

Extracción de ADN y amplificación de secuencias del ITS del ADNr de *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes) para su uso en el análisis filogenético

DNA extraction and ITS sequences amplifications of *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes) for phylogenetic analysis use

Laura Izascum Pérez-Valencia, Lic¹, Anne Santerre, PhD¹,
Alma Rosa Villalobos-Arámbula, PhD¹, Adrián Galván-Corona, Lic²,
Mabel Gisela Torres-Torres, PhD³, Aarón Rodríguez-Contreras, PhD²,
Laura Guzmán-Dávalos, PhD²

Resumen

Objetivo: Evaluar dos métodos de extracción de DNA en especies de *Ganoderma* para determinar la efectividad en la amplificación de fragmentos de ITS de uso en el análisis filogenético.

Materiales y métodos: Se compararon dos técnicas de extracción de ADN (Doyle y Doyle 1987 y Aljanabi y Martínez 1997) para materiales frescos y de herbario de 19 especies de *Ganoderma*. Para la amplificación por PCR de la secuencia completa del ITS se utilizó el par de cebadores (ITS1F e ITS4) de acuerdo con las condiciones descritas en Guzmán-Dávalos *et al.* (2003).

Resultados: Las muestras de especímenes frescos presentaron una banda en el gel de agarosa, mientras que la mayoría de los especímenes de más de siete años no mostraron dicha banda. Sin embargo, a pesar de la ausencia de banda se logró amplificar la región ITS de especímenes frescos como de herbario.

Conclusiones: Se concluye que los dos métodos son una alternativa para la extracción de ADN de calidad de especímenes de *Ganoderma* y su posterior uso en la amplificación de la región del ITS.

Palabras clave: Macromicetos; Caracteres moleculares; Polyporaceae.

Abstract

Objective: To evaluate two methods of extracting from DNA of *Ganoderma* species to determine the effectiveness in amplifying ITS fragments for use in phylogenetic analysis.

Materials and methods: Two techniques of DNA extraction (Doyle & Doyle 1987 y Aljanabi & Martínez 1997) were compared for fresh and herbarium samples of 19 species of *Ganoderma*. For PCR amplification of the complete sequence of the ITS was used primer pair (ITS1F and ITS4) according to the conditions described in Guzmán-Dávalos *et al.* (2003)

Results: The samples of fresh specimens showed a band in the agarose gel, while most of the specimens over 7 years showed no such band. However, despite the absence of a band is able to amplify the ITS region of fresh and herbarium specimens.

Conclusions: We conclude that the two methods are an alternative for the extraction of DNA from specimens of *Ganoderma* quality and its subsequent use in the amplification of the ITS region.

Keywords: Macromycetes; Molecular characters; Polyporaceae.

Introducción

El género *Ganoderma* P. Karst., pertenece a la familia *Ganodermataceae* (Basidiomycetes, Fungi), para la cual Ryvarden y Moncalvo (1997)

reconocen un total de 220 especies; la familia está constituida por un pequeño número de géneros que presentan distribución cosmopolita y que se desarrollan sobre el suelo o madera muerta (Ryvarden y Johansen 1980). De acuerdo con

¹ Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. e-mail: magitoto@yahoo.com

² Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

³ Grupo de Valoración y Aprovechamiento de la Biodiversidad, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Colombia.

Fecha de recibido: Septiembre 21, 2011

Fecha de aprobación: Diciembre 5, 2011

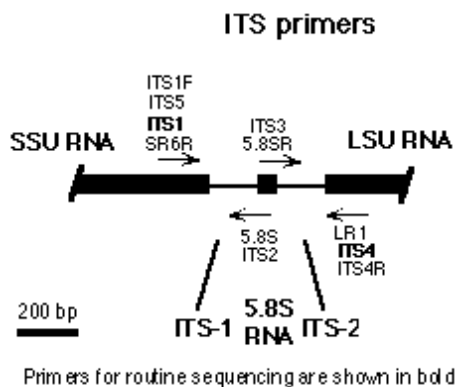


Figura 1. Esquema de la región espaciadora interna transcrita (ITS).

la estructura de la superficie del píleo, Steyaert (1980) estableció cuatro subgéneros (*Ganoderma*, *Elfvigia*, *Plecoderma*, *Anamixoderma*) y dividió el subgénero *Ganoderma* en dos secciones (*Ganoderma* y *Characoderma*). Otros autores, como Corner (1983) y Ryvarden (1991), han referido a las especies laqueadas como del complejo *G. lucidum* y las especies opacas como del complejo *G. applanatum* que han sido denominados como los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvigia*, respectivamente.

