



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LAS RELACIONES
FILOGENETICAS DEL GENERO
Hydnodon

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA

VIOLETA PATIÑO CONDE

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO



200



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de las relaciones filogenéticas del género
Hydnodon "

realizado por

Violeta Patiño Conde

con número de cuenta 9227832-3, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Propietario

M. Sc. Dolores González Hernández

Propietario

Dra. Margarita Villegas Ríos

Suplente

Dr. Arturo Estrada Torres

Suplente

Dr. Juan José Morrone Lupi

[Handwritten signatures of Joaquín Cifuentes Blanco, Dolores González Hernández, Margarita Villegas Ríos, Arturo Estrada Torres, and Juan José Morrone Lupi]

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature of Patricia Ramos Morales]

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mis padres Lourdes y Alfredo como una pequeña muestra por todo su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Laura y Pablo como una muestra de mi amor.

A Ricardo por su amor y paciencia, por haberme metido en este vericuetto de la Sistemática filogenética.

A toda mi familia por darme eso de lo que nunca podré desprenderme, su amor. Muy especialmente a Mercedes, Jorge y Manuel por darme tantos recuerdos.

A todos mis sobrinos por recordarme que todavía me gusta ser niña.

A todos mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por su apoyo irrestricto durante la presente investigación.

A la M. SC. Dolores González Hernández por todo su apoyo y por sus valiosos comentarios al presente manuscrito.

A la Dra. Margarita Villegas Ríos porque sin sus observaciones tal vez este proyecto hubiese naufragado.

A Dolores y Cristi por la paciencia que me tuvieron durante mis desastrosas estancias en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.

Al Dr. Arturo Estrada Torres por sus valiosos comentarios del presente manuscrito, así como por las facilidades otorgadas para la utilización de material herborizado en la obtención de los datos moleculares, porque sin éste no hubiese sido posible el presente trabajo.

Así mismo al Dr. Juan José Morrone Lupi por sus valiosos comentarios para la versión final de este manuscrito.

Al Dr. Efraín de Luna por las interesantes y formativas pláticas que de alguna manera han repercutido en el presente manuscrito.

A la M. en C. Silvia Espinosa Matias por el apoyo que me brindo en la toma de fotografías al MEB.

A todos los compañeros del Herbario FCME, Lupita, Lilia, José Luis, Alfonso, Sigfrido, Felipe, Mundo y Michael por sus valiosas sugerencias durante la realización del presente trabajo y por lo placentero que han hecho mi estancia en la sección de Micología.

Al proyecto de becas PaMa y Ric.

La presente investigación fue financiada por los proyectos:
CONACYT 29011-N y 34312-V, y DGAPA IN-217198
Y por el programa de becas PROBETEL

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
La sistemática filogenética de basidiomicetos	3
La sistemática filogenética de Homobasidiomycetes y sus perspectivas	4
La problemática taxonómica del genero <i>Hydnodon</i>	9
Los caracteres moleculares en la sistemática filogenética	13
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Revisión taxonómica de <i>Hydnodon thelephorus</i>	20
Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU.....	21
Análisis cladista	26
RESULTADOS	31
Revisión taxonómica de <i>Hydnodon thelephorus</i>	31
Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU	33
Análisis cladista	34
DISCUSIONES	38
Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU	38
Las relaciones filogenéticas del género <i>Hydnodon</i> Banker	40
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	48

RESUMEN

La historia taxonómica del género *Hydnodon* Banker ha sido compleja. Banker (1913) delimitó al género con base en un ejemplar de basidioma pileado-estipitado de color naranja a rojo, de contexto carnoso-gelatinoso, de himenio hidnoide y esporas con ornamentación equinulada.

Banker (1913), Miller (1933) y Harrison (1973), basándose en la presencia de un himenio hidnoide, propusieron a *Hydnodon* como miembro de la familia Hydnaceae. Donk (1964) lo ubica como miembro de la familia Thelephoraceae Chev. con base en la presencia de esporas subglobosas y equinuladas, semejantes a las de algunos géneros de esa familia. Por su parte, Maas Geesteranus (1963) reconoció una posible relación entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* -un género clavarioide- dado el carácter cianofílico de sus esporas, y sugirió la inclusión de ambos géneros dentro de la familia Gomphaceae por la misma razón; sin embargo, nunca formalizó la transferencia de ninguno de los géneros a dicha familia. Finalmente, Jülich (1981) propone una familia distinta para este género, Hydnodontaceae, dada las características tan particulares de *Hydnodon*. Adicionalmente, Jülich propone un fuerte vínculo filogenético entre esta familia y la Scytinopogaceae, cuyo único miembro es el género *Scytinopogon*.

El presente trabajo, basado en el análisis filogenético de las subunidades cortas ribosomales nuclear y mitocondrial, sugiere un fuerte vínculo filogenético entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* tal y como lo habían sugerido Maas Geesteranus (1963) y Jülich (1981). Diversos caracteres microscópicos parecen ser congruentes con estos resultados, como la presencia de hifas infladas, hifas gleopleróticas y una reacción fuertemente cianofílica en las ornamentaciones de las esporas. La posición de ambos géneros en el contexto global de la filogenia de los Homobasidiomycetes es incierta hasta el momento, por lo que nuevas evidencias y un mejor muestreo podrán brindarnos hipótesis más robustas al respecto.

Palabras clave: *Hydnodon*, Homobasidiomycetes, subunidad corta ribosomal nuclear (nuc-SSU), subunidad corta ribosomal mitocondrial mt-SSU, filogenia.

INTRODUCCIÓN

La sistemática tradicionalmente se ha dedicado al descubrimiento, descripción e inventario de las especies que habitan el planeta, organizando todo este conocimiento en colecciones científicas y bases de datos. A lo largo de su historia, la sistemática como cualquier otra ciencia ha experimentado diversas revoluciones teóricas y metodológicas que han ido marcando su rumbo, así la adopción de la teoría evolutiva en la sistemática y en toda la biología ha dado lugar a nuevos paradigmas sobre el origen y diversificación de la vida, por lo que en la actualidad la sistemática además de seguir cumpliendo con sus tareas tradicionales, dedica enormes esfuerzos y recursos para inferir las relaciones filogenéticas entre las especies y los procesos evolutivos que les han dado origen. De manera conjunta a esta tarea, los taxónomos ha promovido la construcción de una clasificación biológica que refleje las relaciones evolutivas de los taxa y sea a la vez una fuerte herramienta predictiva que permita dar una explicación a la enorme riqueza biológica; así como conservar y hacer uso de la gran diversidad biológica que hemos heredado (Anónimo, 1994; Vane-Wright,1996). La sistemática, particularmente la sistemática filogenética, tiene el papel exclusivo de producir una referencia histórica para el entendimiento de la biodiversidad (González y De Luna, 1996). Así, el avance en el conocimiento y entendimiento de las relaciones filogenéticas que guardan las especies entre sí, es un marco de referencia básico para de estudios posteriores ya sean de tipo ecológico, evolutivo, biogeográfico, de coevolución, o en general del estudio de la biología comparada (Wanntorp *et al*, 1990; de Pinna, 1996; Feder, 1996; Schuh, 2000)

Dentro de la sistemática existen tres enfoques o escuelas taxonómicas: fenética o taxonomía numérica, evolucionista o tradicional y cladista o sistemática filogenética. Mientras que la fenética surge como una metodología para delimitación de los taxa o grupos mediante el criterio de "similitud total", las escuelas evolucionista y cladista tienen como objetivos principales el descubrimiento de las relaciones filogenéticas y la construcción de una clasificación biológica que refleje la filogenia. Particularmente, el cladismo surge como método alternativo al enfoque tradicional o evolucionista que carece de una metodología crítica y objetiva para la evaluación de hipótesis sobre relaciones filogenéticas (De Luna, 1995).

Por su parte, el cladismo ha desarrollado sólidos fundamentos tanto en aspectos teóricos como metodológicos, dando lugar a una metodología sólida basada en una ontología

"racionalista crítica" y en la teoría evolutiva (Sober,1988; De Luna, 1995). Los métodos cladistas están orientados a la evaluación de hipótesis de homología y monofilesis, a través del análisis de caracteres homólogos en el marco de una epistemología refutacionista (Hennig, 1966; Wanntorp *et al*, 1990; de Pinna, 1991; De Luna, 1996; Mishler y De Luna 1997; Brower y Schawaroch, 1996). La metodología cladista comprende tres fases: análisis de caracteres, la búsqueda de los árboles más parsimoniosos y la evaluación de las hipótesis, lo que implica un proceso de "iluminación recíproca" entre sus distintas fases. Por lo anterior, los métodos cladistas, hoy en día, son considerados como robustos para la investigación sistemática (de Pinna, 1996; Minelli, 1993; Sober, 2000; Schuh, 2000). Particularmente, los métodos cladistas han influido fuertemente en la investigación filogenética del reino Fungi, donde el uso de diversas fuentes de datos como de ultraestructura, químicos o moleculares, han permitido clarificar muchos aspectos de la historia evolutiva del grupo. En la actualidad, el análisis comparativo de la variación a nivel de secuencias de ADN es una de las herramientas más frecuentemente empleadas en los estudios filogenéticos de diversos grupos de hongos, ya que ha resultado ser una eficiente fuente alternativa de datos históricos, y consecuentemente ha revolucionado la micología evolutiva (Bruns *et al*, 1991; Berbee y Taylor, 1999).

ANTECEDENTES

La sistemática filogenética de basidiomicetos

Dentro del estudio de la diversidad fúngica, los trabajos de reconstrucción filogenética han tomado relevancia hasta hace poco más de una década, impulsados en gran parte por los avances técnicos, metodológicos y teóricos. El uso de los diversos tipos de caracteres (morfológicos, fisiológicos, químicos, de ultraestructura y moleculares) ha permitido esclarecer muchas de las problemáticas taxonómicas dentro de la enorme diversidad del reino Fungi. En la actualidad, las diversas investigaciones filogenéticas comienzan a esclarecer la historia temprana de la evolución del reino Fungi (ver Theler, 1988; Bruns *et al*, 1991; Bruns *et al*, 1992; Swann y Taylor, 1993, 1995).

En este sentido, los estudios comparativos de secuencias de ADN han reafirmado las sospechas, basadas en otros tipos de caracteres, de que todos los organismos estudiados por los micólogos no forman un grupo monofilético. Bruns *et al* (1991) confirmaron que los grupos Acrasiomycota, Myxomycota y Dictyosteliomycota forman linajes separados del reino Fungi y que están más emparentados con diversos grupos de protistas que con cualquier linaje fúngico. Éste mismo estudio sugiere que grupos como Oomycota, Hyphochytriomycota y Labyrinthulomycota están fuertemente relacionados con las algas café y diatomeas, miembros del linaje Stramenopila (Berbee y Taylor, 1999). Así en un sentido estrictamente histórico, el reino Fungi sólo comprende a los linajes Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota y Chytridiomycota; y es el grupo hermano del reino Animalia. En este nuevo panorama evolutivo, los coenomycetes (Chytridiomycota *plus* Zygomycota) están en la base del árbol y son el grupo hermano del linaje Basidiomycota-Ascomycota (Berbee y Taylor, 1999). Entre las características que identifican y comparten todos los miembros del reino Fungi está una misma ruta metabólica para la lisina y la quitina como principal componente de la pared celular.

El grupo Basidiomycota-Ascomycota ha ocupado un lugar importante en la investigación sistemática dado su enorme diversidad taxonómica y su importancia dentro de los ecosistemas templados y tropicales.

Particularmente los basidiomicetos, pertenecientes a este último linaje, ocupan un lugar importante en los estudios sistemáticos debido a la importancia económica y cultural que tienen para la humanidad, además de ser factores claves en la conservación de los hábitats. Tradicionalmente, este grupo de hongos se ha dividido en dos grandes grupos, con base

en la morfología de los basidios, Heterobasidiomycetes y Homobasidiomycetes. Los primeros se caracterizan por presentar fragmobasidios en tanto que los segundos presentan holobasidios (Alexopoulos *et al*, 1996). Sin embargo, estudios filogenéticos basados en el análisis de la subunidad corta del ADN ribosomal nuclear (nuc-SSU) proponen la existencia de tres linajes de basidiomicetos: Urediniomycetes, Ustilaginomycetes e Hymenomycetes, contradiciendo las propuestas de clasificación previas para este grupo de hongos (Swan y Taylor, 1995).

Dentro de los Hymenomycetes, que se caracterizan por presentar septos doliporo y un huso acromático de tipo globular (Swan y Taylor, 1995), se agrupan los Homobasidiomycetes, Auriculariales, Tulaslenales, Tremellales, Ceratobasidiales y Dacrymycetales. Dada la gran diversidad de especies que conforman estos grupos de hongos, muchos de los estudios sistemáticos se han enfocado a descubrir, clasificar y reconstruir la historia filogenética de cada uno de estos grupos de hongos.

En los últimos años se han realizado diversos trabajos para entender las relaciones filogenéticas dentro de los homobasidiomicetos (Ej. Hibbett *et al*, 1997; Hibbett y Thorn, 2000), específicamente a nivel de familia, géneros o grupos de especies (Ej. Hibbett y Donogue, 1995; Villegas *et al*, 1999; Hibbett y Vilgalys, 1993; Moncalvo *et al*, 1993; Vilgalys y Sun, 1994; Hibbett *et al*, 1995; Kretzer y Bruns, 1997; Lui *et al*, 1997; Hopple y Vilgalys, 1999; Drehmel *et al*, 1999; Hughey *et al*, 2000). Así mismo, el estudio de la evolución de las formas del basidioma desde un enfoque filogenético ha clarificado parcialmente como es que las diversas formas han evolucionado dentro de los diversos linajes fúngicos (Ej. Binder *et al*, 1997; Pine *et al*, 1999; Moncalvo *et al*, 2000). Finalmente, los estudios a nivel de especie también han sido centrales en la reconstrucción filogenética del reino Fungi (Ej. Hansen *et al* 1999; Mitchell y Bresink, 1999; White *et al*, 1998; Aanen *et al*, 2000).

La sistemática filogenética de Homobasidiomycetes y sus perspectivas

Los homobasidiomicetos comprenden el 23% de las especies conocidas de hongos verdaderos, con aproximadamente 13 000 especies. (Hawksworth *et al*, 1995). Están presentes en todos los ecosistemas terrestres, su abundancia y diversidad en bosques y selvas sólo son rebasadas por las plantas vasculares e insectos. Entre sus principales funciones ecológicas se encuentra la degradación de materia orgánica y la liberación de nutrientes al suelo. Algunas especies son patógenos de plantas vasculares, insectos o de

otros hongos, mientras que otras establecen relaciones simbióticas formando micorrizas o líquenes. Esto ha hecho que los hongos sean reconocidos como factores determinantes en la conservación de los ecosistemas tropicales y templados. Desde un punto de vista antropocéntrico estos hongos tienen importancia tanto económica como cultural ya que son factores importantes dentro de la agricultura forestal y son fuentes de alimentación o medicamentos. Además, muchas especies de homobasidiomicetos han llegado a ser parte sustancial de los ritos o costumbres de distintas culturas humanas.

La taxonomía tradicional de este grupo de hongos se basa principalmente en caracteres morfológicos tanto macroscópicos como microscópicos. En el caso de los homobasidiomicetos, la morfología del himenio ha sido utilizada para distinguir dos grandes grupos de homobasidiomicetos: himenomicetos -en el sentido tradicional- y gasteromicetos (Alexopoulos *et al*, 1996). Los primeros presentan el himenio expuesto en tanto que los gasteromicetos lo presentan encerrado. Por su parte, los himenomicetos se dividen en dos grandes grupos: Agaricales, con himenio laminado, y Aphylllophorales, cuya morfología del himenio es más diversa pero nunca en forma de láminas. Diversos autores han especulado que los Aphylllophorales y los gasteromicetos son grupos artificiales (Donk, 1964); sin embargo, en el caso del grupo de Agaricales esto se ha cuestionado raramente (Singer, 1986).

Recientemente, diversos estudios filogenéticos basados en datos morfológicos, de ultraestructura y moleculares han corroborado la posición de los Homobasidiomycetes dentro del linaje de los basidiomicetos; sin embargo, existe evidencia encontrada sobre la monofilia del grupo de los homobasidiomicetos (Swan y Taylor, 1995). Uno de estos trabajos sugieren que grupos de heterobasidiomicetos, como Auriculariales, Tulasnellales y Ceratobasidiales, se anidan dentro del clado de los Homobasidiomycetes formando conjuntamente un grupo monofilético (Hibbett y Thorn, 2000). A este grupo se les suman los Dacrymycetales y Tremellales para formar el linaje Hymenomycetes (Swan y Taylor, 1993, 1995).

Por otro lado, Hibbett *et al* (1997) trabajaron a un nivel más fino, dando como resultado un marco teórico de las relaciones filogenéticas de los grandes grupos dentro de los Homobasidiomycetes. El estudio se basó en el análisis combinado de las secuencias génicas de las subunidades ribosomales cortas nuclear (nuc-SSU) y mitocondrial (mt-SSU). Posteriormente, Hibbett y Thorn (2000), sumando los resultados de éste y otros trabajos

para homobasidiomicetos, han propuesto una nueva hipótesis sobre las relaciones filogenéticas dentro grupo. De esta novedosa hipótesis filogenética resalta la existencia de 8 grandes grupos o clados de homobasidiomicetos, que en muchos sentidos contrastan con las propuestas tradicionales. (Fig.1).

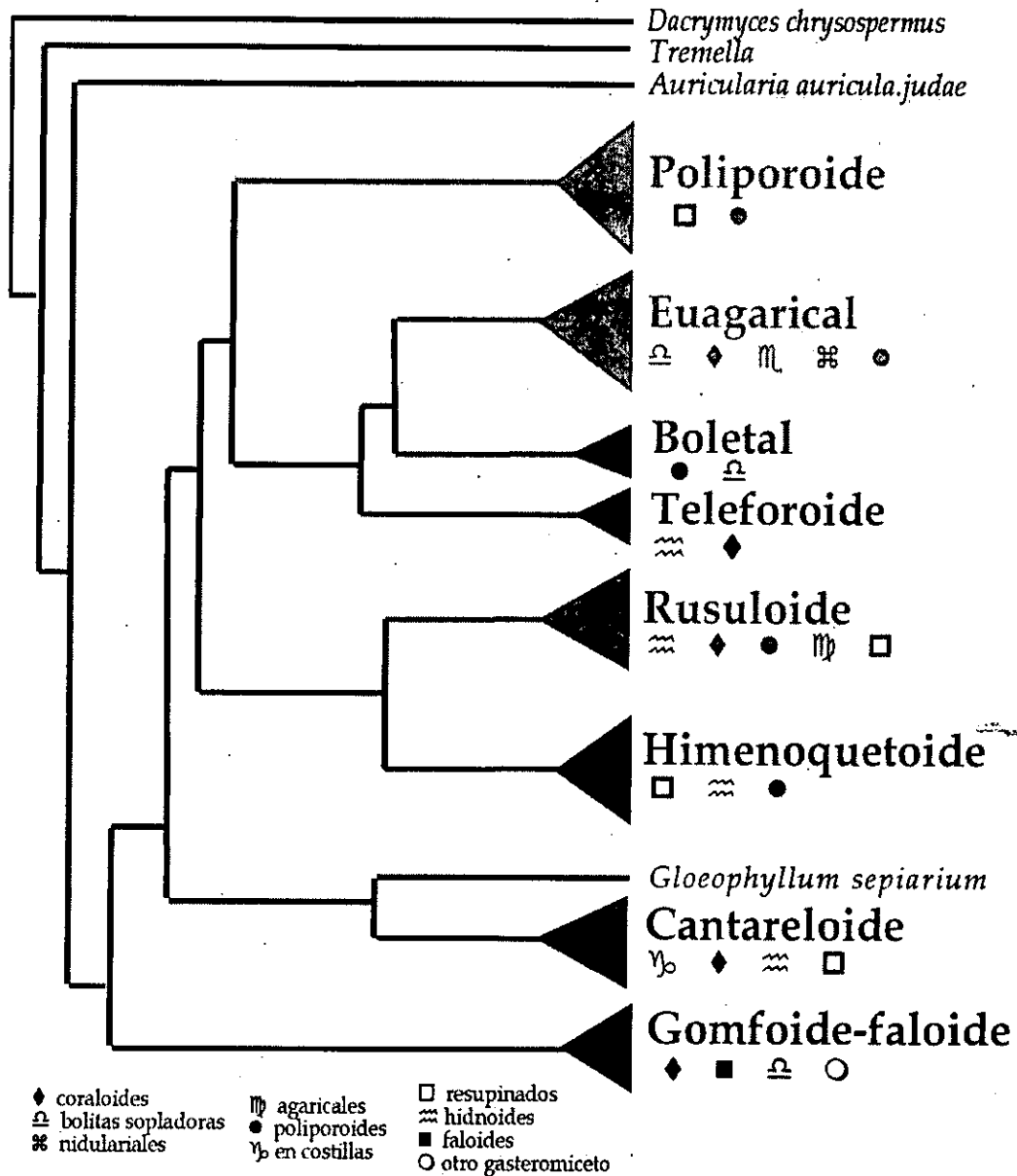


Fig. 1 Filogenia de Homobasidiomycetes inferida de nuc y mt- SSU (ADNr)
 Cladograma redibujado desde el publicado en Hibbett *et al*, 1997

El primero de estos 8 grandes grupos de homobasidiomicetos es el Poliporoide, el cual incluye a miembros tradicionalmente ubicados en las familias Corticiaceae, Ganodermataceae, Polyporaceae y Sparassidaceae. Morfológicamente se presenta dentro de este grupo una variedad de formas del basidioma, que van desde las corticiodes hasta las formas típicas del género *Sparassiss*, pasando por las setas del género *Lentinus*. También existe una diversidad en cuanto al tipo de himenio siendo el más dominante el poroide. En general los miembros de éste clado son degradadores de madera. A pesar de la evidencia actual, existen serias dudas sobre los límites y la monofilia del grupo.

