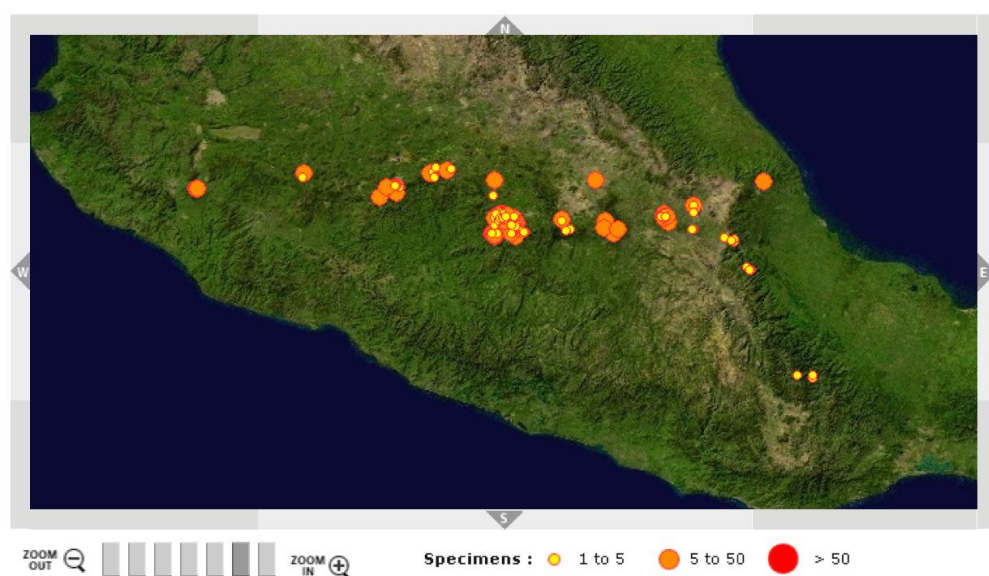


Figura 3. Localidades de los materiales recolectados para los que se produjeron códigos de barras.

## **Anexos**

Anexo 1. Base de datos con la información taxonómica y de recolecta de los 895 ejemplares de hongos procesados.

Anexo 2. Fotografías de 783 de los ejemplares procesados.

## **Discusión**

El presente proyecto tenía como objetivo procesar 1000 ejemplares para generar sus códigos de barras. Procesamos 895 ejemplares, es decir un 89.5%. Este objetivo no se cumplió en su totalidad pues originalmente se planteaba también incluir materiales recolectados en Oaxaca de 2000 a 2003, las pruebas nos demostraron que estos materiales, por su edad, no tenían un éxito de secuenciación satisfactorio por lo que se decidió solo trabajar con ejemplares mas recientes, muchos de los cuales los tuvimos que recolectar con fondos concurrentes. El factor de éxito del proyecto, es decir el porcentaje de materiales satisfactoriamente secuenciados fue de 81.7%; incluso fue mayor al 75% planteado en el protocolo. El 18.3% de los materiales procesados no se pudo secuenciar, esto se debió a dos razones. Aproximadamente el 5% de los materiales no se pudo amplificar satisfactoriamente aun y cuando se usaron distintas combinaciones de iniciadores. Para un poco mas del 10% de los materiales que si se lograron amplificar las secuencias que se produjeron no fueron de calidad, esto básicamente se debió a la estructura secundaria ocasionalmente presente la región de los ITS y que impide la secuenciación. Se planteó originalmente producir códigos de barras para 300 especies de hongos ectomicorrízicos, se obtuvieron para 368 especies. Es decir, aunque no se obtuvieron todos los códigos de barras comprometidos, el objetivo de número de especies incluso se supero en un 22.7%. Esto se debe a que originalmente estaba planeado producir tres códigos de barras por especie y hubo muchas que se obtuvo al menos uno o dos y se secuenciaron muchas especies que originalmente no estaban programadas. Esto en parte se debió a que el análisis morfológico y molecular de varios complejos de especies demostró que había mas de un taxa bajo nombres de especies ampliamente usados. Esto tiene relación con el número de especies identificadas sólo hasta nivel de género. Todas ellas son taxa que no corresponden con especies previamente descritas por lo que esta metodología demostró su capacidad de identificación de especies potencialmente nuevas.

