



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ESTUDIO SISTEMÁTICO DEL GÉNERO
Melanoleuca (FUNGI: AGARICALES)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

P R E S E N T A

MARISOL SÁNCHEZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO

COMITÉ TUTORAL: DR. TEÓFILO HERRERA SUÁREZ
DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/445/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del (la) alumno (a) **SANCHEZ GARCIA MARISOL** con número de cuenta **301566643** con la tesis titulada "**Estudio sistemático del género *Melanoleuca* (Fungi: Agaricales)**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO**:

Presidente: DR. TEOFILO HERRERA SUAREZ
Vocal: DRA. DENI CLAUDIA RODRIGUEZ VARGAS
Secretario: DR. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO
Suplente: M. EN IBB CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Suplente: DRA. LAURA GUZMAN DAVALOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de septiembre de 2010.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

JNF/DCRV/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica y el apoyo otorgado durante mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionarme la beca con número 220289 para financiar mis estudios.

Al Programa de Apoyo a los estudios de posgrado (PAEP), por los fondos otorgados para participar como ponente en el X Congreso Nacional de Micología (20-25 de septiembre 2009, Guadalajara, Jalisco) y en el 9 International Mycological Congress (1-6 de agosto 2010, Edimburgo, Escocia).

Al proyecto de investigación DGAPA-PAPIIT con número IN218008 “Contribuciones al conocimiento de la biodiversidad de los hongos mexicanos” por su apoyo para realizar esta investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, Dr. Teófilo Herrera Suárez y Dra. Laura Guzmán Dávalos por su asesoría, apoyo y valiosos comentarios que proporcionaron durante el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joaquín Cifuentes por su confianza, apoyo y enseñanzas durante mi formación; por compartir conmigo su invaluable conocimiento y por el interés que tuvo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Guzmán por sus valiosas observaciones durante el desarrollo de este proyecto; por la revisión y comentarios que ayudaron a mejorar el escrito final.

Al Dr. Teófilo Herrera por todos sus comentarios durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Luisa Alba por permitirme trabajar en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias.

A Claudia y Betty por compartir sus conocimientos conmigo, por ser tan pacientes cuando me enseñaron las técnicas moleculares, por contagiarme su entusiasmo por la biología molecular y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Brandon Matheny por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad de Tennessee, donde pude ampliar este proyecto, mis conocimientos y el interés por la micología y la sistemática.

A la M. en C. Laura Márquez, encargada del Laboratorio de Biología Molecular y del secuenciador automático del Instituto de Biología, por el excelente servicio de secuenciación.

A la M. en IIB Claudia Segal por aceptar ser parte de mi jurado y por sus sugerencias que ayudaron a mejorar la versión final de este escrito.

A la Dra. Dení Rodríguez por las correcciones y comentarios hechos a este trabajo.

A Lupita y Karina por toda su ayuda y los consejos que me dieron para obtener mejores resultados en los experimentos.

A Martin Ryberg por resolver mis enormes dudas acerca de los análisis filogenéticos y por lograr que mi interés por la bioinformática creciera.

A los curadores de herbario: M. en C. Ricardo Valenzuela (ENCB), Dra. Laura Guzmán (IBUG), M. en C. Elvira Aguirre (MEXU), M. en C. Alejandro Kong (TLXM), Dr. Gastón Guzmán (XAL) y Dra. Ellen Larsson (GB), por el préstamo de materiales utilizados en este estudio.

A mi familia. A mi mamá por apoyarme en todas mis decisiones, por impulsarme para seguir adelante, por consentirme y por aguantar todas mis locuras (principalmente mis enojos). A mi hermano por apoyarme en todo momento y por ser un ejemplo para mí. A Karen porque más que una cuñada es como la hermana que nunca tuve. A Regina por traer tanta alegría a mi vida y por todas las sonrisas que me da.

A mis amigos Betty, Cisteil, Luis Felipe, David, Robert y Ángel por estar ahí y porque sé que siempre puedo contar con ellos.

A los miembros de “la trinchera” (Luz, Alfredo, Paty, Samuel, Jorge y Anahí) por todos los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de clase, por lograr que los momentos de mayor tensión fueran más agradables.

Finalmente agradezco a todas las personas que de alguna manera estuvieron presentes o contribuyeron para la culminación de este trabajo.

**Quiero dedicar esta tesis a
mi familia porque sin su apoyo
ésto no hubiera sido posible.**

“Sólo cuando el último árbol esté muerto, el último río envenenado, y el último pez atrapado, te darás cuenta que no puedes comer dinero”.

-Sabiduría indoamericana-

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico, es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

-Marie Curie-

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
Sistemática filogenética del reino Fungi	7
El concepto de especie en hongos.....	9
2. ANTECEDENTES.....	11
Historia del género <i>Melanoleuca</i>	11
Descripción del género <i>Melanoleuca</i>	11
Conocimiento actual del género <i>Melanoleuca</i>	13
Clasificación infragenérica.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares	16
4. METODOLOGÍA.....	17
Muestreo taxonómico	17
Técnicas moleculares	17
Análisis filogenéticos	24
Reconstrucción de estados ancestrales	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Reconstrucción filogenética.....	29
Alineamiento	29
Análisis filogenético	36
I. Inferencia filogenética de RPB1	36
II. Inferencia filogenética de los genes ribosomales (ITS+nLSU)	39
III. Inferencia filogenética de las tres regiones combinadas (ITS+nLSU+RPB1)	42
Reconstrucción de estados ancestrales	45

5.2. Contribución al conocimiento de <i>Melanoleuca</i> en México.....	46
Clave para las especies de <i>Melanoleuca</i> que se distribuyen en México.....	48
Descripción de las especies mexicanas de <i>Melanoleuca</i>	50
6. DISCUSIÓN.....	55
Monofilia de <i>Melanoleuca</i>	55
Relaciones filogenéticas dentro de <i>Melanoleuca</i>	55
Delimitación de especies de <i>Melanoleuca</i>	56
El género <i>Melanoleuca</i> en México.....	63
El género <i>Melanoleuca</i> en el mundo.....	64
Clasificación infragenérica.....	64
7. CONCLUSIONES.....	66
8. LITERATURA CITADA.....	68
9. ANEXOS.....	81
Anexo 1. Ejemplares incluidos en el análisis filogenético.....	81
Anexo 2. Árboles filogenéticos obtenidos de cada matriz mediante los tres criterios utilizados en este trabajo (MP, ML, AB).	86
Anexo 3. Árboles obtenidos en cada una de las estrategias de partición implementadas en MrBayes.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Basidioma y estructuras microscópicas de <i>Melanoleuca</i>	12
Figura 2. Djagrama de la metodología que se llevó a cabo en este trabajo.....	18
Figura 3. Diagrama de las regiones amplificadas.....	22
Figura 4. Diagrama de la metodología que se siguió para la clonación de algunas de las muestras.....	23
Figura 5. Mapa de la distribución de los ejemplares incluidos en este trabajo.....	34
Figura 6. Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano del RPB1...37-38	
Figura 7. Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano de los genes ribosomales (ITS+nLSU).....	40-41
Figura 8.Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano de las regiones ITS+nLSU+RPB1.....	43-44
Figura 9. Reconstrucción de estados ancestrales (cistidios: ausencia-presencia-forma).....	45-46
Figura 10. Mapa de la distribución de los ejemplares mexicanos de <i>Melanoleuca</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. programas de PCR que se utilizaron para la amplificación de las regiones estudiadas.....	20
Tabla 2. Estrategias de partición analizadas en MrBayes.....	27
Tabla 3. Ejemplares incluidos en el análisis filogenético.....	30
Tabla 4. Números de acceso de <i>GenBank</i> de las secuencias obtenidas a través de esta base de datos.....	34
Tabla 5. Modelos de sustitución nucleotídica que se ajustan a cada una de las matrices y particiones.....	35
Tabla 6. Nombres utilizados para ejemplares mexicanos antes de este trabajo.....	48

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar las relaciones filogenéticas de *Melanoleuca*, con el fin de establecer los límites taxonómicos, ecológicos y geográficos que puedan ayudar a delimitar especies, así como conocer su posición filogenética dentro de los Agaricales. La inferencia filogenética se llevó a cabo utilizando secuencias de DNA de las siguientes regiones: ITS, nLSU y RPB1, obtenidas de ejemplares recolectados en América y Europa. Estos datos se analizaron por medio de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y métodos Bayesianos. Los resultados apoyan fuertemente la monofilia de *Melanoleuca* y su inclusión en el clado pluteoide, como grupo hermano de *Pluteus*. La ausencia o presencia de cistidios, así como la forma que éstos presentan, son caracteres importantes para reconocer grandes grupos. La reconstrucción de estados ancestrales de este carácter indicó que la ausencia de cistidios es el posible estado ancestral de *Melanoleuca*. La distribución geográfica y/o ecológica provee información muy útil para la delimitación de especies en taxa donde la morfología no es suficiente para establecer los límites. Se descubrieron especies nuevas que se distribuyen en México, con lo que se demuestra que los nombres europeos se han aplicado de manera inadecuada a especies morfológicamente similares de México y el resto de América. Este trabajo representa una primera aproximación al conocimiento de las relaciones filogenéticas de *Melanoleuca*.

ABSTRACT

The aim of this research was to study the phylogenetic relationships of *Melanoleuca* in order to evaluate the taxonomic, ecological and geographical boundaries that can be useful for species delimitation as well as to know its phylogenetic position among the Agaricales. Phylogenetic relationships were inferred using ITS, nLSU and RPB1 sequence data from a number of specimens collected in America and Europe. These data were analyzed using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian methods. The results strongly support *Melanoleuca* as a monophyletic group and its inclusion in the pluteoid clade, being the sister group of *Pluteus*. The cystidial presence and type are important characters to recognize major lineages. The ancestral state reconstruction of this character shows that the lack of cystidia is the possible ancestral state of *Melanoleuca*. The geographic and ecological distribution provides useful information for species delimitation in some taxa where morphological characters are not enough to establish species boundaries. New species distributed in Mexico were discovered; this shows that European names have been widely misapplied to similar-looking species in Mexico and in the rest of America. This study represents a first approximation to the knowledge of the phylogenetic relationships in *Melanoleuca*.

1. INTRODUCCIÓN

La sistemática tiene un papel muy importante en el estudio de la biodiversidad (Cracraft, 2002), pues no sólo se encarga de la descripción, nomenclatura y clasificación de las especies, sino también de esclarecer la historia evolutiva de los organismos, además de ser la base de la biología comparada y la conservación (Ross, 1974; Schuh, 2000).

En los últimos años ha habido un gran desarrollo de la sistemática filogenética, cuyo principal objetivo es conocer las relaciones genealógicas entre los grupos de organismos, así como producir clasificaciones que reflejen dichas relaciones (Wiley, 1981; Hibbett y Donoghue, 1998). Incluso los análisis filogenéticos no son sólo del interés de los taxónomos, sino también de científicos dedicados a otras disciplinas dentro de la biología, así como de ciencias externas a ésta (De Luna *et al.*, 2005). Es gracias al progreso en la teoría y metodología filogenética que la sistemática ha logrado avanzar, alcanzando cada vez una mayor aceptación como ciencia (Cracraft, 2002).

Las técnicas de biología molecular han llegado a ser una parte muy importante de los estudios de sistemática filogenética, los cuales han aumentado en los últimos años, ya que los datos obtenidos a partir de estas técnicas proveen información muy importante para hacer reconstrucciones filogenéticas (Bruns *et al.*, 1992; Hibbet *et al.*, 1997; González, 1998; Tehler *et al.*, 2000; Bapteste *et al.*, 2002). A nivel de especie, las filogenias inferidas a través de datos moleculares ofrecen registros indirectos de eventos de especiación y de tasas de diversificación (Barracough y Nee, 2001; Ricklefs, 2009; Rabosky y McCune, 2009). Aunque existen conflictos respecto a si los caracteres moleculares proveen mayor y mejor información que los morfológicos para estimar filogenias (Patterson *et al.*, 1993), y pese a las ventajas y desventajas de cada uno de ellos, lo cierto es que unos no excluyen a otros y los estudios que contienen tanto datos moleculares como morfológicos proporcionan mejores interpretaciones acerca de las relaciones evolutivas que aquellos que sólo se basan en un tipo de datos (Moritz y Hillis, 1996; Lutzoni, 2004).

Los hongos forman un grupo muy diverso, que desempeñan funciones de vital importancia para el mantenimiento de los ecosistemas: en procesos de descomposición de materia orgánica, como simbioses y patógenos. Sin embargo, el conocimiento acerca de sus relaciones evolutivas dista de ser completo (McLaughlin *et al.*, 2009).

Los recientes avances en los estudios de sistemática molecular permitieron esclarecer algunas de las relaciones entre estos organismos. Estos análisis se basaron principalmente en las secuencias de los genes ribosomales (Bruns *et al.*, 1991; Lutzoni *et al.*, 2004), las cuales se

utilizan ampliamente, ya que poseen un gran número de repeticiones en tándem (Butler y Metzenberg, 1989). Esto permite amplificar fácilmente estas regiones, incluso de materiales con DNA degradado, como es el caso de los ejemplares herborizados. Además, las distintas regiones de estos genes permiten evaluar las relaciones filogenéticas de los organismos a distintos niveles (Bruns *et al.*, 1991). Sin embargo, en algunos casos el poder resolutivo de los genes ribosomales es limitado (ej. Diezmann *et al.*, 2004; Frøslev *et al.*, 2005; Lumbsch *et al.*, 2005; Hofstetter *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007), por lo que recientemente se incrementó el uso de genes que codifican para proteínas, así como el uso de múltiples loci. Algunos de los genes más utilizados son: β -tubulina, la subunidad seis de la ATPasa mitocondrial (*atp6*), el factor de elongación *tef1 α* , y las dos subunidades más grandes de la RNA polimerasa II (*RPB1* y *RPB2*), entre otras. Estas regiones demostraron ser útiles para inferir relaciones evolutivas con un fuerte soporte o con un soporte superior al de topologías inferidas por medio de genes ribosomales (Kretzer y Bruns, 1999; Liu *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001; Matheny *et al.*, 2002; Begerow *et al.*, 2004; Kropp y Matheny 2004; Lutzoni, *et al.*, 2004; Frøslev *et al.*, 2005; Matheny, 2005; Rehner y Buckley, 2005; James *et al.*, 2006; Matheny *et al.*, 2007).

Sistemática filogenética del reino Fungi

Los estudios filogenéticos con base en caracteres moleculares permitieron establecer la monofilia del reino Fungi (también llamado Eumycota), considerando únicamente cinco phyla dentro de él: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota, excluyendo así a los siguientes grupos: Oomycota, Acrasiomycota, Hyphochytriomycota, Labyrinthulomycota, Myxomycota y Dictyosteliomycota (Bruns *et al.*, 1991; Bowman *et al.*, 1992; Berbee y Taylor; 1999, Lutzoni *et al.*, 2004; Blackwell *et al.*, 2006). Estos estudios también dejaron atrás la idea de que las plantas y los hongos comparten el mismo ancestro y mostraron un panorama nuevo, en el que el reino Animalia es el grupo hermano de los hongos, con el que comparte una historia evolutiva (Wainright *et al.*, 1993; Steenkamp *et al.*, 2006).

El phylum Chytridiomycota corresponde a un grupo polifilético (James *et al.*, 2000; 2006), que incluye formas unicelulares o filamentosas, con células flageladas en alguna parte del ciclo de vida, lo que llevó a pensar que la forma acuática, flagelada y unicelular es el estado plesiomórfico de todos los hongos (Lutzoni *et al.*, 2004).

El phylum Zygomycota es también un grupo polifilético (Tanabe *et al.*, 2004; Blackwell *et al.*, 2006), que contiene formas filamentosas y sin flagelo; saprobias y simbioses (Lutzoni *et al.*, 2004). Anteriormente se consideró dentro de este grupo a los Glomales, pero en estudios

recientes se demostró que los Glomales forman un phylum distinto: Glomeromycota, cuyos integrantes se asocian a plantas formando micorrizas arbusculares (Schüßler *et al.*, 2001). Se demostró que Glomeromycota es grupo hermano de los phyla Ascomycota y Basidiomycota, y forma un clado monofilético que se diversificó junto con las plantas terrestres (Simon *et al.*, 1993; Taylor, 1995; Berbee y Taylor, 2000; Redecker *et al.*, 2000a; 2000b; Redecker y Raab, 2006).

Los phyla Ascomycota y Basidiomycota forman un grupo monofilético denominado Dikarya, el cual se caracteriza por la formación de hifas dicarióticas durante alguna etapa del ciclo de vida (Bowman *et al.*, 1992; James *et al.*, 2006). Este clado comprende aproximadamente el 95% de los hongos conocidos (Blackwell *et al.*, 2006). El phylum Ascomycota es el más grande dentro del reino Fungi y se caracteriza por la formación de ascosporas; se divide en tres subphyla monofiléticos: Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina (James *et al.*, 2006).

El phylum Basidiomycota incluye alrededor de 30 000 especies (Kirk *et al.*, 2008), que se caracterizan por la formación de basidiosporas. Dicho grupo se divide en tres subphyla: Pucciniomycotina (=Uredinomycetes), Ustilaginomycotina (=Ustilaginomycetes) y Agaricomycotina (=Hymenomycetes) (Blackwell *et al.*, 2006; James *et al.*, 2006). Este último incluye una gran variedad de formas que fueron objeto de diversos estudios (ej. Hibbett y Binder, 2002; Hibbett, 2004), y contiene alrededor de dos tercios de los basidiomicetos conocidos. Dentro del subphylum Agaricomycotina se incluyen los siguientes clados: Tremellomycetes, Dacrymycetes y Agaricomycetes (Blackwell *et al.*, 2006; Hibbet, 2006; Matheny *et al.*, 2007). Los primeros dos subphyla se caracterizan por presentar fragmobasidios, mientras que los holobasidios se encuentran presentes únicamente en el clado de los Agaricomycetes constituyendo el grupo de los Homobasidiomycetes junto con los Auriculariales y Ceratobasidiales formando un grupo monofilético (Swann y Taylor, 1995; Hibbett y Thorn, 2001). El clado Agaricomycotina ha sido sujeto de un gran número de estudios para analizar la monofilia del grupo, así como la de los subclados que lo conforman (ej. Hibbett *et al.*, 1997; Moncalvo *et al.*, 2000; 2002; Larsson *et al.*, 2004; 2006; Binder *et al.*, 2005; Hibbett, 2006; Hosaka *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006; Matheny *et al.*, 2007).

Dentro de los Homobasidiomycetes se distinguen 12 clados: Poliporoide, Euagarical, Boletal, Teleforoide, Rusuloide, Hymenochaetoide, Cantharelloide, Gomphoide-Phalloide, Atheloide, Plebioide, Corticioide y Trechisporoide (Larsson *et al.*, 2004; Binder *et al.*, 2005). El clado Euagarical incluye a los hongos con láminas y corresponde a la definición que Singer (1986) asignó al suborden Agaricineae, aunque también contiene algunos taxa que fueron

clasificados dentro de los Aphylophorales, así como algunos órdenes de Gasteromycetes (Moncalvo *et al.*, 2002; Binder *et al.*, 2005; Matheny *et al.*, 2006).

Es evidente que los avances en la sistemática filogenética permiten un mayor entendimiento de las relaciones entre los distintos grupos que forman el reino Fungi; sin embargo, esto también da lugar a preguntas nuevas, dejando así un amplio camino por recorrer.

El concepto de especie en hongos

En el caso de los hongos, el concepto de especie más utilizado es el morfológico, en el que se emplean caracteres tanto macromorfológicos como micromorfológicos para diferenciar una especie otra. Asimismo que sintetizan o no metabolitos secundarios proporciona información taxonómica útil en algunos grupos (Petersen y Hughes, 1999; Taylor *et al.*, 2000). El concepto biológico también es utilizado ampliamente y gracias a éste se reconocieron especies biológicas distintas dentro de una especie morfológica (Petersen y Hughes, 1999). Sin embargo, la aplicación de estos conceptos resulta problemática y a veces inadecuada para distinguir grupos naturales, ya que no refleja su historia evolutiva (Petersen y Hughes, 1999), sin olvidar que algunos hongos no pueden ser cultivados o no se conoce su estado teleomorfo, y en algunos casos la capacidad de reproducirse se mantiene como un carácter ancestral en grupos en donde existe un aislamiento geográfico. Por lo que varias de las especies reconocidas bajo alguno de estos conceptos son en muchas ocasiones más de una especie filogenética (Taylor *et al.*, 2000).

El concepto filogenético de especie es uno de los más usados en los últimos años, éste señala que una especie es el grupo de organismos más pequeño diagnosticable, dentro del cual hay un patrón de ancestría-descendencia (Cracraft, 1983).

El uso creciente de este concepto para delimitar las especies se debe a dos factores principales: el desarrollo de la sistemática filogenética durante los últimos años, y el incremento en el interés por parte de la comunidad científica por conocer las relaciones evolutivas entre los organismos por medio del establecimiento de grupos naturales. Con el concepto filogenético, el número de especies de hongos se incrementó hasta en un 300%, lo cual refleja la confusión taxonómica que existe actualmente dentro de este grupo, la cantidad de especies crípticas reconocidas (Hawksworth, 1991; 2001), y las limitaciones que algunos conceptos presentan ante esta problemática.

Considerando la importancia de este concepto para delimitar las especies y algunas críticas ante su mayor aplicación, surgieron metodologías alternativas para incorporar la mayor cantidad de información disponible de los organismos, en lo que algunos autores llaman “taxonomía integrativa”, en la cual se contempla no sólo información obtenida a partir de secuencias de DNA, sino también la información morfológica, geográfica, ecológica, reproductiva, de comportamiento, desarrollo, etc. (Dayrat, 2005; DeSalle *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

Historia del género *Melanoleuca*

El nombre genérico *Melanoleuca* Pat. fue propuesto en 1897 por Patouillard, aunque la definición del género fue publicada en 1887 por el mismo autor bajo el nombre *Melaleuca* Pat., que resultó ser un homónimo de *Melaleuca* L. (*nomen conservandum*), un nombre utilizado por Linneo para designar un género de plantas de la familia Myrtaceae (Pfister, 1984; Kuyper, 1986a; Riva, 1988).

En la descripción original se mencionaron principalmente caracteres macromorfológicos, y en este concepto se incluyen algunas especies que anteriormente se encontraban en los géneros *Tricholoma* y *Collybia sensu* Fries (Pfister, 1984; Riva, 1988). Al no ser una descripción amplia y detallada provocó confusión y algunos autores consideraron dentro de este grupo a especies pertenecientes a otros géneros.