A pesar de que el género ha sido estudiado por diversos autores (Furtado 1965; Steyaert 1980; Bazzalo y Wright 1982; Gilbertson y Ryvarden 1986; Adaskaveg y Gilbertson 1988; Ryvarden 1991, 2000), incluso con datos moleculares y de otro tipo (Adaskaveg y Gilbertson 1986; Moncalvo *et al.* 1995; Gottlieb *et al.* 1998, 2000; Moncalvo 2000; Smith y Sivasithamparam 2000; Hong y Jung 2004), su taxonomía es controversial. Sin embargo, en los últimos cinco años Torres-Torres y Guzmán-Dávalos (2005, 2008a, b, c, 2009, 2012) y Torres-Torres *et al.* (2009a, b) han realizado contribuciones importantes en las que aportan caracteres novedosos para la identificación de las especies que contribuyen a dar nuevas interpretaciones en los análisis filogenéticos.

Hasta hace algunos años, en los estudios en

sistemática se utilizaban casi siempre caracteres morfológicos; sin embargo, existen caracteres que pueden estar sometidos a la subjetividad de quien los analiza o bien no todos los caracteres relevantes son apreciables a simple vista o no tenemos la capacidad para definir inequívocamente las homologías. En la actualidad, las herramientas que se utilizan en la sistemática se han extendido; ahora no sólo se toman en cuenta los caracteres morfológicos sino también los caracteres moleculares.

La región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosomal (ADNr) nuclear (Figura 1), contiene dos regiones variables no codificadoras, que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, entre la subunidad pequeña, la región 5.8S y los genes que codifican para ARNr de la subunidad grande (Gardes y Bruns 1993). La funcionalidad del ITS está relacionada con la división específica dentro del transcripto primario ITS-1 e ITS-2 durante la maduración de las subunidades pequeñas (SSU), 5.8S y la subunidad ribosomal grande (LSU).

Entre las características convenientes para el análisis de secuencias ITS en hongos, se encuentran: la región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales; la naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar, aun cuando se utilicen muestras de ADN pequeñas o muy diluidas o altamente degradadas (ADN obtenido de material viejo y especímenes de herbarios) pero pese a esto, en algunos géneros de hongos como *Ganoderma* esta región es difícil de amplificar dada la naturaleza de la presencia de pigmentos y contaminación con ARN (Torres-Torres *et al.* 2009). Lo anterior presenta una complicación ya que muchas veces los caracteres moleculares son difíciles de obtener por el estado en el que se encuentran los materiales de herbario lo que hace necesario estandarizar protocolos.

Este trabajo es parte de un proyecto más amplio, que tiene como objetivo establecer las relaciones filogenéticas, en la mayoría de los casos a nivel infragenérico de un grupo selecto de macromicetos, empleando caracteres morfológicos, moleculares y químicos. En ese proyecto para el género *Ganoderma* en particular, se pretende comprobar su monofilia, estudiar con caracteres morfológicos, moleculares y químicos las relaciones filogenéticas de las especies, y definir si la presencia o ausencia de laca en el píleo de los basidiomas de *Ganoderma* es la sinapomorfia a nivel infragenérico. Así, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos de una de las fases iniciales del proyecto, referente a la obtención de datos moleculares. En particular se presentan los resultados sobre la extracción de ADN y amplificación de ITS de especímenes de *Ganoderma*.

Materiales y métodos

Material. Se estudiaron 93 especímenes de 19 especies del género *Ganoderma* de acuerdo con la clasificación tradicional del grupo. Los especímenes se recolectaron entre 1904 y 2004; la mayoría de las muestras se obtuvieron a partir de ejemplares de herbario y muy pocas de materiales recién recolectados. De los 93 especímenes se realizaron 170 extracciones de distintos tejidos del basidioma: 73 corresponden a contexto, mientras que 84 corresponden a tubos. En trece muestras no se indica el tipo de tejido.

Experimentos de optimización para el género *Ganoderma*. Para la extracción de ADN a partir de muestras de herbario o frescas se ensayaron dos protocolos, uno con SDS y proteinasa K para la eliminación de proteínas (Aljanabi *et al.* 1997), ya utilizado en el laboratorio de Genética para la extracción de ADN de insectos y plantas (Palomera 2005) y otro con CTAB y cloroformo-isoamílico para la eliminación de proteínas (Doyle y Doyle 1987), optimizado para extraer

ADN de diversos tejidos de pinos (Palomera 2002). En ambos protocolos se incluyó en el buffer de lisis PVP al 1%, además se adaptaron los protocolos a la cantidad de tejido de las muestras de herbario de *Ganoderma*.