Las especies para las que se produjeron más códigos de barras, todas son recursos forestales no maderables muy importantes para nuestro país. Algunas de ellas son hongos comestibles de alto valor en el mercado como *Boletus edulis s.l.*, *Morchella elata s.l.*, *Tuber separans s.l.*, *Amanita novinupta* (comúnmente identificada como *A. rubescens*), *Lactarius c.f. sanguifluus*, *Amanita calyptroderma* (comúnmente identificada como *A. caesarea*) y *Russula c.f. chloroides*. Otras son especies ampliamente distribuidas y asociadas a estados juveniles de árboles como los pinos, entre ellas se encuentran *Rhizopogon fallax*, *Laccaria trichodermophora*, *Helvella c.f. lacunosa*, *Laccaria laccata*, *Laccaria vinaceobrunnea*, y *Suillus pseudobrevipes*. El alto número de códigos de barras de estas

especies nos permitirá hacer inferencias sobre la diversidad genética de sus poblaciones y su distribución geográfica.

La calidad y largo de las secuencias es reflejo de la calidad de materiales que se usaron para el proyecto. Todos fueron recolectados y secados pensando en la integridad de su ADN. Los métodos de extracción y amplificación también demostraron ser adecuados y eficientes. Es importante mencionar que el consenso sobre el uso de la región del ITS como la región estándar para código de barras de hongos apenas se logró este año (Schoch et al., 2012). Sin embargo este proyecto ha estado produciendo códigos de barras para esta región desde el 2010. Lo que demuestra que nuestra decisión fue la correcta.

Actualmente en la base de datos BOLD existen 3584 registros de ascomicetos con secuencias, México ocupa el cuarto lugar con 405 registros (85 de este proyecto). Existen 5578 registros de basidiomicetos con secuencias. México ocupa el segundo lugar con 1068 registros (643 de este proyecto). La gran mayoría de las secuencias en la base de datos de México, son las que producimos en este proyecto.

## **Conclusiones**

Contar con códigos de barras para los hongos a mi juicio es de mayor relevancia que para las plantas y los animales. Digo esto por que, por su ciclo de vida, la parte vegetativa microscópica del hongo es la que ejerce su actividad metabólica y ecológica y prácticamente es imposible de identificar taxonómicamente. La gran mayoría de los hongos se desarrollan dentro de sus simbiontes o substratos sin manifestar reproducción sexual. Contar con una base de datos confiable para su identificación a través del ADN permitirá develar aspectos de su biología y ecología. Además tiene muchas aplicaciones de impacto social como el diagnóstico de patógenos y parásitos etc. Particularmente si se elige la región del ITS será posible relacionar cientos de miles de secuencias ambientales que ya existen en las bases de datos con la identidad de los organismos pues prácticamente toda la ecología molecular de muestras ambientales de hongos se hace con los ITS.

## **Literatura consultada**

- Abbott, S.P., Currah, R.S., 1997. The Helvellaceae: Systematic revision and occurrence in North and Northwestern North America. *Mycotaxon* 62, 1-125.
- Bessette, A.E., Roody, W.C., Bessette, A.R., 2000. North American Boletes. Syracuse University Press, Syracuse, New York.
- Begerow, D., H. Nilsson, M. Unterseher y W. Maier. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:99-108.
- Bellemain, E., T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet y H. Kauserud. 2010. ITS as DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10:189.