Kühner y Maire (1926) hicieron evidente el carácter amiloide de la pared de las esporas de las especies de este género, al utilizar el reactivo de Melzer, y dieron a este carácter una gran importancia para delimitar al grupo. Posteriormente, Métrod (1942) descubrió la existencia de algunas especies carentes de cistidios, por lo que reconoció que la presencia de estas células no podría considerarse como un carácter distintivo del género, es por esto que propuso otra definición, en la cual incluyó a todas las especies de Agaricaceae con la pared de las esporas cubierta de verrugas amiloides. Sin embargo, esta definición todavía era muy amplia e incluía a algunas especies de *Leucopaxillus* Boursier, por lo que el mismo autor en 1948, en un trabajo titulado *Ensayo sobre el género Melanoleuca*, consideró caracteres micro y macromorfológicos para delimitar al género (Métrod, 1948).

Descripción del género *Melanoleuca*

Melanoleuca Pat. 1897. **Catalogue Raisonné des Plants Cellulaires de la Tunisie 22.**

Especie tipo: *Melanoleuca melaleuca* (Pers.) Murrill

=*Agaricus melaleucus* Pers.

=*Melaleuca vulgaris* (Pat.) Pat.

La palabra *Melanoleuca* proviene del griego *mélas*, *mélanos* que significa negro y *leukós* que quiere decir blanco, que hace referencia al blanco de las láminas y al color oscuro del píleo y del estípite (Ulloa y Herrera, 1994).

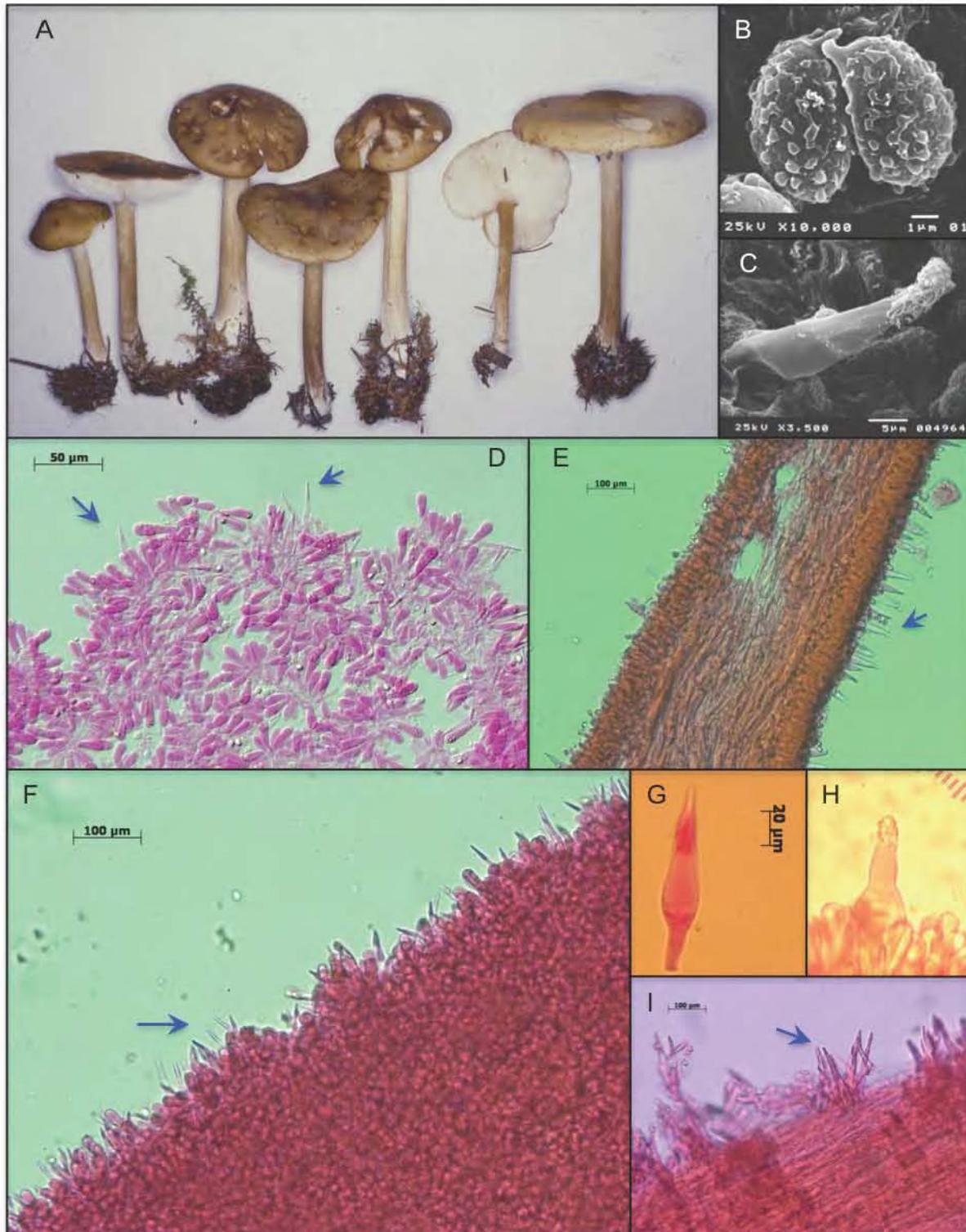


Fig. 1. Basidiomas y estructuras microscópicas de *Melanoleuca*. A. Basidiomas (Foto: Cifuentes 28-31). B. Esporas. C. Cistidio fusiforme con cristales en el ápice. D. Cistidios urticoides. E. Pleurocistidios fusiformes. F. Queilocistidios urticoides. G. Cistidio fusiforme. H. Cistidio lageniforme con cristales en el ápice. I. Caulocistidios.

Caracteres macromorfológicos

Basidioma tricolomatoide. Estípito central (en ocasiones excéntrico), generalmente fibriloso, sólido, carece de velo. Píleo seco y glabro, puede ser higrófono o no. Láminas generalmente delgadas y muy juntas, blancas a amarillentas, en ocasiones con tonos rosáceos, a veces se manchan al tacto de color café, adnadas-emarginadas, aunque algunas especies pueden tener láminas uncinadas o decurrentes; los bordes de las láminas generalmente son estériles, rara vez son fértiles. Esporada blanca. Contexto blanquecino, aunque en una gran cantidad de especies puede obscurecerse desde la base del estípito hasta alcanzar tonos de color café o negruzco. Olor más o menos farinoso, con un sabor dulce. Tienen un desarrollo gimnocárpico y estipitocárpico (Fig. 1A).

Las especies de este género crecen principalmente en bosques de coníferas, pastizales y dunas de arena, aunque también se pueden encontrar algunas especies en bosques tropicales; son terrícolas o húmicas y de hábito solitario o gregario.

Caracteres micromorfológicos

Pileipellis tipo tricodermo, a veces tipo cutis. No presentan fíbulas. Basidios cortos, cilíndricos generalmente con cuatro esporas y granulaciones siderófilas. Trama lamelar regular o subregular. Esporas de 8-11 x 4-6 μm , subglobosas a elipsoides con pared delgada, hialinas a amarillentas, cubiertas con verrugas amiloides, que a veces se interconectan entre sí por unas delgadas líneas, presentan una placa suprahilar lisa que por lo general está rodeada por una areola amiloide (Fig. 1B). La mayoría de las especies presentan queilocistidios¹, los cuales pueden ser de dos tipos: lageniformes o urticoides², por lo general presentan incrustaciones de oxalacetato de calcio en el ápice. Pleurocistidios³ y caulocistidios⁴ similares a los queilocistidios (Fig. 1C-I).

Conocimiento actual del género *Melanoleuca*

Se han descrito aproximadamente 180 especies bajo este nombre; sin embargo, no todas ellas pertenecen al género, algunas corresponden a *Tricholoma*, *Leucopaxillus*, *Clitocybe*, entre otros (Bigelow y Smith, 1969; Pfister, 1984).

¹ Cistidios situados en el borde de las láminas.

² También llamados “pelos de ortiga”, ya que la forma es similar a los pelos de la planta *Urtica dioica* L.

³ Cistidios ubicados en las caras de las láminas.

⁴ Cistidios situados en el estípito.

Murrill (1914) publicó la descripción de 119 especies de Norteamérica, de las cuales únicamente seis pertenecen realmente a dicho género (Pfister, 1984). Singer (1986) consideró 48 especies a nivel mundial, mientras que Bon (1978) reconoció 65 sólo para Europa. Boekhout (1988) publicó una revisión de Holanda utilizando conceptos de especie más flexibles, lo que llevó a agrupar especies que Bon había separado y considerar algunas variedades como simples variaciones de una misma especie. Kirk *et al.* (2008), consideraron que existen alrededor de 50 especies en el mundo.

En Norteamérica se han reconocido 19 especies: *M. alboflavida*, *M. angelesiana*, *M. borealis*, *M. brevipes*, *M. earlei*, *M. eccentrica*, *M. evenosa*, *M. lewisii*, *M. mackleri*, *M. melaleuca*, *M. microspora*, *M. planiceps*, *M. praecox*, *M. reai*, *M. subcinerea*, *M. subcinereiforme*, *M. tanana*, *M. utahensis*, y *M. verrucipes* (Murrill, 1914; Smith, 1944; Smith y Rea, 1944; Thiers, 1958; Gillman y Miller, 1977; Singer, 1989; Matheny y Vellinga, 2009).

En México actualmente se conocen nueve especies: *M. aff. cavipes*, *M. brevipes*, *M. cognata*, *M. excissa*, *M. grammopodia*, *M. melaleuca*, *M. poliroleuca*, *M. strictipes*, y *M. yucatanensis* (Herrera y Guzmán, 1961; Sánchez León, 1961; Martín del Campo, 1968; Guzmán, 1972; 1982; 1983; 1986; Valdés-Ramírez, 1972; Mendiola, 1974; Frutis y Guzmán, 1983; Martínez Alfaro *et al.*, 1983; Bon, 1984; Courtecuisse y Pfister, 1984; Pérez-Silva y Aguirre-Acosta, 1985; 1986; Zarco, 1986; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sánchez-García, 2008).

Debido a los escasos estudios taxonómicos enfocados a este grupo y a las múltiples interpretaciones de las especies, es difícil establecer una cifra precisa del número de especies.

En cuanto a los trabajos de sistemática molecular, sólo unos cuantos han incluido especies de *Melanoleuca*. En estos estudios se relacionó a dicho grupo con el género *Pluteus* dentro de un clado denominado Pluteoide. Los géneros *Volvariella*, *Macrocystidia* y el gasteromiceto marino *Limnoperdon* también parecen estar relacionados con este grupo. Sin embargo, la relación de *Melanoleuca* con otros Agaricales aún es incierta (Moncalvo *et al.*, 2002; Matheny *et al.*, 2006; Garnica *et al.*, 2007).

Clasificación infragenérica

Existen varias clasificaciones infragenéricas, a continuación se describen las propuestas por Singer (1986) y Boekhout (1988):

Singer (1986) propuso dividir al género en cuatro secciones con base principalmente en el tamaño y color del basidioma.

- Sección *Alboflavidae* Sing.: Píleo claro, principalmente blanquecino, aunque puede presentar colores grisáceos, ocráceos o parduscos; esporada de color crema o en algunos casos completamente blanca, láminas generalmente estrechas, a veces la ornamentación de las esporas no es muy evidente.
- Sección *Humiles* Sing.: Píleo de color gris, café oscuro o negruzco; la pared de las esporas se observa claramente ornamentada por la presencia de un exosporio bien desarrollado, estípote furfuráceo, pubescente o escuamuloso, con fibrillas color negro.
- Sección *Oreinae* Sing.: Píleo y esporas como en la sección *Humiles*. Estípote generalmente pruinoso, los basidiomas pequeños tienen un estípote blanco o gris al igual que las láminas, si el diámetro del píleo es mayor a los 30 mm, entonces presentan láminas blancas y estrechas (las especies muy grandes no están consideradas en esta sección).
- Sección *Melanoleuca*: Píleo, esporas y superficie del estípote como en la sección *Oreinae*, las especies pequeñas presentan un contexto de color café, el diámetro del píleo es de 30 mm o menos, en caso de no presentar estas características son consideradas dentro de la sección *Oreinae*, las especies más grandes presentan tonos oscuros en el estípote.

Boekhout (1988) propuso una clasificación infragenérica con base en la morfología de los cistidios.

- Subgénero *Macrocystis* Boekhout: Con las secciones *Alboflavidae* Singer, *Cognatae* (Singer) Kühner y *Strictipedes* Bon; este subgénero se caracteriza por presentar queilocistidios fusiformes a lageniformes y pleurocistidios similares a los queilocistidios.
- Subgénero *Urticocystis* Boekhout: En el que se encuentran las secciones *Grammopodiae* Bon y *Humiles* (Singer) Singer; presenta queilocistidios urticoides; pleurocistidios ausentes o muy escasos, si están presentes son similares a los queilocistidios.
- Subgénero *Melanoleuca*: En donde se incluyen las especies sin cistidios.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las relaciones filogenéticas de *Melanoleuca* con el fin de establecer los límites morfológicos, ecológicos y geográficos de las especies de este grupo, así como conocer la posición filogenética del género dentro de los Agaricales.

Objetivos particulares

1. Evaluar la monofilia del género con base en análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcritos del DNA ribosomal (ITS), una región de la subunidad grande del DNA ribosomal (nLSU) y una región de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB1), de ejemplares recolectados en América y Europa.
2. Obtener una hipótesis de las relaciones filogenéticas dentro de este grupo mediante el análisis de las secuencias obtenidas.
3. Evaluar y reconocer la importancia de los caracteres geográficos, ecológicos y morfológicos que permitan delimitar las especies pertenecientes a este género.
4. Establecer una base a partir de la cual se puedan realizar más estudios de filogenia molecular en este grupo.

4. METODOLOGÍA

Muestreo taxonómico

Se revisaron ejemplares de *Melanoleuca* depositados en las siguientes colecciones mexicanas de hongos: Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB), Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME), Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG), Herbario del Instituto de Biología, UNAM (MEXU), Herbario del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (TLXM), Herbario del Instituto de Ecología, A.C. en Xalapa, Ver. (XAL), así como de las siguientes colecciones extranjeras: Herbario de la Universidad de Tennessee, USA (TENN) y Herbario de la Universidad de Gotemburgo, Suecia (GB). Para los ejemplares del herbario FCME, se revisó el catálogo fotográfico de Cifuentes (2006).

Los ejemplares se estudiaron por medio de las técnicas utilizadas en micología para observar y medir estructuras como: esporas, basidios y cistidios (Largent *et al.*, 1977). Posteriormente se determinaron morfoespecies utilizando claves taxonómicas (Gillman y Miller, 1977; Bon, 1991; Watling y Turnbull, 1998; Boekhout, 1999; Horak, 2005; Vesterholt, 2008). Del total de los materiales revisados se seleccionaron algunos ejemplares para llevar a cabo la extracción del DNA, excluyendo a los que no se encontraban en buenas condiciones para su estudio y a aquellos que no tenían suficientes datos de recolecta. En algunos casos se contaba con varios especímenes recolectados en el mismo sitio cuyas características morfológicas eran similares, en dichos casos se seleccionó sólo un ejemplar para llevar a cabo las técnicas moleculares y los análisis filogenéticos (Fig. 2). Por último se elaboró una clave taxonómica de los ejemplares mexicanos. Las referencias de colores se basaron en la guía de color Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978).

Técnicas moleculares

Obtención de DNA

Para la extracción de DNA genómico se usaron entre 20 y 50 mg de basidioma, con cuatro protocolos distintos: método de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio; Gardes y Bruns, 1993) y los *kits* de extracción E.Z.N.A.® Fungal DNA (Omega Bio-tek, Doraville, Georgia), E.Z.N.A.® High Performance Fungal DNA (Omega Bio-tek) y DNeasy® Plant Mini kit (QIAGEN, Valencia, California). En todos los casos los materiales se colocaron en tubos de 1.5 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido; posteriormente se trituraron con un micropistilo hasta obtener un polvo fino.

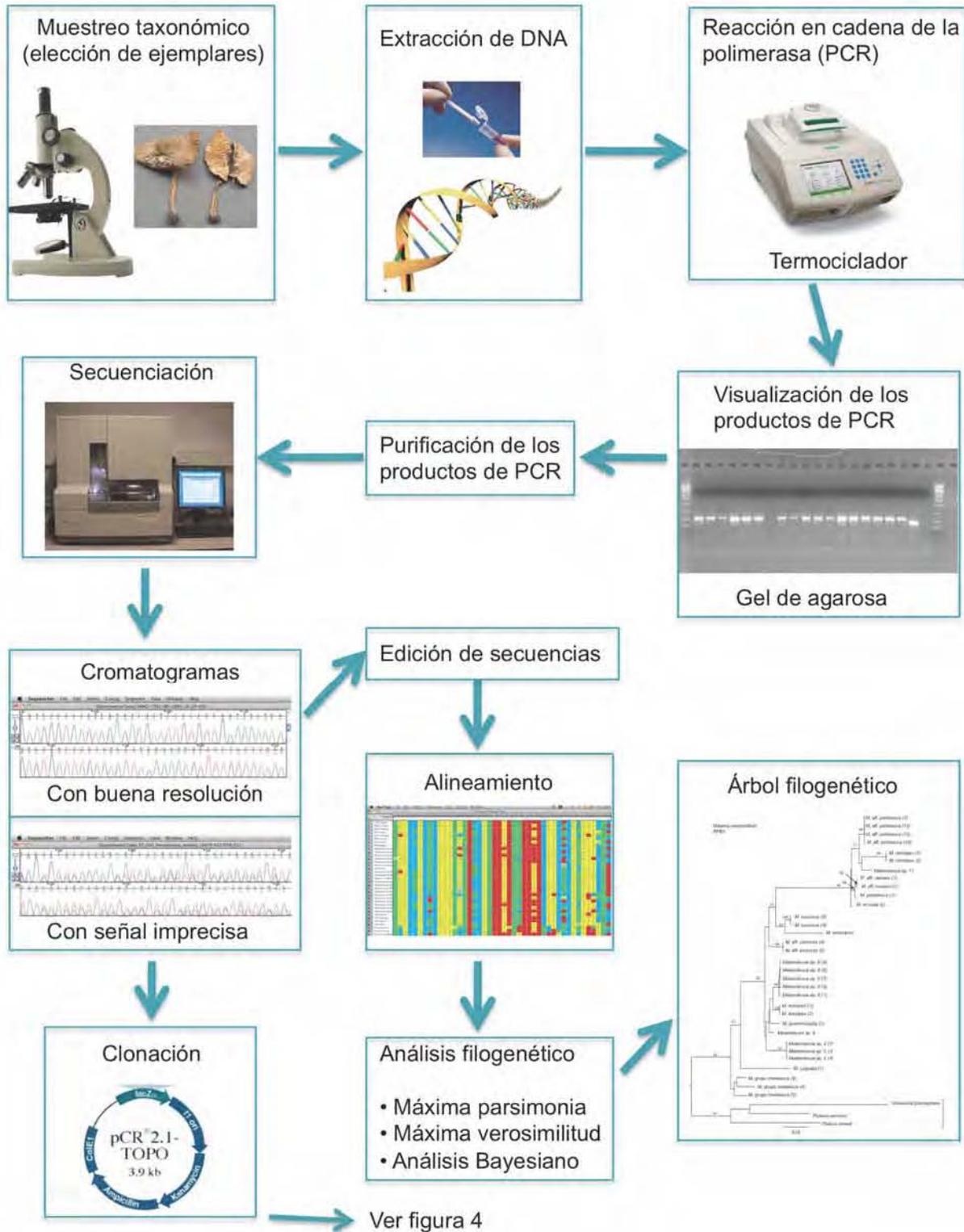


Fig. 2. Diagrama de la metodología que se llevó a cabo en este trabajo.

Método de CTAB (Gardes y Bruns, 1993)

- Se añadieron 300 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM (pH 8), NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, 2% CTAB, 0.2% β-mercaptoetanol).
- Se congelaron y descongelaron las muestras introduciéndolas en nitrógeno líquido y después en baño maría a 65°C (este paso se repitió dos veces).
- Se incubaron a 65°C durante toda la noche.
- Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló en vortex.
- Se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml.
- Se precipitó el DNA con un volumen de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.
- Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó lavó la pastilla con alcohol etílico al 70%.
- Por último se resuspendió el DNA en 50 µl de agua Milli Q.

E.Z.N.A.® Fungal DNA (Omega Bio-tek)

- Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para materiales herborizados con una ligera modificación en la cantidad de Buffer de elución, utilizando en total 150 µl.

E.Z.N.A.® HP Fungal DNA (Omega Bio-tek)

- Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para materiales herborizados con una pequeña modificación en la cantidad de Buffer de elución, utilizando 125 µl.

DNeasy® Plant kit (QIAGEN®)

- Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, modificando la cantidad de Buffer de elución a 50 µl.

A partir del DNA genómico se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 para la PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron tres regiones:

- Los espaciadores internos transcritos del DNA ribosomal (ITS).

- Una región de la subunidad grande del DNA ribosomal (nLSU).
- Una región de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB1).

Para la amplificación de los fragmentos deseados se utilizaron dos protocolos distintos, los cuales son descritos a continuación y referidos en el texto como protocolo 1 ó 2.

Protocolo 1: (50 µl de reacción)

- 5 µl de buffer de PCR 10X (BioTecMol, México)
- 5 µl de MgCl₂ (30mM)
- 5 µl de dNTP's (20mM)
- 5 µl de cada cebador (100µM)
- 0.2 µl de Amplificasa® Taq DNA polimerasa (5U/µl)

Protocolo 2: (25 µl de reacción)

- 5 µl de buffer de PCR 5X (Promega, Madison, Wisconsin)
- 0.5 µl de dNTP's (100mM)
- 1.25 µl de cada cebador (100µM)
- 0.125 µl de Amplificasa Taq DNA polimerasa (5U/µl)

Se utilizaron cuatro condiciones distintas de PCR para obtener los fragmentos deseados (Tabla 1).

Tabla 1. Programas de PCR que se utilizaron para la amplificación de las regiones estudiadas.