El clado Euagarical está integrado por representantes de 7 familias de Agaricales, 4 de Aphyllophorales, 3 de Gasteromycetes, y de acuerdo con otras fuentes de evidencia podrían estar anidados dentro de este clado los Ceratobasidiales. De esto resulta evidente la gran diversidad morfológica tanto en la forma del basidioma como en el tipo de himenio que se presenta dentro del grupo. Desde un punto de vista ecológico también se trata de un grupo muy diverso que incluye a especies ectomicorrizógenas, degradadoras de materia orgánica, patógenas entre otras. La monofilia del grupo es apoyada en el trabajo de Hibbett *et al* (1997), aunque en la actualidad siguen siendo sometidas a pruebas las hipótesis filogenéticas de este enorme grupo de homobasidiomicetos (ver Moncalvo *et al*, 2000).

Por su parte, el clado Boletal está conformado por algunos representantes de lo que tradicionalmente se ha considerado Gomphidiaceae, Coniophoraceae y Calostomaceae, además de representantes de los ordenes Hymenogastrales y Melanogastrales. Aquí encontramos hongos con himenio poroide, laminado; y algunos grupos de gasteromicetos como las "bolitas sopladoras", falsas trufas y hongos secotioides. La monofilia del grupo está moderadamente soportada por la evidencia actual, por lo que es necesario realizar estudios más profundos del grupo que permitan entender con mayor certidumbre sus límites filogenéticos (Hibbett *et al*, 1997).

El clado Teleforoide está representado por géneros tradicionalmente ubicados dentro de la familia Thelephoraceae Chev. como *Hydnellum* y *Thelephora*, y en trabajos previos por otros géneros como *Boletopsis*, *Tomentella*, *Pseudotomentella* y *Sarcodon* (Gardes y Bruns, 1996; Bruns *et al*, 1998). En lo general la hipótesis de Donk (1964) para la familia Thelephoraceae coincide en gran medida con las hipótesis filogenéticas actuales (Hibbett y Thorn, 2000). Los géneros agrupados en el clado Teleforoide parecen compartir algunas características

como la ornamentación, el color oscuro y el perfil angular de las esporas. Respecto a las relaciones de este grupo con la familia Bankeraceae o con algún otro grupo de homobasidiomicetos no han sido exploradas.

Uno de los clados más diverso es el Rusuloide, que incluye representantes de la familia Russulaceae y de 8 familias de Aphylophorales: Auriscalpiaceae, Bondarzewiaceae, Corticiaceae, Echinodontaceae, Hericiaceae, Lachnocladiaceae, Polyporaceae y Stereaceae. La variación morfológica en las formas del basidioma e himeneo es enorme, al igual que la diversidad ecológica, encontrándose especies patógenas, saprófitas y algunas especies llegan a establecer relaciones simbióticas formando micorrizas o líquenes.

Por su parte, el clado Himenoquetoide, de acuerdo diversos estudios, incluye a los miembros de la familia Hymenochaeteceae y algunos de Corticiaceae y Polyporaceae. Aunque dentro de este grupo todas las especies presentan hifas septadas con un parentosoma no perforado, la diversidad de formas en el himenio comprende desde poroide, hidnoide hasta corticioide. En general, los himenoquetoides tienen hábitos lignícolas aunque algunos forman micorrizas con orquídeas. Hasta el momento existe la certeza de que la familia Hymenochaeteceae y algunos miembros de las Corticiaceae y Polyporaceae forman parte de este clado.

El clado Cantareloide, que de acuerdo con el análisis de Hibbett *et al* (1997) agrupa miembros de las familias Cantharellaceae, Hydnaceae, Clavariaceae, Clavulinaceae y Corticiaceae. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Pine *et al* (1999) donde se incluyeron más especies de los géneros *Cantharellus*, *Craterellus* y *Clavulina*. Por su parte, otros análisis filogenéticos sugieren que el grupo de los Tulasnellales, clasificados tradicionalmente dentro de los Heterobasidiomycetes, se anidan dentro de este grupo (Bruns *et al*, 1998; Hibbett y Thorn, 2000). Este grupo de heterobasidiomicetos junto con *Botryobasidium* formarían el grupo hermano del resto de los cantareloides. Morfológicamente, este linaje incluye formas cantareloides, agaricoides, hidnoides, coraloides, clavarioides y corticioides. La presencia de basidios estériles parece ser la característica distintiva; sin embargo, este atributo también se ha encontrado en otros grupos de Aphylophorales (Pine *et al*, 1999; Donk, 1964).

Por último, el clado Gomfoide-faloide está representado por miembros de las familias Clavariaceae, Gomphaceae, y por algunos gasteromicetos de los ordenes Lycoperdales, Nidulariales y Phallales. Estudios realizados por otros autores (Bruns *et al*, 1998; Pine *et al*,

1999; Thorn *et al*, 2000) sugieren también la inclusión de miembros de Gauteriales e Hymenogastrales dentro del clado. Hibbett y Thorn (2000) reconocen la presencia de dos grandes grupos dentro del clado Gomfoide-faloide. El primero de ellos conformado por la familia Gomphaceae *sensu* Donk (1964), *Clavariadelphus* y los Gauteriales. El segundo integrado por diversos gasteromicetos como *Geastrum* y *Sphaerobolus* y por miembros de los Phallales y de los Hymenogastrales. Es evidente la diversidad de formas que se presentan dentro de este grupo: clavarioides, hidnoides resupinados, setas típicas y falsas trufas entre otras.

Las relaciones y los límites filogenéticos entre estos 8 grandes clados de homobasidiomicetos aun permanecen oscuras ya que la evidencia actual apoya débilmente las relaciones a niveles basales, y, consecuentemente la posición de la raíz dentro de los Homobasidiomycetes es también desconocida (Hibbett y Thorn, 2000). Por otra parte, estos resultados sustentan el punto de vista respecto a que la historia evolutiva de los homobasidiomicetos está marcada por procesos de convergencia y paralelismo en la morfología del basidioma (Hibbett *et al*, 1997).

Este trabajo es un gran esfuerzo por entender las relaciones filogenéticas entre los homobasidiomicetos, pero aun falta mucho por conocer sobre las relaciones filogenéticas de estos grupos de hongos. Sin embargo, es el marco referencial más robusto con el que se cuenta actualmente, sobre la sistemática de homobasidiomicetos, y que sirve de marco de referencia de trabajos futuros, ya sean sistemáticos, ecológicos o evolutivos. Los avances en el conocimiento taxonómico de los hongos, particularmente de sus relaciones filogenéticas, permitirá tomar decisiones sobre la conservación y la explotación de estos recursos naturales y de los ecosistemas donde ellos habitan.

Problemática taxonómica del género *Hydnodon*

El género *Hydnodon* ha sido desde siempre punto de controversia, particularmente su ubicación taxonómica, debido a que presentan una combinación de características *sui generis*. El estudio taxonómico de dichos caracteres no ha permitido esclarecer con certidumbre las relaciones filogenéticas del género, ni su posición taxonómica, por lo contrario ha generado la controversia que nos ocupa.

Tradicionalmente, la taxonomía del género se basa exclusivamente en caracteres morfológicos como el tipo de himenio, la consistencia, el color de la esporada, el sistema

hifal, así como en el tamaño, forma y ornamentación de las esporas. La importancia taxonómica dada por lo diferentes taxónomos a cada uno de los distintos caracteres morfológicos, ha dado lugar a diversas hipótesis sobre la ubicación taxonómica y las relaciones filogenéticas del género *Hydnodon* (Fig. 2).

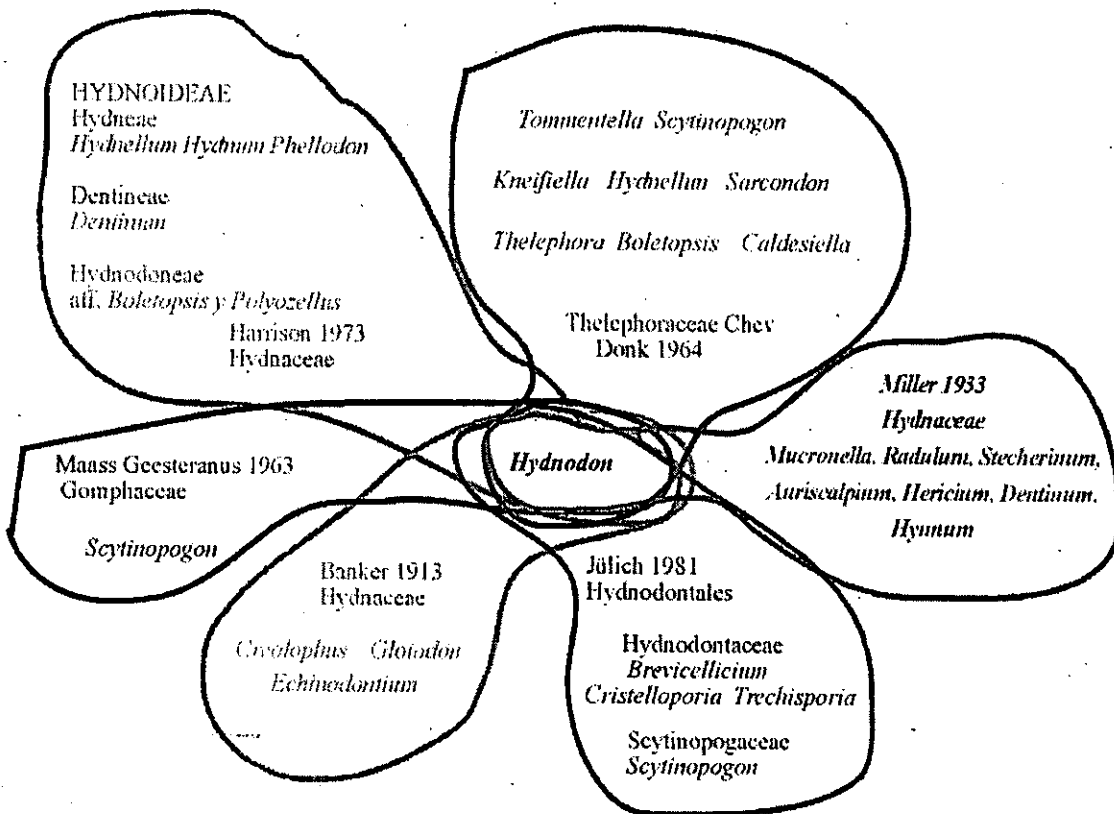


Fig. 2 Propuestas tradicionales de clasificación para *Hydnodon*.

Banker (1913), revisando un ejemplar determinado como *Hydnum theleporum* Lev., describió el género monotípico *Hydnodon*; y lo definió como un basidiomiceto con basidioma pileado-estipitado, expandido e irregular, de superficie plana, color naranja a rojo; de contexto carnoso, delgado y cuando seco es duro y quebradizo; el estípite es irregular. Presenta un himenio de tipo hidnoide con dientes cortos y robustos, irregulares y tuberculoides de color rojizo; las esporas son pequeñas, blanquecinas, opacas y con ornamentación equinulada.

De acuerdo con Banker (1913), el nuevo género pertenecía a la familia Hydneaceae *sensu* Fries, guardando especial relación con los géneros *Phellodon*, *Auriscalpium* y *Gloiodon* por la semejanza entre las esporas de estos cuatro géneros. Aunque la consistencia y estructura

del píleo lo hacia más semejante a *Hydnum* (Banker, 1913). Así mismo, en un estudio de revisión de la familia Hydnaceae *sensu* Fries, Miller (1933) excluye a géneros como *Echinodontium*, *Phlebia*, *Irpex*, *Sistotrema*; y deja a dentro de la familia a géneros como *Mucronella*, *Gloiodon*, *Steccherinum*, *Auriscalpium*, *Hydnum*, *Odontia* e *Hydnodon* Banker, este último por presentar un himenio dentado y por tratarse de un autobasidiomiceto.

Harrison (1973) basándose en el estudio de caracteres morfológicos macroscópicos "fácilmente reconocibles", considera que *Hydnodon* debe permanecer dentro de la familia Hydnaceae *sensu* Harrison. La cual está dividida en las subfamilias Hydnoideae y Hericioideae, que a su vez se dividen en tribus. Al género *Hydnodon* lo ubicó en la subfamilia Hydnoideae, específicamente en la tribu Hydnodoneae, por la presencia de un himenio hidnoide, y por la características particulares del propio género. Entre sus más cercanos "parientes" estarían *Hydnellum*, *Hydnum*, *Phellodon*, *Bankera* y *Dentinum*, miembros también de la subfamilia Hydnoideae. A su vez, Harrison (1973) sugiere que algunas características de *Hydnodon*, como el color de la esporada y la ornamentación de las esporas, lo relaciona más con la familia Thelephoraceae.

Es importante resaltar que los caracteres utilizados por estos taxónomos (tipo de himenio, la coloración, el olor, el contexto) resultan muy útiles en la taxonomía a nivel de géneros y especies de hidnoides. Sin embargo, estas mismas características han resultado ser muy ambiguas para establecer los límites entre las familias Hydnaceae, Thelephoraceae y Polyporaceae (Miller, 1933). El tipo de himenio fue un carácter ampliamente usado en la clasificación y taxonomía tradicional entre las especies, por lo que Harrison (1973) lo acepta. Aunque sin dejar de mencionar que en el caso de la familia Hydnaceae, el himenio dentado o hidnoide se presenta en una amplia gama de grados y formas, lo que sugiere orígenes distintos. Aunado a esto y compartiendo opinión con Miller (1933), este taxónomo da cuenta de la dificultad de establecer los límites entre las familias Thelephoraceae, Polyporaceae e Hydnaceae.

Años antes, Maas Geesteranus (1963) sugirió una compleja relación entre los géneros *Hydnodon* y *Scytinopogon*, este último tradicionalmente ubicado en la familia Clavariaceae, con base en la presencia de hifas infladas, una trama hifal monomítica y esporas cianofílicas cuyas formas y ornamentaciones son semejantes. Así mismo, plantea un escenario evolutivo entre las formas de los basidioma de ambos géneros, y finalmente sugiere que la familia más apropiada para ambos géneros es la familia Gomphaceae *sensu*

Geesteranus debido a que en ésta se encuentran géneros con esporas cianofílicas. Sin embargo, esta propuesta ha sido desvirtuada ya que muchas de las especies de *Scytinopogon* utilizadas por este taxónomo para basar su propuesta fueron posteriormente transferidas a otros géneros, sin embargo nuevos estudios han reportado esporas cianofílicas en ambos géneros (Cifuentes, 1996; ver resultados del presente trabajo).

Por su parte, Donk (1964) reduce la familia Hydnaceae al género *Hydnum* y propone la inclusión de *Hydnodon* dentro de la familia Thelephoraceae Chev. debido a la presencia de esporas subglobosas y equinuladas, semejantes a las esporas de *Sarcodon* e *Hydnellum*. Además dentro de esta familia existen algunos géneros de hidnoides estipitados y propone que la presencia del ácido telefórico y la reacción positiva a KOH son características distintivas de la familia Thelephoraceae. No obstante, en el caso de *Hydnodon* no se ha confirmado la primera y la segunda es negativa. Estudios más recientes (Cifuentes, 1996; Stalpers, 1993) han demostrado que ambas características no se presentan en todos los géneros de la familia ni son exclusivos de ésta. Durante la revisión del orden Thelephorales, llevada a cabo por Stalpers (1993), *Hydnodon* no es incluido y tampoco se propone una hipótesis alternativa al respecto, a pesar de que la propuesta de ubicación taxonómica de Donk (1964) es ampliamente aceptada en la actualidad.

Casi 20 años después, Jülich (1981) propone una familia propia para el género, la familia Hydnodontaceae Jülich que junto con la familia Scytinopogaceae forman el orden Hydnodontales. Este orden está caracterizado por la presencia de basidios cilíndricos a suburniformes, hifas infladas y esporas pequeñas con ornamentación verrugosa. Y estaría relacionado con Sistotrematales y tal vez con Cantharellales vía la familia Scytinopogaceae.

La familia Hydnodontaceae agrupa hongos que van desde resupinados hasta estipitados, con himenio poroide, granular o hidnoide; y esporas verrugosas a equinuladas. Entre los géneros incluidos está *Hydnodon* Banker, *Brevicellicium* Larsson y Hjortstam, *Cristelloporia* Johansen y Ryv y *Trechispora* Karst, estos tres últimos ubicados posteriormente dentro de la familia Sistotremataceae Jülich (Hawksworth *et al*, 1995). Aunque Jülich (1981) propone nuevamente alguna relación entre los género *Hydnodon* y *Scytinopogon*, los caracteres empleados para fundamentar dicha relación son distintos a los empleados por Maas Geesteranus (1963), además ubica a cada género en familias diferentes.

Hasta el momento, los trabajos taxonómicos en *Hydnodon*, basados exclusivamente en el estudio de caracteres morfológicos del basidioma y algunos caracteres microscópicos, no han aportado evidencia suficiente que permita clarificar tanto las relaciones filogenéticas de este género como su posición filogenética entre los homobasidiomicetos. Más aun, estos caracteres han sido fuertemente cuestionados como caracteres diagnósticos, al encontrárseles distribuidos en grupos de hongos muy diversos.

Los caracteres moleculares en la sistemática filogenética

Las especies son un mosaico de características primitivas y derivadas resultado de su historia evolutiva; estas características son rasgos o atributos intrínsecos que las especies ha heredado a través del proceso evolutivo. En la actualidad, la sistemática filogenética hace uso de todos los caracteres -morfológicos, fisiológicos, de ultraestructura, bioquímicos o moleculares- de las especies. Independientemente del tipo de carácter que se emplee todos deben ser vistos como potenciales conectores o marcadores históricos, ya que cualquier carácter puede contener información histórica a algún nivel particular de la jerarquía biológica (Sober, 1988; Hall, 1994, González, 1997). Lo importante es que estos caracteres presenten variación discreta y que ésta sea heredable e independiente de otros caracteres (González, 1996). Desde un enfoque cladista, éstos deben cumplir con los criterios de homología: similitud, conjunción y congruencia (Paterson, 1982, De Luna, 1996).

En la última década, el estudio de la variación a nivel de secuencias de ADN ha tomado un papel central en la reconstrucción de las relaciones filogenéticas. Particularmente, la sistemática molecular tiene como objetivo inferir las relaciones filogenéticas con base en la información histórica contenida en genes, productos de éstos, o regiones del genoma de las especies (Moritz y Hillis, 1996b; Page y Holmes, 1998). Diversos factores han sido importantes en el avance de esta "nueva" disciplina. El desarrollo de la PCR (por sus siglas en inglés, Polimerase Chain Reaction) ha posibilitado obtener, en un corto tiempo, grandes cantidades de ADN a partir de minúsculas muestras (Bruns *et al*, 1991). Así mismo, la secuenciación automatizada permite obtener rápidamente una gran cantidad de datos (Miyamoto y Cracraft, 1991; Soltis y Soltis 1998a).

Por su parte, como consecuencia del empleo de datos moleculares, la sistemática filogenética ha enfrentado nuevos retos ontológicos, epistemológicos, metodológicos y técnicos en las distintas fases del análisis. Dentro de la planeación de un análisis filogenético de secuencias de ADN, la selección del (o los) marcador(es) histórico(s) - ya sea un gen estructural, codificable o regiones no codificables- debe basarse sobre la problemática taxonómica que se pretenda contestar. Esto se debe a que la utilización de uno u otro tipo de marcador, cualquiera que sea el gen, tiene una cobertura muy baja y una resolución a un nivel taxonómico particular (Baverstock y Mortiz, 1996; Hillis *et al.*, 1996b; González, 1997). Por su parte, el alineamiento de las secuencias equivale a la construcción de una matriz, lo que epistemológicamente corresponde a la formulación de las hipótesis de homología primaria (Brower y Schawaroch, 1996) por lo que los parámetros empleados en este proceso tiene fuertes implicaciones en los resultados obtenidos. De manera conjunta a los avances en el marco teórico, nuevas estrategias de análisis o de búsquedas de árboles se desarrollan año con año, repercutiendo en los alcances que la investigación sistemática va logrando.