Se llevaron a cabo dos experimentos, cada uno con ocho muestras (100-306 mg) que se trabajaron con los dos métodos de extracción de ADN. En el primer experimento se utilizaron 8 ml de buffer de extracción en el protocolo de Doyle y Doyle y 4 ml de buffer de extracción para el protocolo con Proteinasa K. En el segundo experimento se utilizaron 4 ml de buffer de extracción para los dos protocolos. La calidad del ADN extraído se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook *et al.* 1989).

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN con el protocolo basado en proteinasa K el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se agregaron 4 ml de buffer salino (NaCl 0.4M, Tris-HCl 10mM, EDTA 2 mM) con PVP al 1%. Se mezcló suavemente por inversión y se añadieron 400 µl de SDS al 20% y 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se mezcló por inversión y se incubó por una hora a 65°C. Se añadieron 3 ml de NaCl 6M y se mezcló lentamente por 30 seg. Se centrifugó a 4000 rpm por 45 min a 24°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó la misma cantidad de isopropanol frío. Se mezcló suavemente por inversión, se incubó toda la noche a -20°C, se centrifugó a 4°C por 30 min a 4000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 20 min y se agregaron 2.5 ml de etanol al 70% frío. Se mezcló por inversión cada 5 min al menos tres veces. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se decantó el etanol. La pastilla de ADN se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml con 1 ml de etanol al 70% frío, repitiendo el lavado dos veces más. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se decantó el etanol. La pastilla se

diluyó en 100 µl-500 µl de TE (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM), disolviendo a temperatura ambiente toda la noche. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Con el método de extracción de Doyle y Doyle (1987) el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se transfirió la muestra a un tubo de 15 ml con 4 ml de buffer CTAB 2X (CTAB 2%, Tris 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4M) con PVP al 1% previamente calentado a 65°C. Se incubó por 60 min a 65°C. Una vez fría la muestra se añadieron 4 ml de cloroformo (alcohol isoamílico 24:1), se centrifugó a 4000 rpm por 45 min, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregó el mismo volumen de isopropanol frío, se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. Se decantó el sobrenadante. Se añadieron 4 ml de buffer de lavado (etanol absoluto, acetato de amonio 7.5M). Se centrifugó a 2000 rpm por 2 min. Se decantó y secó. Se añadieron 800 µl de buffer TE (Tris 1M pH 7.4, EDTA 0.5 M) y 280 µl de agua destilada para disolver la pastilla. Se añadieron 520 µl de acetato de amonio 7.5 M. Se agregaron 3.5 ml de etanol absoluto frío. Se incubó por una hora a -20°C. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se decantó y secó la pastilla. Se añadieron 3 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se decantó. Se añadió 1 ml de etanol al 70% frío. Se transfirió la pastilla de ADN a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se repitió el lavado con 1 ml de etanol al 70% frío. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se decantó. Se disolvió la pastilla de ADN en 300-500 µl de TE. Se dejó a temperatura ambiente toda la noche.

Amplificación de ITS. Para la amplificación por PCR de la secuencia completa del ITS se utilizó el par de cebadores (ITS1F e ITS4) de acuerdo con las condiciones descritas en Guzmán-Dávalos *et al.* (2003) con algunas modificaciones. El volumen total de la reacción para la PCR fue de 25 µl por muestra. Con 23 µl de mezcla

PCR (buffer PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 5 mM, BSA 1 mg/ml), 1 µl de mezcla primer-Taq (primer 5 y 3 10 µM y 0.2 µl de TaqPol 5U/µl) y 1 µl de ADN (que se diluye 1:1 en caso de presentarse una alta concentración de pigmentos). Las muestras se amplificaron con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 24 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación 50°C por 45 seg y elongación a 72°C por 2 min; 14 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación 50°C por 45 seg, (aumentar 5 seg por ciclo) y elongación a 72°C por 2 min. Elongación prolongada final a 72°C por 10 min.

El fragmento amplificado se separó en geles de agarosa (2%) con amortiguador TBE 1X, las muestras se corrieron en promedio a 80 voltios por dos horas y los geles se tiñeron con bromuro de etidio para visualizar la banda de aproximadamente 500 pb en un transiluminador de luz UV (UVP-TS20E). Se tomaron fotografías de los geles con una cámara polaroid y con el sistema de foto documentación EDAS (Kodak Digital Science 1D v.3.0.2), posteriormente se procedió a su análisis.