PROGRAMA	ITS-A	ITS-B	LSU	RPB1
Desnaturalización inicial	94°C /4 min	95°C /3 min	95°C /3 min	95°C /4 min
Número de ciclos	30 ciclos	34 ciclos	34 ciclos	34 ciclos
Desnaturalización	94°C /30 seg	95°C /1 min	95°C /1 min	95°C /1 min
Alineamiento	60°C /1 min	54°C /1 min	50°C /1 min	50°C /1 min
Extensión	72°C /2 min	72°C /1 min	72°C /90 seg	72°C /1 min
Extensión final	72°C /7 min	72°C /10 min	72°C /10 min	72°C /10 min
Termociclador	Perkin Elmer 480	Bio-Rad C1000	Bio-Rad C1000	Bio-Rad C1000

Amplificación de los ITS

Para obtener la región completa de los ITS se utilizaron los siguientes pares de cebadores: ITS1F-ITS4B e ITS1F-ITS4. En algunos casos no fue posible obtener todo el fragmento, por lo que se emplearon cebadores internos: ITS1F-ITS2 para el ITS1 e ITS3-ITS4B y 5.8SR-ITS4 para el ITS2 (Gardes y Bruns, 1993, White *et al.*, 1990, Vilgalys y Hester, 1990) (Fig. 3). Para estas regiones se utilizó el protocolo 1 y el programa de amplificación ITS-A; en algunos casos se empleó el protocolo 2 en combinación con el programa ITS-B (Tabla 1).

Amplificación de la región nLSU

Se usaron los pares de cebadores LR0R-LR16, LR0R-LR5 y LR0R-LR7 (Vilgalys y Hester, 1990; <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) (Fig. 3). Para la amplificación de este fragmento se siguió el protocolo 2 y el programa nLSU (Tabla 1).

Amplificación de la región RPB1

Para esta región se probaron los cebadores gRPB1 A-for (Stiller y Hall, 1997) y fRPB1 C-rev (Matheny *et al.*, 2002); sin embargo, la amplificación no fue exitosa, por lo que se diseñaron dos cebadores internos para *Melanoleuca*: Mint2F (5'-GGTTGCGTGGTCAAATGG-3') y Mex2R (5'-GGCATCACSGTCAGAATCATCC-3'), los cuales amplifican productos de aproximadamente 750pb, que incluyen una región del intrón 2 y la región completa del intrón 3 (Fig. 3), que se encuentran entre los dominios conservados A y C. Para amplificar este fragmento se utilizó el protocolo 2 y el programa RPB1.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE, teñidos con bromuro de etidio.

Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos obtenidos se purificaron con el *kit* QIAquick® (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante pero con una elución final de 25 µl. En algunos casos los productos se purificaron directamente del gel con el *kit* GeneClean® III (Q-BIOgene, Carlsbad, California).

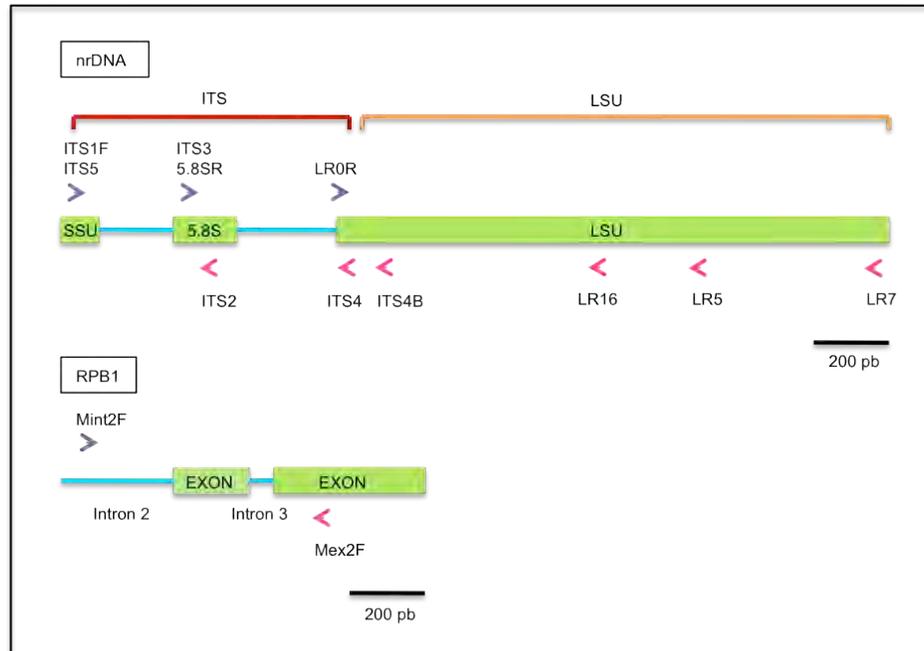


Fig. 3. Diagrama de las regiones amplificadas (ITS, nLSU y RPB1); las flechas indican los sitios de anclaje de los cebadores.

Clonación

Un pequeño porcentaje de las secuencias de ITS (5%) y RPB1 (3%) se clonaron, ya que se obtuvieron cromatogramas con una señal imprecisa. Para la clonación se utilizaron dos *kits*, CloneJET® PCR (Fermentas) y TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, California) (Fig. 4).

1. CloneJET® PCR (Fermentas)

Los productos de PCR purificados se ligaron a un plásmido pJET 1.2/Blunt, siguiendo el protocolo del fabricante. Para la transformaciones se tomaron 2.5 µl de la mezcla de ligación y se colocaron en hielo durante 2min, después se añadieron 50 µl de células de *Escherichia coli* competentes tratadas con cloruro de calcio y se dejaron en hielo durante 5 min. Las células transformadas se pusieron a crecer en un medio de cultivo selectivo LB preparado con 100 µg/ml de ampicilina, se incubaron toda la noche a 37°C, posteriormente se seleccionaron seis colonias para continuar con la extracción del plásmido por medio de lisis alcalina (Engebrecht *et al.*, 2001).

Una vez obtenido el plásmido se hizo una digestión con la enzima BglII, ya que el vector utilizado contiene dos sitios de corte para esta enzima, que liberan el inserto permitiendo conocer el tamaño del fragmento insertado. Los fragmentos fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE, con bromuro de etidio. Por último, se

seleccionaron los plásmidos que contenían insertos del tamaño esperado y fueron secuenciados con los cebadores pJET1.2-F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), y pJET1.2-R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3).

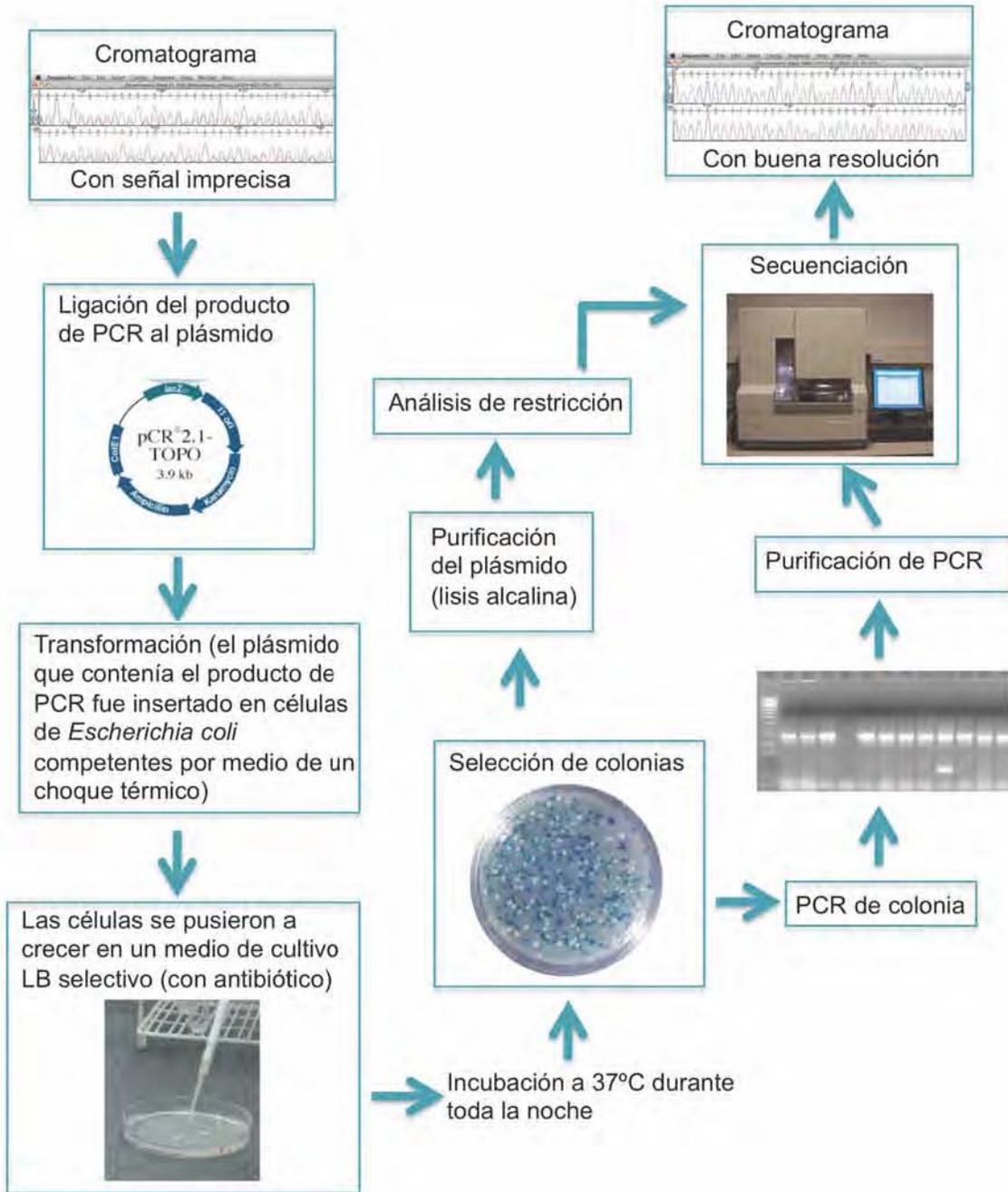


Fig. 4. Diagrama de la metodología que se siguió para la clonación de algunas de las muestras.

2. TOPO TA (*Invitrogen*)

Los productos de PCR purificados se ligaron a un plásmido pCR 2.1-TOPO, siguiendo el protocolo del fabricante, posteriormente se insertaron en células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot MX efficiency DH5a-T1); para esto se utilizaron 3 µl de la reacción de ligación, que se añadieron al vial de células competentes, el cual se colocó en hielo durante 5 min, a continuación se dio un choque térmico por 30 seg a 42°C, inmediatamente después se puso el tubo en hielo y se añadieron 250 µl de medio SOC; el tubo se incubó durante una hora a 37°C a 200 rpm. Después de la transformación, las células se pusieron a crecer en un medio de cultivo LB preparado con 50 µg/ml de kanamicina y 55 µl de 50 mg/ml de X-gal en dimetilformamida. Las células se incubaron toda la noche a 37°C, después se seleccionaron 10 colonias para llevar a cabo una PCR con los cebadores M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT GAA-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACCAT-3'), utilizando el programa ITS-B (Tabla 1). Por último se seleccionaron entre tres y cinco colonias que contenían fragmentos del tamaño esperado para secuenciar.

Secuenciación

Las reacciones de secuencia se prepararon en volúmenes de 10 µl que contenían de 0.5 a 1 µl de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California), 1 µl de primer (2 µM), 1.5 µl de DNA, 1.5 µl de Buffer 5X y de 5 a 5.5 µl de agua. Los cebadores utilizados fueron los mismos que se usaron para la amplificación.

La secuenciación se llevó a cabo en secuenciadores automáticos de capilar modelos ABI 3100 y ABI 3730 (Applied Biosystems).

Análisis filogenéticos

Para estudiar las relaciones evolutivas de *Melanoleuca* se construyeron árboles filogenéticos, que son representaciones gráficas que describen las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia de un grupo de secuencias u organismos, a partir de caracteres representativos compartidos entre las entidades biológicas (Page y Holmes, 1998).

Elección del grupo externo

En trabajos previos se propuso que *Melanoleuca* forma parte de un clado denominado Pluteoide, dentro del cual también se encuentran *Pluteus* Fr. y *Volvariella* Speg. (Moncalvo *et al.*, 2002; Matheny *et al.*, 2006; Garnica *et al.*, 2007). Con base en esta información se utilizaron cuatro especies del género *Pluteus* y una especie de *Volvariella* como grupo externo.

Alineamiento

Las secuencias se editaron y ensamblaron con Sequencher 4.9 (Gene Codes, Ann Arbor). Los alineamientos se llevaron a cabo en el programa MAFFT 6.717 (Kato y Toh, 2008); posteriormente se ajustaron manualmente en MacClade 4.08 (Maddison y Maddison, 2005). Para concatenar las secuencias de distintos genes en una sola matriz se utilizó el programa SeaView 4.2.3 (Gouy *et al.*, 2010).

La inferencia filogenética se efectuó bajo los criterios de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Se analizaron tres matrices: I) RPB1, II) ITS+nLSU, III) ITS+nLSU+RPB1.

Máxima parsimonia (MP)

El principio básico de este método es la búsqueda del árbol o árboles que minimicen la cantidad de cambios evolutivos para explicar los datos (Farris, 1972; Fitch, 1971; Kludge y Farris, 1969; Sober, 1988).

Se llevó a cabo en el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2000), empleando una búsqueda heurística con intercambio de ramas por medio de bisección y reconexión (TBR) y 1000 réplicas de adición de secuencias al azar. Todas las posiciones nucleotídicas fueron tratadas con el mismo peso y como no ordenadas; los *gaps* fueron considerados como caracteres faltantes. El soporte de los nodos se obtuvo calculando 100 pseudorréplicas de bootstrap no paramétrico (Felsenstein, 1985); cada pseudorréplica consistió en una búsqueda heurística con 10 réplicas de adición de secuencias al azar e intercambio de ramas por TBR. Se obtuvo un árbol consenso de mayoría del 50%. Los valores de bootstrap $\geq 70\%$ fueron considerados significativos (Hillis y Bull 1993).

Máxima verosimilitud (MV)

El concepto de verosimilitud (likelihood) se refiere a la probabilidad condicional de obtener los datos observados dada una hipótesis. Por lo tanto, el árbol que tenga la mayor probabilidad de producir las secuencias observadas dado un modelo evolutivo es el que se elige. El *log likelihood* de cada árbol es maximizado estimando la longitud de ramas, entre otros parámetros; este valor es el que se utiliza para comparar los diferentes árboles (Yang, 1996; Felsenstein, 2004).

Para este análisis se utilizó GARLI 1.0 (Zwickl, 2006), empleando los parámetros preestablecidos en el programa y aplicando el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se

ajustara a los datos, el cual fue seleccionado por medio de jModelTest (Posada, 2008), bajo el criterio de información Akaike (AIC; Akaike, 1973; Posada y Buckley, 2004). El análisis se corrió cinco veces para evitar el estancamiento de la búsqueda en un óptimo local. De los cinco árboles con mejor valor de verosimilitud se eligió el que tuviera el valor más alto optimizando los parámetros del modelo y la longitud de ramas en PAUP*. El análisis de bootstrap se llevó a cabo en GARLI con 100 réplicas y los mismos parámetros usados previamente, con excepción del número de búsquedas en la corrida que se limitó a uno para reducir el tiempo de búsqueda. El árbol consenso de mayoría del 50% se obtuvo con PAUP*, los valores de bootstrap $\geq 70\%$ fueron considerados significativos (Hillis y Bull, 1993).

Inferencia bayesiana (AB)

Este método se basa en el Teorema de Bayes, el cual relaciona la función de verosimilitud con las probabilidades anteriores y posteriores, calculando la probabilidad posterior a partir de la verosimilitud y la probabilidad anterior. Predice cuál es la probabilidad de que el modelo sea correcto dados los datos observados. Las probabilidades posteriores se obtienen explorando el espacio de árboles mediante rutas azarosas modeladas por las Cadenas Markovianas de Monte Carlo (MCMC; Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Huelsenbeck *et al.*, 2002; Felsenstein, 2004).

Partición de los datos

Al usar genes distintos, se puede asumir que éstos evolucionan a diferentes tasas. Considerando que en este trabajo se incluyeron tres regiones distintas y una de ellas es una región de un gen codificante para una proteína que contiene intrones y exones, las matrices fueron divididas en varias particiones. Una partición es la división de los caracteres moleculares en subgrupos; la separación de los caracteres puede ser por genes, posición de codones y regiones codificantes o no codificantes.

El objetivo de las particiones es poder incluir en un mismo análisis todos los datos provenientes de los distintos genes asignando a cada una de las regiones los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica correspondientes, esto es, analizar todos los datos juntos sin dejar a un lado la heterogeneidad entre regiones.

Se analizaron diferentes combinaciones de particiones para después elegir la estrategia de partición más adecuada (Tabla 2). Para estos análisis se escogió el modelo evolutivo adecuado para cada una de las particiones por medio de jModelTest (Posada, 2008), bajo el criterio de información Akaike (AIC; Akaike, 1973; Posada y Buckley, 2004).

Tabla 2. Estrategias de partición analizadas en MrBayes (pos. se refiere a la posición de los codones).

Matriz	Estrategia de partición
I. RPB1	
P1	Sin partición
P2	Intrón, exón (completo)
P3	Intrón, exón (1ª y 2ª pos.), exón (3ª pos.)
P4	Intrón, exón (1ª pos.), exón (2ª pos.), exón (3ª pos.)
II. ITS+nLSU	
P1	Sin partición
P2	nLSU, ITS (región completa)
P3	nLSU, ITS 1 y 2, región 5.8s
III. ITS+nLSU+RPB1	
P1	Sin partición
P2	nLSU, ITS (región completa), RPB1 (completo)
P3	nLSU, ITS 1 y 2, región 5.8s, RPB1 (completo)
P4	nLSU, ITS (región completa), intrón, exón (completo)
P5	nLSU, ITS (región completa), intrón, exón (1ª y 2ª pos.), exón (3ª pos.)
P6	nLSU, ITS (región completa), intrón, exón (1ª pos.), exón (2ª pos.), exón (3ª pos.)
P7	nLSU, ITS 1 y 2, región 5.8s, intrón, exón (completo)
P8	nLSU, ITS 1 y 2, región 5.8s, intrón, exón (1ª y 2ª pos.) , exón (3ª pos.)
P9	nLSU, ITS 1 y 2, región 5.8s, intrón, exón (1ª pos.), exón (2ª pos.), exón (3ª pos.)

Análisis Bayesianos

Se llevaron a cabo en el programa MrBayes 3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). En cada análisis se efectuaron dos corridas simultáneas, con cuatro cadenas de Markov (MCMC), 10 millones de generaciones, se salvó un árbol cada 1000 generaciones, se especificó el modelo evolutivo correspondiente a cada una de las particiones, permitiendo parámetros heterogéneos entre ellas. Es importante mencionar que algunos de los modelos incluidos en jModelTest no están implementados en MrBayes, en estos casos el modelo utilizado fue el siguiente más complejo al modelo elegido por jModelTest. Esta decisión se basó en que la inferencia Bayesiana es relativamente robusta incluso en presencia de una leve sobre-parametrización del modelo, por lo que en este contexto es menos importante encontrar el modelo más simple que represente los datos (Ronquist *et al.*, 2005).

Para evaluar el punto en que las cadenas alcanzaron la fase estacionaria y obtener una aproximación del número apropiado de generaciones para descartar en el *burn-in*, se utilizó el programa Tracer vs. 1.5 (Rambaut y Drummond, 2009). De los árboles restantes se obtuvo un árbol consenso de mayoría del 50%. Las frecuencias con que aparece cada clado en el conjunto de árboles se interpretó como la probabilidad posterior. Las probabilidades posteriores $\geq 95\%$ fueron consideradas significativas (Huelsenbeck *et al.*, 2002; Wilcox *et al.*, 2002).

Elección de la mejor estrategia de partición

En muchas ocasiones simplemente se elige la estrategia que incluya la mayor cantidad de particiones, ya que se sabe que esto conduce a una reducción del error sistemático, dando como resultado mejores valores de verosimilitud y probabilidades posteriores más precisas; sin embargo, al aumentar el número de particiones también disminuye la cantidad de datos en cada partición, lo que produce un incremento del error aleatorio debido al tamaño de muestra (Brandley *et al.*, 2005). Para conocer la estrategia de partición más adecuada se utilizó el factor Bayes (BF); este valor fue estimado a partir de las medias armónicas de los valores de verosimilitud muestreados durante la fase estacionaria de las MCMC (Newton y Raftery, 1994), que fue calculado en MrBayes al momento de resumir las muestras con el comando *sump*. Si la diferencia entre las medias armónicas multiplicada por dos ($2 * \log BF$) es mayor a 10 se considera como un valor con un soporte positivo para el modelo con la media armónica mayor (Kass y Raftery, 1995; Newton y Raftery, 1994; Raftery, 1996). Para esto también se consideró que las dos corridas convergieran; en el caso de que no hubiera dicha convergencia esa partición no se tomó en cuenta.

Reconstrucción de estados ancestrales

Considerando que la presencia y ausencia de cistidios, así como la forma que presentan son caracteres importantes para la delimitación de subgéneros y especies, se realizó una reconstrucción de estados ancestrales utilizando este carácter y codificándolo como se presenta a continuación: 0 = ausencia, 1 = presencia (urticoides), 2 = presencia (lageniformes o fusiformes). Esta reconstrucción se llevó a cabo en el programa Mesquite vs. 2.72 (Maddison y Maddison, 2009) utilizando el método de parsimonia (Maddison, 1995; Cunningham, 1999).

5. RESULTADOS

Los resultados se dividen en dos partes: la primera consta del análisis filogenético de las tres regiones que fueron secuenciadas, y la segunda se enfoca en las especies mexicanas, en donde se incluye una clave taxonómica y una descripción de los caracteres macro y micromorfológicos.

5.1. Reconstrucción filogenética

Se obtuvieron 150 secuencias de 83 ejemplares (82 secuencias de ITS; 36 de nLSU y 32 de RPB1) de especímenes recolectados principalmente en México, Estados Unidos de América y Suecia, entre otros (Tabla 3; Fig. 5); a éstas se añadieron 11 secuencias obtenidas de *GenBank* del NCBI, correspondientes a las siguientes especies: *Melanoleuca verrucipes* (Fr.) Singer, *Pluteus atromarginatus* (Konrad) Kühner, *P. cervinus* (Schaeff.) P. Kumm., *P. petasatus* (Fr.) Gillet, *P. romelli* (Britzelm.) Lapl. y *Volvariella gloiocephala* (DC.) Boekhout & Enderle (Tabla 4).