El genoma como banco de información histórica

El genoma, particularmente en eucariontes, está constituido por regiones codificadoras, reguladoras, estructurales y por regiones no codificadoras. Las distintas regiones del genoma presentan tasas de cambio heterogéneas como consecuencia de los procesos evolutivos que las afectan, dando como resultado un banco de información histórica de amplia señal filogenética (Page y Holmes, 1998). De hecho, dentro de un sólo gen o región génica se pueden presentar tasas de cambio heterogéneas, por lo que podemos observar la alternancia de regiones altamente conservadas con regiones altamente variables. Como consecuencia de esto, los datos moleculares son utilizados en la investigación de las relaciones filogenéticas de diversos grupos biológicos y a los distintos niveles de la jerarquía taxonómica. Una ventaja de los datos moleculares es que las técnicas utilizadas para su obtención pueden ser aplicadas a cualquier gen o productos de éste y a la genética de cualquier organismo (González, 1998). Los datos moleculares, como marcadores históricos, representan una fuente alternativa de datos, principalmente, en aquellos grupos de organismos donde la variación morfológica es pobre o donde cualquier otra fuente de información histórica resulta poco accesible. Particularmente, en la sistemática

filogenética de hongos el uso de los datos moleculares ha sido aceptado como una fuente alternativa o complementaria a los datos morfológicos, dando lugar a un nuevo entendimiento de la historia evolutiva del reino Fungi (Bruns *et al*, 1991, Berbee y Taylor, 1999)

En la actualidad existe una tendencia a combinar distintos caracteres, ya sean dos ó más genes o bien datos morfológicos con datos moleculares. La combinación de diversos genes o tipos de caracteres, con tasas evolutivas diferentes, es una estrategia que permite resolver los distintos niveles de una filogenia (Soltis y Soltis, 1998a). El efecto que sobre la resolución de un cladograma tiene el combinar genes, con tasas evolutivas diferenciales, es conocido como el valor complementario (HersHKovitz *et al*, 1999). Diversos estudios teóricos y empíricos han demostrado que los valores de robustez de un cladograma se incrementan cuando se adicionan más caracteres al análisis (Huelsenbeck, 1995; Poe y Swofford, 1999). Particularmente, cuando dos o más conjuntos de datos se combinan, los valores de bootstrap (medida de robustez de los clados), el número de clados resueltos y la proporción de sitios informativos por taxón se ven incrementados significativamente en comparación con los resultados obtenidos de análisis separados (Soltis *et al*, 1998; Bremer *et al*, 1999). Aunado a esto, algunos estudios empíricos han demostrado que en los análisis de los datos combinados, el tiempo computacional se reduce drásticamente respecto al tiempo requerido para los análisis de los datos separados. Estas observaciones aparentemente reflejan el efecto aditivo de las subyacentes señales filogenéticas de cada uno de los tipos de datos (Soltis *et al*, 1998).

En el caso de la sistemática filogenética de hongos, la estrategia de combinar genes ha tenido resonancia. Moncalvo *et al* (2000) proponen dos razones para combinar genes mitocondriales y nucleares, la primera es debido a que éstos no están ligados (físicamente) y la segunda, porque presentan tasas de cambio distintas y entonces podrían contar historias filogenéticas distintas o complementarias.

Las subunidades cortas ribosomales nuclear (nuc-SSU) y mitocondrial (mt-SSU) en la sistemática filogenética

Los genes del ADN ribosomal se han utilizados ampliamente como fuente de caracteres en la reconstrucción filogenética (Berbee y Taylor, 2000). Esto se atribuye a por lo menos cuatro propiedades de estos genes: una función crítica dentro de la célula, ubicuidad,

variabilidad y abundancia dentro del genoma (Hershkovitz *et al*, 1999). El ADN ribosomal es la región del genoma que codifica para el ARN ribosomal, el cual forma parte estructural de los ribosomas, sitio donde se lleva a cabo la traducción de ARNm a proteínas. Estos genes es que presentan a lo largo de toda la escala evolutiva y en los distintos genomas (nuclear, mitocondrial y en cloroplastos). Otra característica importante es que estos genes presentan niveles de conservación heterogénea, consecuencia del efecto diferencial de las fuerzas de selección y de los procesos de evolución (Schlötterer, 1998; Hillis y Dixon, 1991; Bruns y Szaro, 1992), lo que colectivamente proporciona una señal filogenética a muy diversos niveles de la jerarquía taxonómica y consecuentemente su uso a diferentes niveles de la diversidad biológica (Bruns *et al*, 1991; Soltis y Soltis, 1998a; Hershkovitz *et al*, 1999). Su abundancia dentro de los genomas (nuclear, mitocondrial, cloroplasto), posibilita la amplificación enzimática de los genes a partir del ADN genómico, aun cuando la calidad de éste sea no sea la mejor (Berbee y Taylor, 2000). Así mismo, existe una amplia gama de “primers” comerciales que permiten amplificar y secuenciar estos genes. Además están disponibles una gran cantidad de secuencias de estos genes en hongos en las diferentes bases de datos (GeneBank, NCBI), lo que permite hacer comparaciones a distintos niveles taxonómicos.

En eucariontes, el cistrón del ADNr codifica las subunidades 18S, 5.8S y 26 ó 28S, separadas por dos espaciadores internos, ITS-1 e ITS-2, cada cistrón está flanqueado por dos espaciadores intergénicos, IGS-1 e IGS-2 (Fig. 3). La región 18S (nuc-SSU), que codifica el ARN nuclear que se incorpora a la subunidad corta de los ribosomas, contiene aproximadamente 1 800 bp y se encuentra flaqueada por las regiones IGS-2 e ITS-1. Está presente en todos lo organismos vivos, aunque en los procariontes la subunidad ribosomal 16S es considerada su análogo, y exhibe una señal filogenética similar en rangos taxonómicos equivalentes (Hillis y Dixon, 1991; Soltis y Soltis, 1998a). La región de la 18S es una de las regiones más altamente conservadas dentro los genes ribosomales cuya tasa de cambio es relativamente baja; sin embargo, presenta, al igual que la 26 o 28S, pequeños segmentos o regiones con tasas de cambio altas (Schlötterer, 1998; Hershkovitz *et al*, 1999). Las diferentes tasas de cambio de la secuencias tiene una correspondencia con su estructura secundaria, donde las regiones conservadas corresponden a las regiones “stem” y las regiones variables corresponden a las regiones “loop” de la estructura del asa (Soltis y Soltis 1998b). Estas características hacen posible que el alineamiento se lleve a cabo sin

intrones de Tipo I, preferentemente insertados en genes codificadores de proteínas (Osiewacz, 1996; Paquin *et al*, 1997; Page y Holmes, 1998). Además el genoma mitocondrial presentan una mayor proporción de adeninas y timinas que el nuclear.

Algunos trabajos sistemáticos en hongos, con en la subunidad corta ribosomal mitocondrial (mt-SSU), han reportado que presenta regiones hipervariables alternadas con regiones relativamente conservadas (Hibbett y Donoghue, 1995). Su tamaño en hongos varía entre 600 y 800bp, aunque se han reportado secuencias de hasta 2 000 bp, diferencias que se deben a eventos de inserción-delección en las regiones hipervariables. Un aspecto interesante del genoma mitocondrial de hongos es que este se hereda en forma biparental y hay recombinación genética, contrario a los que sucede en animales en don se hereda de forma uniparental y la recombinación no se lleva a cabo (Paquin *et al*, 1997).

En los estudios sistemáticos, diversos genes ribosomales o codificadores de proteínas del genoma mitocondrial se emplean como fuente de evidencia en la reconstrucción filogenética de diversos grupos de seres vivos y a los distintos niveles de la jerarquía taxonómica. Esto se debe a que comparte con sus homólogos nucleares algunas propiedades como un amplio rango de tasas evolutivas lo que permite resolver las relaciones filogenéticas a distintos niveles de la jerarquía taxonómica (Hillis *et al* 1996a).

Los genes ribosomales del genoma mitocondrial se han empleado, principalmente en la sistemática zoológica para descubrir las relaciones filogenéticas a nivel de especies cuyas divergencias serían más recientes (Hillis *et al* 1996a). En la sistemática filogenética de hongos ésta subunidad ha resultado ser una importante fuente de datos principalmente a nivel de específico y subespecífico (ver de Jong, 2001).

OBJETIVOS

- 1) Obtener una hipótesis de las relaciones filogenéticas del género *Hydnodon* con base en el análisis cladista de las secuencias nuc-SSU y mt-SSU, utilizando como marco de referencia la hipótesis Hibbett *et al* (1997) de las relaciones filogenéticas de los Homobasidiomycetes.
- 2) Con base en la hipótesis filogenética obtenida realizar un análisis crítico de las propuestas previas de clasificación del género *Hydnodon* y de los caracteres taxonómicos empleados.
- 3) Realizar una revisión taxonómica del *Hydnodon thelephorus*, principalmente de los caracteres que han tenido relevancia en su clasificación.
- 4) Desarrollar un método de extracción de ADN genómico a partir de micromuestras de ejemplares herborizados, cuya calidad del ADN sea adecuada para su posterior amplificación y secuenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de hacer explícitos el contenido y estructura del presente trabajo, se considero conveniente desarrollarlo en tres aspectos fundamentales: 1) la revisión taxonómica de *Hydnodon thelephorus*, 2) la obtención de las secuencias génicas de las subunidades cortas ribosomales mitocondrial y nuclear a partir de ejemplares herborizados, y 3) el análisis cladista para conocer la posición filogenética del género *Hydnodon*, partiendo de los resultados obtenidos por Hibbett *et al* (1997) sobre las relaciones filogenéticas de los Homobasidiomycetes.

1) Revisión taxonómica de *Hydnodon thelephorus*

Durante el presente trabajo se revisaron, bajo microscopio estereoscópico y óptico, cinco ejemplares de *Hydnodon thelephorus*, provenientes de zonas tropicales de los estados de Veracruz y Quintana Roo, pertenecientes a las colecciones del Herbario de Instituto de Ecología, A. C. Xalapa (XAL), al Herbario de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (TLXM), y al Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. (ENCB). (Ver Anexo 1.)

La revisión morfológica comprendió tanto caracteres macroscópicos como microscópicos; para estos últimos se realizaron cortes a mano libre empleado navajas comerciales de doble filo, tanto en píleo como en el estípite, exponiéndose en alcohol etílico al 96%, posteriormente al 70% y finalmente montándose en KOH al 10%. Se tomaron algunas fotografías de caracteres de importancia taxonómica. Por medio de un ocular micrométrico previamente calibrado, se realizaron las mediciones del tamaño de esporas y basidios. Con la finalidad de observar y fotografiar con mayor claridad las diversas estructuras microscópicas se empleó floxina como colorante; para comprobar o descartar una reacción cianofílica en las esporas se usó azul de algodón.

Para la descripción de los caracteres macroscópicos del basidioma se empleó un microscopio estereoscópico. Además fueron recopilados los datos de campo de cada uno de los ejemplares, siempre y cuando estuvieran disponibles. La revisión del género *Scytinopogon* fue únicamente bibliográfica.

Se prepararon dos muestras de esporas de *H. thelephorus*, bajo la técnica de O'Donnell (1979) modificada por Espinosa (coms. pers.), para ser observadas al microscopio

electrónico de barrido MEB (JEOL JSM-5310LV), del Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, UNAM.

2) Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU

Antes de comenzar a describir los métodos empleados, es importante señalar que la utilización de materiales herborizados en la extracción de ADN y la obtención de datos moleculares representa en sí un reto desde el punto de vista de las técnicas moleculares. Ya que en muchas ocasiones el ADN de los organismos herborizados se encuentra degradado y en bajas concentraciones, dificultando la amplificación y secuenciación de los genes de interés.

Una de las principales causas del mal estado de ADN extraído de material herborizado, es justamente el método de herborización. En hongos, la herborización por medio de calor directo podría influir fuertemente en los procesos de degradación del material genético. En algunas ocasiones esta situación se agrava con los años y por el tratamiento que se les da a los ejemplares dentro de las colecciones.

Otro factor que puede influir en la calidad del ADN es el método de extracción. En el caso de hongos, la ruptura de las paredes celulares requiere de procedimientos de más agresivos, que en muchas ocasiones pueden degradar aun más el ADN. Además estos procesos liberan grandes cantidades de polisacáridos, principales constituyentes de las paredes celulares, que actúan como "secuestradores de ADN", disminuyendo el rendimiento de la extracción.

Para minimizar algunos de estos problemas, el ADN se extrajo exclusivamente del tejido del himenio o de soluciones de esporas, utilizando para ello "detergentes" orgánicos recomendados para tejidos con grandes cantidades de polisacáridos. Esto permitió obtener un ADN genómico de mejor calidad y en mayor concentración, y casi sin ninguna contaminación. Una estrategia complementaria que se llevo a cabo fue el aumento en el tiempo de precipitación alcohólica del ADN genómico, lo cual permitió obtener mayor cantidad de ADN a partir de pequeñas muestras de tejido.

Los resultados obtenidos bajo estas estrategias fueron positivos, permitiendo la posterior amplificación y secuenciación de los genes ribosomales mitocondrial y nuclear a partir del ADN genómico extraído de ejemplares herborizados, y sólo fueron necesarias algunas pequeñas modificaciones en los protocolos estándares desarrollados en Laboratorio de

Sistemática Molecular, bajo la dirección de la M. Sc. Dolores González, adscrito al Departamento de Sistemática Vegetal del Instituto de Ecología A. C. de Xalapa, Ver.

Para la extracción, amplificación y secuenciación del ADN de *H. thelephorus*, fueron utilizados los ejemplares: Estrada-Torres 6230., Escalante 180, Bandala-Muñoz 1011 y Ventura 5898, y para *Scytinopogon* se usó el ejemplar Cifuentes 676. (Anexo 1.)

La obtención de las secuencias génicas se divide en: a) extracción de ADN genómico, b) purificación del ADN genómico, c) amplificación de los genes y d) su secuenciación.

a) Extracción de ADN genómico

Se usaron aproximadamente 200 mg de tejido herborizado seco, principalmente del himenio, ó 1 ml de solución de esporas para la extracción. El tejido fue macerado con 400 µl de buffer de extracción (CTAB 2x, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20mM, NaCl 1.4 M), usando como abrasivo vidrio finamente molido. Después de la maceración, se agregaron 200 µl de buffer de extracción. Toda la mezcla fue puesta en un baño maría a 55°C (PRESICION modelo 180) por 48 hrs.

Antes de iniciar la extracción, el tejido se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le agregó 1 vol. igual de P:C:I (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1v/v), agitándose suavemente por algunos segundos. Después de unos minutos de reposo, la mezcla se centrifugó a 12 300 rpm durante 15 min en una microcentrifuga (Micro Max, IEC). La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril, se le agregó 1 vol. igual de C:I (Cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1v/v) y se centrifugó a 12 900 rpm por 10 min. Una vez separada la fase acuosa de la fase orgánica, la primera se repartió uniformemente en varios tubos eppendorf estériles. Por cada 200 µl de esta solución se agregaron 100 µl de una solución de acetato de sodio (NaCH₃CO₂) 6 M. y 1 ml de etanol absoluto previamente enfriado (-20°C), y se dejó precipitando a -20°C por tiempo mínimo de 48 hrs.

Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 13 200 rpm durante 15 min. El sobrenadante se desecho y el botón se lavó con 300 µl de etanol al 80 % (v/v), previamente enfriado a -20°C. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 min para formar nuevamente el botón y se extrajo el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta, evitando resuspender el botón. El precipitado de ADN se secó en un microconcentrador (Hetotrap CT 60e y

Hectovac VR1, HETO-HOLTEN A/S) a 50°C por 7 min. Finalmente, el botón se resuspendió en 30 o 40 µl de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8) o de agua destilada estéril, para ello se agitó por 3 min en un vórtex (Maxi Max 37600, THERMOLYNE).

De esta solución se tomaron de 5 a 7 µl para calcular la concentración de ADN genómico, usando como estándar una solución de ADN λ de concentración conocida. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa estándar al 0.8 %, utilizando bromuro de etidio como revelador. Una estrategia alternativa que permitió ahorrar muestra de ADN, fue la siguiente: antes de ser cuantificada la concentración de ADN, la muestra fue purificada con GENE CLEAN II Kit (Bio. 101).

b) Purificación del ADN genómico

La solución de ADN genómico se purificó bajo el protocolo de GENE CLEAN II Kit (Bio 101). Sólo en algunas ocasiones se aumentó el tiempo de contacto entre las partículas de sílica de "glass milk" y la solución de ADN. El ADN se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril, en dos tiempos - 15 µl cada uno. A continuación se describe el protocolo.

A la solución de ADN se adicionaron 3 vol. de NaI y aproximadamente 1µl de "glass milk" por cada 100µl de la solución ADN/NaI, agitándose por algunos segundos en el vórtex. Se dejó reposar por un mínimo de 15 min hasta un máximo de 72 hrs, resuspendiendo esporádicamente la solución. Posteriormente, se centrifugó a 13 200 rpm durante 5 min, la fase acuosa se desecho. El botón de "glass milk"/ADN se lavo tres veces con 300µl de "new wash". Centrifugándose brevemente para formar el botón, y desechando el sobrenadante en cada lavada. El botón de ADN/glass milk se secó a 50°C durante 5 min en un microconcentrador. Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en 30 o 40µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH: 8) o agua destilada estéril, y se centrifugó por última vez para separar la sílica de la solución acuosa de ADN. Esta solución se utilizó para amplificar el gen de interés a través de la técnica de PCR, usando "primers" específicos.

c) Amplificación de ADNr.

Por cada 50µl de reacción, se utilizaron entre 20 y 25 ng de ADN genómico, 5µl de 10X buffer de amplificación para la enzima Platinum Pfx (Gibco BRL®, Life Technologies), 5 µl

de una solución equimolar de dNTP's (250 μ M cada nucleótido), 0.5 unidades de ADN polimerasa Platinum Pfx, 0.6 a 1 μ l de MgSO₄ 50mM, 3 μ l de cada primer 10mM, 0.5 μ l de Enhancer PCRx 10x, y se adicionó agua destilada estéril hasta completar los 50 μ l. Las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo en un Termociclador Techne (Genius), bajo las siguientes condiciones: (1) un ciclo a 94°C por 4 min; (2) 25-35 ciclos a 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, 68°C por 2 min; (3) un ciclo a 72°C por 7 min.

Para las amplificaciones de los pares MS1- MS2 y NS3 - NS8, se utilizaron 6 μ l de dNTP's 10mM, y la temperatura de "anealing" fue elevada hasta 55°C. Para el gen mitocondrial se utilizaron 1.5 μ l de cada primer. El tamaño de los productos amplificados se determinó con ADN digerido con EcoRI/Hind III.

Reamplificación. En la mayoría de los casos fue necesario realizar reamplificaciones para aumentar la concentración del producto de amplificación. Por cada 50 μ l de reacción se utilizaron entre 20 y 25 ng de los fragmentos previamente amplificados, 5 μ l de buffer de amplificación para la enzima AmpliTaq 10x, 8 μ l de una solución equimolar de dNTP's (250 μ M cada nucleótido), 0.35 μ l de ADN polimerasa AmpliTaq, 2.5 μ l de cada primer 10mM, y se adicionó agua destilada estéril hasta completar los 50 μ l. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: (1) un ciclo a 94°C por 3 min; (2) 25-35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s., 68°C por 1 min; (3) un ciclo a 72°C por 7 min.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa estándar al 0.8%, usando como revelador bromuro de etidio. El tamaño de los productos amplificados se determinó con ADN digerido por EcoRI/Hind III.

Primers. Los primers utilizados en el presente trabajo fueron descritos por White *et al* (1990), R. Vilgalys y por Lane *et al* (1985). Para amplificar la subunidad ribosomal corta nuclear (18 S), se usaron los pares de primers NS1-NS8, NS1-NS4 y NS3-NS8 (Tabla 1). Y para la subunidad ribosomal corta mitocondrial (12S) se usó el par de primers MS1-MS2 (Tabla 2).