Resultados

Extracción de ADN. De las 130 extracciones de ADN de las muestras de *Ganoderma*, 115 se efectuaron con el protocolo con proteinasa K, mientras que sólo 15 fueron procesadas con el método de Doyle y Doyle. El análisis del ADN obtenido en el gel de agarosa al 2% mostró que la mayoría de las muestras (67%) obtenidas con el método con proteinasa K, no presentan ninguna banda de ADN de alto peso molecular o degradado, el 9% de las muestras procesadas mostraron un barrido que indica ADN altamente degradado y solo el 24% mostró una banda de ADN de alto peso molecular (Tabla 1). El análisis de los resultados obtenidos en la extracción de ADN a partir de los dos tipos de tejidos:

Tabla 1. Resultados del análisis del ADN obtenido de muestras de *Ganoderma*.

Análisis de la electroforesis	Proteinasa K		Doyle y Doyle	
	Tubo	Contexto	Tubo	Contexto
Sin banda en el gel	40	37	5	3
Banda de ADN de alto peso molecular	16	12		
Banda de ADN altamente degradado	5	5	4	3

contexto y tubo, no muestran diferencias. Con respecto a las muestras obtenidas con el protocolo Doyle y Doyle, el análisis mostró que en el 53% de las muestras no se observó ninguna banda en el gel, mientras que en el 47% de las muestras se registró una banda de ADN de alto peso molecular. La mayoría de los especímenes de *Ganoderma*, fueron colectados hace siete a cincuenta años atrás, lo que explica la ausencia de banda en el gel.

Amplificación con PCR de secuencias ITS. Los productos de PCR obtenidos con el par de cebadores ITS1-F e ITS4 se observaron en la mayoría de los casos como una banda en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos de PCR, para el ITS completo en las muestras de *Ganoderma* fue de 700 pb. Algunas muestras de ADN también amplificaron una banda inespecífica de 500 pb (Figura 2). Hasta ahora se cuenta con los resultados de 253 reacciones de PCR, en donde sólo el 30% mostró amplificación en la banda de interés. Se realizó una prueba de reamplificación con 1 µl del producto de PCR para las muestras de ADN que no amplificaron para el ITS completo, y aumentando en el programa de alineación °C, con lo que se logró la amplificación de algunas muestras de *Ganoderma* (Figura 3).

Discusión

Con base en los resultados de la electroforesis del primer experimento para las muestras de *Ganoderma* con los dos protocolos de extracción, se encontró que de los dos métodos probados, el

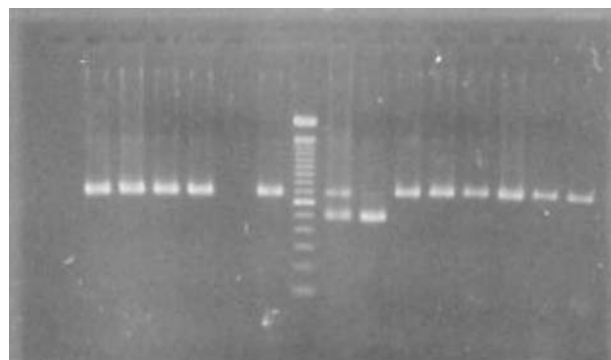


Figura 2. Amplificación por PCR de la secuencia ITS completa.

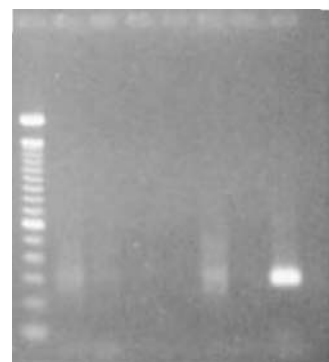


Figura 3. Reamplificación de la región ITS2.

más adecuado para la extracción de ADN de especímenes de *Ganoderma* es el de proteinasa K, porque el producto final contiene menos pigmentos que aquellas muestras procesadas con el método de Doyle y Doyle; además, el protocolo es más sencillo. Sin embargo, el segundo experimento, nos revela que en el caso de *Ganoderma* no siempre se eliminan los pigmentos, aún con el método de proteinasa K. Así, la cantidad de pigmentos en la muestra dependerá del tejido utilizado. Es importante señalar que con estos dos experimentos se logró establecer tanto la

cantidad óptima de reactivos, como la cantidad de muestra en mg a utilizar; estos resultados coinciden con los del trabajo realizado por Torres-Torres *et al.* (2009b).

De cualquier manera, sabemos que ambos protocolos de extracción de ADN son adecuados para muestras frescas o colectadas en los últimos cinco años porque en muestras con estas características se observan bandas de ADN de alto peso molecular en el gel de agarosa. Es importante señalar que en el gel también se observaron pigmentos coextraídos con el ADN, como un barrido intenso en el fondo del gel, lo que impide la cuantificación del ADN por espectrofotometría.