Alineamiento

El alineamiento de los ITS consistió en 83 taxa con 736 caracteres; algunas de las regiones presentaron alineamientos ambiguos por lo que fueron excluidas; después de la exclusión de estas regiones quedaron 645 caracteres.

El alineamiento de la región nLSU estuvo formado por 42 taxa con 1426 caracteres; en esta región no se excluyeron caracteres.

El alineamiento de RPB1 estuvo constituido por 792 caracteres de los cuales 343 pertenecen al intrón 2, 58 son del intrón 3 y 391 del exón. En el intrón 2 se encontró una zona con alineamiento ambiguo, por lo que se excluyó del análisis. Después de la exclusión de esta región el alineamiento de RPB1 estuvo formado por 778 caracteres.

Las secuencias fueron integradas en tres matrices:

- I. RPB1: Formada por 32 taxa del grupo interno y tres del grupo externo, con un total de 778 caracteres.
- II. ITS+nLSU: Constituida por 83 taxa del grupo interno y cinco del grupo externo, con un total de 2071 caracteres.
- III. ITS+nLSU+RPB1: Integrada por 89 taxa, de los cuales 84 pertenecen al grupo interno y cinco al grupo externo, con un total de 2849 caracteres.

Tabla 3. Ejemplares incluidos en el análisis filogenético (los datos completos de recolecta se encuentran en el Anexo 1).*Acrónimos de herbarios obtenidos a partir del Index Herbariorum (Thiers, <http://sweetgum.nybg.org/ih/>).

Nombre	Recolector/No. Recolecta	Herbario*	Lugar de recolecta	Número de nucleótidos obtenidos	
				ITS	nLSU RPB1
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>cavipes</i> [1]	Rodríguez García	FCME	Guerrero, México	625	895
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>cavipes</i> [2]	J Schöndube 89	IBUG	Jalisco, México	625	762
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>excissa</i> [1]	J Cifuentes 4157	FCME	Michoacán, México	629	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>excissa</i> [2]	L Guzmán-Dávalos 152	ENCB	Estado de México, México	629	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>excissa</i> [3]	J Cifuentes 3445	FCME	Tlaxcala, México	628	905
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>excissa</i> [4]	A Montoya-Esquivel 1282	TLXM	Tlaxcala, México	631	905
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>excissa</i> [5]	Hernández-Cuevas 2188	TLXM	Tlaxcala, México	630	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [1]	L Guzmán-Dávalos 269	ENCB	Estado de México, México	625	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [2]	L Guzmán-Dávalos 709	ENCB	Hidalgo, México	624	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [3]	G Guzmán 4246	ENCB	Distrito Federal, México	624	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [4]	Jones 123	ENCB	Estado de México, México	624	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [5]	Mitastein oct 28-1970	ENCB	Estado de México, México	624	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [6]	J Cifuentes 577	FCME	Michoacán, México	625	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [7]	Sánchez-Espinosa & JL Villarruel-Ordaz 698	FCME	Michoacán, México	624	768
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [8]	Juárez, Martínez & A Montañez 331	FCME	Michoacán, México	624	899
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [9]	Hernández-Muñoz 350	FCME	Tlaxcala, México	625	
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [10]	M Sánchez-García 32	FCME	Hidalgo, México	624	809
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [11]	Álvarez, Busto & A Montañez 369	FCME	Michoacán, México	622	911

<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [12]	L Pérez Ramírez 533	FCME	Hidalgo, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [13]	Bulnes & J Cifuentes 2695	FCME	Michoacán, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [14]	F Ramírez Guillén 392	XAL	Puebla, México	626
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [15]	D Murrieta 1025	XAL	Veracruz, México	624, 903, 740
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [16]	VL Márquez	FCME	Michoacán, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [17]	Ortega Lechuga 2	FCME	Estado de México, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [18]	Medina & García 1182	ENCB	Hidalgo, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [19]	G Guzmán 6326	ENCB	Hidalgo, México	624
<i>Melanoleuca</i> aff. <i>polioleuca</i> [20]	Cobos Meza & L Pérez Ramírez 1311	ENCB	Estado de México, México	624
<i>Melanoleuca alboflavida</i> [1]	A Stupka RHP24926	TENN	Carolina del Norte, EUA	622
<i>Melanoleuca alboflavida</i> [2]	LR Hesler LRH10725	TENN	Carolina del Norte, EUA	622
<i>Melanoleuca alboflavida</i> [3]	HS Jackson HSJ7433	TENN	Canadá	622
<i>Melanoleuca arcuata</i> [1]	M Moser 70343	TENN	Suiza	578, 669
<i>Melanoleuca arcuata</i> [2]	M Moser RHP29112	TENN	Austria	625, 595
<i>Melanoleuca arcuata</i> [3]	SA Gordon & RH Petersen TFB4307	TENN	Suiza	626, 916
<i>Melanoleuca brevipes</i> [1]	Litten RHP29182	TENN	Nueva York, EUA	629, 1418, 682
<i>Melanoleuca brevipes</i> [2]	L & A Stridvall LAS84/141-B	GB	Suecia	629, 914, 769
<i>Melanoleuca cinereifolia</i>	L & A Stridvall LAS 92/065	GB	Suecia	625
<i>Melanoleuca cognata</i> [1]	RH Petersen TFB4170	TENN	Escocia	645, 763
<i>Melanoleuca cognata</i> [2]	Montoya-Esquivel 1825	TLXM	Tlaxcala, México	645
<i>Melanoleuca cognata</i> [3]	L & A Stridvall LAS 84/146	GB	Suecia	645, 945
<i>Melanoleuca excissa</i> [1]	D Krüger 10190	TENN	Alemania	638, 903

<i>Melanoleuca excissa</i> [2]	L & A Stridvall LAS 00/221	GB	Suecia	638	900	759
<i>Melanoleuca excissa</i> [3]	L & A Stridvall LAS 97/019	GB	Suecia	638		762
<i>Melanoleuca grammopodia</i> [1]	L & A Stridvall LAS 00/130	GB	Suecia	649		661
<i>Melanoleuca grammopodia</i> [2]	M Moser 67/287	TENN	Polonia	649	900	
<i>Melanoleuca poliioleuca</i> [1]	L & A Stridvall LAS 77/532	GB	Suecia	620		
<i>Melanoleuca poliioleuca</i> [2]	L & A Stridvall LAS 85/292	GB	Suecia	620		
<i>Melanoleuca poliioleuca</i> [3]	L & A Stridvall LAS 01/183	GB	Suecia	620	911	758
<i>Melanoleuca</i> sp1 [1]	G Guzmán 19274	ENCB	Veracruz, México	612	895	
<i>Melanoleuca</i> sp1 [2]	G Guzmán 11494	ENCB	Querétaro, México	612	877	
<i>Melanoleuca</i> sp2 [1]	MR Sánchez-Jácome 966	IBUG	Jalisco, México	617	916	759
<i>Melanoleuca</i> sp2 [2]	O Vargas 265	IBUG	Jalisco, México	489		
<i>Melanoleuca</i> sp2 [3]	MG Buenrostro 36	IBUG	Jalisco, México	631		764
<i>Melanoleuca</i> sp2 [4]	G López Damián 50	IBUG	Jalisco, México	638	935	756
<i>Melanoleuca</i> sp3	G Luna	FCME	Guerrero, México	645	929	
<i>Melanoleuca</i> sp4 [1]	WA Murrill F19927	TENN	Florida, EUA	645		
<i>Melanoleuca</i> sp4 [2]	WA Murrill LRH16302	TENN	Florida, EUA	305		
<i>Melanoleuca</i> sp5	G Guzmán 7540	ENCB	Estado de México, México	614		
<i>Melanoleuca</i> sp6	RH Petersen TFB5597	TENN	Idaho, EUA	625	922	
<i>Melanoleuca</i> sp7 [1]	LR Hesler LRH20176	TENN	Tennessee, EUA	628		
<i>Melanoleuca</i> sp7 [2]	LR Hesler LRH21486	TENN	Tennessee, EUA	628		
<i>Melanoleuca</i> sp8 [1]	LR Hesler LRH26047	TENN	Tennessee, EUA	634	872	768
<i>Melanoleuca</i> sp8 [2]	A Zabriski RHP25590	TENN	Tennessee, EUA	634	917	
<i>Melanoleuca</i> sp8 [3]	LR Hesler RHP26268	TENN	Tennessee, EUA	633	906	

<i>Melanoleuca</i> sp8 [4]	C Lyles 32	TENN	Carolina del Sur, EUA	634	902	768
<i>Melanoleuca</i> sp8 [5]	LR Hesler LRH20806	TENN	Tennessee, EUA	634		
<i>Melanoleuca</i> sp8 [6]	E Badham EB113	TENN	Tennessee, EUA	634		722
<i>Melanoleuca</i> sp8 [7]	LR Hesler LRH20420	TENN	Tennessee, EUA	633		720
<i>Melanoleuca</i> sp8 [8]	AD Sime 9948	TENN	Tennessee, EUA	634		761
<i>Melanoleuca</i> sp9	L & A Stridvall LAS 85/142A	GB	Suecia	635		772
<i>Melanoleuca</i> sp10 [1]	LR Hesler LRH16740	TENN	Tennessee, EUA	646	925	
<i>Melanoleuca</i> sp10 [2]	Rogerson 4108	TENN	Utah, EUA	646	928	
<i>Melanoleuca</i> sp11	RH Petersen RHP8331	TENN	Argentina	626	1425	761
<i>Melanoleuca strictipes</i> [1]	L & A Stridvall LAS 99/005	GB	Suecia	622		754
<i>Melanoleuca strictipes</i> [2]	L & A Stridvall LAS 06/163	GB	Suecia	622	912	716
<i>Melanoleuca stridula</i> [1]	L & A Stridvall LAS 88/179	GB	Suecia	622		
<i>Melanoleuca stridula</i> [2]	L & A Stridvall LAS 07/009	GB	Suecia	622	936	
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [1]	RH Petersen TFB8206	TENN	Alaska, EUA	619	1381	
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [2]	A Montoya-Esquivel 1404	TLXM	Tlaxcala, México	625	942	
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [3]	F Ruan, González y A Montañez 320	FCME	Michoacán, México	627		604
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [4]	J Cifuentes 2005-292	FCME	Estado de México, México			760
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [5]	L & A Stridvall LAS 00/194	GB	Suecia	636	934	758
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [6]	RH Petersen TFB8241	TENN	Alaska, EUA	627	1416	
<i>Melanoleuca</i> grupo <i>melaleuca</i> [7]	RH Petersen TFB5599	TENN	Idaho, EUA	644	1418	

Tabla 4. Números de acceso de *GenBank* de las secuencias obtenidas a través de esta base de datos.

ESPECIES	ITS	nLSU	RPB1
<i>Melanoleuca verrucipes</i>	DQ490642	DQ447924	DQ457687
<i>Pluteus atromarginatus</i>		DQ094788	
<i>Pluteus cervinus</i>		DQ071729	DQ067955
<i>Pluteus petasatus</i>		AF042611	
<i>Pluteus romelli</i>		AY634279	AY862187
<i>Volvariella gloiocephala</i>		AY745710	DQ447945

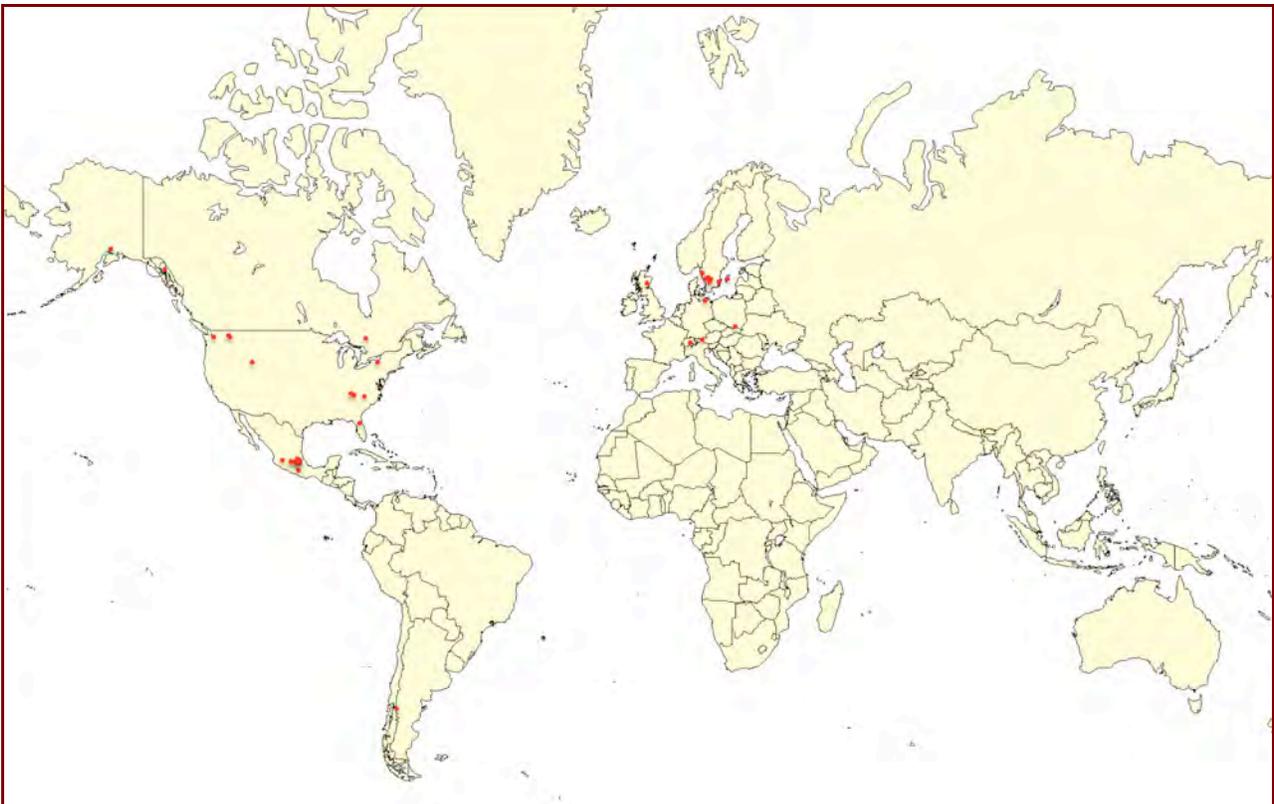
**Fig. 5.** Mapa de la distribución de las ejemplares incluidos en este estudio. Los puntos rojos indican los lugares donde fueron recolectados.

Tabla 5. Modelos de sustitución nucleotídica que se ajustan a cada una de las matrices y particiones.

	ITS+ nLSU	ITS+ nLSU+ RPB1	RPB1 Región completa	RPB1 INTRÓN	RPB1 EXÓN	RPB1 EXÓN 1ª pos.	RPB1 EXÓN 2ª pos.	RPB1 EXÓN 3ª pos.	RPB1 EXÓN 1ª y 2ª pos.	ITS Región completa	ITS 1 y 2	5.8s	nLSU
Número de sitios	2071	2849	778	387	391	131	130	130	261	645	487	158	1426
Modelo	TPM+I+G	TN+I+G	TN+I+G	TIM3ef+G	TNef+I+G	TIM1+G	TVM+G	TIM2+I+G	SYM+G	SYM	TIM3ef+G	JC	SYM+I+G
-L ln	6738.02	12222.73	5226.17	2333.23	2862.40	542.18	428.22	1751.56	967.12	3720.86	3212.38	240.53	3044.89
Frecuencias nucleotídicas													
A	0.2721	0.2751	0.2530	0.25	0.25	0.2597	0.4178	0.2041	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
C	0.1883	0.1917	0.2181	0.25	0.25	0.2463	0.2248	0.2633	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
G	0.2354	0.2530	0.2684	0.25	0.25	0.3440	0.1420	0.3131	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
T	0.3042	0.2802	0.2606	0.25	0.25	0.1500	0.2155	0.2196	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tasa de sustitución													
[A-C]	1.0000	1.0000	1.0000	0.6212	1.0000	1.0000	0.1614	2.1212	1.9188	0.9846	0.4154	-----	0.9265
[A-G]	5.5050	3.4910	4.0908	2.2749	5.5583	1.0733	11.2413	11.2782	3.1539	3.1725	2.2012	-----	6.6990
[A-T]	1.4396	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.7512	2.1212	0.1659	2.3639	1.0000	-----	2.5473
[C-G]	1.4396	1.0000	1.0000	0.6212	1.0000	0.0000	20.5043	1.0000	1.3400	0.5999	0.4154	-----	0.3304
[C-T]	5.5050	6.6192	7.5297	4.4316	9.8701	3.6304	11.2413	21.0032	5.1510	4.7114	2.9845	-----	14.2142
[G-T]	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	-----	1.0000
Variación entre sitios													
I	0.7010	0.5830	0.4050	-----	0.4700	-----	-----	0.0170	-----	-----	0.1620	-----	0.7830
G	0.5940	0.5110	0.9660	0.3340	1.2630	0.1630	0.1070	2.5400	0.1340	-----	0.5510	-----	0.7120

TN (Tamura y Nei, 1993); TIM (Posada, 2003); TVM (Posada, 2003); SYM (Zharikh, 1994); JC (Jukes y Cantor, 1969), TPM = K81 (Kimura, 1981); GTR (Tavaré, 1986)

I – proporción de sitios invariables, G – heterogeneidad de tasas de sustitución entre sitios, ef – frecuencias de bases iguales.

Análisis filogenético

A continuación se presenta una breve descripción de los árboles obtenidos a partir de cada matriz.

I. Inferencia filogenética de RPB1

Máxima parsimonia (MP)

Este análisis generó 161 árboles igualmente parsimoniosos ($L = 976$, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.5337, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.4663, RI = 0.8054, RC = 0.4572); 426 caracteres fueron constantes y 352 fueron variables, de los cuales 290 fueron parsimoniosamente informativos (Anexo 2).

Máxima verosimilitud (MV)

El modelo sugerido por jModelTest bajo el criterio AIC fue el TN+I+G (Tabla 5). El valor de verosimilitud del árbol obtenido después de optimizar los parámetros del modelo y el largo de ramas fue de $-\ln L = 5229.45785$ (Anexo 2).

Análisis Bayesiano (AB)

En la comparación de las diferentes estrategias de partición la que se encontró favorecida por medio del factor Bayes fue la P4, en la que se consideraron cuatro particiones (Tabla 2). Los modelos de sustitución nucleotídica que se ajustaron a cada una de las particiones se encuentran en la Tabla 5. A pesar de los diferentes parámetros estimados en las distintas estrategias, las topologías obtenidas no variaron; las diferencias se observaron en las probabilidades posteriores de algunos clados (Anexo 3).

Se descartaron tres millones de generaciones en el *burn-in*, que fue el tiempo en que ambas corridas alcanzaron la fase estacionaria. El árbol consenso de mayoría del 50% se obtuvo a partir de los últimos 7 000 árboles de cada corrida (Anexo 2).

Comparación de los tres métodos (MP, MV y AB)

Las topologías obtenidas con los tres criterios utilizados presentan sólo algunas pequeñas diferencias; por ejemplo *M. cognata* según el criterio de MP se agrupa con los taxa pertenecientes al grupo *M. melaleuca*, los cuales carecen de cistidios, mientras que en MV y AB se agrupan con los taxa con cistidios. Tomando en cuenta el valor de bootstrap en el análisis de MP se considera que no es una incongruencia significativa.

En los tres análisis (MP, MV, AB) se apoya fuertemente la monofilia del grupo interno (Fig. 6). Se separa un clado que contiene las especies con cistidios (clado A), que a su vez se divide en dos subclados (A1 y A2). El subclado A1 contiene especies con cistidios urticoides y fusiformes/lageniformes, dentro del cual se puede observar que las especies con cistidios fusiformes/lageniformes forman un grupo monofilético (B), que tiene como grupo hermano al clado que contiene a *M. verrucipes* y *M. excissa*. El clado A2 está formado por taxa que presentan únicamente cistidios urticoides, aunque el soporte de este clado no es significativo.

Con los métodos de MV y MP, los taxa que carecen de cistidios forman un grupo monofilético, pero con un soporte muy bajo, mientras que con el método de AB se encuentran como grupo no monofilético, por lo que se considera que las relaciones entre estos taxa no se resuelven con estos datos.

Fig. 6. Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano de RPB1. Los valores de probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas, seguidos de los valores de bootstrap ≥ 70 obtenidos del análisis de máxima verosimilitud. Los valores de bootstrap ≥ 70 del análisis de máxima parsimonia se indican debajo de las ramas. Los asteriscos (*) indican el país donde fueron recolectados los ejemplares (* Argentina, * Austria, * Escocia, * Estados Unidos de América, * México, * Suecia).

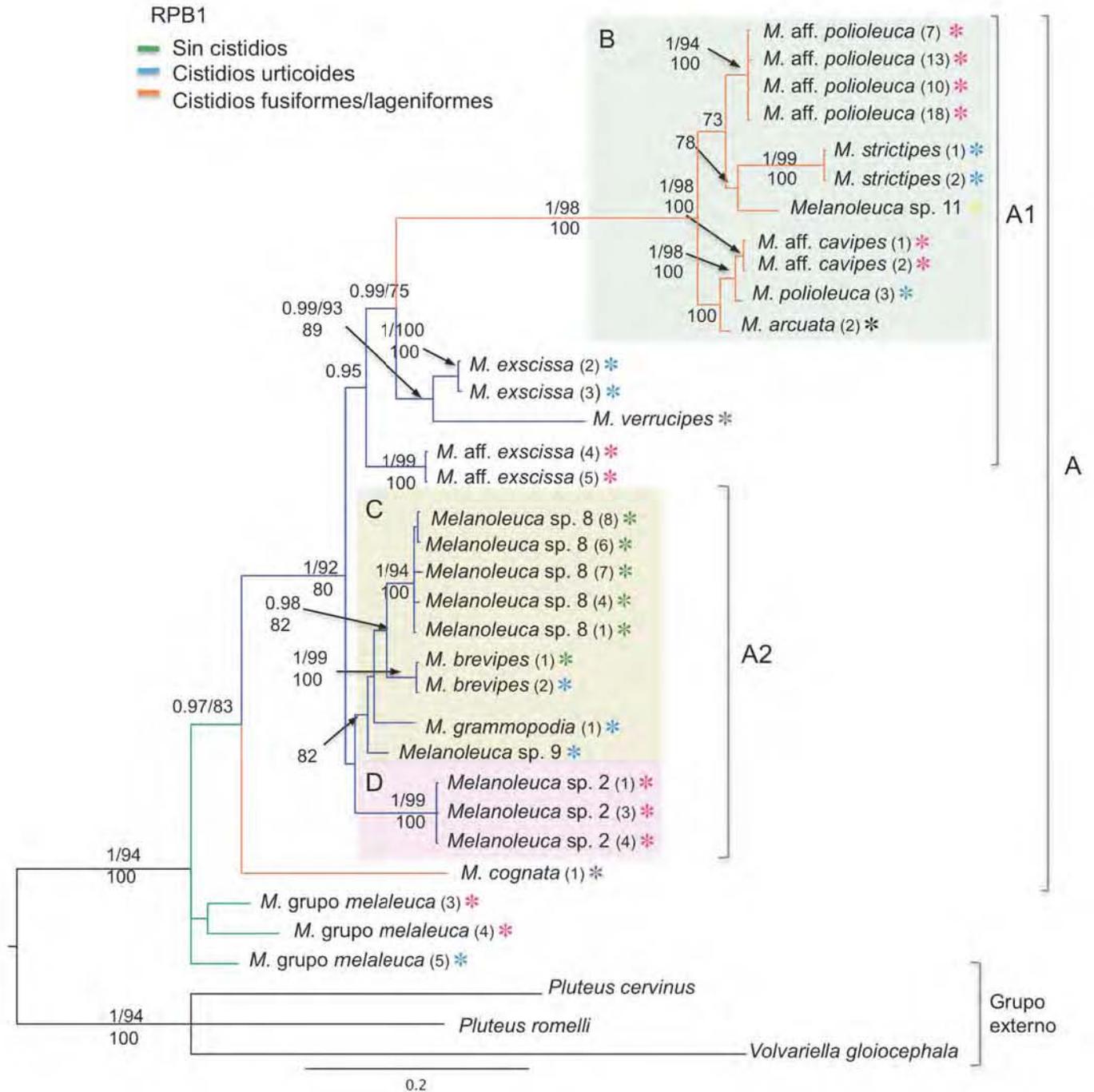


Fig. 6.