Primer	Secuencia (5' → 3')	Dirección	Autor
NS1	GTAGTCATATGCTGTCTC	5' → 3'	White <i>et al</i> 1990
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	5' → 3'	White <i>et al</i> 1990
NS4	CTCCGTCAATTCCTTAAG	3' → 5'	White <i>et al</i> 1990
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	3' → 5'	White <i>et al</i> 1990

Tabla 1. Secuencias de los primers diseñados para la nuc-SSU

Primers	Secuencia (5' → 3')	Dirección	Autor
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	5' → 3'	White <i>et al</i> 1990
MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC	3' → 5'	White <i>et al</i> 1990

Tabla 2. Secuencias de los primers diseñados para la mt-SSU

Purificación de los productos de PCR. Los productos de PCR se purificaron bajo el protocolo de "Gene Clean" (Bios, 101), descrito en la sección de purificación de ADN genómico. Sólo cuando se observaron más de un producto de PCR, las muestras se purificaron en un gel de agarosa (low melting point) al 2%, se cortó la banda de interés y se utilizó ADN digerido con EcoRI/Hind III para identificarla.

d) Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo bajo el protocolo de secuenciación cíclica, recomendado para "Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit" (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Una vez purificada y cuantificada la solución de los productos de PCR, se usaron aproximadamente entre 100 y 150ng del ADN amplificado por cada reacción. Por cada 20µl de reacción se utilizó un 1µl de primer 10mM, 7µl de "Thermo Sequenase" y se aforó con agua destilada estéril a 20µl. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en una termocicladora "DNA thermal cycler 480" (PERKIM-ELMER) bajo las siguientes condiciones de secuenciación cíclica: (1) 3 min a 94 C; (2) 25 ciclos a 94°C por 30s, a 45°C por 15 s y a 60°C por 4 min. Para la secuenciación parcial de la nuc-SSU se utilizaron los primers NS1, NS3, NS4, SR7, SR5 y SR2, y para la secuenciación parcial de la mt-SSU se usaron los primers MS1 y MS2 (Tablas 3 y 4).

Primer	Secuencia (5' → 3')	Dirección de secuenciación	Autor
SR2	CGGCCATGCACCACC	3' → 5'	Vilgalys
SR5	GTGCCTCCGTC AATT	3' → 5'	Vilgalys
SR7	GTTCAACTACGAGCITTTTAA	3' → 5'	Vilgalys
NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC	5' → 3'	White <i>et al</i> 1990
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	5' → 3'	White <i>et al</i> 1990
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTAAG	3' → 5'	White <i>et al</i> 1990

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados en la secuenciación de la nuc-SSU

Primers	Secuencia (5' → 3')	Dirección de secuenciación	Autor
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	5'→3'	White <i>et al</i> 1990
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC	3'→5	White <i>et al</i> 1990

Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados en la secuenciación de la mt-SSU

Una vez concluido el programa de secuenciación, las reacciones se trasladaron cada una a un tubo eppendorf estéril, evitando el aceite mineral que se utiliza para que no se evapore la reacción. Las reacciones se precipitaron con 7µl de acetato de amonio 7.5M, y 68µl de etanol absoluto (-20°C) en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min, desechándose la fase acuosa. El precipitado se lavó con 300µl de etanol al 70% (v/v) y nuevamente se centrifugó, por 15 min, desechándose el sobrenadante. La muestra se secó a 50°C por 5 min. Por último, se adicionó 3.8µl de buffer "formamide loading dye", del kit de secuenciación. Las muestras se desnaturalizan a 70°C durante 2 min, y se corren en un gel de acrilamida al 5% en un secuenciador automatizado ABI-373A (PERKIM-ELMER). El gel de secuenciación se analiza con el programa Sequencing Analysis 3.0 (Applied Biosystems).

3) Análisis cladista

El análisis cladista se divide en tres fases: a) construcción de la matriz de datos, b) la búsqueda de los árboles más parsimoniosos y c) las pruebas de robustez. Particularmente, en los análisis con secuencias génicas la construcción de una matriz corresponde al alineamiento de las secuencias. El segundo punto dentro de un análisis cladistas es la búsqueda de los árboles más parsimoniosos. El tercer punto es la evaluación de las hipótesis filogenéticas a través de las pruebas de robustez, por ejemplo bootstrap e índice de decaimiento.

a) Construcción de la matriz de datos

La matriz de datos original fue obtenida desde el sitio web de TreeBASE (<http://herbaria.harvard.edu/treebase/>) y salvada como archivo NEXUS. Las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU de *Sparassiss spathulata*, *Cantharellus tubaeformis*, *Aleurodiscus botryosus*, *Albatrellus syringae* y *Peniophora nuda* se excluyeron en todas las búsquedas. Las tres primeras secuencias fueron excluidas de los análisis debido a que presentaban

regiones altamente divergentes respecto al resto de los OTU's, lo que hace difícil su alineamiento en estas regiones. En el caso de las secuencias de *A. syringae* y *P. nuda* se excluyeron también del análisis ya son "taxa volátiles", es decir, la posición de estos OTU's es inestable.

Con la intención de mejorar el muestreo de Hibbett *et al* (1997) para homobasidiomicetos y someter a prueba las distintas hipótesis de clasificación previas para *Hydnodon*, se realizó una búsqueda en la base de datos de secuencias génicas de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/). Fueron introducidos en el buscador de NCBI todos los nombres de los taxones previamente relacionados con el género *Hydnodon*, estando disponibles solamente las secuencias ribosomales mitocondriales de *Clavaria zollingerii* (AF185985), *Sistotrema musicola* (AF334892), *Irpex lacteus* (AF163043) y *Dentipellis separans* (AF334876); y nucleares de *S. musicola* (AF334936), *I. lacteus* (AF082683) y *D. separans* (AF334911).

Las secuencias generadas en este trabajo primero se depuraron y luego se alinearon. Cada uno de los electroferogramas producidos durante la secuenciación se revisaron visualmente para determinar las regiones útiles de la secuencia de cada gen. En cada reacción son secuenciadas de 400 a 500 bp aproximadamente. Por encima de éste margen la secuenciación es poco confiable, presentándose numerosos nucleótidos ambiguos lo que hace necesario excluir estos datos. Debido a ello, fue necesario realizar varias reacciones de secuenciación para obtener la secuencia completa de cada gen. En el caso de la nuc-SSU se obtuvieron secuencias con los primers NS1, NS3, NS4, SR2, SR5 y SR7; y en el de caso de la mt-SSU secuencias con los primers MS1 y MS2. Todas las secuencias se procesaron en el programa SeqApp, en dirección 5' → 3'. En el caso de las secuencias que se obtuvieron con dirección 3' → 5 se re-escribieron en la dirección 5' → 3' usando el comando "Rev-Compl" del menú de "Sequence" del programa. Cuando se presentaron ambigüedades en las secuencias de un mismo gen y mismo ejemplar, se consultaron nuevamente los electroferogramas de cada una de ellas para resolver dicha ambigüedad.

Finalmente, las secuencias mitocondriales y nucleares de *H. thelephorus*, *S. robustus*, *S. musicola*, *I. lacteus*, *D. separans* y *C. zollingerii* se incorporaron a la matriz original para ser alineadas manualmente, en SeqApp, tomando como referencia el alineamiento propuesto por Hibbett *et al* (1997). En total, la matriz consistió de 90 taxones y de 3487 caracteres. Se

calcularon las frecuencias de cada uno de los nucleótidos con la opción " bases" del menú de "Data" en PAUP 4.0 (Swofford, 2001) y el porcentaje de purinas y pirimidinas para cada gen.

2) *Búsqueda de los árboles más parsimoniosos*

Esta parte del análisis cladista se divide en 4 partes: a) estrategias de muestreo, b) las relaciones filogenéticas de *Hydnodon thelephorus*, c) Análisis filogenéticos del gen mitocondrial y del gen nuclear: información aportada por cada uno de los genes y d) pruebas de robustez de los clados.

a) *Estrategias de muestreo*

En vista del gran número de OTU's y con la finalidad de conocer el efecto del muestreo, se realizaron previamente varios análisis filogenéticos bajo la estrategia de incluir sólo algunos representantes de los clados de homobasidiomicetos, propuestos por Hibbett y Thorn (2000). Es decir, se disminuyó la cantidad de OTU's con la finalidad de aumentar el poder de búsqueda y disminuir el tiempo computacional (Soltis y Soltis, 1996). Se siguieron tres estrategias para representar cada uno de los clados de homobasidiomicetos: 1ª) un muestreo filogenético tomando al azar los representantes de cada clado que mantuvieran la estructura basal del árbol de Hibbett *et al* (1997) después del análisis, nombrado Azar; 2ª) un muestreo filogenético tomando como representantes a los taxones más basales de cada clado (Nixon y Davis, 1991), nombrado Clados más basales; y 3ª) un muestreo filogenético seleccionando a los representantes de cada clado bajo un criterio de diversidad morfológica del basidioma, nombrado Diversidad de formas (ver los OTU's incluidos en cada análisis en la Anexo 2). Los análisis se llevaron a cabo con el programa PAUP* 4.0 (Swofford, 2000) en una Macintosh G3/333MHz, usando máxima parsimonia. Las regiones ambiguas y con indels se excluyeron de los análisis (1177 caracteres). Los 2310 caracteres restantes se incluyeron en los análisis como no ordenados e igualmente pesados. Las búsquedas se realizaron con 25 réplicas heurísticas empleando como algoritmo de rearrreglo de ramas "Tree Bisection and Reconnection (TBR) y la adición de OTU's fue aleatoria (random addition sequences).

A la par se realizó un análisis donde se incluyeron la mayoría de los OTU's, excepto *spathulata*, *C. tubaeformis*, *A. botryosus*, *A. syringae* y *P. nuda*. Este análisis se llevó a cabo

bajo las mismas condiciones de búsqueda que los anteriores. Este análisis se identifica en las tablas y en el resto del texto como Matriz completa.

En total se realizaron 12 análisis divididos en tres grupos: a) únicamente con taxones de la matriz original; b) además de los taxones originales, se adicionaron las secuencias nuclear y mitocondrial de *I. lacteus*, *D. separans*, *S. robustus*, *S. musicola* y *C. zollingerii*; y c) a las matrices del grupo (b) se adicionaron las secuencias de *H. thelephorus*. En todos los análisis se utilizaron las secuencias de *Dacrymyces crysospermus*, *Tremella* sp. y *Auricularia auricula.judae* como grupos externos para orientar los cladogramas.

Las topologías de los árboles obtenidos del grupo de análisis que incluyeron a *H. thelephorus* se compararon con el árbol publicado por Hibbett *et al* (1997), específicamente en la estructura básica de su hipótesis de las relaciones entre los grandes grupos de homobasidiomicetos. Para este mismo grupo de análisis se calculó el número de caracteres informativos por taxón y la proporción de clados resueltos en cada análisis respecto al número de clados de interés.

b) Las relaciones filogenéticas de *Hydnodon thelephorus*

Los árboles obtenidos de los análisis de Matriz completa, Diversidad de formas del basidioma y Clados más basales tienen una buena resolución a niveles intermedios y basales (Fig. 5); además en todos los casos se requirieron de tiempos cortos. Por lo que, se decidió seguir la estrategia de Matriz completa, que incluye el mayor número de OTU'S, para realizar una búsqueda con un mayor número de réplicas. Así como para conocer el efecto de incluir sólo las secuencias parciales de la nuc-SSU de *H. thelephorus*. Se llevaron a cabo 3 análisis filogenéticos, excluyendo en todos ellos los siguientes taxa: *S. spathulata*, *A. syringae*, *A. botryosus*, *C. tubaeformis* y *P. nuda*. Los OTU's incluidos en cada uno de los análisis fueron los mismos, excepto que en el análisis 3 se incluyó a *S. robustus*. En los análisis 1 y 3 se incluyeron 2310 caracteres, en tanto que en el análisis 2 solo 1577, ya que se excluyó la región no secuenciada del gen nuclear de *H. thelephorus* (Tabla 5). Estos análisis se realizaron bajo las mismas condiciones que los de la sección *Estrategias de muestreo*, excepto porque se realizaron 1 000 replicas heurísticas en lugar de 25. En todos los análisis se utilizaron las secuencias de *D. crysospermus*, *Tremella* sp. y *A. auricula.judae* como grupos externos para orientar los cladogramas.

Conjuntos de caracteres	1	2	3
Regiones ambiguas y Indels de los genes nuclear y mitocondrial	X	X	X
Mocho=2626-3487 (región del gen nuclear no secuenciada para <i>H. thelephorus</i>)		X	
No. de caracteres incluidos	2310	1608	2310
No. de OTU's incluidos	84	84	85

Tabla 5. Conjuntos de caracteres excluidos de los análisis del tercer grupo, y el número total de OTU's incluidos en cada uno de ellos.

c) Análisis filogenéticos del gen nuclear y del gen mitocondrial: información aportada por cada uno de los genes

Con la intención de conocer la señal filogenética aportada, a este nivel de la jerarquía taxonómica, por cada uno de los genes se realizaron análisis separados. Cada análisis se llevo a cabo bajo las mismas condiciones que el análisis 3. Sin embargo, sólo se realizaron 10 replicas heurísticas para el análisis de la nuc-SSU, y 2 para el análisis de la mt-SSU debido a que se requiere de grandes cantidades de tiempo computacional.

3) Pruebas de robustez de los clados

Se evaluó la robustez de los clados de los cladogramas resultantes del análisis de Diversidad de formas, y del análisis 3. Se calcularon los valores de bootstrap con PAUP 4.0 (Swofford, 2001), para ello se realizaron 100 réplicas de por cada una de las 20 réplicas heurísticas bajo los siguientes parámetros: "Random Addition Sequence" y TBR como algoritmo de rearrreglo de ramas. También se calculó el índice de decaimiento para algunos clados, utilizando Autodecay 4.0 (Erikson, 1999), para ello se realizaron 100 réplicas heurísticas por cada nodo bajo los siguientes parámetros: "Random Addition Sequence" y TBR.

RESULTADOS

1) Revisión taxonómica de *Hydnodon thelephorus*

Píleo de tamaño mediano (19-29 mm individual, seco), plano a infundibuliforme, y en algunas ocasiones dividido en lóbulos, margen incurvado y festonado, en fresco color crema o blanquecino hasta naranja y cuando es de color crema se observan trazos o surcos radiales de color naranja, salmón o rosa-violáceo; en seco desde amarillo claro hasta naranja. Contexto simple sin zonas aparentes, consistencia carnosa, carnosa-subgelatinosa o cartilaginosa-carnosa, cuando seco es duro y quebradizo; color en fresco desconocido, en seco desde ocre hasta café rojizo; en fresco olor y sabor desconocidos. Himerio formado por dientes decurrentes, poco apretados, de ápice fimbricado (desgarrado); dientes en fresco de color rosa vinaceo muy pálido o salmón con los ápices blanquecinos, en seco de color naranja claro hasta rojizos con los ápices de color amarillo oscuro; cada diente madura de la base a la punta. Estípite corto, central, excéntrico a casi lateral, ligeramente clavado en la base, de color naranja o blanquecino con trazos naranja o crema con tonos salmón, de consistencia carnosa-gelatinosa, rodeado en la base de un micelio blanquecino de apariencia algodonosa. Contexto simple sin zonas aparentes, de consistencia carnosa-subgelatinosa, color en fresco desconocido, en seco amarillo pálido (Lámina 1).

Trama hifal del píleo monomítica con hifas entrelazadas embebidas en una matriz gelatinosa; hifas con fíbulas en la mayoría de los septos, también se observan numerosas conexiones en H; gran parte de la trama está compuesta de hifas infladas o hifas con septos ampuliformes de pared delgada; también se observan algunas hifas gleopleróticas de contenido más denso, amarillento, de pared delgada y muy refringentes; algunas hifas tortuosas (Lámina 2). Trama hifal del estípite monomítica con hifas infladas, entremezcladas, con fíbulas e hifas gleopleróticas. Micelio basal compuesto por hifas muy anchas, de pared relativamente engrosada y contenido denso (Lamina 2). Basidios 19-27 X 6-7 μ m, clavados a ligeramente esferopedunculados, con 2 o 4 esterigmas con fíbula basal (Lámina 3). Basidiosporas 4 - 6 X 3- 5.2 μ m, vistas al microscopio fotónico (MF) presentan una apariencia subglobosa a elíptica aunque llegan a observarse algunas esporas de forma y contorno anguloso e irregular; de color amarillo pálido en KOH; ornamentación verrugosa, no se aprecia el apéndice hilar (Lámina 3). Al microscopio electrónico de barrido (MEB) se observa una forma y contorno más regular en las esporas, que va de subglobosa a ovoide. La ornamentación está compuesta de verrugas cónicas con un ápice

redondeado y llegan a presentarse algunas veces agregadas en pares, principalmente en esporas inmaduras o en aquellas de contorno más irregular. El apéndice hilar se confunde con la ornamentación (Lámina 4). Reacción cianofílica positiva principalmente en la ornamentación de las esporas maduras, y en las esporas inmaduras la reacción se presenta en toda la pared (Lámina 3).

Hábito y hábitat: basidiomas cantarelloides, multipileados, gregarios, connatos a cespitosos. Terrícola en bosques mesófilos de montaña y tropical subperennifolio (Cifuentes, 1996).

Distribución: Se ha registrado para Bahamas, Brasil, Chile, EUA, Guyana Francesa y Jamaica; en México se ha registrado para los estados de Hidalgo, Quintana Roo y Veracruz (Cifuentes, 1996).

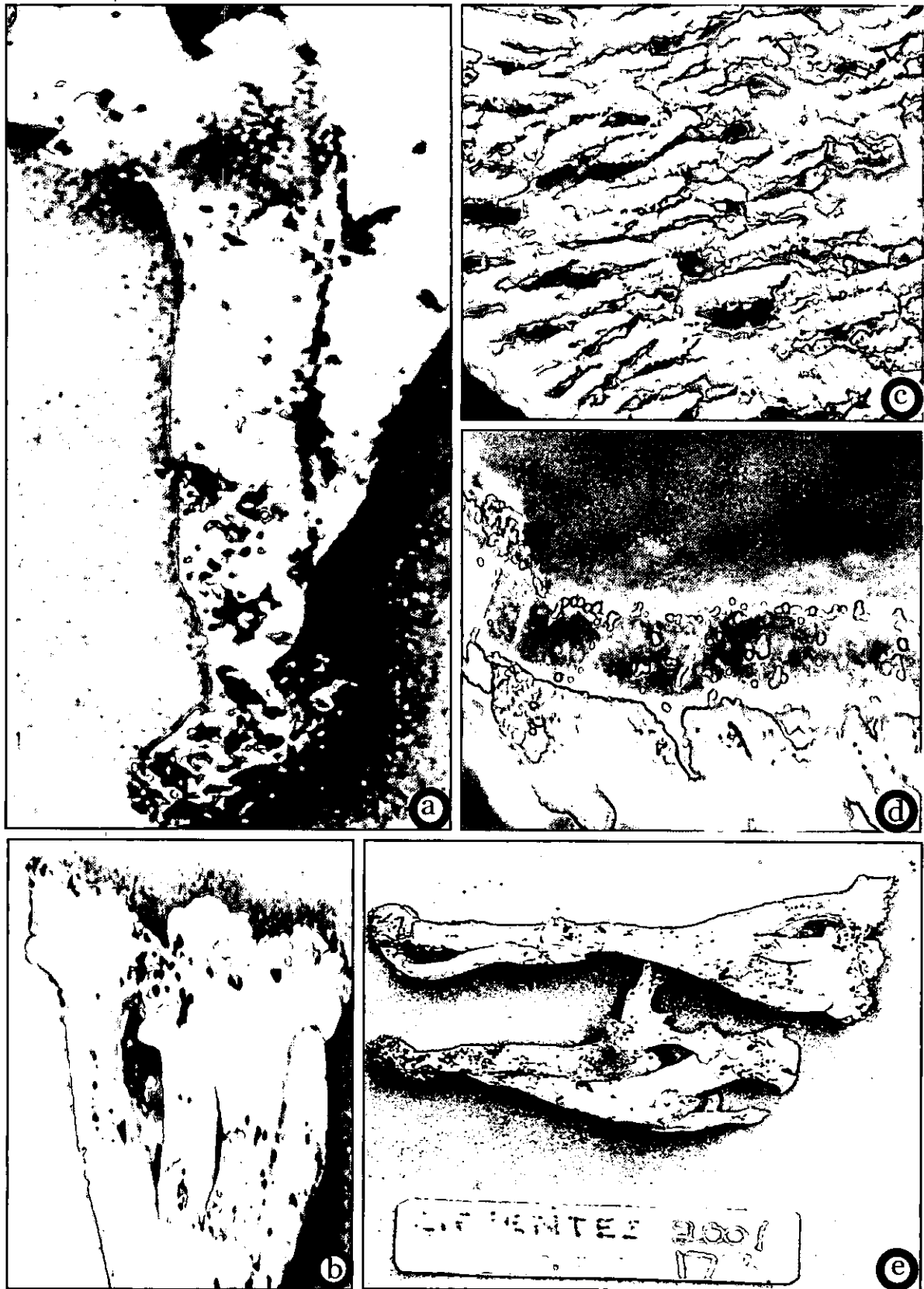


Lámina 1. *Hydnodon thelephorus*, caracteres macroscópicos. **a** Basidioma maduro mostrando himenio de color salmón. **b** Pileo ramificado. **c** Himenio hidnoide. **d** Contexto del pileo. **e** Vista general de *H. thelephorus*. Fotos **a** y **b**: Cifuentes 2001-177.