- Bigelow, H.E., 1978. The cantharelloid fungi of New England and adjacent areas. *Mycologia* 70(4), 707-756.
- Bon, M., 1988. Guía de campo de los hongos de Europa. Ediciones Omega, Barcelona.
- Chen, W., K. A. Seifert y C. A. Levesque. 2009. A high density COX1 barcode oligonucleotide array for identification and detection of species of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Molecular Ecology Resources* 9:114-129.
- Frutis, I. y R. Valenzuela. 2009. Macromicetos. *In* La diversidad biológica del Estado de México. Estudio de Estado, G. Ceballos, (ed.). Gobierno del Estado de México, Toluca. p. 243-249.
- Gardes, M. y T. D. Bruns. 1993. ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- Gilmore, S., T. Gräfenhan, G. Louis-Seize y K. A. Seifert. 2009. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* 9:90-98.
- Grund, D.W., Harrison, K.A., 1976. Nova Scotian Boletes. *Bibliotheca Mycologica* Band 47. J. Cramer, Vaduz.
- Guzmán, G. 1994. Las colecciones de hongos en México y su problemática en la biodiversidad del país. *Bol. Soc. Bot. México*:35-37.
- Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*:369-384.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95:641-655.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball y J. R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society Series B* 270:313-321.
- Hesler, L.R., Smith, A.H., 1979. North American species of *Lactarius*. Ann Arbor, the University of Michigan Press, Michigan.
- Hollingsworth, P., L. Forrest, J. Spouge, M. Hajibabaei, S. Ratnasingham, M. van der Bank, M. Chase, R. Cowan, D. Erickson, A. Fazekas, S. Graham, K. James, K. Kim, W. Kress, H. Schneider y et.al. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:12794-12797.
- Jenkins D.T., 1986. *Amanita of North America*. Mad River Press, Eureka, California.
- Kelly, L. J., P. M. Hollingsworth, B. J. Coppins, C. J. Ellis, P. Harrold, J. Tosh y R. Yahr. 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist* doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03677.x.
- Kennedy, P., R. Garibay-Orijel, L. Higgins y R. Angeles-Argaiz. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21:559-568.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter y J. A. Stalpers. 2008. *Dictionary of the Fungi*. CABI, Wallingford, UK. p.

- Largent, D., D. Johnson y R. Watling. 1984. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Mad River Press, Eureka, California. p.
- Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micologia Aplicada International* 14:61-74.
- Methven, A.S., 1990. The genus *Clavariadelphus* in North America. *Bibliotheca Mycologica* 138. J. Cramer, Berlin.
- Nilsson, R. H., M. Ryberg, K. Abarenkov, E. Sjökvist y E. Kristiansson. 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *Fems Microbiology Letters* 296:97-101.
- Nilsson, R. H., M. Ryberg, E. Kristiansson, K. Abarenkov, K. H. Larsson y U. Kõljalg. 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1:e59.
- O'Brien, B. L., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo y R. Vilgalys. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5544-5550.
- Petersen, R.H., 1979. Notes on Cantharelloid fungi. IX. Illustrations on new or poorly understood taxa. *Nova Hedwigia* 31(1,2), 1-23.
- Riva, A., 1988. *Tricholoma*. *Fungi Europaei* 3. Libreria Editrice Giovanna Biella, Saronno.
- Singer, R, Araujo, I., Ivor, M.H., 1983. The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially Central Amazonia. *Belv. Nova Hedwigia* 77, 1-352.
- Singer, R., García, J., Gómez, L.D., 1990. The Boletinae of Mexico and Central America 1 & 2. *Nova Hedwigia* 98, 1-72.
- Santamaria, M., S. Vicario, G. Pappada, G. Scioscia, C. Scazzocchio y C. Saccone. 2009. Towards barcode arkers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria. *BMC Bioinformatics* 10:S15.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen y Fungal-Barcoding-Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 16:6241-6246.
- Seena, S., C. Pascoal y F. Cássio. 2010. DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity* 44:77-87.
- Stockinger, H., M. Kruger y A. Schußler. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:461-474.
- Vialle, A., N. Feau, M. Allaire, M. Didukh, F. Martin, J. M. Moncalvo y R. C. Hamelin. 2009. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Mol. Ecol. Res.* 9:99-113.
- Xiang, J. M. y D. A. Hickey. 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Notes* 7:365-373.