II. Inferencia filogenética de los genes ribosomales (ITS+nLSU)

Máxima parsimonia (MP)

En este análisis se produjeron 148 árboles igualmente parsimoniosos ($L = 721$, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.4875, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.4125, RI = 0.8753, RC = 0.5014); 1735 caracteres fueron constantes, 336 fueron variables, de los cuales sólo 222 fueron parsimoniosamente informativos (Anexo 2).

Máxima verosimilitud (MV)

El modelo sugerido por jModelTest bajo el criterio AIC fue el TPM1+I+G (Tabla 5). El valor de verosimilitud del árbol obtenido después de optimizar los parámetros del modelo y el largo de ramas fue de $-\ln L = 6714.05802$ (Anexo 2).

Análisis Bayesiano (AB)

En la comparación de las diferentes estrategias de partición, la que se encontró favorecida por medio del factor Bayes fue la P3, en la que se consideraron tres particiones (Tabla 2). Los modelos de sustitución nucleotídica que se ajustaron a cada una de las particiones se muestran en la Tabla 5. Entre los tres árboles obtenidos mediante las estrategias de partición las diferencias fueron pocas, como la posición de los clados *Melanoleuca* sp. 10 y *M. stridula*. En los tres casos se mantienen los taxa con cistidios lageniformes como un grupo monofilético y los taxa sin cistidios como clados basales (Anexo 3).

El *burn-in* fue de un millón de generaciones, que fue el tiempo en que las dos corridas alcanzaron la fase estacionaria. El árbol consenso de 50% mayoría se llevó a cabo con los últimos 9 000 árboles de cada corrida.

Comparación de los tres métodos (MP, MV y AB)

En los tres análisis (MP, MV y AB) se recupera el grupo interno como monofilético con soportes elevados (Fig. 7), también se observa un clado monofilético (B) conformado por los ejemplares que presentan cistidios fusiformes/lageniformes, que tienen como grupo hermano a un ejemplar que se caracteriza por tener un basidioma pequeño y por presentar queilocistidios urticoides apenas visibles. A pesar de que los árboles obtenidos por cada uno de los métodos muestran ciertas diferencias, éstas no se consideraron significativas, ya que los soportes no son elevados. La mayor parte de los nodos terminales se encuentran resueltos y con soportes altos; sin embargo, los nodos internos no cuentan con soportes significativos, por lo que las

relaciones entre los diferentes grupos de especies no se aclaran por completo. Uno de los aspectos que se encuentran más claros es la monofilia del clado B; también se observa en los árboles obtenidos por los tres métodos de análisis (Anexo 2) que las especies carentes de cistidios que pertenecen al grupo *M. melaleuca* son basales, así como *M. cognata*, una especie con cistidios lageniformes, y que las relaciones entre estas especies no se encuentran resueltas.

Fig. 7. Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano de los genes ribosomales (ITS+nLSU). Los valores de probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas, seguidos de los valores de bootstrap ≥ 70 obtenidos del análisis de máxima verosimilitud. Los valores de bootstrap ≥ 70 del análisis de máxima parsimonia se indican debajo de las ramas. Los asteriscos (*) indican el país donde fueron recolectados los ejemplares (* Alemania, * Argentina, * Austria, * Canadá, * Escocia, * Estados Unidos de América, * México, * Polonia, * Suecia. * Suiza).

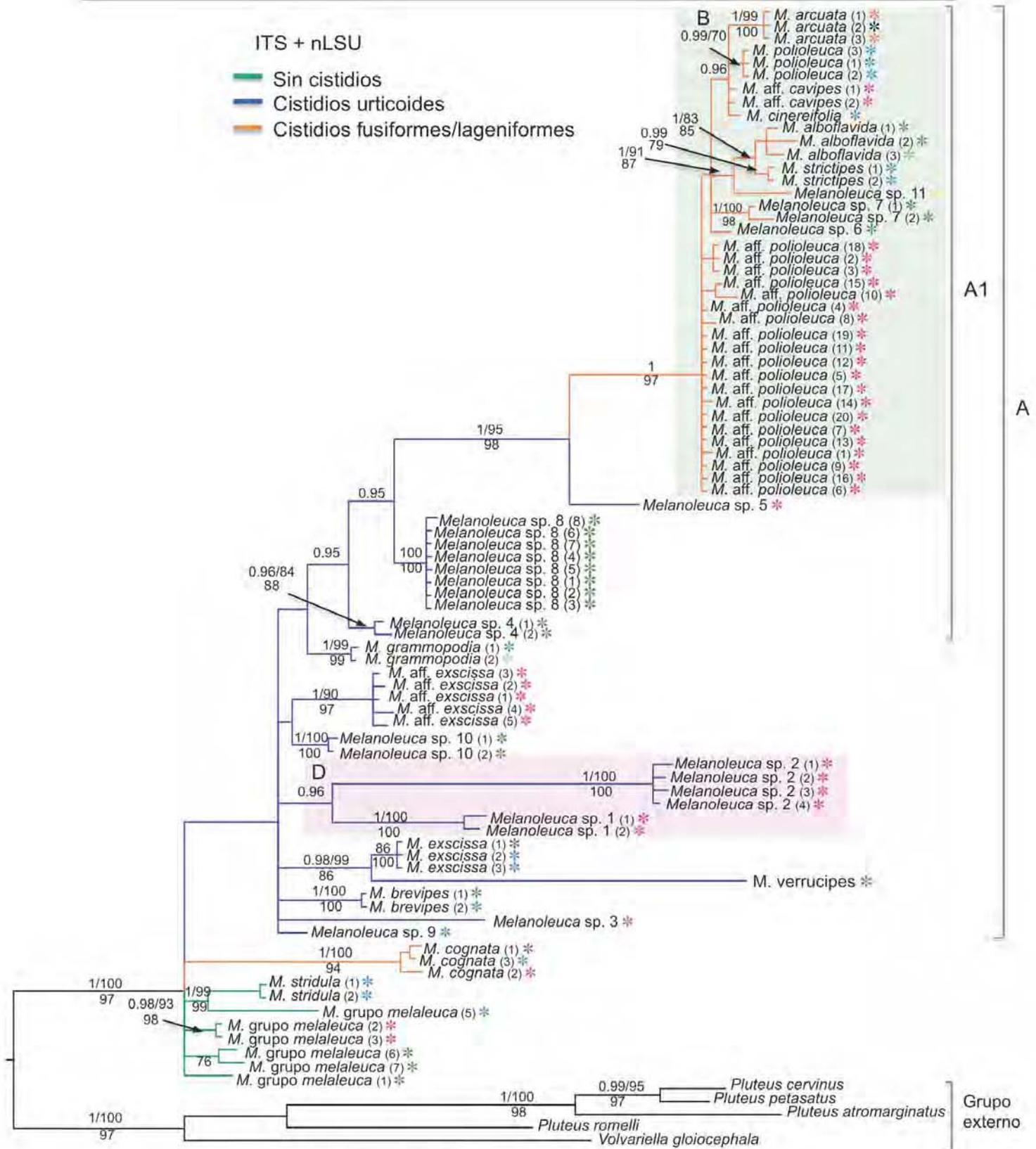


Fig. 7.

III. Inferencia filogenética de las tres regiones combinadas (ITS+nLSU+RPB1)

Máxima parsimonia

Este análisis generó 433 árboles igualmente parsimoniosos ($L = 1782$, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.4877, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.5123, RI = 0.8243, RC = 0.4473); 2161 caracteres fueron constantes, 688 fueron variables, de los cuales únicamente 512 fueron parsimoniosamente informativos (Anexo 2).

Máxima verosimilitud

El modelo sugerido por jModelTest bajo el criterio AIC fue el TN+I+G (Tabla 5). El valor de verosimilitud del árbol obtenido después de optimizar los parámetros del modelo y el largo de ramas fue de $-\ln L = 12200.32763$ (Anexo 2).

Análisis Bayesiano

En la comparación de las diferentes estrategias de partición, la que resultó favorecida por el factor Bayes fue la p9, en la que se consideraron siete particiones (Tabla 2); sin embargo, esta estrategia se descartó cuando se observó que después de 13 millones de generaciones las corridas no convergieron, lo que pudo deberse a la sobre-parametrización de los datos. Por lo que se consideró como mejor estrategia la P8, en la que se incluyeron seis particiones (Tabla 2) y fue la siguiente favorecida por el factor Bayes. Los modelos de sustitución nucleotídica que se ajustaron a cada una de las particiones se muestran en la Tabla 5. Las topologías obtenidas a partir de cada estrategia no tuvieron muchas variaciones entre ellas; únicamente se observaron unas pequeñas diferencias en los valores de las probabilidades posteriores (Anexo 3).

Se descartaron un millón de generaciones en el *burn-in*, que fue el tiempo en que ambas corridas alcanzaron la fase estacionaria. El árbol consenso de mayoría del 50% se obtuvo a partir de los últimos 9 000 árboles de cada corrida.

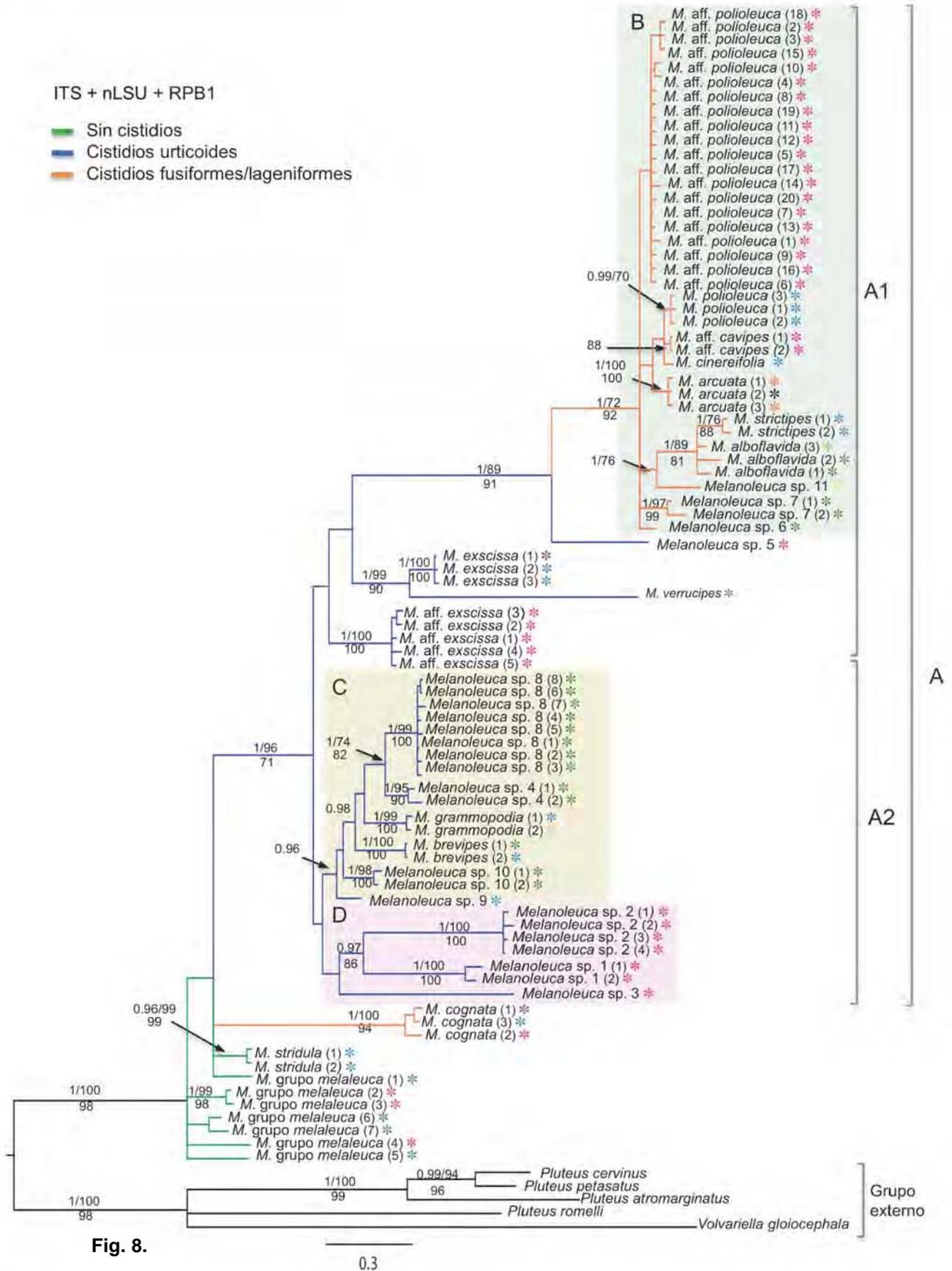
Comparación de los tres métodos (MP, MV y AB)

Los árboles obtenidos por los tres métodos (Anexo 2) apoyan la monofilia del grupo interno. En el árbol generado por MP se muestran pequeñas diferencias con respecto a los árboles generados por MV y AB, como la presencia de un tercer clado (basal) compuesto por especies carentes de cistidios, en el que además se incluye a *M. cognata*, mientras que en los árboles generados por MV y AB las relaciones entre estas taxa permanecen inciertas pero mantienen

una posición basal, como en el caso de MP; sin embargo, no son diferencias que se consideren significativas pues el soporte de este clado, así como el de otros que se encuentran en posiciones distintas, no están soportadas con valores de bootstrap o probabilidades posteriores significativos (Anexo 2).

El análisis de los tres genes concatenados muestra a las especies con cistidios (excepto *M. cognata*) como un grupo monofilético, que se divide en dos clados (A1 y A2), el primero integrado por especies con cistidios de los dos tipos y el segundo con cistidios urticoides. El clado A2 se separa en dos subclados (C y D); el primero conformado por especies de Estados Unidos de América y Europa y el segundo formado por especies exclusivamente mexicanas (Fig. 8). Las especies que carecen de cistidios se observan como clados basales no resueltos.

Fig. 8. Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido del análisis Bayesiano de las regiones ITS+nLSU+RPB1. Los valores de probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas, seguidos de los valores de bootstrap ≥ 70 obtenidos a partir del análisis de máxima verosimilitud. Los valores de bootstrap ≥ 70 del análisis de máxima parsimonia se indican debajo de las ramas. Los asteriscos (*) indican el país donde fueron recolectados los ejemplares (* Alemania, * Argentina, * Austria, * Canadá, * Escocia, * Estados Unidos de América, * México, * Polonia, * Suecia, * Suiza).



Reconstrucción de estados ancestrales

Se sugiere que el estado ancestral de *Melanoleuca* con respecto a los cistidios es su ausencia y por lo tanto la presencia de dichas estructuras es un carácter derivado, que se ha conservado en varios linajes. Los cistidios urticoides se presentaron una vez y después se originaron los cistidios fusiformes/lageniformes; en el caso de estos últimos pudo haber dos eventos independientes; uno que se presentó en *M. cognata*, una especie conocida por presentar cistidios prominentes y otro que se presentó en el subclado B, en el que se encuentran especies de distintas partes del mundo y que se caracterizan por presentar cistidios fusiformes/lageniformes (Fig. 9). Sin embargo se debe tener en cuenta que la posición de *M. cognata* como un grupo basal todavía es incierta, ya que no se encuentra apoyada con soportes significativos, por lo que no se puede decir con certeza que esta sea la forma en que evolucionaron los cistidios con respecto a este clado.

Este carácter parece tener mucho potencial taxonómico para la delimitación morfológica de las especies de *Melanoleuca* y aunque no se conoce con seguridad la función que desempeñan estas estructuras, se encuentran en una gran cantidad de grupos de Agaricales en los que también tienen importancia taxonómica (ej. *Pluteus*, *Inocybe*, *Crepidotus*, *Hohenbuehelia*, *Stropharia*, entre otros; Hesler y Smith, 1965; Singer 1978; Kuyper, 1986b; Thorn y Barron, 1986; Nishida, 1989; Noordeloos, 1999; Aime et al., 2005).

Fig. 9. Reconstrucción de estados ancestrales (cistidios: ausencia-presencia-forma), obtenido por el método de máxima verosimilitud, a partir del árbol consenso de mayoría del 50%, generado por medio del análisis Bayesiano.

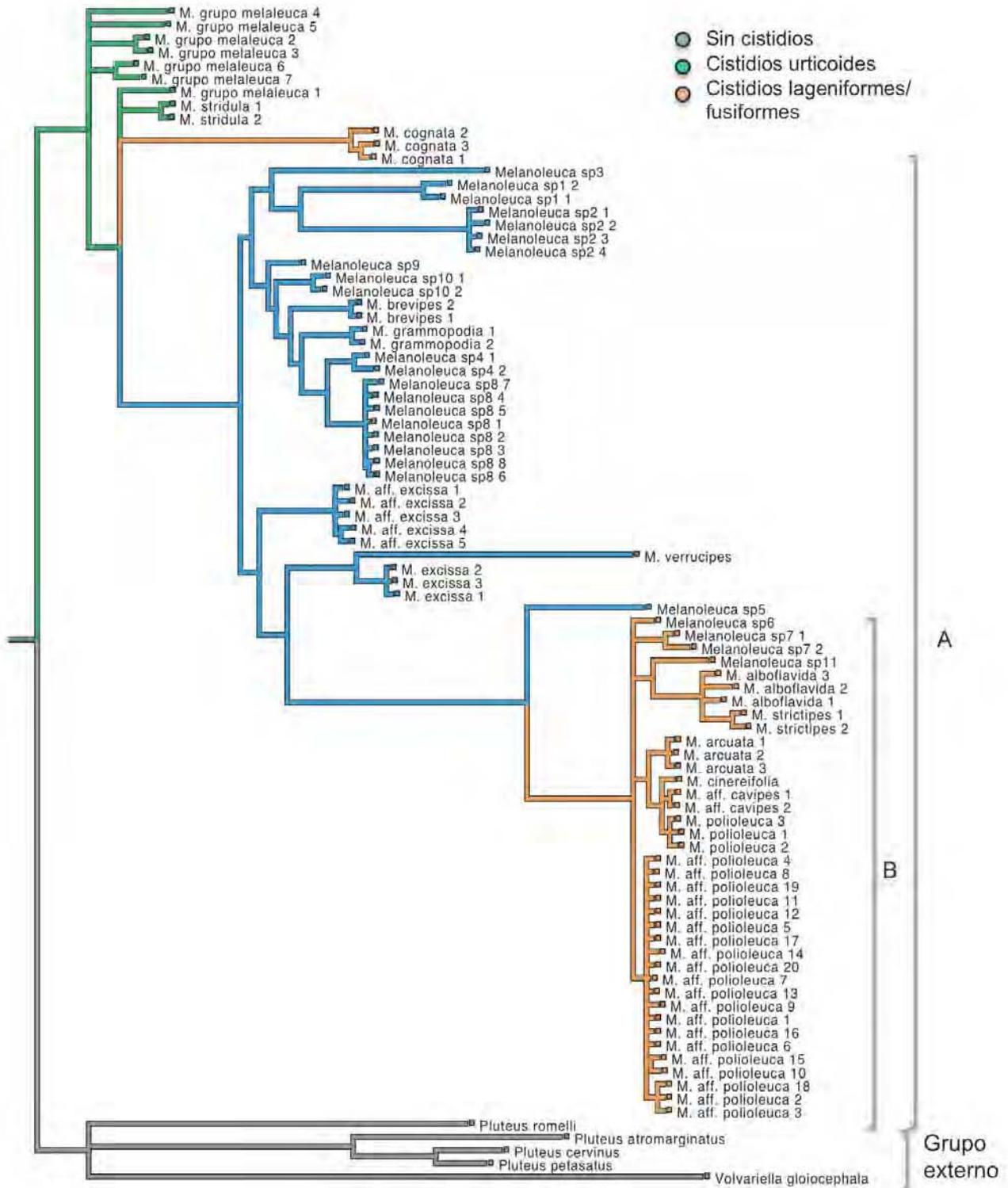


Fig. 9.

5.2. Contribución al conocimiento de *Melanoleuca* en México

A continuación se presenta la sección enfocada a las especies mexicanas de *Melanoleuca*.

Los ejemplares mexicanos incluidos en este estudio se distribuyen principalmente en el centro del país, en los estados de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, Michoacán, Tlaxcala y Veracruz (Fig. 10), en bosques de coníferas, bosques mesófilos de montaña y pastizales.

Se encontraron ocho especies, de las cuales siete parecen ser nuevas para la ciencia. La mayor parte de los taxa mexicanos, aunque presentan morfología similar a las especies europeas, son especies filogenéticamente distintas, lo cual demuestra que la mayoría de los nombres europeos utilizados antes de este trabajo para ejemplares mexicanos son inapropiados (Tabla 6), tal como ha ocurrido con otros Agaricales de América (Lim *et al.*, 2003; Vellinga *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007).