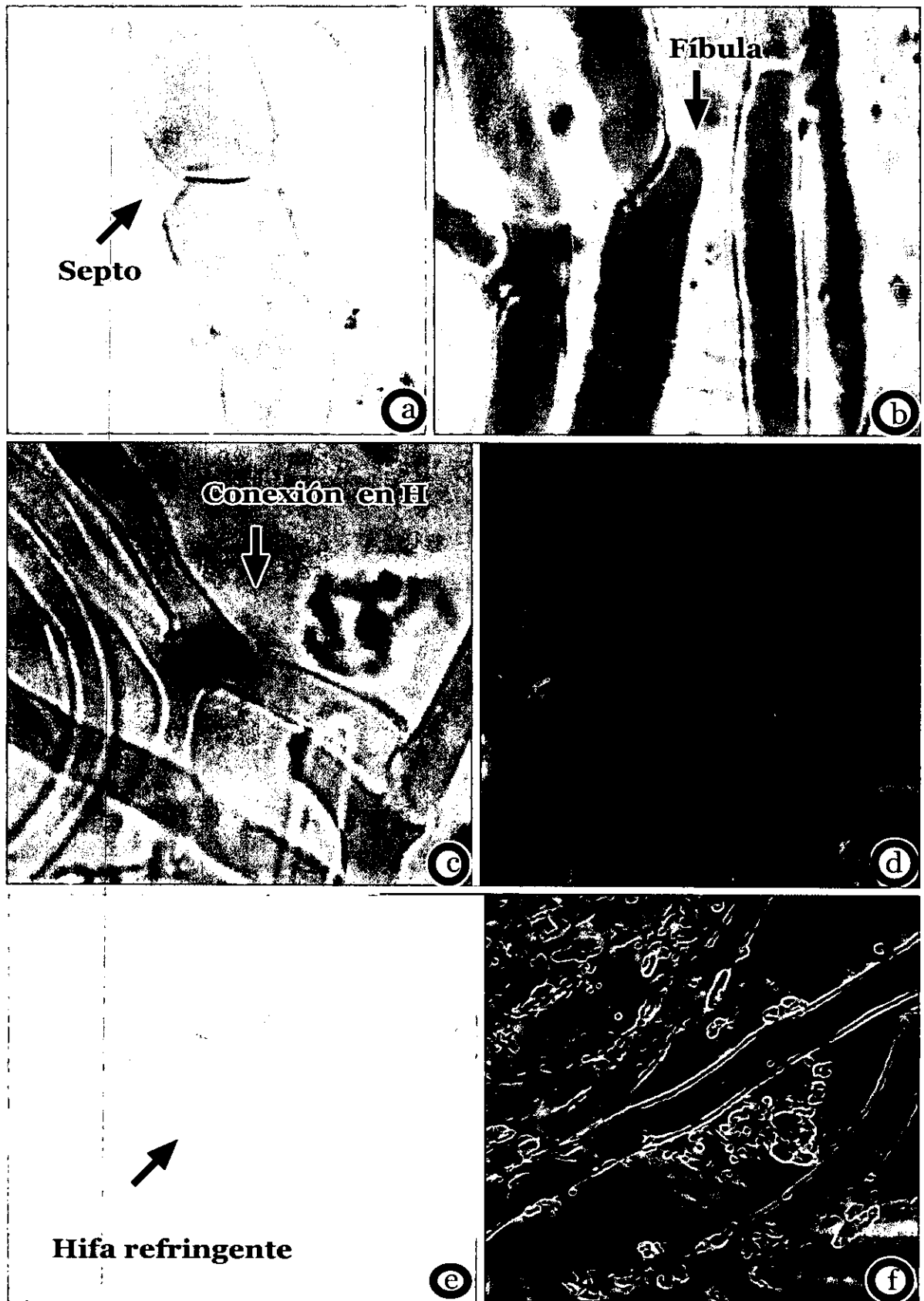


Lámina 2. Sistema hifal en *H. thelephorus*. **a** Hifas infladas. **b** Fíbulas en casi todos los septos. **c** Conexiones en H. **d** Hifas tortuosas. **e** Hifas gleopleróticas. **f** Hifas del micelio basal.

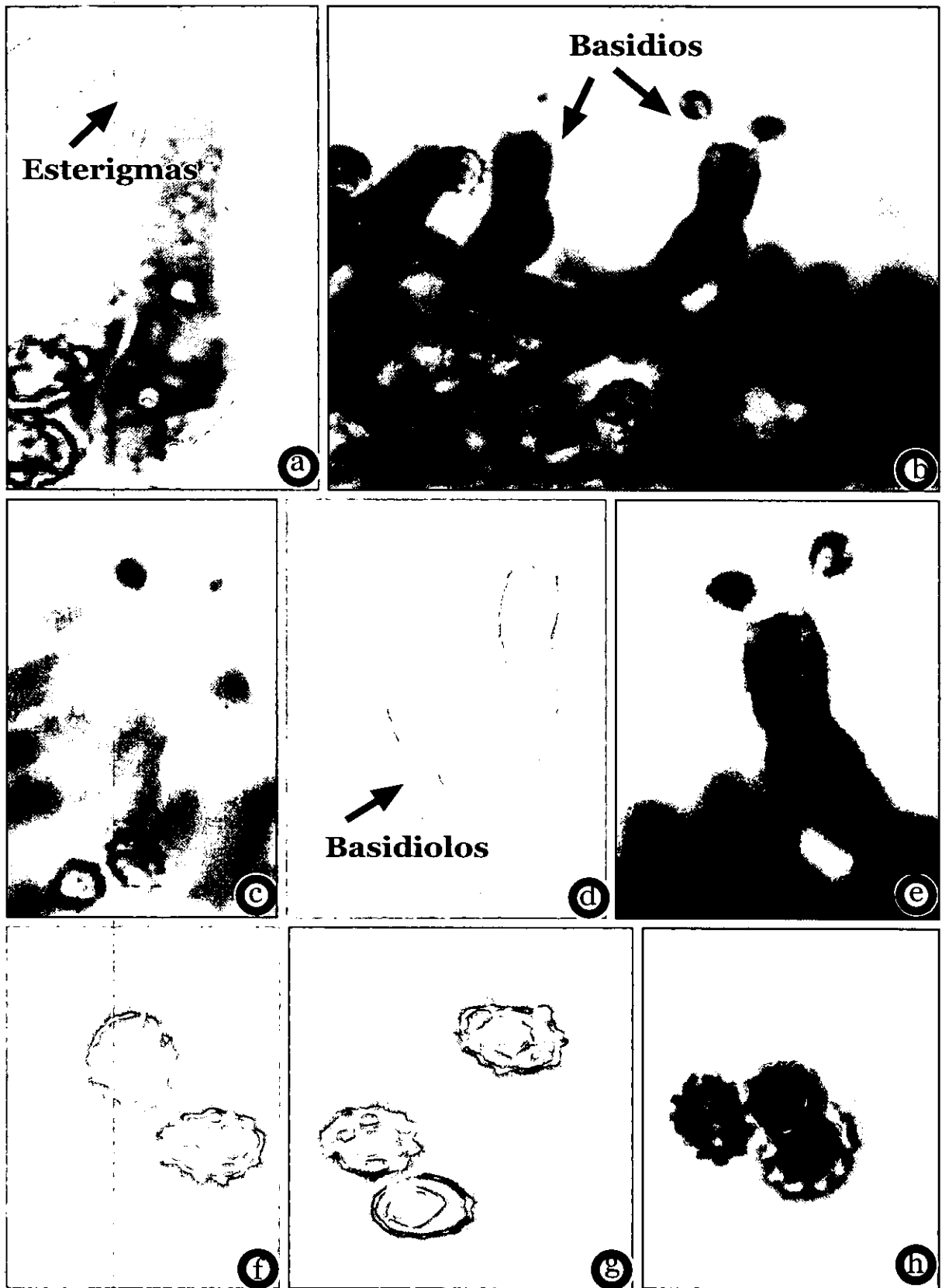


Lámina 3. Himenio y esporas. **a** Basidio bispórico **b** Vista general del himenio **c** Basidio tetraspórico y esporas. **d** Basidio bispórico y basidiolos. **e** Basidio bispórico y esporas **f** y **g** Esporas verrugosas en KOH. **h** Reaccion cianofilica

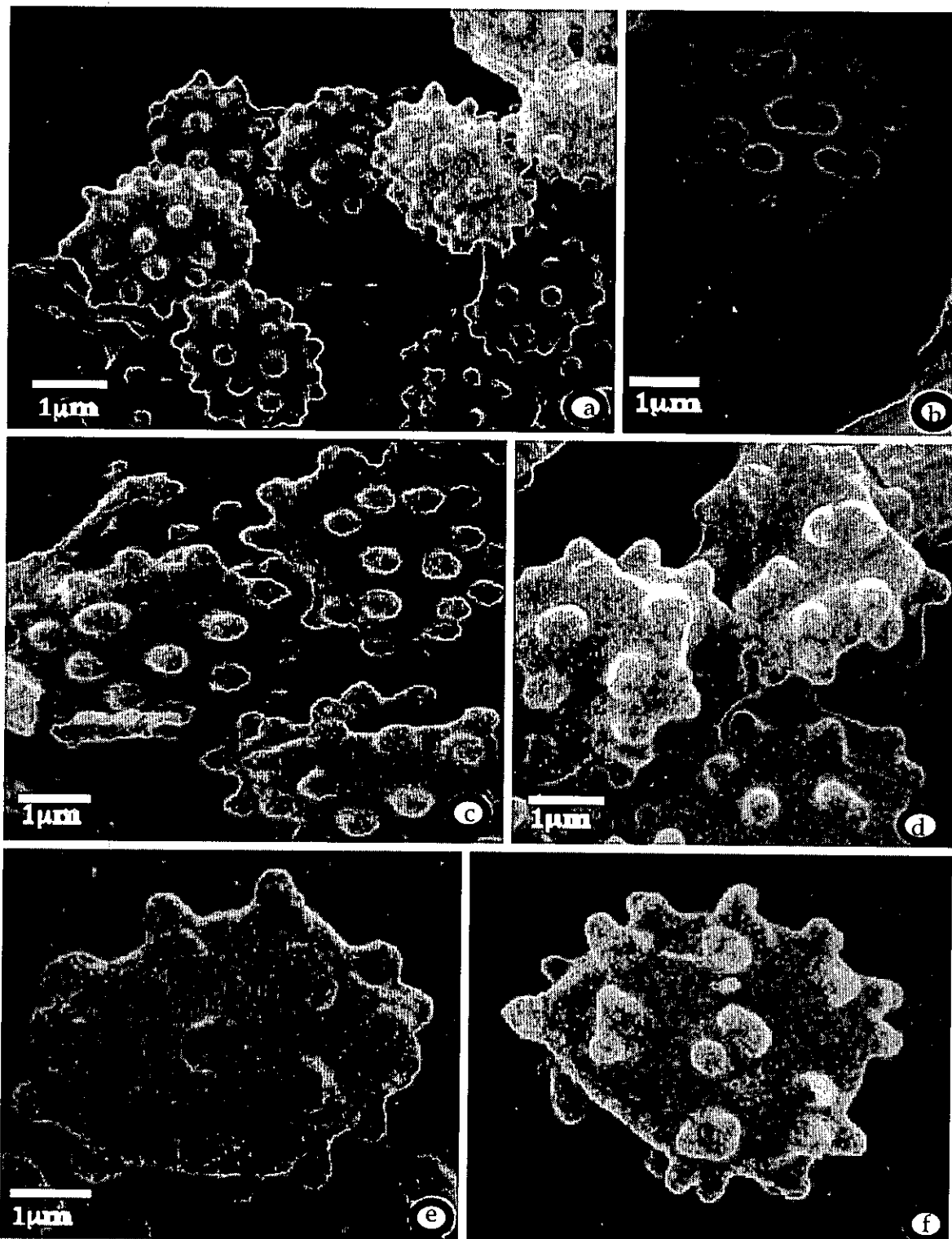


Lámina 4. *Hydnodon thelephorus*, forma y ornamentación de las esporas vistas al MEB. a Esporas verrugosas (Suarez 97). b Espora inamadura unida a un esterigma (Bandala 4011). c Espora de contorno regular (Suarez 97). d Esporas de forma angulosa irregular (Bandala 4011). e Espora de *H. thelephorus* (Bandala 4011). f Espora de *Scytinopogon robustus* (Cifuentes 676).

2) Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU

La calidad y cantidad del ADN obtenido de cada uno de los ejemplares fueron variables ya que las distintas formas de herborización, la antigüedad y el tratamiento que se les da a los ejemplares tienen efectos directos sobre éstos dos aspectos. En el caso de los ejemplares de *H. thelephorus* recolectados en los años 1972, 1983 y 1986 se observó un ADN muy degradado y en concentración baja, en tanto el ADN obtenido del ejemplar recolectado en el año de 1999 se encontraba en un buen estado de conservación y en concentración alta. Para este último, se observó como una banda intensa y claramente definida de ADN con concentración de 20ng/ μ l, que contrastaba con las bandas casi imperceptibles y poco definidas del resto de los ejemplares. Para el caso del ejemplar de *S. robustus*, el ADN extraído del ejemplar recolectado en 1980, se encontraba degradado pero en cantidades relativamente altas lo que permitió su posterior amplificación.

Respecto a las fuentes de ADN por cada uno de los ejemplares -tejido del himenio y solución de esporas- no se observaron diferencias en la calidad del ADN extraído pero fue evidente que en el caso de la extracción de ADN a partir de tejido del himenio fue mayor la concentración de ADN.

Las amplificaciones del gen nuclear y mitocondrial para *H. thelephorus* se obtuvieron a partir del ADN genómico extraído del ejemplar recolectado en 1999, y para *S. robustus* del ejemplar recolectado en 1980. A partir de dichas amplificaciones se obtuvieron para *H. thelephorus* las secuencias parciales: mt-SSU con 531 bp y de nuc-SUU con 1049 bp, y para *S. robustus* las secuencias parciales: mt-SSU con 517 bp y de nuc-SUU con 902 bp. En ambos casos las reacciones de secuenciación para los primers nucleares NS7 y NS8 resultaron no exitosas. Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente en SeqApp, e incorporadas a la matriz original de Hibbett *et al* (1997). La matriz de datos comprende en total 90 taxones (OTU's) y 3487 caracteres, de los cuales los primeros 1315 son del gen mitocondrial y del 1316 al 3487 son del gen nuclear. La composición de nucleótidos por gen puede verse en la Tabla 6.

Subunidad corta ribosomal	Adenina	Guanina	Citosina	Timina	Purinas	Pirimidinas
Mitocondrial	0.34727	0.23343	0.16676	0.25254	58.07%	41.93%
Nuclear	0.27629	0.25978	0.19775	0.26618	53%	47%

Tabla 6. Composición de bases en las subunidades cortas ribosomales mitocondrial y nuclear

3) Análisis cladista

Estrategias de muestreo

En el primer grupo de análisis, donde sólo se incluyeron los OTU's de la matriz original, los clados para Homobasidiomycetes propuestos por Hibbett y Thorn (2000) fueron recuperados en su totalidad, aunque las relaciones entre éstos variaron de una a otra estrategia. La estrategia al Azar fue la única que recuperó en la topología basal del árbol de Hibbett *et al* (1997) (resultados no mostrados). La adición de más secuencias a la búsqueda en cualquiera de las estrategias de representantes generó cierta inestabilidad en la topología previamente obtenida, colapsándose algunos de los clados. En el caso de la estrategia de Diversidad de formas y del análisis Matriz completa, todos los grandes clados para homobasidiomicetos se recuperan, aunque las relaciones entre éstos variaron respecto a la propuesta original (Fig. 5a y b). La relación de los clados de interés recuperados en cada uno de los análisis se muestra en la Tabla 7.

En las distintas estrategias, *Hydnodon* siempre es el grupo hermano de *Scytinopogon* pero la posición de ambos con respecto a los ocho grandes clados de homobasidiomicetos es poco clara. En las estrategias de Diversidad de formas y de Clados más basales, ambos géneros junto con el género *Gloeophyllum* son el grupo hermano del agrupamiento Rusuloide-Himenoquetoide (Figs. 5b y d); en tanto en la estrategia al Azar las relaciones basales entre los distintos clados incluyendo el clado de *Hydnodon* y *Scytinopogon* no están resueltas (Fig. 5c). Finalmente, en el análisis de Matriz completa, el grupo de *Hydnodon* y *Scytinopogon* más *Gloeophyllum* son el grupo hermano del clado formado por los clados Poliporoide, Rusuloide, Himenoquetoide, Euagarical, Boletal y Teleforoide (Fig. 5a).

El número de caracteres informativos varió en cada una de las estrategias de búsqueda, pero siempre incrementándose conforme se aumentó el número de OTU's, por lo que la estrategia de Matriz completa con 685 caracteres informativos fue la más alta. De manera contraria, las estrategias de Azar, Diversidad de formas y Clados más basales tuvieron un menor número de caracteres informativos. A pesar de esto, la proporción de caracteres informativos por taxones fue mayor en las estrategias donde se utilizó el menor número de OTU's, como las estrategias al Azar y la de Clados más basales, con 12 y 13 caracteres informativos por taxón respectivamente.

La proporción de caracteres informativos por taxón fue menor en las estrategias de Diversidad de formas y Matriz completa, con 8 y 10 respectivamente. El consenso estricto

mayormente resuelto fue para estos últimos análisis (Tablas 7 y 8). En lo que respecta al tiempo computacional empleado por cada estrategia hay notables las diferencias, sin embargo, todas son posibles de llevarse a cabo en tiempos cortos (Tabla 8).

	Matriz completa	Azar	Biodiversidad	Clados basales
Poliporoide (P)	✓	✗	✓	✓
Euagarical (E)	✓	✓	✓	✓
Boletal (B)	✓	✓	✓	✓
Teleforoide (T)	✓	✓	✓	✓
Rusuloide (R)	✓	✓	✓	✓
Himenoquetoide (H)	✓	✓	✓	✓
Cantareloide (C)	✓	✓	✓	✓
Gomfoide-faloide (G-P)	✓	✓	✓	✓
EB	✓	✗	✓	✓
EBT	✓	✗	✗	✗
P(EBT)	✗	✗	✗	✗
RH	✓	✓	✓	✓
RH(PEBT)	✗	✗	✗	✗
C(RHPEBT)	✓	✗	✓	✓
G-P(CRHPEBT)	✓	✗	✓	✓

Tabla 7. Clados de interés recuperados en las distintas estrategias de análisis. Nota: Las iniciales corresponden a cada uno de los clados propuestos por Hibbett y Thorn (2000). Las combinaciones de las iniciales corresponden a clados que agrupan a dos o más grupos de homobasidiomicetos.

	Matriz completa	Azar	Biodiversidad	Clados basales
No. de árboles	13	10	1	2
L	5 372	3 658	4 021	2 819
CI	0.323	0.418	0.376	0.462
No. de caracteres	685	584	604	526
No. de OTU's	85	48	59	40
Carac/OTU's	8	12	10	13
No. de clados	13/15	8/15	12/15	12/15
Tiempo	5 min.	28s	2.18 min.	12s

Tabla 8. Resultados de cada una de las búsquedas del último grupo de análisis. L = longitud de los árboles más parsimoniosos. Nota: CI = índice de consistencia. No. de caracteres = número de caracteres informativos. Carac/OTU's = proporción de caracteres informativos por taxón. No. de clados = número de clados recuperados respecto al número de clados de interés. Tiempo = tiempo computacional empleado en 25 réplicas heurísticas utilizando máxima parsimonia

Las relaciones filogenéticas de Hydnodon thelephorus

Análisis 1. Una vez excluidos los indels y las regiones ambiguas, la matriz quedó conformada por 2 310 caracteres y 84 OTU's. De los caracteres incluidos, 1 259 fueron constantes, 371 variables no informativos y 680 variables informativos. Se obtuvieron 4

árboles igualmente parsimoniosos de longitud 5 306 (Índice de Consistencia (CI) = 0.3206, Índice Reescalado (RC) = 0.1535, Índice de Retención (RI) = 0.4788, Índice de Homoplasia (HI) = 0.6794). En el consenso estricto se recuperan los ocho grandes clados de homobasidiomicetos propuestos por Hibbett y Thorn (2000), ubicándose el género *Hydnodon* junto con *Clavaria zollingerii* como grupo hermano del clado Cantareloide (Fig. 6a).

Análisis 2. Además de excluirse del análisis las regiones ambiguas y los indels, también se excluyeron los caracteres del gen nuclear no secuenciados para *H. thelephorus* (chartset Mocho = 2.626-3.487). De los 1 608 caracteres incluidos, 781 son constantes, 264 variables no informativos y 563 variables informativos. Se obtuvieron 23 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 4 342 (CI = 0.2563, RC = 0.1463, RI = 0.4736, HI = 0.4737). El consenso estricto propone a *Gloeophyllum* como grupo hermano del género *Hydnodon*. Por otro lado, el clado Rusuloide se comporta como un grupo polifilético, y el grupo externo *Tremella* sp. queda anidado dentro del clado Himenoquetoide del grupo interno (Fig. 6b).