Conclusiones

El trabajo permite concluir que los dos protocolos son una buena alternativa para la extracción de ADN de *Ganoderma* spp., en donde el ADN permitió la amplificación de la región ITS por la técnica de PCR; ambos protocolos son de aplicación en estudios moleculares más finos y en el análisis filogenético.

Agradecimientos

Proyecto CONACYT 42957 con LGD como investigador responsable. Proyecto U de G P3E 32980 (2005) con ARVA como investigador participante. Beca CONACYT para Laura Izascum Pérez Valencia. PAY-SNI para Adrián Galván Corona. A la Universidad Tecnológica del Chocó y proyecto Nuffic por los recursos proporcionados para los estudios de doctorado de Mabel Gisela Torres Torres.

Literatura citada

Adaskaveg JE, Gilbertson RL. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae* in relation with taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia*. 80: 493-507.

Adaskaveg JE, Gilbertson RL. 1988. Basidiospores, pylocistidia and other basidiocarp characters in several species of *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia*. 80: 493-597.

Aljanabi SM, Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res.* 25: 4692-3.

Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Mol Phylogen Evol.* 29: 435-55.

Bázalo ME, Wright JE. 1982. Survey of the argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon*. 16: 293-325.

Corner EJH. 1983. *Ad Polyporaceas I. Amauroderma and Ganoderma*. Cadiz: Cramer. 183 pp.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-5.

Furtado JS. 1965. Relation of microstructure of the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Mycologia*. 57: 588-611.

Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol Ecol.* 2: 113-8.

Gilbertson, RL, Ryvarden L. 1986. Fungiflora. *North Am Polyp.* 1: 287-306.

Guzmán-Dávalos L, Mueller GM, Cifuentes J, Miller AN, Santerre A. 2003. Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data. *Mycologia*. 95: 1204-14.

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8 ed. Wallingford: CAB International.

Hong SG, Jung HS. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycology*. 96: 742-55.

Miller RN, Holderness GM, Bridge PD, Paterson RRM, Sariah M, Hussin MZ, *et al.* 1995. A multidisciplinary approach to the characterization of *Ganoderma* in oil-palm cropping systems. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM (Eds). *Proceedings of Contributed Symposium 59A*. 5th International Mycological Congress. Vancouver, agosto 1995. p. 57-66.

Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, hasta 6 autores *et al.* 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol Phylogen Evol.* 23: 357-400.

Palomera V. 2002. Comparación de métodos de extracción de DNA de diferentes tejidos de tres especies de

- pinos blancos (*Pinus* spp.). Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.
- Palomera V. 2005. Interacción entre *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales, Spiroplasmataceae), su huésped *Dalbulus maidis* (Hemiptera, Cicadellidae) y enemigos naturales. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.
- Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores Nomenclature and Taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Oslo: Fungiflora.
- Ryvarden L. 2000. Studies in neotropical polypores 2. A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with laccate pileus. *Mycology*. 92:180-91.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor. 545 pp.
- Steyaert RL. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bull Jardin Botanic Nat* (Belgica). 50: 135-86.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2005. Notas sobre la variación morfológica de *Ganoderma curtisii* en México. *Rev Mex Micol*. 21: 39-47.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2008a. *Caracteres micromorfológicos importantes en la determinación de especies de Ganoderma* (Ganodermataceae). Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología. Mar del Plata, noviembre 10-13.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2008b. *Ganoderma vivianmercedianum* sp. nov. and related species. *Mycotaxon*. 105: 447-54.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2008c. Taxonomic status and new localities for *Ganoderma ravenelii*. *Mycotaxon*. 103: 33-40.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2009. *Claves para determinar especies de Ganoderma* (Ganodermataceae) en México. Memorias del X Congreso Nacional de Micología de México. Guadalajara, septiembre 20-24. 247 pp.
- Torres-Torres MG, López-Dellamary FA, López-Iñiguez AI, Gómez-Hermosillo CM, Guzmán-Dávalos, Maya L. 2009a. *Metabolitos secundarios como fuente potencial de caracteres taxonómicos en Ganoderma* (Ganodermataceae). Memorias del X Congreso Nacional de Micología de México; día y mes del evento, y ciudad. 243 pp.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L, Villalobos-Arámbula AR. 2009b. Metodología para la extracción de ADN de material de herbario de *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes). *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* 28: 186-9.
- Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L. 2012. The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon*. 119: 201-16.
- Zervakis GI, Moncalvo J, Vilgalys R. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Mycobiology*. 150: 715-26.