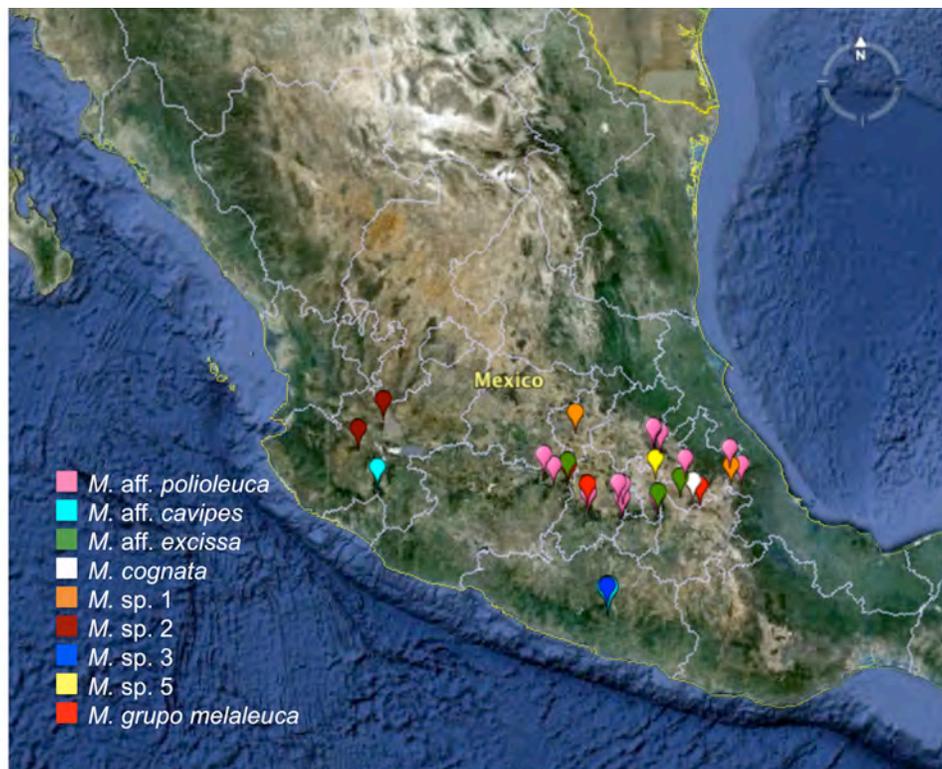


Fig. 10. Mapa de la distribución de los ejemplares mexicanos de *Melanoleuca*.

Tabla 6. Nombres utilizados para ejemplares mexicanos antes de este trabajo.

Nombres previos	Nombres actuales (provisionales)
<i>M. aff. cavipes</i>	<i>M. aff. cavipes</i>
<i>M. brevipes</i>	<i>Melanoleuca</i> sp. 2
<i>M. cognata</i>	<i>M. cognata</i>
<i>M. excissa</i>	<i>M. aff. excissa, Melanoleuca</i> sp. 2
<i>M. graminicola, M. melaleuca, M. vulgaris</i>	Grupo <i>M. melaleuca</i>
<i>M. grammopodia</i>	<i>Melanoleuca</i> sp. 3
<i>M. polioleuca</i> a veces mal determinado como <i>M. melaleuca</i>	<i>M. aff. polioleuca</i>
<i>M. strictipes</i>	No se obtuvieron secuencias
<i>M. yucatanensis</i>	No se obtuvieron secuencias

Clave para las especies de *Melanoleuca* que se distribuyen en México

- 1a. No presenta cistidios **Grupo *M. melaleuca***
- 1b. Presenta cistidios **2**
- 2a. Cistidios urticoides **3**
- 2b. Cistidios lageniformes o fusiformes **8**
- 3a. Queilocistidios presentes y pleurocistidios ausentes **4**
- 3b. Queilo- y pleurocistidios presentes, aunque los pleurocistidios son escasos* **6**
- 4a. Basidios monospóricos, bispóricos y tetraspóricos. Píleo de color café beige claro, liso, umbonado a ligeramente deprimido. Estípite central o excéntrico, liso a estriado.....
..... ***Melanoleuca* sp. 1**
- 4b. Basidios únicamente tetraspóricos **5**
- 5a. Píleo de aproximadamente 30 mm de diámetro, liso o color moreno gris. Láminas con bordes lisos o aserrados. En bosques de pinos ***Melanoleuca* sp. 5**
- 5b. Píleo de 50-80 mm de diámetro, convexo a plano convexo de color café-amarillento. Láminas con borde liso. En bosque mesófilo de montaña ***Melanoleuca* sp. 3**

- 6a.** En selva mediana subperennifolia. Píleo de 15 a 35 mm de diámetro, convexo a plano subcóncavo, glabro, seco, de color café-grisáceo. Estípite de 20-40 x 1-2 mm. Cistidios con un septo transversal medio..... ***M. yucatanensis***
- 6b.** En bosques de coníferas..... **7**
- 7a.** Píleo de 65 a 100 mm de diámetro. Cistidios generalmente con un septo transversal. En bosques de coníferas ***Melanoleuca* sp. 2**
- 7b.** Píleo de 12 a 55 mm de diámetro. Cistidios generalmente con un septo transversal. En bosques de coníferas ***M. aff. excissa***
- 8a.** Láminas con tonos rosáceos y se tornan más oscuras, hasta ocráceas en ejemplares maduros..... ***M. cognata***
- 8b.** Láminas blanquecinas..... **9**
- 9a.** Píleo de 35 a 50 mm de diámetro, plano-convexo a plano, de color gris claro. Cistidios fusiformes y lageniformes. Caulocistidios nunca con un septo transversal, distribuidos uniformemente. En bosque mesófilo de montaña ***M. aff. cavipes***
- 9b.** Píleo de 28 a 160 mm de diámetro, plano-convexo y en algunas ocasiones con un pequeño umbo, de color café oscuro a café claro. Cistidios en su mayoría fusiformes, algunos son lageniformes. Caulocistidios a veces con septo transversal y se encuentran formando pequeños grupos de 10 a 30 cistidios aproximadamente. En bosques de coníferas ***M. aff. polioleuca***

*Los pleurocistidios urticoides a veces son difíciles de observar, por lo que se recomienda realizar cortes muy delgados y hacer varias preparaciones, para saber con certeza si estas estructuras están o no presentes.

Descripción de las especies mexicanas de *Melanoleuca*

A continuación se presenta una breve descripción de cada una de las especies de *Melanoleuca* que se encuentran en México.

Melanoleuca* aff. *cavipes

Píleo de 35-50 mm de diámetro, de plano-convexo a plano, margen recto, de color café-grisáceo (5C3), aclarándose hacia el margen, superficie lisa y húmeda. **Láminas** sinuadas, muy juntas, anchas, blancas, borde liso. **Estípite** 40 x 3 mm, cilíndrico, sólido, de color café-grisáceo (5C3), más claro hacia el ápice, con estrías longitudinales, carnosos-fibrosos. **Contexto** de color café grisáceo, cambia a color café-chocolate al maltratarse. En bosque mesófilo de montaña.

Esporas de 7-8 x 4-5 μm , $Q = 1.4-2$, elipsoides a oblongas, con ornamentaciones en forma de verrugas aisladas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (20.6-)23-31(-33) x 8(-10) μm , tetraspóricos clavados. **Queilocistidios** de (41-)49-64(-59.1) x (8-)10-13(-12.8) μm , fusiformes y lageniformes, con cristales en el ápice. **Pleurocistidios** similares a los queilocistidios.

Melanoleuca* aff. *excissa

Píleo de 12 a 55 mm de diámetro, convexo a plano-convexo, ligeramente deprimido en el centro, margen incurvado, de color café-amarillento a café oscuro (5E5, 5E4), superficie lisa y seca. **Láminas** adheridas a decurrentes, juntas a muy juntas, blanquecinas (4A2, 4B3), borde liso. **Estípite** de 30-60 x 3-7 mm, cilíndrico con base ligeramente clavada, sólido, de color café-amarillento, cubierto de estrías longitudinales muy finas, fibroso. **Contexto** concolor a la superficie del píleo, pero en el centro es blanco. **Olor** agradable, aromático. **Sabor** a hierba. En bosques de *Quercus* y *Abies-Juniperus*

Esporas de 7-9 x 4-5 μm , $Q = 1.4-1.8$, elipsoides, con ornamentaciones en forma de verrugas, amiloides, hialinas. **Basidios** de 20.6-36 x 7.7-10 μm , tetraspóricos clavados. **Queilocistidios** de (38.5-)41-56.5 x 7.7-10 μm , urticoides, algunos con un septo transversal. **Pleurocistidios** similares a los queilocistidios pero muy escasos y en ocasiones no se observan fácilmente.

Melanoleuca* aff. *polioleuca

Píleo de 28-160 mm, plano-convexo a plano, en algunas ocasiones umbonado, margen decurvado, en el centro de color café (5D5, 5E5, 5F5-8, 6E6, 5F4-6) aclarándose hacia el

margen a color café-rojizo a amarillo (4C5, 5C3-5, 5D3-7, 5E4-6, 6D4), superficie lisa, húmeda, glabra, higrófana o no. **Láminas** libres, sinuadas, uncinadas, subadheridas a adheridas, juntas a muy juntas, blancas a amarillentas (1-4A2). **Estípites** 40-170 x 4-12(-18) mm, cilíndrico, generalmente ensanchándose un poco hacia la base, sólido, blanco a amarillo pálido (4A2-B4, 5D4-E4), con fibrillas longitudinales de color amarillo oscuro a café (4C4, 5C2-3, 5D4-E4), carnoso-fibroso. **Contexto** blanco, color café beige, o anaranjado-grisáceo (4A2, 5C2, 6B3). **Olor** dulce, inapreciable y a veces agradable. **Sabor** farináceo, amargo, a veces inapreciable. En bosques de *Abies*, *Abies-Pinus*, *Pinus-Quercus* y *Abies-Juniperus*.

Esporas de 6-9(-10) x 4-5(-6) μ m, Q = (1.2-)1.4-1.8 (-2), elipsoides a oblongas, con ornamentaciones en forma verrugas aisladas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (18-)21-31(-39) x (5-)8(-10) μ m, tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de (26-)51-77(-90) x 8-18(-21) μ m, fusiformes y algunos lageniformes, en general presentan cristales en el ápice. **Pleurocistidios** similares a los queilocistidios.

Melanoleuca cognata (Fr.) Konrad & Maubl.

Píleo de 42-56 mm de diámetro, plano convexo con un pequeño umbo en el centro, color amarillo mostaza (4B5), superficie higrófana y lisa. **Láminas** sinuadas, subadheridas o libres, juntas, blanquecinas con tonos rosáceos, se oscurecen en ejemplares maduros. **Estípites** de 50-160 x 5-14 mm, cilíndrico, sólido, de color blanco a amarillo champagne (4B4), con estrías longitudinales de color amarillo rubio (4C4), fibroso-carnoso. **Contexto** blanquecino a amarillo champagne (4A2, 4B4). **Olor** dulce. **Sabor** insípido a agradable. En bosques de *Pinus-Quercus*.

Esporas de 7-9 x 4-5 μ m, Q = 1.4-1.6(-2), elipsoides a oblongas, generalmente oblongas, con ornamentaciones en forma de verrugas, amiloides, hialinas. **Basidios** de 20.5-30 (-33.5) x 7.5 (-10) μ m, tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de 51.5-64(-77.5) x 10-13(-20) μ m, lageniformes, algunos fusiformes con cristales en el ápice. **Pleurocistidios** similares a los queilocistidios.

***Melanoleuca* sp. 1**

Píleo de 10 a 50 mm de diámetro, plano, umbonado a ligeramente deprimido, de color gris-café claro, superficie lisa y seca. **Láminas** sinuadas, juntas, blanquecinas. **Estípites** central o

excéntrico, uniforme y en algunos casos más ancho hacia el ápice, sólido, liso a estriado, blanquecino o concolor con el píleo, carnoso-esponjoso. **Contexto** blanquecino. **Olor** fúngico, más o menos agradable. Gregario en pastizal a la orilla de un camino.

Esporas de 8-10 x 5-6 μm , $Q = 1.3-1.8$, elipsoides a oblongas, con ornamentaciones en forma de verrugas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (28-)33.5-43.7 x 7.7-10 μm , tetraspóricos, aunque también se observan mono y bispóricos, clavados. **Queilocistidios** urticoides, muy difíciles de observar. **Pleurocistidios** ausentes.

***Melanoleuca* sp. 2**

Píleo de 65 a 10 mm de diámetro, plano-convexo a plano, margen ondulado, de color amarillo-café claro, en algunas áreas con tonos más oscuros, superficie higrófana y lisa,. **Láminas** subadheridas, algunas decurrentes, juntas, blanquecinas. **Estípite** central, clavado, sólido, liso, concolor al píleo, fibroso. **Olor** fúngico. Gregario en bosques de *Pinus-Quercus*.

Esporas de (6-)7-8 x 5(-6) μm , $Q = 1.3-1.6$, elipsoides, con ornamentaciones en forma de verrugas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (23-)25.7-30.8(33.4) x 7.7 μm , tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de (33.4-)36-43.6(-49) x (5-)7.7 μm , urticoides con un septo transversal y cristales en el ápice. **Pleurocistidios** escasos, difíciles de observar, similares a los queilocistidios.

***Melanoleuca* sp. 3**

Píleo de 50-82 mm de diámetro, convexo con un pequeño umbo a plano-convexo, color anaranjado-café (5C3) a café oscuro (6F7, 6E6), superficie radialmente fibrilosa. **Láminas** sinuadas, juntas, blanquecinas (4A2). **Estípite** de 70-105 x 4-9 mm, cilíndrico a clavado, sólido, color anaranjado-café (6C4), estriado longitudinalmente, fibroso-carnoso. **Contexto** blanquecino (4A2). **Olor** inapreciable. **Sabor** desagradable, amargo. En bosque mesófilo de montaña.

Esporas de 7-9 x 4-5 μm , $Q = 1.4- 1.8 (-2.2)$, elipsoides a oblongas, por lo general oblongas con ornamentaciones en forma de verrugas aisladas, algunas son alargadas y otras redondas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (28-)33.5-39(-41) x 7.5-10.5 μm , tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de 51-69 x 8-10 μm , urticoides, con cristales en el ápice. **Pleurocistidios** ausentes.

***Melanoleuca* sp. 5**

Píleo liso, de color moreno gris, superficie lisa. **Láminas** sinuadas, juntas, blancas. **Estípite** cilíndrico, algo bulboso, concolor al píleo. En bosque de *Pinus*.

Esporas de (6-)7-8 x 4-5 μ m, Q = (1.2-)1.4-1.75, amiloides, ornamentadas, elipsoides a oblongas. **Basidios** de 28-37.5 x 7.7-10 μ m, tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de 48-51 x 3-4 μ m, urticoides, algunos con un septo transversal, muy difíciles de observar. **Pleurocistidios** no observados.

***Melanoleuca yucatanensis* Guzmán & Bon**

Píleo de 15-35 mm de diámetro, convexo a un poco plano o subcóncavo, de color café grisáceo, superficie seca y glabra. **Láminas** subadnadas, juntas, blancas o blanquecinas a amarillentas. **Estípite** de 20-40 x 1-2 mm, blanco a blanquecino, glabro. **Contexto** blanquecino. **Olor** inapreciable. En bosque tropical subperennifolio.

Esporas de (5.2-)6-7 x 4.5-6(-6.7) μ m, globosas o subelipsoides, con ornamentaciones en forma de verrugas, amiloides, hialinas. **Basidios** de 16.5-28.5 x 9-10.5 μ m, tetraspóricos, clavados. **Queilocistidios** de 31.5-55.5 x 4.5-9 μ m, urticoides, con un septo transversal en medio y cristales en el ápice. **Pleurocistidios** similares a los queilocistidios pero sin cristales en el ápice.

Grupo *M. melaleuca*

Píleo de 28-56 mm, plano-convexo a plano, ligeramente umbonado, centro color café oscuro (6F4-6, 5E4-5) a café claro (5D4) y en el margen café claro (5D4-6) a café oscuro (6E4), margen levantado, superficie lisa, seca o húmeda, en algunos casos es higrófana. **Láminas** adheridas o emarginadas, de juntas a muy juntas, blanquecinas a marfil (4A2, 4B3). **Estípite** de 28-93 x 3-7 mm, cilíndrico, algunas veces ensanchado hacia la base, blanquecino (4A2) a color café claro (5B3, 5D4), con estrías longitudinales de color café (6E4), carnoso-fibroso. **Contexto** blanco. **Olor** inapreciable a agradable dulce. **Sabor** en ocasiones fúngico. En bosques de *Abies-Juniperus* o *Abies-Pinus*.

Esporas de 6-8(-9) x 4-6 μ m, Q = 1.2-1.4(-1.8), elipsoides con ornamentaciones en forma de verrugas aisladas, amiloides, hialinas. **Basidios** de (20-)30-39 x 8-10 μ m, tetraspóricos, clavados. **Cistidios** ausentes.

Nota: se considera el concepto de *M. melaleuca sensu* Kühner (1978).

6. DISCUSIÓN

Monofilia de *Melanoleuca*

En todos los análisis se recupera el género *Melanoleuca* como monofilético, con soportes muy altos. Por otro lado, la inclusión de este grupo dentro del clado Pluteoide y la relación con el género *Pluteus* se confirma, tal como se había planteado en trabajos anteriores (Moncalvo *et al.*, 2002; Matheny *et al.*, 2006; Garnica *et al.*, 2007), en los que tanto la monofilia como la posición filogenética dentro de los Agaricales no se encontraba clara. A pesar de que *Melanoleuca* se agrupaba con *Pluteus* y *Volvariella*, el soporte no era muy alto, lo que pudo deberse al tamaño de la muestra, ya que al ser trabajos donde se incluye una gran cantidad de grupos de Agaricales, los representantes de cada uno de los géneros son pocos.

Tradicionalmente *Melanoleuca* se ubicaba dentro de la familia Tricholomataceae, por caracteres como el color de la esporada, hábito y tipo de esporas (Arora, 1986; Singer, 1986; Breitenbach y Kränzlin, 1991; Watling y Turnbull, 1998); actualmente se sabe que esta familia es polifilética (Moncalvo *et al.*, 2000; 2002; Matheny *et al.*, 2006; Garnica *et al.*, 2007); teniendo representantes de varios clados, entre ellos el clado Pluteoide en el que se encuentran géneros que al igual que *Melanoleuca* son saprótrofos y tienen especies que presentan cistidios.

Relaciones filogenéticas dentro de *Melanoleuca*

El análisis obtenido a partir de la combinación de los tres genes estudiados muestra un clado fuertemente apoyado, que contiene a la mayoría de las especies con cistidios (clado A). Éste se divide en dos clados (A1 y A2). El clado A1 está conformado por la mayor parte de las especies con cistidios fusiformes/lageniformes y algunas especies con cistidios urticoides. Dentro de este clado se observa un subclado compuesto por *M. aff. polioleuca*, otro integrado por *M. polioleuca*, *M. arcuata*, *M. cinereifolia* y *M. aff. cavipes*. Estas dos últimas se encontraron agrupadas en algunos árboles dentro de un solo clado (Anexo 2); sin embargo, las diferencias en la forma de los cistidios y el tipo de vegetación en que se encuentran no sugiere conespecificidad de estos taxa. *Melanoleuca cinereifolia* es una especie que se distribuye en dunas costeras entre la planta perenne *Ammophila arenaria*, mientras que *M. aff. cavipes* se encuentra en bosques mesófilos de montaña. El siguiente subclado incluye a *M. strictipes* y *M. alboflavida*, taxa característicos por el color blanquecino del basidioma y los cistidios fusiformes casi subcilíndricos. Como grupo hermano de este clado se encuentra un ejemplar de Argentina que presenta cistidios fusiformes/lageniformes prominentes. En el clado B también se observan otros dos taxa denominados *Melanoleuca* sp. 6 y *Melanoleuca* sp. 7, los cuales se distribuyen

en Estados Unidos de América y como el resto de los taxa presentan cistidios fusiformes/lageniformes fácilmente visibles. Como grupo hermano se encuentra *Melanoleuca* sp. 5, un taxón de México que presenta queilocistidios urticoides apenas visibles.

Melanoleuca excissa y *M. verrucipes* parecen estar fuertemente relacionadas; ambas presentan cistidios urticoides, en algunos casos septados. *Melanoleuca excissa* tiene un basidioma de color café y *M. verrucipes* tiene un basidioma blanquecino y presenta proyecciones en el estípite que parecen verrugas de color café. Esta última es fácilmente reconocible y hasta hace algunos años sólo se conocía su distribución en Europa; sin embargo, recientemente se encontró en el oeste de Estados Unidos de América (Matheny y Vellinga, 2009). Cercano a este grupo se encuentra *M. aff. excissa*, un clado compuesto por ejemplares mexicanos que presentan características morfológicas similares a *M. excissa*.

En el clado A2, se encuentran únicamente taxa con cistidios urticoides y se divide en dos subclados (C y D), el primero compuesto por ejemplares de Estados Unidos de América y Europa, y el segundo integrado por taxa exclusivamente mexicanos, que corresponden a especies no descritas. Finalmente, en la parte basal se encuentran los taxa carentes de cistidios y *M. cognata* que es una especie con cistidios lageniformes. En el caso de los taxa sin cistidios se consideraron parte del grupo *M. melaleuca*, tomando en cuenta el concepto propuesto por Kühner (1978), en el que consideró que esta especie no presenta cistidios.

En cuanto al tipo de cistidios por su posición (queilo- y pleurocistidios) no parecen tener señal filogenética pues en los grandes grupos que se separaron hay clados tanto con queilo y pleurocistidios, así como algunos que sólo presentan queilocistidios; sin embargo, estos caracteres sí son útiles para la delimitación de especies.