Análisis 3. Se utilizaron los 84 taxones del análisis 1 y se adicionaron las secuencias de *S. robustus* (cuya secuencia nuclear es parcial al igual que la de *H. thelephorus*). De 2 310 caracteres incluidos en el análisis, 1 253 fueron constantes, 372 variables no informativos y 685 variables informativos. Se obtuvieron 37 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 5351 (CI = 0.2614, RC = 0.154, RI = 0.481, HI = 0.7386). En el consenso estricto se recuperan los ocho clados para homobasidiomicetos además del clado que forman *H. thelephorus* y *S. robustus* junto con *Gloeophyllum* (Fig. 6c.).

Análisis filogenéticos del gen nuclear y del gen mitocondrial: información aportada por cada uno de los genes

Gen nuclear. La matriz consistió de 1 845 caracteres y 84 OTU's. De los caracteres incluidos, 1 158 fueron constantes, 291 variables no informativos y 396 variables informativos. Se obtuvieron 1 800 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 2 607 (CI = 0.378, RC = 0.189, RI = 0.501, HI = 0.622). En el consenso estricto, se recuperan la mayoría de los grandes clados de homobasidiomicetos propuestos por Hibbett y Thorn (2000), ubicándose el género *Hydnodon* junto con *Scytinopogon* como grupo hermano del clado Gomfoide-faloide (Fig. 7a).

Gen mitocondrial. La matriz final tuvo un total de 465 caracteres y 82 OTU's. De los caracteres incluidos, 76 fueron constantes, 105 variables no informativos y 285 variables informativos. Se obtuvieron 10 812 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 2 584 (CI = 0.291, RC = 0.139, RI = 0.478, HI = 0.709). En el consenso estricto, cada uno de los OTU's se colapsan sobre la base del cladograma perdiéndose toda estructura (Fig. 7b). Durante este análisis se considero innecesario seguir con mas de dos replicas ya que hasta este punto el número de árboles superaba los 10 000, además el tiempo computacional empleado era de 23 hrs.

Valores de robustez de los clados

Los valores de bootstrap e índice de decaimiento para los cladogramas de Diversidad de formas y de Matriz completa variaron en algunos clados (Figs. 8a y b). El clado de *H. thelephorus* y *S. robustus* obtuvo 26 de decaimiento y 100 de bootstrap, sin embargo, la relación de éstos con *Gloeophyllum* es apenas soportado por valores de decaimiento de 1 y de menos de 50 para el bootstrap en el análisis de Matriz completa. Por su parte, los valores obtenidos en el análisis de Diversidad de formas para el clado de *Hydnodon* y *Scytinopogon* son de 24 para el índice de decaimiento y de 100 para el bootstrap aunque su relación con *Gloeophyllum* es soportada por valores de 4 y de menos de 50 para el índice de decaimiento y bootstrap, respectivamente. En general, en ambos análisis la mayoría de los clados de homobasidiomicetos propuestos por Hibbett y Thorn (2000) están soportados por valores altos de bootstrap y/o decaimiento. No obstante, las hipótesis de relaciones filogenéticas entre los clados son débilmente soportadas tanto por el análisis de bootstrap como por el de decaimiento.

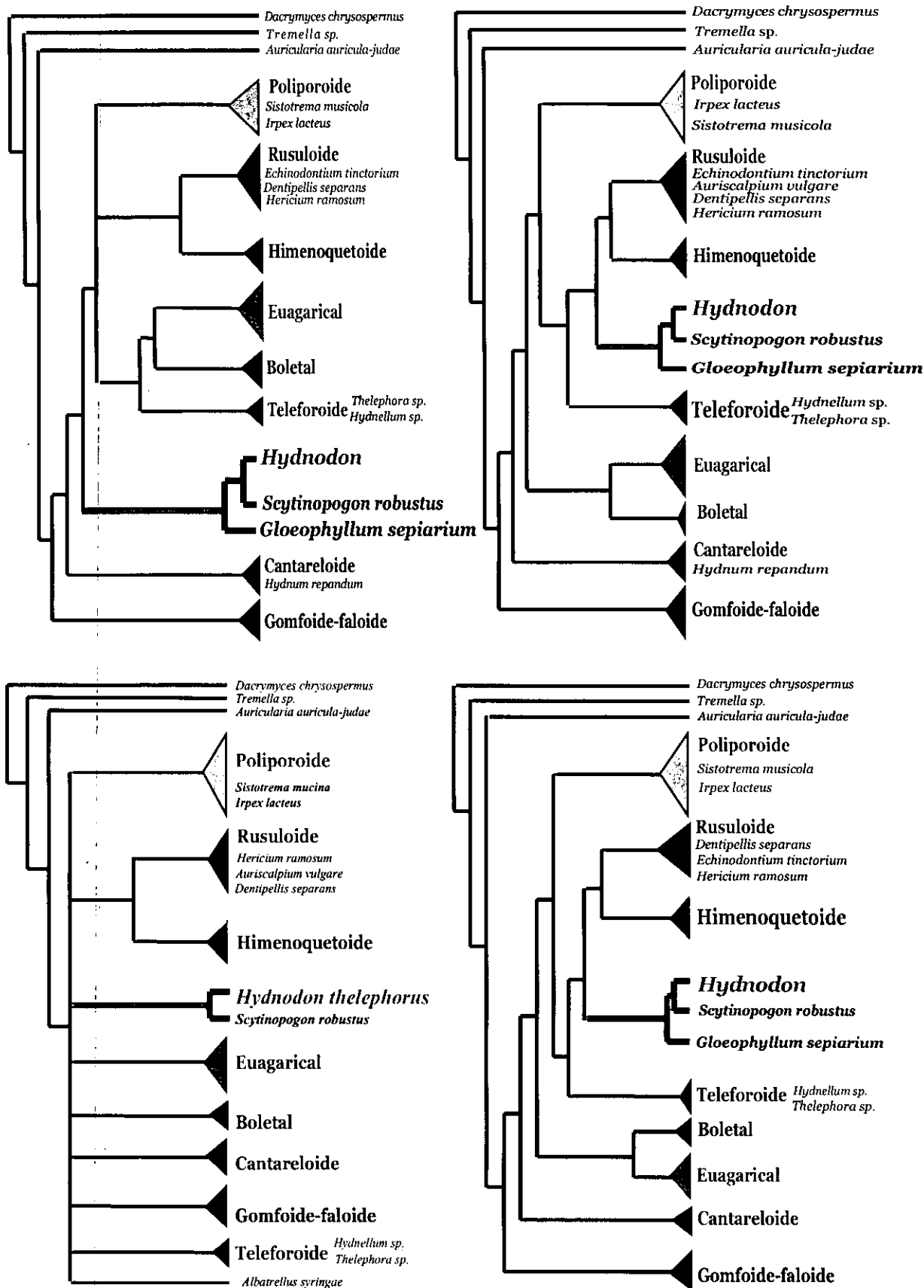


Figura 5 . Consenso estricto de las estrategias de muestreo a) Matriz completa, b) Diversidad de formas, c) Azar y d) Clados más basales.

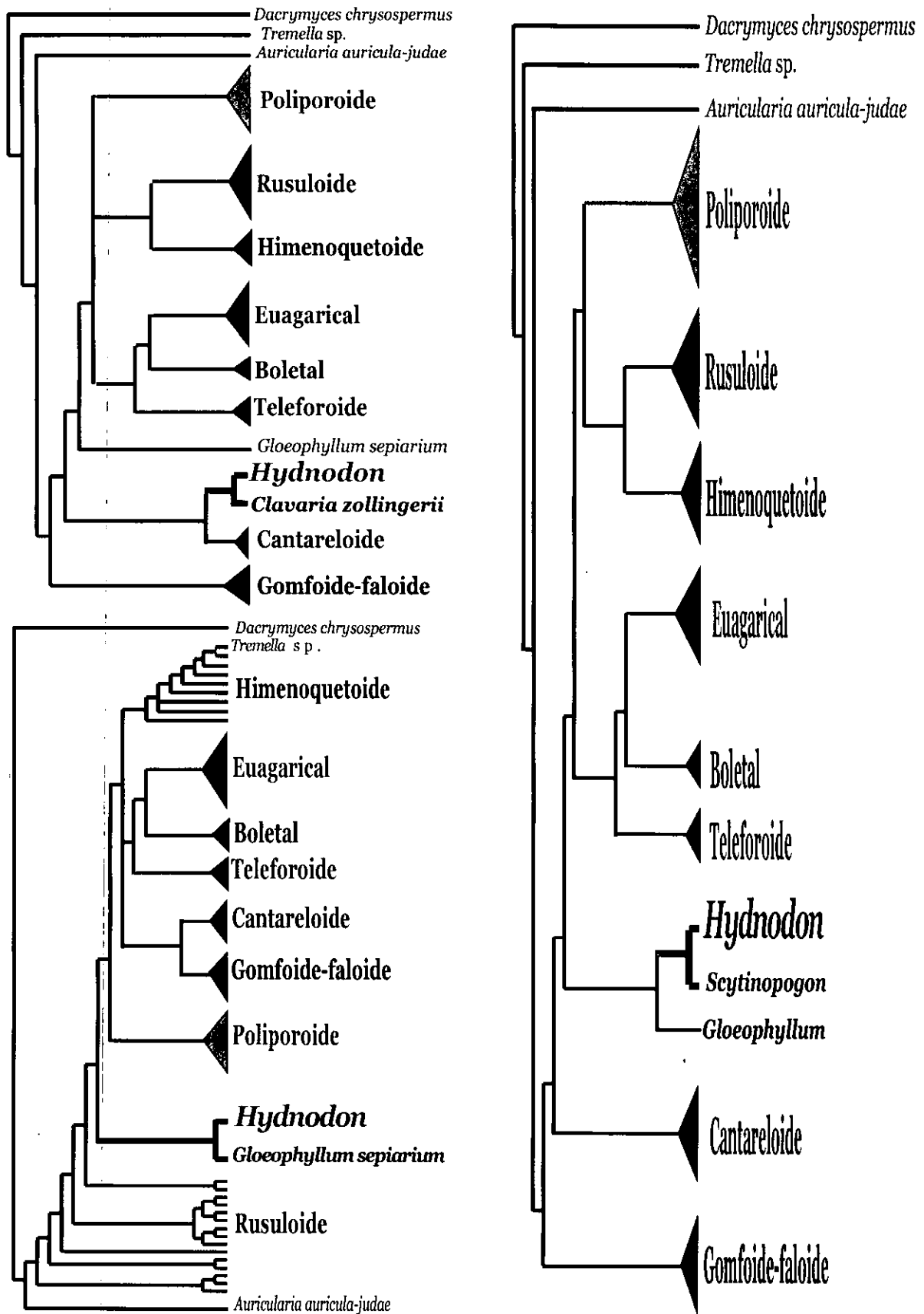


Figura 6. Consenso estricto de los: **a)** Análisis 1, **b)** Análisis 2 y **c)** Análisis 3.

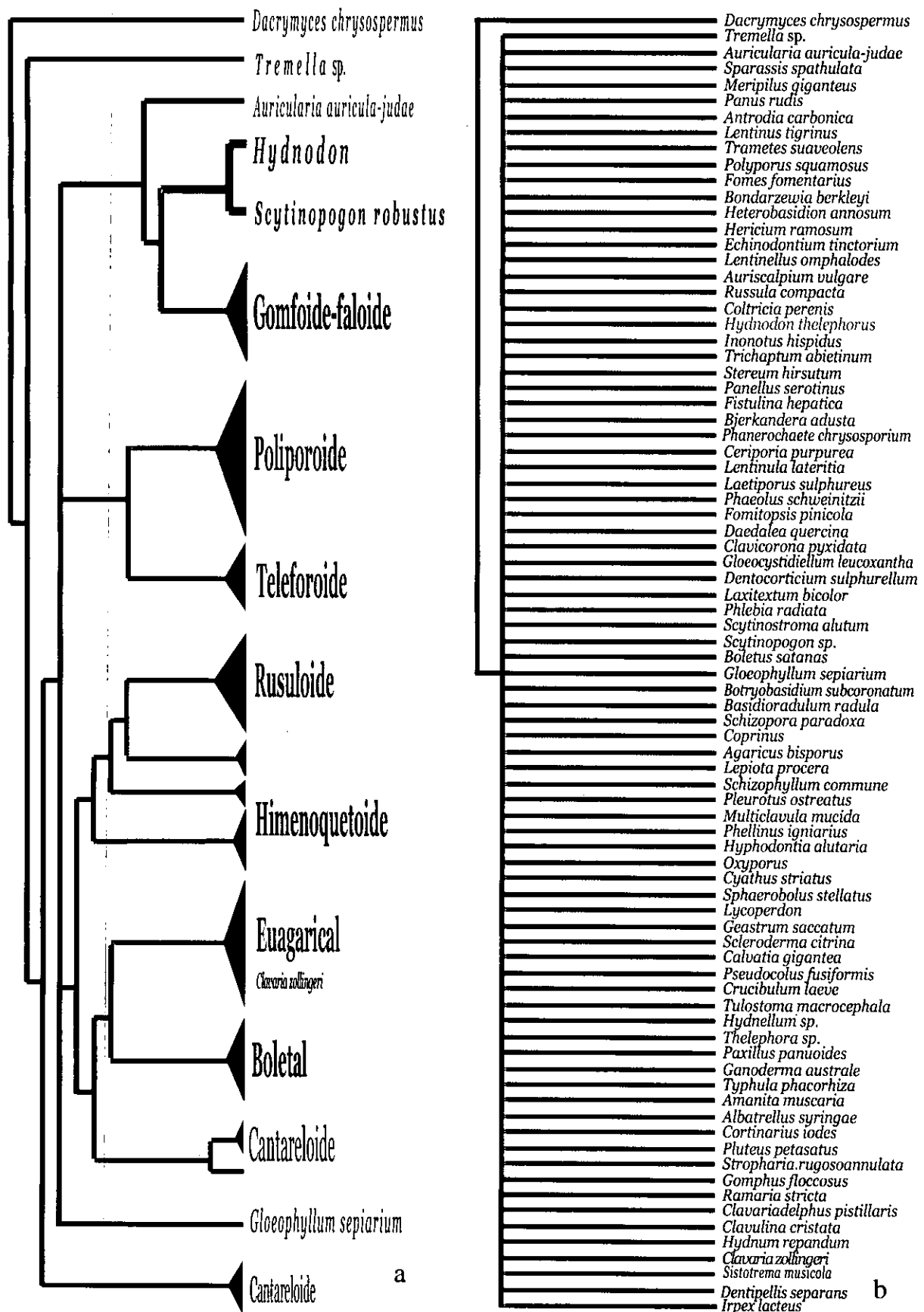


Figura 7. Consenso estricto de los análisis separados de a) nuc-SSU y b) mt-SSU.

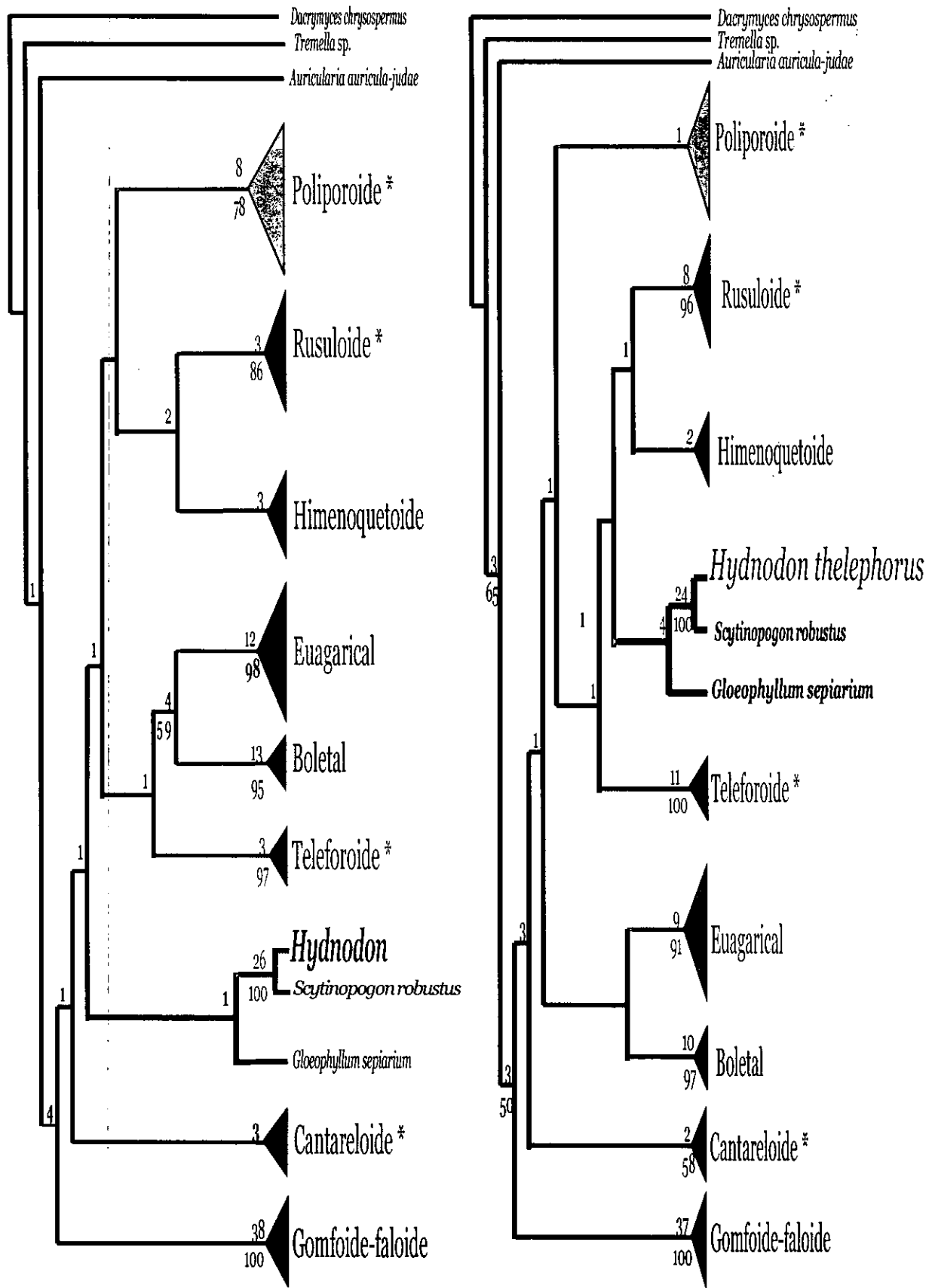


Figura 8. Valores de bootstrap (abajo) y decaimiento (arriba) para: a) Análisis 3 y b) la estrategia de Diversidad de formas. El asterisco (*) señala los clados donde ha surgido el himenio hidoide.

DISCUSIONES

Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU

Indudablemente las colecciones científicas representan un acervo único, son el banco principal de ejemplares para los estudios sistemáticos y en muchas ocasiones la única fuente de ejemplares como es el caso actual del género *Hydnodon*. La fenología de este hongo hidnoide, ha obligado a los taxónomos a trabajar sólo con material herborizado. Si bien este tipo de material puede presentar algunas desventajas como la pérdida de algunos caracteres morfológicos macroscópicos (coloración, dimensiones de los basidiomas), sigue conservando otros caracteres como el material genético, de donde pueden ser extraídos datos para la reconstrucción filogenética.

La obtención de datos moleculares a partir de ejemplares herborizados es una estrategia que ha ido cobrando relevancia, principalmente por la falta de ejemplares frescos y la necesidad de conocer más sobre la historia evolutiva de los diversos grupos de hongos. Sin embargo, la obtención de datos moleculares a partir de ejemplares herborizados presenta ciertas limitaciones como la reducida cantidad de material susceptible de ser utilizado en la extracción del ADN y las altas probabilidades de que el ADN se encuentre degradado, reduciendo la posibilidad de obtener buenos datos.

Diversos factores podrían estar afectando la calidad y la cantidad de ADN de un ejemplar herborizado, en primer lugar, las condiciones en que son herborizados los ejemplares tienen efectos directos sobre la desnaturalización y degradación del material genético. Por ejemplo, la utilización de calor directo en la herborización acelera la degradación de los ácidos nucleicos durante el proceso de muerte celular, fragmentando el material genético en pequeñas cadenas de ADN. No obstante, estas cadenas pueden bien contener genes completos o cistrones, susceptibles de ser amplificados y secuenciados. Otro factor que afecta gravemente la calidad del ADN en los materiales herborizados es la utilización de naftalina o algún otro plaguicida para el control de plagas en las colecciones, ya que la mayoría de este tipo de sustancias pueden actuar como teratógenos o como degradadores químicos del ADN. Tal vez éste fue el caso de los ejemplares de *H. thelephorus* recolectados en los años de 1972, 1983 y 1986, que al estar expuestos en numerosas ocasiones a naftalina (coms. pers.) su material genético fue fuertemente degradado, por lo que el ADN extraído de estos ejemplares se encontraba altamente degradado y resulto ser deficiente como sustrato de amplificación para los genes nuc-SSU y mt-SSU.