Delimitación de especies de *Melanoleuca*

Se encontraron pocos caracteres morfológicos que pueden ayudar a delimitar las especies; sin embargo, se observó que en algunos casos la distribución geográfica y/o ecológica permite dicha delimitación. En el presente trabajo se reconocen 25 especies y el denominado grupo *M. melaleuca*; los cuales se discuten a continuación:

Grupo *M. melaleuca*

Como ya se mencionó, este grupo está compuesto por taxa carentes de cistidios. *Melanoleuca melaleuca* (Pers.) Murrill, es una de las especies con mayor controversia, pues algunos autores consideran que es una especie que posee cistidios fusiformes y lageniformes (Gillman y Miller, 1977; Pegler, 1977; Bon, 1991; Fontenla *et al.*, 2003), mientras otros la tratan como una

especie carente de cistidios (Kühner, 1978; Watling y Turnbull, 1998; Boekhout, 1999; Horak, 2005; Vesterholt, 2008). Esta confusión se debe a que no existe el tipo y en la descripción original no se mencionan caracteres micromorfológicos, por lo que no se puede saber con seguridad si esta es una especie con o sin cistidios. En 1887, cuando Patouillard describió el género *Melanoleuca*, basó su descripción en *Agaricus melaleucus* Pers., que denominó *M. vulgaris* Pat. Murrill (1911) renombró a esta especie *M. melaleuca*, dando una descripción más detallada que la original, pero basándose en ejemplares colectados en Estados Unidos de América; en dicha descripción tampoco mencionó la presencia o ausencia de cistidios.

En 1953 Kühner y Romagnesi en su trabajo titulado *Flore analytique de champignons supérieurs*, consideran a *M. melaleuca* como una especie con cistidios prominentes. Posteriormente Kühner (1978) en su obra *Agaricales de la zone alpine. Genre Melanoleuca* Pat., cambió su opinión y consideró a *M. melaleuca* como una especie carente de cistidios, argumentando que los ejemplares colectados y descritos en esta publicación son muy similares a la ilustración que Fries presentó en su obra *Icones selectae Hymenomycetum nondum delineatorum* como el típico *A. melaleucus*. A partir de esta publicación este concepto ha sido el más aceptado por la comunidad micológica, aunque algunos micólogos siguen considerando a *M. melaleuca* como una especie con cistidios (Bon, 1991; Fontenla *et al.*, 2003).

Se han descrito alrededor de 12 especies de *Melanoleuca* sin cistidios (Bon, 1991; Gillman y Miller, 1977); sin embargo, las descripciones no son detalladas y carecen de información importante, por lo que en estos casos es necesario comparar los materiales con los ejemplares tipo para poder saber con certeza de que especie se trata. Para no generar mayor confusión taxonómica, se decidió considerar por el momento a estos ejemplares como parte del grupo *M. melaleuca*, hasta poder compararlos con los ejemplares tipo.

Aunque los estudios filogenéticos muestran que es muy probable que existan varias especies dentro de este grupo, no se encontraron caracteres morfológicos, ecológicos o geográficos que permitan delimitarlas.

Melanoleuca* aff. *cavipes

Se agruparon aquí ejemplares mexicanos similares a *M. cavipes*, que se caracterizan por tener un píleo pequeño (30-50 mm) plano, liso, de color claro (gris-beige), y micromorfológicamente por tener cistidios fusiformes. Aunque estos caracteres concuerdan con los ejemplares estudiados, el tamaño de las esporas difiere, ya que *M. cavipes* tiene esporas de 8-9 x 5-6 μm mientras en estos ejemplares las esporas son más pequeñas (7-8 x 4-5 μm). Además estos

especímenes fueron recolectados en bosques mesófilos de montaña de los estados de Jalisco y Guerrero, mientras que *M. cavipes* se distribuye en bosques de coníferas de Europa.

Melanoleuca* aff. *excissa

Cinco ejemplares mexicanos recolectados en el Estado de México, Michoacán y Tlaxcala, presentan características macro y micromorfológicas similares a las de *M. excissa*; sin embargo, estos especímenes se agrupan en un clado distinto con un fuerte soporte. El tipo de vegetación en donde se encuentran los integrantes de ambos clados también es similar, ya que se distribuyen en bosques templados. A pesar de las similitudes que estos ejemplares comparten con *M. excissa*, pueden considerarse especies distintas, por la distribución geográfica.

Melanoleuca* aff. *polioleuca

En este grupo se encuentran ejemplares que presentan basidiomas de distintos tamaños, con píleos que van desde 28 hasta 160 mm de diámetro. En un principio se llegó a considerar que dicha variación podría indicar que se trataba de más de una especie; sin embargo, en este estudio se encontró que los ejemplares pertenecen a una sola especie, ya que los caracteres micromorfológicos que presentan cada uno de ellos son similares, así como la distribución y el tipo de vegetación en el que fueron recolectados (bosque de coníferas). Además los análisis filogenéticos apoyan dicha idea. Por otro lado, se observa que a pesar de presentar características similares a *M. polioleuca*, no se trata de la misma especie, lo cual puede explicarse por la distribución, *M. polioleuca* es una especie muy común en Europa, mientras que los ejemplares incluidos en el análisis.

***Melanoleuca alboflavida* (Peck) Murrill**

Este clado contiene tres ejemplares recolectados en Carolina del Norte y Canadá. Esta especie se reportó en el este y centro de Estados Unidos de América a altitudes que no sobrepasan los 1000 msnm. El basidioma se caracteriza por presentar un color blanquecino, además de queilo- y pleurocistidios fusiformes a lageniformes con el ápice redondeado, llegando a tener una forma subcilíndrica. *Melanoleuca alboflavida sensu* Singer corresponde a un sinónimo de *M. evenosa* (Sacc.) Konrad (= *Tricholoma cnista sensu* Bresadola), que también es considerada como un sinónimo de *M. strictipes sensu* autores británicos. En los árboles obtenidos se observa que *M. alboflavida* se separa de *M. strictipes*, aunque se encuentran agrupadas en un

mismo clado. La diferencia principal entre estas dos especies es la distribución: *M. alboflavida* es una especie que se distribuye en Norteamérica y *M. strictipes* en Europa.

Melanoleuca arcuata (Bull.) Singer

Esta especie se caracteriza por tener las láminas con tonos ocráceos, además de presentar queilo- y pleurocistidios en su mayoría lageniformes, aunque también se pueden observar algunos fusiformes. *Melanoleuca arcuata* ha sido sujeta a numerosas interpretaciones, llegando a ser considerada como un sinónimo de *M. cognata* (Bresadola, 1927; Bresinsky & Stangl, 1977) por el color de las láminas; sin embargo, los cistidios que cada una de ellas presenta son distintos, siendo los de *M. cognata* fusiformes y más alargados que los de *M. arcuata*. A pesar de que estas dos especies presentan algunas características similares, *M. arcuata* se agrupa con otras especies con cistidios fusiformes/lageniformes, mientras que *M. cognata* se ubica en una posición basal.

Melanoleuca brevipes (Bull.) Pat.

Este clado está integrado por un ejemplar de Nueva York y otro de Suecia, que se caracterizan por tener un estípite muy corto con respecto al tamaño del píleo, micromorfológicamente presentan queilocistidios urticoides, en algunos casos septados, y carece de pleurocistidios. Puede llegar a confundirse con *M. grammopodia* f. *macrocarpa* Boekhout, la cual presenta un estípite más pequeño que el diámetro del píleo, y también carece de pleurocistidios; sin embargo, presenta esporas un poco más alargadas que *M. brevipes* y el basidioma es en general más grande.

Melanoleuca cinereifolia (Bon) Bon

Es una especie que se distribuye en Europa; se caracteriza por un basidioma de color gris claro y la presencia de queilo- y pleurocistidios fusiformes, además de encontrarse en dunas costeras donde crece la planta *Ammophila arenaria*. En este trabajo esta representada por un ejemplar de Suecia, similar a *M. aff. cavipes*; sin embargo, se diferencian por el tipo de vegetación donde se encuentran y la distribución geográfica.

Melanoleuca cognata (Fr.) Konrad & Maubl.

Esta especie se llegó a considerar como cercana a *M. arcuata*, ya que esta última presenta láminas con tonos beige, mientras que *M. cognata* tiene láminas con tonos rosáceos. Sin

embargo, presentan diferencias en cuanto a los cistidios, ya que en *M. cognata* son fusiformes/lageniformes más grandes que en *M. arcuata* y con una terminación aguda. En general es una especie fácil de identificar y muy común en Europa, los ejemplares incluidos en este estudio se recolectaron en Escocia, Suecia y México, lo que muestra que a pesar de ser una especie descrita para Europa también se encuentra en México.

***Melanoleuca excissa* (Fr.) Singer**

Este clado está compuesto por ejemplares de Suecia y Alemania, los cuales presentan cistidios urticoides con un septo, los queilocistidios son fácilmente visibles y en algunos casos son numerosos; sin embargo, los pleurocistidios son difíciles de observar. Se encuentran en bosques de coníferas y pastizales.

***Melanoleuca grammopodia* (Bull.) Murrill**

Esta especie se caracteriza por la presencia de un estípite estriado longitudinalmente y por tener un píleo umbonado; en cuanto a los caracteres micromorfológicos, presenta queilocistidios urticoides, algunos de ellos septados y carece de pleurocistidios. Los ejemplares incluidos en este estudio corresponden a las dos formas que consideró Boekhout (1988) (f. *grammopodia* y f. *macrocarpa*). La primera presenta un píleo de 50-150 mm de diámetro, mientras que la segunda se distingue por un píleo de 100-200(-300) mm de diámetro. La forma *macrocarpa* se reconoció por algunos autores como una especie distinta, la cual recibe el nombre de *M. subbrevipes* Métrod (1942). En este trabajo se demuestra que la diferencia de tamaño es simplemente una variación de la misma especie, por lo que *M. subbrevipes* se considera un sinónimo de *M. grammopodia*.

***Melanoleuca polioleuca* (Fr.) G. Moreno**

Esta especie está representada por ejemplares recolectados en Suecia y se caracteriza por tener un píleo de color café oscuro que contrasta con el color claro del estípite; presenta queilo- y pleurocistidios principalmente fusiformes, aunque también se pueden observar cistidios lageniformes. Esta especie fue nombrada de manera inadecuada *M. melaleuca*, debido a que algunos autores la consideran una especie con cistidios como los que se pueden observar en ejemplares de *M. polioleuca*; es por esto que en la mayoría de las colecciones de hongos (herbarios) los ejemplares de *M. polioleuca* se pueden encontrar bajo el nombre *M. melaleuca*. Dentro de esta especie han se reconocen tres formas: f. *langei* Boekhout, f. *fragillima* (Fr.) Boekhout y f. *polioleuca* con base en el tamaño del basidioma (Boekhout, 1999). Algunos

autores reconocen que la forma *langei* debe ser considerada una especie diferente por tener un umbo muy marcado y láminas decurrentes (Watling y Turnbull, 1998). Otra forma que se consideró es la f. (Fr.) Boekhout; sin embargo, actualmente se considera una especie distinta: *M. oreina* Kühner & Maire, que se caracteriza por presentar un basidioma pequeño (30-40 mm) y unas láminas de color gris a gris-beige (Boekhout y Kuyper, 1996).

Melanoleuca strictipes (P. Karst.) Jul. Schäff

Este clado contiene dos ejemplares recolectados en Suecia, que se caracterizan por tener un basidioma blanquecino, y queilo- y pleurocistidios fusiformes casi subcilíndricos. Es similar a *M. alboflavida* pero se distribuye en Europa en zonas subalpinas; es considerada un sinónimo de *M. evenosa* (ver discusión bajo *M. alboflavida*)

Melanoleuca stridula (Fr.) Singer

A pesar de que este es un taxón carente de cistidios y por lo tanto debería considerarse dentro del grupo *melaleuca*, se decidió separarlo ya que es fácilmente distinguible de los otros ejemplares sin cistidios. Presenta un basidioma pequeño, el píleo mide 2-4 cm de diámetro, y las esporas son subglobosas y notablemente más pequeñas (5-7 x 4-5 μ m) que las de otras especies de este género. Este clado está integrado por dos ejemplares de Suecia.

Melanoleuca verrucipes (Fr.) Singer

Es una especie con basidioma blanquecino y estípites con proyecciones en forma de puntos de color café en el ápice, que presenta queilo- y pleurocistidios urticoides. Hasta hace unos años esta especie únicamente se conocía en Europa; sin embargo, recientemente se recolectó en el oeste de Estados Unidos de América (Matheny y Vellinga, 2009).

***Melanoleuca* sp. 1**

Este clado está conformado por dos ejemplares mexicanos, recolectados en pastizales de Veracruz y Querétaro. Se caracterizan por tener basidiomas color claro (café-beige), el píleo mide aproximadamente 6 cm de diámetro, presentan queilocistidios urticoides, apenas visibles, carecen de pleurocistidios y tienen basidios monospóricos, bispóricos y tetrásporicos, con esterigmas muy largos. Aunque algunas especies de *Melanoleuca* presentan basidios bispóricos no se habían reportado monospóricos, ni con esterigmas tan largos, por lo que estos ejemplares se consideran como una especie nueva.

***Melanoleuca* sp. 2**

Aquí se agruparon cuatro especímenes recolectados en México, únicamente del estado de Jalisco, los cuales tienen queilocistidios urticoides que se pueden observar fácilmente, la mayoría presenta un septo y cristales en el ápice, los pleurocistidios son similares a los queilocistidios, pero muy escasos. Uno de los ejemplares se parece a *M. brevipes*, ya que el tamaño del diámetro del píleo es mayor a la longitud del estípite; sin embargo, los otros no presentan esta característica. Estos materiales también presentan similitudes con *M. grammopodia*; sin embargo, esta especie no posee pleurocistidios. Otra especie similar es *M. excissa*, pero el tamaño del basidioma es menor al de los ejemplares de Jalisco, por lo que al no encajar en ninguna otra descripción se considera una especie nueva.

***Melanoleuca* sp. 3**

Este ejemplar mexicano es similar a *M. grammopodia*, ya que presentan caracteres macromorfológicos similares, como un estípite estriado longitudinalmente y un píleo embonado. En cuanto a los caracteres micromorfológicos se caracterizan por la presencia de queilocistidios urticoides y la ausencia de pleurocistidios. La diferencia que tiene este ejemplar con respecto a *M. grammopodia* es en el tamaño de los cistidios, los cuales miden 51-90 x 7.5-10 µm en este espécimen, mientras que los de *M. grammopodia* son más pequeños (25-50 x 5-10 µm). Otra diferencia es el tipo de vegetación en que se encuentran, *M. grammopodia* en bosques templados mientras que este ejemplar fue recolectado en bosque mesófilo de montaña del estado de Guerrero.

***Melanoleuca* sp. 4**

Este clado está integrado por dos ejemplares recolectados en Florida, que presentan queilo- y pleurocistidios urticoides, con un basidioma de color café-grisáceo. Uno de ellos es el tipo de *M. melaleuca* var. *caespitosa*; sin embargo, no corresponde con la descripción de *M. melaleuca* por la presencia de cistidios urticoides.

***Melanoleuca* sp. 5**

Corresponde a un ejemplar mexicano recolectado en el estado de Michoacán. Es similar a *M. rasilis* (Fr.) Singer, por las características que presenta; sin embargo, esta última tiene láminas grisáceas, mientras que el ejemplar en estudio presenta láminas blancas. Otra especie similar es *M. iris* Kühner, aunque el tamaño del píleo de esta especie es de 6-7.5 cm y el píleo de este

ejemplar mide 4 cm de diámetro. Las características de este ejemplar no corresponden con ninguna especie descrita.

***Melanoleuca* sp. 6**

Presenta muchos queilo- y pleurocistidios lageniformes con terminación aguda, es un ejemplar de Idaho que podría tratarse se una especie nueva para la ciencia.

***Melanoleuca* sp. 7**

Son dos ejemplares de Tennessee, con queilo- y pleurocistidios lageniformes y fusiformes, probablemente una especie nueva para la ciencia.

***Melanoleuca* sp. 8**

Estos son ejemplares recolectados en Tennessee y Carolina del Norte, que presentan queilo- y pleurocistidios urticoides, a veces septados. Las características que presentan no corresponden con ninguna especie descrita.

***Melanoleuca* sp. 9**

Es un ejemplar de Suecia, que se encontraba bajo el nombre *M. grammopodia*; sin embargo, tiene pleurocistidios, por lo que se trata de una especie distinta.

***Melanoleuca* sp. 10**

Estos ejemplares fueron recolectados en Utah y Tennessee, y se caracterizan por tener queilocistidios urticoides que son difíciles de ver. Se podría tratar de *M. utahensis* L.S Gillman & McKnigh o *M. leucophylloides* (Bon) Bon.

***Melanoleuca* sp. 11**

Corresponde a un ejemplar de Argentina que tiene queilocistidios lageniformes.

El género *Melanoleuca* en México

La mayoría de las especies mexicanas se distribuyen a lo largo del Eje Volcánico Transmexicano, que es una zona de gran riqueza biológica y donde se registra una importante cantidad de especies endémicas (Morrone, 2005), por lo que el hecho de encontrar un número considerable de especies nuevas en esta zona no es sorprendente. Además, se ha observado

que la mayoría de los estudios filogenéticos llevan al descubrimiento de especies nuevas que eran reconocidas como una sola especie morfológica o biológica (Petersen y Hughes, 1999, Taylor *et al.*, 2000)

A pesar de que la mayor parte de las especies mexicanas resultaron ser nuevas no se debe descartar el posible uso de nombres europeos para ejemplares mexicanos, pues en algunos casos si se trata de las mismas especies, como *M. cognata*, descrita para Europa que se encontró en México en el estado de Tlaxcala. En este caso no se puede descartar el hecho de que sea una especie introducida, considerando que de las especies mexicanas estudiadas ésta es la única con distribución en Europa y que en muchos casos se sabe que las especies de Europa y América son distintas sería recomendable un estudio filogeográfico para conocer su distribución original y posibles mecanismos de dispersión (ej. Vizzini *et al.*, 2009) para que de esta forma se pueda saber con certeza si es una especie introducida o no.

El género *Melanoleuca* en el mundo

La mayoría de las especies descritas son de Europa, en donde este género ha sido moderadamente estudiado. El hecho de que en México la mayor parte de los ejemplares correspondan a especies nuevas permite suponer que en otras partes del mundo en donde este grupo no se ha estudiado con detalle ocurra algo similar, y también es de esperarse que el número de especies estimado (~50, Kirk *et al.*, 2008) sea considerablemente menor al número de especies real de este género. Tan solo en este trabajo se encontraron 25 especies, lo que corresponde a la mitad del número total de especies estimado. Si se considera que sólo se revisaron ejemplares de unos cuantos herbarios, el número debe incrementar notablemente.

Clasificación infragenérica

La clasificación planteada por Singer (1935) no parece estar soportada por la filogenia obtenida en este trabajo. Dicha clasificación se basó en el tamaño y color del basidioma, los cuales son caracteres que en ocasiones no son de mucha utilidad ni siquiera para la delimitación de las especies, por lo que menos se puede esperar que agrupen especies. Por ejemplo: en el caso de *M. aff. poliroleuca* se pueden encontrar ejemplares que presentan píleos muy pequeños, de 28 mm de diámetro, o muy grandes, de hasta a 160 mm.

Boekhout (1988) se basó en la ausencia y presencia de cistidios así como en la morfología que éstos presentan para separar al género en tres subgéneros. Estos resultados muestran que los representantes del subgénero *Urticocystis* forman un grupo parafilético. Es importante señalar que estas relaciones no se encuentran muy claras, pues los nodos no tienen

soportes altos (Fig. 8). En el caso del subgénero *Macrocystis*, aunque la mayor parte de los representantes estudiados se agrupan en un solo clado, la especie *M. cognata* que también se consideró como perteneciente a este subgénero se encuentra en una posición basal, alejada del resto de las especies con cistidios. No obstante, su ubicación en los árboles no está fuertemente apoyada, por lo que excluyendo a esta especie, el subgénero *Macrocystis* forma un grupo monofilético. En cuanto a los taxa sin cistidios que integran el subgénero *Melanoleuca* no se encuentran claras las relaciones entre ellos. De manera que sería prematuro saber con certeza si la clasificación infragenérica propuesta por Boekhout es una clasificación que refleje una clasificación natural. Para poder dilucidar estas relaciones se recomienda incluir más especies y/o generar secuencias de otras regiones tanto de los ejemplares estudiados como de otros ejemplares.

7. CONCLUSIONES

- Se reconoce la monofilia del género *Melanoleuca* y su inclusión en el clado pluteoide, como grupo hermano del género *Pluteus*.
- Los clados terminales se recuperaron con gran soporte en cada uno de los análisis; sin embargo, las relaciones entre algunos de éstos todavía permanecen inciertas, por lo que es recomendable incluir más especies y/o generar secuencias de otras regiones tanto de los ejemplares estudiados como de otros ejemplares para poder dilucidar algunas de las relaciones que aún permanecen dudosas.
- Se encontraron siete especies nuevas que se distribuyen en México, con lo que se reconoce la importancia de este tipo de estudios para el conocimiento de la diversidad fúngica.
- La mayor parte de los taxa mexicanos, aunque presentan morfología similar a las especies europeas, son especies filogenéticamente distintas, lo cual demuestra que los nombres europeos que se utilizan para denominar especies de México y otras partes de América, son inapropiados.
- La ausencia y presencia de cistidios, así como las diferentes formas que éstos presentan es de gran utilidad para la delimitación de las especies de *Melanoleuca*. La reconstrucción de estados ancestrales de este carácter indicó que la ausencia de cistidios podría ser el estado ancestral de *Melanoleuca*.
- Los caracteres morfológicos que ayudan a delimitar especies dentro de este género son escasos. Se observó que en algunas ocasiones la distribución geográfica, así como el tipo de vegetación en la que se encuentran, ayuda en gran medida a lograr dicha delimitación.
- Considerando que los cistidios proveen información importante para la delimitación de las especies; en los taxa que carecen de estas estructuras la determinación de especies es aún más complicada, por lo se recomienda realizar estudios en los que se aumente el número de ejemplares y de genes para poder establecer límites entre ellos, ya que por el momento no se encontraron diferencias morfológicas, ecológicas o geográficas que puedan ayudar al establecimiento de los límites entre especies sin cistidios.

- Este trabajo representa una primera aproximación al conocimiento de las relaciones filogenéticas del género *Melanoleuca*, que hasta ahora permanecían por completo desconocidas.