Contrariamente, el ADN extraído del ejemplar recolectado en 1999 presentó pocas señales de degradación y funcionó perfectamente como sustrato para las amplificaciones de los genes nuc-SSU y mt-SSU. Probablemente la calidad del ADN extraído de este ejemplar fue en menor medida afectada, a pesar de haber sido herborizado con calor directo (coms. pers.), ya que el material nunca estuvo en contacto con naftalina o alguna sustancia similar. Una situación similar sucedió con el ejemplar de *S. robustus*, recolectado en 1980, ya que pese a la antigüedad del ejemplar, y que fue secado con calor directo, el ADN extraído de éste se encontraba poco degradado y en una buena concentración ya que nunca se mantuvo en contacto con naftalina o alguna sustancia similar lo que evitó una mayor degradación del material genético del ejemplar, y permitió la amplificación y la secuenciación de los genes de interés. Un factor más que pudiese estar afectando la calidad del ADN, es la antigüedad de los ejemplares, como en el caso del ejemplar de *S. robustus*, aunque en menor medida que los métodos de herborización y los cuidados de preservación en las colecciones.

La utilización de material de herbario para la obtención de datos moleculares presenta otras desventajas como la pequeña cantidad de tejido que puede ser utilizada en los ensayos, sin que se dañe la colecta, y que limita la cantidad de ADN para la amplificación y secuenciación de los genes de interés. También, los materiales cuando son recolectados en el campo traen consigo grandes cantidades de contaminación de ADN (bacterias, insectos, etc.). En la mayoría de los casos esta contaminación no es eliminada ni minimizada, así perjudicando la pureza del ADN extraído.

Es evidente que la calidad del ADN tiene repercusiones sobre la posterior amplificación y secuenciación de los genes. Aun cuando fue posible extraer ADN de todos los ejemplares, solamente resultaron exitosas las amplificaciones a partir de ADN poco degradado, como son los casos de los ejemplares de *H. thelephorus* y de *S. robustus*, recolectados en los años 1999 y 1980 respectivamente. Sin embargo, no fue posible completar la secuenciación del gen nuclear en ambos casos tal vez debido a alguna mutación en la zona de primer, o bien, por fallas en los protocolos de secuenciación.

Si bien existe la alternativa de utilizar material herborizado para la obtención de datos moleculares esta debe ser empleada en aquellos casos donde solamente existan materiales herborizados y donde la propia fenología del organismo limite la colecta, y por ende la obtención de material fresco. Una alternativa poco costosa es la preservación en soluciones

salinas de CTAB de pequeñas cantidades de tejido del ejemplar recolectado, para ser utilizados como fuente de material genético para trabajos posteriores.

Las relaciones filogenéticas del género *Hydnodon* Banker

Los resultados obtenidos del análisis filogenético de las subunidades cortas ribosomales nuclear y mitocondrial sustentan un vínculo filogenético entre *Hydnodon* y *Scytinopogon*, cuyo clado obtuvo un valor de 100 para la prueba de bootstrap y un índice de decaimiento de 26 en el análisis 3 (Figura 8a). Lo anterior respalda parcialmente las hipótesis filogenéticas de Maas Geesteranus (1963) y de Jülich (1981) para el género, y a su vez descarta temporalmente cualquier afinidad filogenética con algún miembro de la familia Thelephoraceae como lo propuso Donk (1964), o con la familia Hydnaceae como lo habían propuesto Harrison (1973), Miller (1933) y Banker (1913).

La relación filogenética entre *Hydnodon* y *Scytinopogon*, éste último un género clavariode, podría parecer difícil de predecir si nos basamos solamente en la morfología macroscópica. No obstante, taxónomos como Maas Geesteranus (1963) y Jülich (1981) ya habían propuesto algunos caracteres microscópicos que podrían apoyar aun más la presente hipótesis filogenética para *Hydnodon*. Ambos taxónomos sustentaron la relación entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* en la presencia de un sistema hifal monomítico, hifas infladas, esporas verrugosas y una reacción cianofílica positiva.

El sistema hifal de ambos géneros es monomítico, compuesto por hifas septadas con fíbulas, aunque en *Hydnodon* también se observan numerosas conexiones H (Lámina 2b y c). Otros componentes del sistemas hifal en ambos géneros son las hifas infladas e hifas gleopleróticas (Lámina 2a y e). Corner (1970) describió una trama con abundantes hifas infladas en un ejemplar determinado como *S. robustus*, que recuerda a la trama del pileo de *Hydnodon*. En el caso de las hifas gleopleróticas, estas fueron descritas para *Hydnodon* por Cifuentes (1996), las cuales bajo el MF se caracterizan por tener un contenido denso amarillento y refringente, tal y como las describió Petersen (1988) en el género *Scytinopogon*.

Al comparar las observaciones, al MEB, de las esporas de *Hydnodon* con las de *Scytinopogon* queda claro que las semejanzas, descritas por Maas Geesteranus (1963) y Jülich (1981), en la forma y ornamentación de las esporas no son tan precisas. La forma de las esporas de *Hydnodon* va desde subglobosa a ovoide en tanto que la forma de las esporas de

Scytinopogon es claramente subglobosa (Lámina 4c, e y f). Otra diferencia en la morfología de las esporas es la apariencia del apéndice hilar, para las primeras éste se confunde con la ornamentación, en cambio el apéndice hilar en las segundas es conspicuo y fácil de distinguir (Lámina 4e y f).

La ornamentación de las esporas en ambos géneros, vista bajo el MF, es aparentemente verrugosa (Lámina 3f y g). Sin embargo, bajo el MEB se hacen patentes las diferencias, en el caso las esporas de *Hydnodon* la ornamentación está compuesta principalmente por verrugas cónicas simples de ápice redondeado aunque ocasionalmente se agregan en pares, principalmente en las esporas inmaduras (Lámina 4a, b, c y e). Éste último patrón de ornamentación es muy similar a la ornamentación de las esporas de *Scytinopogon*, donde las verrugas cilíndricas siempre van en pares (Lámina 4f). Pleger y Young (1985) descubrieron que la ornamentación en las esporas de *Scytinopogon* tiene su origen en la capa llamada coriontúnica, localizada entre el endosporium y el mixosporium; en el caso de *Hydnodon* no se ha realizado ningún estudio ultraestructural de las esporas que corrobore el mismo origen de la ornamentación, y que entonces pudiese arrojar nuevas pistas sobre la relación filogenética de éste con *Scytinopogon*.

Otro carácter de importancia taxonómica en ambos géneros, fuertemente ligado con el carácter anterior, es una reacción cianofílica positiva que no suele ser homogénea a lo largo de la esporas sino que se reconoce un patrón donde la ornamentación se tiñe más intensamente que en el resto de la pared (Lámina 3h). Ésto podría delatar un cierto patrón en la estructura de las esporas de ambos géneros, donde el mucostrato -capa responsable de la reacción cianofílica (Keller, 1986)- se encuentra distribuido imbricadamente en la capa de la coriontúnica. En este punto es importante resaltar que sólo el estudio ultraestructural de las esporas, bajo un enfoque comparativo, podría sustentar las hipótesis de homología sobre la ornamentación y el carácter cianofilo de las esporas en ambos géneros.

A la luz de los presentes resultados, estos caracteres retoman importancia en el estudio de las relaciones filogenéticas del género *Hydnodon*, y sugieren que la presente hipótesis filogenética para el género podría ser apoyada no solo por la evidencia molecular sino también por caracteres morfológicos, principalmente microscópicos. Sin embargo, todos los caracteres morfológicos sugeridos como vínculo entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* también han sido observados en distintos grupos de homobasidiomicetos; por ejemplo, la

ornamentación de las esporas de *Hydnodon* es muy semejante a la de algunas especies de *Pseudotomentella*; la presencia de hifas infladas e hifas gleopleróticas ha sido reportada en algunas especies de géneros como *Hydnellum* e *Hydnum*, incluidos en el presente análisis, y también en algunas especies de *Sarcodon*.

Esto implicaría que un mismo carácter ha aparecido independientemente en los distintos linajes de homobasidiomicetos (Fig. 8), acentuando una vez más que la historia filogenética del reino Fungi está marcada por múltiples eventos de paralelismo y convergencia. Sin embargo, la falta de estudios detallados sobre las estructuras podría estar generando una visión errónea en la homologación de dichos caracteres, como sugirieron Harrison (1973) y Miller (1933) para el carácter hidnoide del himenio. Todo lo anterior debe dejar claro que sólo un análisis crítico y objetivo, bajo un practica refutacionista, que incorpore dichos caracteres morfológicos podrá poner estas conjeturas en su justa dimensión.

Retomando la discusión de las hipótesis tradicionales para el género, es importante señalar que sí bien la hipótesis propuesta por Maas Geesteranus (1963) se corrobora por los presentes resultados, la sugerencia de que ambos géneros están relacionados con los miembros de la familia Gomphaceae queda refutada. En cada una de las distintas estrategias de análisis, el grupo de *Hydnodon* y *Scytinopogon* se ubica siempre por fuera de los ocho grandes clados de Homobasidiomycetes, propuestos por Hibbett y Thorn (2000). La relación más cercana de *Hydnodon-Scytinopogon* con algún miembro de la familia Gomphaceae es la sugerida por el análisis separado del gen nuclear, donde propone que estos dos géneros son el grupo hermano del clado gomfoide-faloide aunque sin ninguna relación directa con algún representante del orden Gomphales (Fig. 7a).

Respecto a la hipótesis de Jülich (1981), los resultados parecen coincidir en que estos géneros son tan disímiles del resto de los homobasidiomicetos que comprendería un grupo lejanamente separado, como lo planteó Jülich bajo el concepto del orden Hydnodontales donde incluyó a las familias Hydnodontaceae y Scytinopogaceae. En el presente trabajo no fueron sometidas a prueba las hipótesis de relación entre *Hydnodon* y los géneros *Trechispora*, *Cristelloporia* y *Brevicellium*, propuestos también como miembros de la familia Hydnodontaceae. Tampoco se sometió a prueba la hipótesis taxonómica para el orden Hydnodontales. Este problema podría ser abordado bajo alguna de las estrategias de muestreo empleadas aquí, como la estrategia de Diversidad de formas, pero ampliando

el muestreo taxonómico del clado Cantareliode. Ya que Jülich (1981) sugiero que algunos de los miembros de este clado estaban relacionados con el orden Hydnodontales, via la familia Scytinopogaceae. Ésto permitiría someter a prueba las relaciones previamente propuestas para estos grupos de homobasidiomicetos, y conocer concretamente la relación de *Hydnodon* con este grupo de hongos.

Aunque la relación filogenética entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* se había propuesto ya con anterioridad, y ahora es corroborada por el presente análisis filogenético, nunca gozó de aceptación entre los diversos taxónomos y fue desplazada por aquellas que lo relacionaban con algún hidnoide o teleforoide. No obstante, la información aportada por el análisis combinado las subunidades cortas ribosomales nuclear y mitocondrial y el análisis separado del gen nuclear refutan cualquier relación filogenética de *Hydnodon* con algún teleforal, específicamente con *Hydnellum* sp. o *Thelephora* sp., como lo propuso Donk (1964).

A partir de las recientes hipótesis filogenéticas para diversos grupos de homobasidiomiceto, Hibbett y Thorn (2000) reconocieron la existencia del clado Teleforoide representado en algunos trabajos por *Hydnellum* y *Thelephora* (Hibbett *et al*, 1997) y en otros por *Pseudotomentella*, *Tomentella*, *Boletopsis* y *Sarcodon* (Gardes y Bruns, 1996; Bruns *et al*, 1998). Esta hipótesis basada en datos moleculares coincide básicamente con la propuesta de Donk (1964) para la familia Thelephoraceae, sin embargo, los presentes resultados refutan parcialmente ésta hipótesis ya que *Hydnodon* y *Scytinopogon* - no están relacionados con el clado Teleforoide, particularmente con los géneros *Hydnellum* y *Thelephora*, como lo había propuesto Donk (1964).

Por su parte, las hipótesis taxonómicas de Banker (1913), Miller (1933) y Harrison (1973) para *Hydnodon* son refutas en su totalidad por los presentes resultados, ya que la evidencia actual descarta cualquier relación de *Hydnodon* con algún otro hidnoide incluido en el análisis, como *Hydnum repandum*, *Irpex lacteus*, *Dentipellis separans*, *Echinodontium tinctorium* o *Auriscalpium vulgare*; más aun, los distintos hidnoides no forman un grupo natural. Esto sugiere que el carácter de himenio hidnoide, fuertemente en la taxonomía tradicional, se ha originado independientemente en los diferentes grupos de homobasidiomicetos como puede observarse en los clados: Poliporoide, Russuloide, Cantareloide y en el clado de *Hydnodon* (Figura 8). Si bien es cierto que este carácter, como muchos otros caracteres macroscópicos, se comporta homoplásicamente, cabe la duda de

que en éste caso no se trate de estructuras homologas, como lo advirtieron Miller (1933) y Harrison (1973) al mencionar que las numerosas formas de himenio hidnoide eran tan variables que bien podrían tener orígenes distintos (Harrison, 1973). Así que sólo el estudio morfológico del himenio hidnoide, en el sentido amplio, podría esclarecer dicha problemática.

Más allá de la relación filogenética de *Hydnodon* con *Scytinopogon*, los resultados actuales plantean algunos aspectos interesantes en el contexto global de la filogenia de los Homobasidiomycetes. En primer lugar, una relación del grupo *Hydnodon-Scytinopogon* con el género poliporoide *Gloeophyllum*, débilmente soportada por los valores de robustez (ver resultados). Hasta el momento no existe propuesta alguna al respecto ni evidencia morfológica que los relacione ya que las especies de *Gloeophyllum* presenta un sistema hifal dimítico y esporas lisas, contrariamente a lo que observamos en el grupo de *Hydnodon* y *Scytinopogon*. Bajo esta perspectiva de valores de robustez bajos y ausencia de evidencia morfológica, la relación de *Gloeophyllum* con el grupo de *Hydnodon-Scytinopogon* no es clara. Sumándose a esto, el consenso estricto del análisis separado de la nuc-SSU refuta cualquier relación filogenética de *Hydnodon* con *Gloeophyllum*, y lo ubica como el grupo hermano de el clado Gomfoide-faloide, como se menciona anteriormente.

Dentro de un contexto más global de la filogenia de los homobasidiomicetos, la posición de *Hydnodon* también es ambigua, ya que al parecer la evidencia con la que contamos actualmente aporta poca información a niveles basales de la filogenia, como ya lo advertían Hibbett *et al* (1997). Los presentes resultados sugieren tres hipótesis filogenéticas sobre las relaciones más basales de *Hydnodon*, en primer lugar, el análisis 3 sugiere que *Hydnodon-Scytinopogon* más *Gloeophyllum* son el grupo hermano del clado Poliporoide-Rusuloide-Himenoquetoide-Euagarical-Boletal-Teleforoide, es decir, se encuentra en la base de la filogenia de los homobasidiomicetos (Figura 6c). La segunda hipótesis, soportada por las estrategias de Clados más basales y Diversidad de formas, sugiere que este mismo grupo ya no se encuentra en la base de los homobasidiomicetos, sino que es el grupo hermano del clado Rusuloide-Himenoquetoide y es mas bien distal a la base del árbol (Fig. 5b y d). Por último, el consenso estricto del análisis separado de la nuc-SSU sugiere que *Hydnodon* junto con *Scytinopogon* son el grupo hermano del clado Gomfoide-faloide pero sigue permaneciendo en la base de los homobasidiomicetos (Fig. 7a). Es claro que estos tres resultados son consecuencia de las diferentes condiciones en

que cada uno de los análisis fue realizado, dando como consecuencia que por el momento la hipótesis más robusta es aquella que incluye al mayor número de OTU's y que combina la mayor evidencia, la cual sugiere que *Hydnodon* es el grupo hermano de *Scytinopogon* y que ambos se encuentra en la base de los homobasidiomicetos.

No obstante, es importante señalar que la estabilidad de la filogenia es muy sensible al muestreo taxonómico y al número y tipo de caracteres. Cuando comparamos los cladogramas de la estrategia de Matriz completa y Diversidad de formas, la posición del grupo *Hydnodon-Scytinopogon-Gloeophyllum* cambia sustancialmente aunque se mantiene la misma estructura general de la filogenia (Fig. 5a y b). Esto tal vez refleje la falta de datos en las secuencias nucleares de los géneros *Hydnodon* y *Scytinopogon*, que cómo observamos en el análisis 2 tiene un efecto directo en la hipótesis filogenéticas resultantes (Fig 6b). En este mismo sentido, las filogenias inferidas independientemente de cada uno de los tipos de datos, nuclear y mitocondrial, contrastan fuertemente como consecuencia de la información filogenética que aportan cada uno de ellos a distintos niveles de la filogenia. Igualmente, es claro que la combinación de ambos genes no resuelve robustamente las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos de homobasidiomicetos, incluyendo al grupo de *Hydnodon*. Mejorar el muestreo taxonómico, sobre todo en aquellos clados pobremente representados, y adicionar nueva evidencia (nuevos caracteres morfológicos o moleculares) podría delinear con trazos más claros y precisos la historia filogenética de los Homobasidiomycetes, y desde luego del género *Hydnodon*.

CONCLUSIONES

La taxonomía del género *Hydnodon* Banker ha sido compleja. A lo largo de su historia, este género ha sido relacionado tanto con otros géneros hidnoides como con miembros de la familia Thelephoraceae, aunque también ha sido relacionado con el género *Scytinopogon*. Los análisis combinados de las secuencias nuc-SSU y mt-SSU y el análisis independiente de la nuc-SSU sugieren que *Hydnodon* está cercanamente relacionado con *Scytinopogon*, hipótesis que es fuertemente soportada por los valores de bootstrap y decaimiento. Estos resultados coinciden parcialmente con las hipótesis de Maas Geesteranus (1963) y de Jülich (1981) para el género y refutan las hipótesis de Banker (1913), Miller (1933), Harrison (1973) y Donk (1964).

La presente hipótesis filogenética que relaciona a *Hydnodon* con *Scytinopogon* es congruente con la distribución de algunos caracteres microscópicos, como la presencia de hifas infladas, hifas gleopléricas y un patrón en la reacción cianofílica de las esporas maduras, previamente señalados por Maas Geesteranus (1963) y Jülich (1981). Aun cuando las similitudes morfológicas entre *Hydnodon* y *Scytinopogon* podrían sugerir una fuerte relación entre estos, sólo un análisis crítico y objetivo que incluya dichos caracteres dejaría en claro su importancia histórica.

Por otro lado, a pesar de que la relación de *Hydnodon* con *Scytinopogon* es fuertemente soportada por los presentes resultados, sus relaciones con el resto de los homobasidiomicetos no son poco claras. Los análisis combinados, bajo la estrategia de Matriz completa, sugieren una fuerte relación de estos dos géneros con *Gloeophyllum* y una posición en la base de los homobasidiomicetos, cercana al clado Cantareloide. En tanto, las estrategias de Diversidad de formas y Clados más basales sugieren que el grupo de *Hydnodon-Scytinopogon* está relacionado con el grupo Rusuloide-Himenoquetoide y se encuentra más bien en una posición distal. Por su parte, el análisis separado de la nuc-SSU sugiere que el clado Gomfoide-faloide es el grupo hermano de *Hydnodon-Scytinopogon*.

Esta situación más allá de reflejar las diferencias en que fueron llevados a cabo cada uno de los distintos análisis, deja en claro que las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU proporcionan poca información a niveles basales ya que los valores de bootstrap e índice decaimiento para los nodos basales fueron muy bajos. Así que por el momento, las relaciones basales entre los grandes grupos de homobasidiomicetos permanecen oscuras, y sin que resuelva la interrogante ¿*Hydnodon* está relacionado con los gomfales como lo

sugirió Maas Geesteranus (1963), o con los cantarelloides, vía *Scytinopogon*, como lo sugirió Jülich (1981)?

Por el momento, podemos inclinarnos por aquélla hipótesis, extraída del análisis que incluyo mayor número de taxones y de datos, que sugiere que *Hydnodon* junto con *Scytinopogon* se encuentran en la base de los homobasidiomicetos bajo el contexto actual.

Sólo un análisis que incorpore nueva evidencia (morfológica y molecular) y mejore el muestreo taxonómico de los clados Cantareliode, Teleforoide, Boletal y Gomfoide-faloide, además de que incorpore otros grupos de heterobasidiomicetos, podría delinear más claramente las relaciones filogenéticas de *Hydnodon* y del resto de los grandes grupos de homobasidiomicetos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aanen, D. K. , Kuyper, T. W., Boekhout, T. Y R.F. Hoekstra. 2000. Phylogenetic relationships in genus *Hebeloma* based on ITS1 y 2 sequences, with special emphasis on the *Hebeloma crustuliniforme* complex. *Mycologia* 92 (2): 269 - 281.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.N. y M. Blackwell. 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons, E. E. U.U.
- Anónimo. 1994. *Systematics Agenda 2000*. American Society of Plant Taxonomists, Society of Systematic Biologists y Willi Hennig Society.
- Banker, H.J. 1913. Type studies in the Hydnaceae -VI. The genera *Creolophus*, *Echinodontium*, *Gloiodon* and *Hydnodon*. *Mycologia* V (6).
- Baverstock, P.R. y C., Mortiz. 1996. Sampling. In Hills, D.M., Mortiz, C. y Mable, B.K. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Berbee, M.L. y J.W, Taylor. 1995. From 18 s ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. *Canadian Journal of Botany* 73 (sup): S677 -S683
- . 1999. Fungla Phylogeny. In Oliver, R y M. Schweizer (eds) *Molecular fungal biology*. Cambridge University Press. Cambridge
- . 2000. Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. In McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. y P.A. Lemke (eds). *The Mycota. Systematics and Evolution (Part B)*. Springer, Alemania.
- Binder, M., Besl, H. y Bresinsky, A. 1997. Agaricales or Boletales? Molecular evidencia towards the classification of some controversial taxa. *Zeitschrift für Mykologie* 63: 189 -196.
- Bremer, B., Jansen, R.K., Oxelman, B., Backlund, M., Lantz, H. y K-J. Kim. 1999. More characters or more taxa for robust phylogeny - case study from the coffee family (Rubiaceae). *Systematic Biology* 48 (3): 413 - 435.
- Brower, A.V.Z. y V. Schawaroch. 1996. Three steps of homology assessment. *Cladistics* 12: 265 - 272.
- Bruns, Th.D., White, Th. J. y J.W., Taylor. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annuals Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- . y T. M. Szaro. 1992. Rate and mode differences between nuclear mitochondrial small-subunit rRNA gene in mushrooms. *Molecular Biology and Evolution* 9 : 836 - 855.

- , Vilgalys, R., Barns, S., Gonzalez, D., Hibbett, D.S., Lane, D.J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W.G. y M., Sogin. 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution** 1(3): 231-241.
- , Szaro, T. M., Gardes, M., Cullings, K. W., Pan, J., Taylor, D. L., Horton, T. R., Kretzer, A., Gaebelotto, M. y Li, Y. 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetics analysis. **Molecular Ecology** 7: 257- 272.
- Bruns, T.D., Szaro, T.M., Gardes, M., Cullings K.W., Pan, J.J., Taylor, D.L., Horton, T.R., Kretzer, A, Garbelotto, M y Y. Li. 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. **Molecular Ecology** 7 : 257-272.
- Cifuentes, B.J. 1996. Estudio taxonómico de los géneros hidniodes estipitados (Fungi: **Aphylophorales**) en México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Fac. de Ciencias, UNAM, Mexico D.F.
- Corner, E. J. H. 1970. Supplement to, A monograph of *Clavaria* and allied genera. **Beihefte nova hedwigia** 33.
- Deacon J. W. 1997. **Modern Mycology**. Blackwell Science. Malden MA.
- de Jong, S.N., Lévesque, C.A., Verkley, G. J. M., Abelin, E. C. A., Rahe, J.E. y P.G. Braun. 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabrea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. **Mycological Research** 105 (6): 658-669
- De Luna, E. 1995. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. **Acta Botánica Mexicana** 33: 63-79.
- , 1996. Epistemología de la investigación taxonómica: inferencias filogenéticas y su evaluación. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 58: 43-53.
- , y B.D., Mishler. 1996. El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 59: 131-146.
- de Pinna, M.C.C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics** 7: 367-394.

- _____. 1996. Comparative biology and systematics: controversies in retrospective. *Journal of Comparative Biology* 1: 3-16
- Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3: 199-324.
- Drehmel, D., Monclavo, J-M. y R. Vilgalys. 1999. Molecular phylogeny of *Amanita* based on large-subunit ribosomal DNA sequences: implications for taxonomy and character evolution. *Mycologia* 91 (4): 610 - 618.
- Erikson, T. 1999. *Autodecay 4.0*. Bergius Foundation Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm.
- Feder, M.A. 1996. The analysis of physiological diversity: the prospects for pattern documentation and general questions in ecological physiology. In Feder, M., Bennet, A. Bunguen, W. y R. Huey (eds). *New directions in ecological physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- González, D. 1996. Codificación de las inserciones-delecciones en el análisis filogenético de secuencias génicas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 115-129.
- _____ y De Luna, E. 1996. Sistemática filogenética: teoría, análisis y datos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 97-98.
- _____. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 137-157.
- _____. 1998. Marcadores moleculares para estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Hall, B. K. 1994. *Homology. The hierarchical basis of comparative biology*. Academic Press, San Diego, Ca.
- Hansen, K., Pfister, D.H. y D.S. Hibbett. 1999. Phylogenetic relationships among species of *Phillipsia* inferred from molecular and morphological data. *Mycologia* 91 (2): 299-314.
- Harrison, K. A. 1971. The evolutionary lines in the fungi with spines supporting the hymenium. In Peterson, R.H (ed). *Evolution in the higher Basidiomycetes*. University of Tennessee Press. Knoxville.
- Harrison, K.A. 1973. Aphyllophorales III: Hydnaceae and Equinodontiaceae. In Ainsworth G.C. and A.S. Sussman (eds.). *The fungi*. Academic Press. New York.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. y D.N., Plegler. 1995. *Dictionary of Fungi*. International Mycological Institute. CAB International, Wallingford.

- Hennig, W. 1965. Phylogenetic Systematics. *Annual Review of Entomology* 10: 97-110.
- Hershkovitz, M.A., Zimmer, E.A. y W. J. Hahn. 1999. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M. y R.J. Gomall (eds.) *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & a Frances, London.
- Hibbett, D. S. y R. Vilgalys. 1993. Phylogenetics of *Lentinus* (Basiomycotina) Inferred from molecular and morphological characters. *Systematic Botany* 18 (3): 409 - 433.
- y M. J. Donaghue. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 73 (suppl. 1): S853- S861.
- , Fukumasa Nakai, Y. Tsuneda, A. y M. J. Donaghue. 1995. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 618- 638.
- , Pine, E.M., Langer, E., Langer, G. y M.J. Donaghue. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings National of Academy Science USA* 94: 12002-12006.
- y R.G. Thorn. 2000. Basidiomycota: Homobasidiomycetes. In McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. y P.A. Lemke (eds). *The Mycota. Systematics and Evolution (Part B)*. Springer, Alemania
- Hillis, D. M. y M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetics inference. *The Quaternary review of biology* 66 (4): 411 - 453.
- , Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K. y E.A. Zimmer. 1996a. Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In Hillis, D.M., Mortiz, C. y B.K., Mable. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- , Mable, B.K. y Mortiz, C. 1996b. Applications of Molecular Systematics. In Hillis, D.M., Mortiz, C. y B.K., Mable. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Hopple, J. S. y R., Vilgalys. 1999. Phylogenetics relationships in mushroom genus *Coprinus* and dark-spore allies based on sequence data form the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, outgroups and mophology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 1- 19.

- Hughey, B. D., Adams, G. C., Bruns, T.D. y D.S. Hibbett. 2000. Phylogeny of *Calostoma* the gelatinous-stalked puffball based on nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 92(1): 94 - 104.
- Jülich, W. 1981. *Higher taxa of Basidiomycetes*. Cramer, Vaduz.
- Keller, J. 1986. Ultraestructure des porois sporiques des Aphylophorales. *Mycologia Helvetica* 2 (1): 1-34
- Kretzer, A. y T. D. Bruns. 1997. Molecular revisitation of the genus *Gastrovillus*. *Mycologia* 89: 586- 589.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. y N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16's ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings National of Academy Science USA* 82: 6955-6959.
- Lui, Y. J., Rogers, S. O., y J. F. Ammirati. 1997. Phylogenetics relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Canadian Journal of Botany* 75: 519 - 532.
- Maas Geesteranus, R. A. 1963. Hyphal structures in Hydnums IV. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Ser. C*, 66: 426-457.
- Miller, L.W. 1933. The genera of Hydnaceae. *Mycologia* 25: 286-302.
- Minelli, A. 1993. *Biological Systematics* Chapman & Hall. Padstow
- Mitchell, A.D. y A. Bresink. 1999. Phylogenetics relationships of *Agaricus* species based on ITS-2 y 28s ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91 (4): 811 - 829.
- Mishler, B.D. y E., De Luna. 1997. Sistemática filogenética y el concepto de especie. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 45-57.
- Miyamoto, M. M. y Cracraft, J. 1991. Phylogenetic inference , DNA sequence analysis and the future of molecular systematics. In Miyamoto, M.M. y J. Cracraft (eds.) *Phylogenetic análisis of DNA sequences*. Oxford University Press, Oxford.
- Moncalvo, J-M., Rehner, S. A. y R, Vilgalys. 1993. Systematics of *Lyophyllum* section *Difformia* based evidence from cultures studies and ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 85: 788- 794.
- , Lutzoni, F.M., Rehner, S., Johnson, J. y R., Vilgalys. 2000. Phylogenetics relations of agaric fungi. Based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49 (2): 278-300.

- Moritz, C. y D. M. Hillis. 1996. Molecular Systematics: context and controversies. In Hillis, D.M., Mortiz, C. y B.K., Mable. (eds.) **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Mullis, K.B., y F.A., Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology** 155: 335-350.
- Nixon, K. C. y J.I. Davis. 1991. Polymorphic taxa, missing values and cladistic analysis. **Cladistics** 7: 233-241.
- Page, R. D. M. y E. C. Holmes. 1998. In **Molecular evolution. A phylogenetic approach**. Blackwell science, Cambridge.
- Paquin, B., Laforest, M-J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J., y F. Lang. 1997. The mitochondrial genome project : the fungal mitochondrial genomes and their gene expression. **Current Genetics** 31: 380-395.
- Paterson, C. 1982. Morphological character and homology. In Joysey, K.A. y A.E. Friday (eds). **Problems of phylogenetics reconstruction**. Academic Press, London.
- Pegler, D.N. y Young, T. W. K. 1985. Basidiospores structure in *Ramariopsis* (Clavariaceae). **Transactions of the British Mycological Society** 84 (2): 207 - 214.
- Petersen, R.H. 1988. **The Clavarioid fungi of New Zealand**. Wellington: DSR Bulletin 236
New Zealand
- Pine, E. M., Hibbett, D.S. y M.J. Donaghue. 1999. Phylogenetics relationships of canthalleroid and clavarioid Homobasidiomycetes based an mitochondrial and nuclear rDNA sequences. **Mycologia** 91 (6): 944 - 963.
- Poe, S. y D. L. Swofford. 1999. Taxon sampling revisited. **Science** 398: 299 - 300.
- O'Donnell, K. L. 1979. **Zygomycetes in culture**. Department of Botany, University of Georgia, Athens.
- Osiewacz, H. D. 1996. Extrachromosomal and transposable genetic elements. In Bos, C.J. (editor). **Fungal Genetics Principles and practice**. Marcel Dekker, New York.
- Schlötterer, Ch. 1998. Ribosomal DNA probes and primers. In Karp, A. Issac, P.G. y D.S. Lingam (eds.) **Molecular tools for screening biodiversity**. Chapman & Hall, Londres.
- Singer, R. 1986. "The Agaricales en Modern Taxonomy". Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Schuh, R.T. 2000. **Biological Systematics**. Cornell University Press, Cornell.

- Sober, E. 1988. **Reconstructing the past. Parsimony, Evolution and Inference.** MIT Press, Cambridge.
- Sober, E. 2000. **Philosophy of Biology.** Westview Press, Colorado.
- Soltis D. E. y P.S.Soltis, 1996. Phylogenetic analysis of large molecular data sets. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 59: 99 - 113.
- Soltis D. E. y P.S.Soltis, 1998a. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetics. analysis. In Soltis, D.E., Soltis, P.S. y J.J. Doyle (eds.) **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing.** Klumer Academic Publisher, Boston.
- , 1998b. Molecular evolution of 18s rDNA an agiospermas: Implications for character weighting in phylogenetic analysis. In Soltis, D.E., Soltis, P.S. y J.J. Doyle (eds.) **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing.** Klumer Academic Publisher, Boston.
- , Soltis, P. S., Mort, M.E., Chase, M. W., Savolainen, V., Hoot, S.B. y C.M. Morton. 1998. Inferring complex phylogenies using parsimony: an empirical approach using three large DNA data sets for Angiosperms. **Systematic Biology** 47 (1): 32 - 42.
- Stalpers, J.A. 1993. The Aphyllophorales fungi I: Keys to the species of the Thelephorales. **Studies in Mycology** No. 35.
- Swan, E. C. y J. W. Taylor. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18s rRNA gene perspective. **Mycologia** 85: 923 - 936.
- , y J. W. Taylor. 1995. Phylogenetics perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18s rRNA gene. **Canadian Journal of Botany** 73 (suppl): S862 - S868.
- Swofford, D. L. 2001. **PAUP* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b.** Sinauer, Sunderland, MA.
- Theler, A. 1988. A cladistic outline of the Eumycot. **Cladistics** 4: 227 - 277.
- , Farris, J. S., Limpscomb, D. L. y M. Källersjö. 2000. Phylogenetics analysis on the fungi based on the large rDNA data set. **Mycologia** 92 (3): 475 - 487.
- Vane-Wright, R.I. 1996. Systematics and the conservation of biological diversity. **Annals of Missouri Botanical Garden** 83: 47-57.

- Vilgalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oydter mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science USA 91**: 4599 - 4603.
- Villegas, M. De Luna, E., Cifuentes, J. y A. Estrada. 1999. Phylogenetic studies in Gomphaceae sensu lato (Basidiomycetes). **Mycotaxon 70**: 127 - 147.
- Wanntorp, H.-E., Brooks, D.R., Nilsson, T., Nylin, S., Ronquist, F., Stearns, S.C. y N. Wedell. 1990. Phylogenetics approaches in ecology. **Iokos 57**: 119-132.
- White, E.E., Dubets, C.P., Cruickshank, M.G. y D.J. Morrison. 1998. DNA diagnostic for *Armillaria* species variation in the IGS-1 and IGS-2 regions. **Mycologia 90** (1): 125-131.
- White, J.T., Bruns, S., L. y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y T. J. White (eds). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego.

Anexo 1. Materiales estudiados

Revisión taxonómica

Hydnodon thelephorus

Material estudiado: MÉXICO: QUINTANA ROO. Mpio. de Lázaro Cárdenas, Reserva Ecológica El Edén, nov. 24, 1999, Estrada-Torres 6230 (TLXM); Mpio. de Cancún, Puerto Morelos, Jardín Botánico del CIRQO, nov, 13, 1983, Escalante 180 (XAL); Suárez 97 sin datos de colecta. VERACRUZ: Mpio. de Catemáco, Arroyo Agrio, ago. 18, 1972, Ventura 5898 (ENCB); Mpio. de Huatusco, por la carr. Totutla-Huatusco, cerca de Huatusco, ago. 28, 1986, Bandala-Muñoz 1011 (XAL).

Obtención de las secuencias de las nuc-SSU y mt-SSU.

Hydnodon thelephorus

MÉXICO: QUINTANA ROO. Mpio. de Lázaro Cárdenas, Reserva Ecológica El Edén, nov. 24, 1999, Estrada-Torres 6230 (TLXM); Mpio. de Cancún, Puerto Morelos, Jardín Botánico del CIRQO, nov, 13, 1983, Escalante 180 (XAL). VERACRUZ: Mpio. de Catemáco, Arroyo Agrio, ago. 18, 1972, Ventura 5898 (ENCB); Mpio. de Huatusco, por la carr. Totutla-Huatusco, cerca de Huatusco, ago. 28, 1986, Bandala-Muñoz 1011 (XAL).

Scytinopogon robustus

MÉXICO: HIDALGO. Mpio. Molango, Laguna de Atezca, ago. 9, 1980, Cifuentes 676.

Anexo 2

	OTU's	Matriz completa	Azar	Diversidad de formas	Clados más basales
P	<i>Meripilus giganteus</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Antrodia carbonica</i>	✓			✓
	<i>Sparassiss spathulata</i>			✓	✓
	<i>Lentinus tigrinus</i>	✓	✓	✓	
	<i>Ganoderma australe</i>	✓		✓	
	<i>Fomes fomentarius</i>	✓		✓	
	<i>Polyporus squamosus</i>	✓	✓	✓	
	<i>Trametes suaveolens</i>	✓	✓		✓
	<i>Dentocotidium sulphurellum</i>	✓		✓	✓
	<i>Albatrellus syringae</i>			✓	✓
	<i>Fomitopsis pinicola</i>	✓	✓	✓	
	<i>Daedalea quercina</i>	✓			
	<i>Laetiporus sulphureus</i>	✓			
	<i>Phaeolus schwinitzii</i>	✓	✓		
	<i>Bjerkandera adusta</i>	✓			✓
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	✓	✓		✓
	<i>Ceriporia purpurea</i>	✓			
	<i>Phlebia radiata</i>	✓	✓		
	<i>Panus rudis</i>	✓	✓	✓	✓
R	<i>Bondarzewia berkeleyi</i>	✓			
	<i>Heterobasidion annosum</i>	✓		✓	✓
	<i>Hericium ramosum</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Equinodontium tinctorium</i>	✓		✓	✓
	<i>Russula compacta</i>	✓	✓	✓	
	<i>Auriscalpium vulgare</i>	✓	✓	✓	
	<i>Lentinellus omphaloides</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Lentinellus ursinus</i>	✓			✓
	<i>Clavicornia pyxidata</i>	✓	✓	✓	
	<i>Sterum annosum</i>	✓			
	<i>Sterum hirsutum</i>	✓	✓	✓	
	<i>Gloeocystidiellum leucoxantha</i>	✓			✓
	<i>Laxitextum bicolor</i>	✓		✓	✓
	<i>Scytinostroma alutum</i>	✓			
H	<i>Coltricia perenis</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Hyphodontia alutaria</i>	✓	✓		✓
	<i>Inonotus hispidus</i>	✓			
	<i>Phellinus igniarius</i>	✓	✓	✓	
	<i>Trichaptum abietinum</i>	✓	✓	✓	
	<i>Basidioradulum radula</i>	✓		✓	
	<i>Schizopora paradoxa</i>	✓	✓		
	<i>Oxyporus sp.</i>	✓		✓	
	<i>Panellus stypticus</i>	✓			
	<i>Typhula phacorrhiza</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Panellus serotinus</i>	✓		✓	
	<i>Fistulina hepatica</i>	✓	✓	✓	

E	<i>Schizophyllum commune</i>	✓		✓	
	<i>Pleurotus tuberregium</i>	✓			
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	✓	✓	✓	
	<i>Cyathus striatus</i>	✓	✓	✓	
	<i>Lentinula laetiteria</i>	✓		✓	
	<i>Agaricus bisporus</i>	✓			
	<i>Lepiota procera</i>	✓		✓	
	<i>Tulostoma macrocephala</i>	✓		✓	
	<i>Lycoperdon sp.</i>	✓	✓	✓	
	<i>Calviata gigantea</i>	✓			
	<i>Coprinus sp.</i>	✓	✓	✓	
	<i>Crucibulum laeve</i>	✓	✓		✓
	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	✓			✓
	<i>Amanita muscaria</i>	✓	✓		
	<i>Cortinarius iodes</i>	✓		✓	
<i>Pluteus petasatus</i>	✓			✓	
B	<i>Bolestus satanas</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Scleroderma citrina</i>	✓		✓	
	<i>Paxillus panuoides</i>	✓	✓	✓	✓
T	<i>Hydnellum sp.</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Thelephora sp.</i>	✓	✓	✓	✓
C	<i>Botryobasidium subcorinatum</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Botryobasidium isabellinum</i>	✓			
	<i>Multiclavula mucida</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Hydnum repandum</i>	✓		✓	
	<i>Clavulina cristata</i>	✓		✓	
G-F	<i>Sphaerobolus stellatus</i>	✓	✓	✓	
	<i>Gastrun saccatum</i>	✓	✓	✓	
F	<i>Pseudicolus fusiformis</i>	✓			✓
	<i>Gomphus floccosus</i>	✓	✓		
	<i>Ramaria stricta</i>	✓	✓		
	<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	✓		✓	✓
O	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Sistotrema musicola</i>	✓	✓	✓	✓
T	<i>Irpex lacteus</i>	✓	✓	✓	✓
R	<i>Dentipellis separans</i>	✓	✓	✓	✓
O	<i>Hydnodon thelephorus</i>	✓	✓	✓	✓
S	<i>Scytinopogon robustus</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Clavaria zollingerii</i>	✓	✓	✓	✓
	Numero de OTU's	85	48	59	40

Representantes de cada clado en cada una de las estrategias de muestreo. P= poliporoide, R= rusuloide, H= Himenoquetoide, E= euagarical, B= boletal, T= teleforoide, C= cantareloide, G-F= Gomfoide-faliode, y OTROS= son los OTU's adicionados a la matriz original