8. LITERATURA CITADA

- Aime MC, Vilgalys R, Miller OK. 2005. The Crepidotaceae (Basidiomycota, Agaricales): Phylogeny and taxonomy of the genera and revision of the family based on molecular evidence. *American Journal of Botany* 92: 74-82.
- Akaike H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *In*: Petrov BN, Csaki F (eds.). *Second International Symposium on Information Theory*. Budapest (Hungria): akademiai Kiado p. 267-281.
- Arora D. 1986. *Mushrooms demystified. A comprehensive guide to the fleshy fungi*. Ten Speed Press, Nueva York.
- Baptiste E, Brinkmann H, Lee JA, Moore DV, Sensen CW, Gordon P, Duruflé L, Gaasterland T, López P, Müller M, Philippe H. 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba* and *Mastigamoeba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(3): 1414-1419.
- Barracough TG, Nee S. 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16(7): 391-399.
- Begerow D, John B, Oberwinkler F. 2004. Evolutionary relationships among β -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycological Research* 108(11): 1257-1263.
- Berbee ML, Taylor JW. 1999. Fungal phylogeny. *In*: Olivier RI, Schweizer M. *Molecular fungal biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Berbee ML, Taylor JW. 2000. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. *In*: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds.). *The Mycota VIIIB*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Bigelow HE, Smith AH. 1969. The status of *Lepista*. A new section of *Clitocybe*. *Brittonia*: 21(2): 144-177.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, Langer G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematic Biodiversity* 3: 113-157.
- Blackwell M, Hibbett DS, Taylor J, Spatafora J. 2006. Research coordination networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98(6): 829-837.
- Boekhout T. 1988. New taxa, and new combinations in *Melanoleuca* Pat. and notes on rare species in the Netherlands. *Persoonia* 13: 397-431.
- Boekhout T. 1999. Genus *Melanoleuca*. *In*: Bas C, Kuyper W, Noordeloos ME, Vellinga EC (eds.). *Flora Agaricina Neerlandica* Vol.4. Balkema, Rotterdam.

- Boekhout T, Kuyper TW. 1996. A new name for *Melanoleuca polioleuca* forma *oreina* (Fr.: Fr.) Boekhout. *Persoonia* 16: 253-254.
- Bon M. 1978. Tricholomataceae de France et d'Europe occidentale (Leucopaxilloideae). *Documents Mycologiques* 9(33): 1-79
- Bon M. 1984. Combinaisons et taxons nouveaux. *Documents Mycologiques* 14(53): 6.
- Bon M. 1991. Flore mycologique d'Europe 2. Les Tricholomes et ressemblants. *Documents Mycologiques*. Mémoire hors série No. 2. CRDP de l'Académie d'Amiens, Francia.
- Bowman BH, Taylor JW, Brownlee AG, Lee J, Lu S-D, White TJ. 1992. Molecular evolution of fungi: relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 231-241.
- Brandley MC, Schmitz A, Reeder T. 2005. Partitioned Bayesian analyses, partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards. *Systematic Biology* 54(3): 373-390.
- Breitenbach J, Kränzlin F. 1991. *Fungi of Switzerland* Vol. 3. Verlag Mykologia, Lucerna.
- Bresadola G. 1927. *Iconographia Mycologica* Vol I. Milano: Società Botanica Italiana.
- Bresinsky A, Stangl J. 1977. Beiträge zur revision M. Britzelmayrs "Hymenomyceten aus Südbayern" 13, *Zeitschrift für Pilzkunde* 43: 145-173.
- Bruns TD, Vilgalys R, Barns SM, González D, Hibbett DS, Lane DJ, Simon L, Stickel S, Szaro TM, Weisburg WG, Sogin ML. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analyzes of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 231-241.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 22: 525-564.
- Butler DK, Metzberg RL. 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer size in *Neurospora*. *Genetics* 122: 783-791.
- Cifuentes J (comp.). 2006. *Catálogo fotográfico de macromicetos del centro y sur de México*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (no publicado).
- Courtecuisse R, Pfister J. 1984. Notes de nomenclature concernant les hyménomycètes. Sur quelques épithètes spécifiques préoccupées, II. *Documents Mycologiques* 14(54-55): 93-100.
- Cracraft J. 1983. The significance of phylogenetic classifications for systematic and evolutionary biology. In: Felsenstein J (ed.). *Numerical taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

- Cracraft J. 2002. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 89: 127-144.
- Cunningham, CW. 1999. Some limitations of ancestral character-state reconstruction when testing evolutionary hipotesis. *Systematic Biology* 48(3): 664-674.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- De Luna E, Guerrero JA, Chew-Taracena T. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15(3): 351-370.
- DeSalle R, Egan M, Siddall M. 2005. *Phylosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1905-1916.
- Diezmann S, Cox CJ, Schonian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. 2004. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5624-5635.
- Engbrecht AJ, Brent R, Kaderghai MA. 2001. Minipreps of plasmid DNA. *Currents Protocols in Molecular Biology. Chapter 1: Unit 1.6.*
- Farris J. S. 1977. Estimating phylogenetic tres from distance matrixes. *American Nature* 106: 645-668.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
- Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Fontenla R, Gottardi M, Para R. 2003. Osservazioni sul genere *Melanoleuca*. *Fungi non Delineati Pars XXV*. Edizioni Candusso, Alassio.
- Frøslev TG, Matheny PB, Hibbett DS. 2005. Lower level relationships in the mushrooms genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): a comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 602-618.
- Frutis I, Guzmán G. 1983. Contribución al conocimiento de los hongos del Estado de Hidalgo. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 18: 219-266.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113-118.

- Garnica S, Weiss M, Walther G, Oberwinkler F. 2007. Reconstructing the evolution of agarics from nuclear gene sequences and basidiospore ultrastructure. *Mycological Research* 111(9): 1019-1029.
- Gillman LS, Miller OK, 1977. A study of the boreal, alpine and arctic species of *Melanoleuca*. *Mycologia* 69(5): 927-951.
- González D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.
- Guzmán G. 1972. Algunos macromicetos, líquenes y mixomicetos importantes en la zona del Volcán Popocatepetl (Amecameca-Tlamacas, México). In: *Guías Botánicas de Excursiones en México I, Congreso Latinoamericano de Botánica y V Congreso Mexicano de Botánica*. México, D.F.
- Guzmán G. 1982. New species of fungi from the Yucatan Peninsula. *Mycotaxon* 16: 249-261.
- Guzmán G. 1983. Los hongos de la Península de Yucatán, II. Nuevas exploraciones y adiciones micológicas. *Biotica* 8: 71-100.
- Guzmán G. 1986. Distribución de los hongos en la región del Caribe y zonas vecinas. *Caldasia* 15: 103-120.
- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude significance, and conservation. *Mycological Research* 95(6): 641-655.
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Hesler LR, Smith AH. 1965. North American species of *Crepidotus*. Hafner, Nueva York.
- Herrera T, Guzmán G. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. *Anales del Instituto de Biología UNAM, Serie Botánica* 32: 33-135.
- Hibbett DS. 2004. Trends in morphological evolution in homobasidiomycetes inferred using maximum likelihood: a comparison of binary and multistate approaches. *Systematics Biology*. 53(6): 889-903.
- Hibbett DS. 2006 A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia*. 98(6): 917-925.
- Hibbett DS, Binder M. 2002. Evolution of complex fruiting body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceeding of the Royal Society of London B* 269: 1963-1969.

- Hibbett DS, Donoghue J. 1998. Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologia* 90(3): 347-356.
- Hibbett DS, Pine EM, Langer E, Langer G, Donoghue J. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 12002-12006.
- Hibbett DS, Thorn RG. 2001. Homobasidiomycetes. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds.). *The Mycota VII B*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- Hofstetter V, Miadliskowska J, Kauff F, Lutzoni F. 2007. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 412-426.
- Horak E. 2005. *Röhrlinge und Blätterpilze in Europa*. Elsevier Spektrum. Munich.
- Hosaka K, Bates ST, Beever RE, Castellano MA, Colgan W, Domínguez LS, Nouhra ER, Geml J, Giachini AJ, Kenney SR, Simpson NB, Trappe JM. 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia* 98(6): 949-959.
- Huelsenbeck J, Larget B, Miller RE, Ronquist F. 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51(5): 673-688
- Huelsenbeck J, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.
- Hughes KW, Petersen RH, Mata JL, Psurtseva N, Kovalenko A, Morosova O, Lickey E, Cifuentes J, Lewis D, Nagasawa E, Halling RE, Takehashi S, Aime MC, Baull T, Henke T. 2007. *Megacollybia* (Agaricales). *Report of the Tottori Mycological Institute* 45: 1-57.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadliskowska J, Lumbsch TH, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS,

- Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443(7113): 818-822.
- James TY, Porter D, Leander CA, Vilgalys R, Longcore JE. 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany* 78: 336-350.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro HM (ed.). *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, Nueva York.
- Kass RE, Raftery AE. 1995. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* 90: 773-795.
- Katoh K, Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9(4): 286-298.
- Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Science* 78: 454-458.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford.
- Kludge AG, Farris JS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1978. *Methuen handbook of color*. Eyre Methuen, London.
- Kretzer AM, Bruns TD. 1999. Use of atp6 in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 483-492.
- Kropp BR, Matheny PB. 2004. Basidiospore homoplasy and variation in the *Inocybe chelanensis* group in North America. *Mycologia* 96(2): 295-309.
- Kühner R, Maire R. 1926. Contribution à l'étude des Hymenomycètes et spécialement des Agaricacées. *Le Botaniste* 17: 131-139.
- Kühner R. 1978. Agaricales de la zone alpine. Genre *Melanoleuca* Pat. *Bulletin de la Société Linneenne de Lyon* 47(1): 12-52.
- Kuyper TW. 1986a. Proposal to conserve *Melanoleuca* (Tricholomataceae, Agaricales). *Taxon* 35(2): 377-378.
- Kuyper TW. 1986b. A revision of the genus *Inocybe* in Europe. I. Subgenus *Inosperma* and the smooth-spored species of subgenus *Inocybe*. *Persoonia (Suppl. 3)*: 1-247.
- Largent D, Johnson D, Watling R. 1977. *How to identify mushrooms to genus, III. Microscopic Features*. Mad River Press, Eureka.

- Larsson KH, Larsson E, Kojalg U. 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycological Research* 108(9): 983-1002.
- Larsson KH, Parmasto E, Langer E, Nakasone KK, Redhead SA. 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia* 98(6): 926–936.
- Lim SR, Fischer A, Berbee M, Berch SM. 2003. Is the booted *Tricholoma* in British Columbia really Japanese matsutake? *BC Journal of Ecosystems and Management* 3(1).
- Liu YL, Whelen S, Hall BD. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 1799-1808.
- Lumbsch HT, Schmitt I, Lindemuth R, Miller A, Mangold A, Fernandez F, Huhndorf S. 2005. Performance of four ribosomal DNA regions to infer higher-level phylogenetic relationships of inoperculate euascomycetes (Leotiomyceta) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 512-524.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett DS, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G-H, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny PB, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossmann A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. 2004. Assembling the Fungal Tree of Life: progress, classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91(10): 1446-1480.
- Maddison WP. 1995. Calculating the probability distribution of ancestral states reconstructed by parsimony on phylogenetic trees. *Systematic Biology* 44(4):474-481.
- Maddison DR, Maddison WP. 2005. *MacClade 4.08: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Maddison WP, Maddison DR. 2009. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.72. <http://mesquiteproject.org>.
- Martín del Campo R. 1968. Contribución al conocimiento de la nomenclatura micológica náhuatl. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 2: 25-36.
- Martínez Alfaro M, Pérez-Silva E, Aguirre-Acosta E. 1983. Etnomicología y exploraciones micológicas en la Sierra Norte de Puebla. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 18: 51-64.

- Matheny PB. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 Nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 1-20.
- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge Z, Yang Z, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R y Hibbett DS. 2006. Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia*. 98(6): 982-995.
- Matheny PB, Liu YJ, Ammirati JF, Hall BD. 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *American Journal of Botany* 89(4): 688-698.
- Matheny PB, Vellinga EC. 2009. A North American Flora for Mushroom-Forming Fungi. *Inoculum* 60(5): 28-29.
- Matheny PB, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Nilsson RH, Hughes KW, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch CL, Langer E, Langer G, McLaughlin DJ, Wilson AW, Frøslev T, Ge ZW, Yang ZL, Baroni TJ, Fischer M, Hosaka K, Matsuura K, Seidl MT, Vauras J, Hibbett DS. 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-451.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 17(11): 488-497
- Mendiola G. 1974. *Estudio taxonómico y datos ecológicos de algunas especies mexicanas de los hongos de la familia Tricholomataceae*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F. Tesis Profesional.
- Métrod G. 1942. Sur le genre *Melanoleuca*. *Revue Mycologique* 7 (2-4): 89-96.
- Métrod G. 1948. Essai sur le genre *Melanoleuca*. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 64(3-4): 141-165.
- Miller SL, Nilsson RH, Koster B, Dunham SM, Bernauer T, Matheny PB, McLenon T, Margaritescu, Wei M, Garnica S, Danell E, Langer G, Langer E, Larsson E, Larsson K-H, Vilgalys R. 2006. The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia* 98(6): 937-948.
- Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J, Vilgalys R. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49: 278-305.

- Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hofstetter V, Verduin S, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RJ, Jacobson S, Clémenton H, Miller Jr. O. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.
- Moritz C, Hillis DM. 1996. *Molecular Systematics: Context and controversies*. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
- Morrone JJ. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76(2): 207-252.
- Murrill WA. 1914. *Melanoleuca*. *North American Flora* 10: 3-32.
- Newton MA, Raftery AE. 1994. Approximate Bayesian inference by the weighted likelihood bootstrap (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, series B* 56: 3-48.
- Nishida FH. 1989. Key to the species of *Inocybe* in California. *Mycotaxon* 34: 191-196.
- Noordeloos ME. 1999. Strophariaceae. In: Bas C, Kuyper W, Noordeloos ME, Vellinga EC (eds.). *Flora Agaricina Neerlandica* Vol. 4. Balkema, Rotterdam.
- Page RD, Holmes EC. 1998. *Molecular Evolution: A phylogenetic approach*. Wiley-Blackwell, Malden.
- Patterson C, Williams DM, Humphries CJ. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics* 24: 153-188.
- Pegler DN. 1977. A preliminary agaric flora of east Africa. *Kew Bulletin Additional Series VII*: 1-615.
- Pérez-Silva E, Aguirre-Acosta E. 1985. Micoflora del Estado de Durango, México. *Revista Mexicana de Micología* 1: 315-330.
- Pérez-Silva E, Aguirre AE. 1986. Macromicetos de zonas urbanas de México 1, Área Metropolitana. *Revista Mexicana de Micología* 2: 187-196.
- Pérez-Silva E, Esqueda M, Herrera T, Coronado M. 2006. Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 23-33.
- Petersen RH, Hughes KW. 1999. Species and speciation in mushrooms. *Bioscience* 49: 281-313.
- Pfister J. 1984. Studies of Peck and Murrill types belonging or once belong to the genus *Melanoleuca*. *Mycotaxon* 19: 101-132.

- Posada D. 2003. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *In*: Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Petsko GA, Stein LD, Stormo GD (eds.). *Current Protocols in Bioinformatics*. Nueva York: John Wiley & Sons, Nueva York.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253-1256.
- Posada D, Buckley TR. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Rabosky DL, McCune AR. 2009. Reinventing species selection with molecular phylogenies. *Trends in Ecology and Evolution* 25(2): 68-74.
- Raftery AE. 1996. Approximate Bayes factors and accounting for model uncertainty in generalized linear models. *Biometrika* 83: 251-266
- Rambaut A, Drummond AJ. 2009. *Tracer Analysis Tool vs. 1.5.0*, disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000a. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000b. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.
- Redecker D, Raab P. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 96(6): 885-895.
- Rehner SA, Buckley EP. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1): 84-98.
- Ricklefs RE. Estimating diversification rates from phylogenetic information. *Trends in Ecology and Evolution* 22(11): 602-610.
- Riva A. 1988. *Tricholoma*. Librería Editrice Biella Giovanna, Saronno.
- Robinson MM, Chiang B, Horgen PA. 2001. A phylogeny of the genus *Agaricus* based on mitochondrial atp6 sequences. *Mycologia* 93(1): 30-37.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, Van der Mark P. 2005. Manual de MrBayes 3.1, disponible en <http://mrbayes.csit.fsu.edu/manual.php>.
- Ross H. 1974. *Biological Systematics*. Addison-Wesley Publishing Company, Nueva York.

- Sánchez-García M. 2008. *Contribucion para la revisión taxonómica del género Melanoleuca en México*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Tesis de Licenciatura.
- Sánchez-León VM. 1961. *Contribución al conocimiento fisicoquímico de los suelos forestales del Parque Nacional Insurgente Miguel Hidalgo, Estado de México*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F. Tesis Profesional.
- Schuh R. 2000. *Biological Systematics*. Cornell University Press, Cornell.
- Schüßler A, Schwarzott D, Farris JS. 2001. A new fungal phylum the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413-1421.
- Simon L, Bousquet L, Levesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular plants. *Nature* 363: 67-69.
- Singer R. 1978. Keys for identification of the species of Agaricales II. *Sydowia* 31: 193-237.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. 4a. ed., Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Singer R. 1989. New taxa and new combinations of Agaricales. *Fieldiana Botany* 21: 20
- Smith AH. 1944. New North American agarics. *Mycologia* 36(3): 242-262.
- Smith AH, Rea PH. 1944. Fungi of Southern California II. *Mycologia* 36(2): 125-137.
- Sober E. 1988. Parsimony in systematics: philosophical issues. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14: 335-357.
- Steenkamp ET, Wright J, Baldauf SL. 2006. The protistan origins of animals and fungi. *Molecular Biology and Evolution* 23(1): 93-106.
- Stiller JW, Hall BD, 1997. The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 4250-4255.
- Swann EC, Taylor JW. 1995. Phylogenetic perspectives on basidiomycetes systematics: evidence from the 18S rRNA gene. *Canadian Journal of Botany (Suppl.)*: s862-s868.
- Swofford DL. 2000. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0 b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.
- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sujiyama J. 2004. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1a and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449.

- Tang AMC, Jeewon R, Hyde KD. 2007. Phylogenetic utility of protein (RPB2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 327-349.
- Tavaré S. 1986. *Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences*. In: Miura RM (ed.). *Some mathematical questions in biology-DNA sequence analysis*. Providence (RI): American Mathematical Society p. 57-86.
- Taylor JW. 1995. Molecular phylogenetic classification of fungi. *Archives of Medical Research* 26: 307-314.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- Tehler A, Farris JS, Lipscomb DL, Källersjö M. 2000. Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia* 92(3): 459-474.
- Thiers B. (actualizado continuamente). *Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih> (revisado el 25 mayo de 2010).
- Thiers HD. 1958. The agaric flora of Texas. II. New taxa of white and pink spored agarics. *Mycologia* 50(4): 514-523.
- Thorn RG, Barron GL. 1986. *Nematoctonus* and the tribe Resupinatae in Ontario, Canada. *Mycotaxon* 25: 321-453.
- Valdés-Ramírez M. 1972. Micoflora of a coniferous forest of Mexican basin. *Plant and Soil* 36: 31-38.
- Vellinga EC, de Kok RPJ, Bruns TD. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). *Mycologia* 95(3): 442-456.
- Vesterholt J. 2008. *Melanoleuca*. In: Knudsen H, Vesterholt J (eds.). *Funga Nordica, agaricoid, boletoid and cyphelloid genera*. Narayana Press, Copenhagen.
- Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Vizzini A, Zotti M, Mello A. 2009. Alien fungal species distribution: the study case of *Favolaschia calocera*. *Biological Invasions* 11: 417-429.
- Wainright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK. 1993. Monophyletic origins of the Metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* 260: 340-342.

- Watling R, Turnbull E. 1998. Cantharellaceae, Gomphaceae and Amyloid-Spored and Xeruloid Members of Tricholomataceae (excl. *Mycena*). *In*: Henderson DM, Orton PD, Watling R (eds.). *British Fungus Flora. Agarics and Boleti: Part 8*. Royal Botanic Garden, Edimburgo.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, White TJ (eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Nueva York.
- Wilcox TP, Zwickl DJ, Heath TA, Hillis DM. 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 361-371.
- Wiley EO. 1981. *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley. New York.
- Yang Z. 1996. Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *Journal of Molecular Evolution* 42: 587-596.
- Zarco J. 1986. Estudio de la distribución ecológica de los hongos (principalmente macromicetos) en el Valle de México, basado en los especímenes depositados en el Herbario ENCB. *Revista Mexicana de Micología* 2: 41-72.
- Zharkikh A. 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 39: 315-329.
- Zwickl DJ. 2006. *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion*. University of Texas, Austin. Tesis de doctorado.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ejemplares incluidos en el análisis filogenético.

Melanoleuca alboflavida (Peck) Murrill

CANADA. Ontario: Lake Temagami, Bear Island, Temagami, *HSJ7433*, 14-julio-1935 (TENN).
ESTADOS UNIDOS. North Carolina: Swain County, Great Smoky Mountain National Park (GSMNP), Flat Creek, Bryson City, *LRH10725*, 7-agosto-1937 (TENN). Near Cherokee, *RHP24926*, 9-agosto-1962 (TENN).

Melanoleuca arcuata (Bull.) Singer

AUSTRIA. Tirol: Imst, Imsterau, *RHP29112*, 8-octubre-1962 (TENN). **SUIZA. Luzern:** Willisau, Wellberg, *Moser 70343*, 1-octubre-1970 (TENN). **Ticino:** Roseti, *TFB4307*, 1-octubre-1991 (TENN).

Melanoleuca brevipes (Bull.) Pat.

ESTADOS UNIDOS. New York: Irondequoit, Monroe, *RHP29182*, 27-abril-1966 (TENN).
SUECIA. Västergötland: Trollhättan, Götalunden, Hedeäng, *LAS84-141B*, 22-septiembre-1984 (GB).

Melanoleuca cinereifolia (Bon) Bon

SUECIA. Bohuslän: Uddevalla, Forshälla, Sund, *LAS92-065*, 20-septiembre-1992 (GB).

Melanoleuca cognata (Fr.) Konrad & Maubl.

ESCOCIA. Perthshire: Loch preserve, Tulloch Moor, *TFB4170*, 11-nov-1991 (TENN).
MÉXICO. Tlaxcala: Mpio. Huamantla, Cañada Grande, ladera E Volcán la Malinche, Parque Nacional la Malinche, *Montoya-Esquivel 1825*, julio-2004 (TLXM). **SUECIA. Västergötland:** Trollhättan, Götalunden, Hedeäng, *LAS85-146*, 26-septiembre-1985 (GB).

Melanoleuca excissa (Fr.) Singer

ALEMANIA. Mecklenburg-Vorpommern: Lubmin near Greifswald, road to Freest/ Nuclear Power Plant, *D. Krüger 10190*, 22-mayo-1999 (TENN). **SUECIA. Västergötland:** Herrljunga, Grude, *LAS97-019*, 6-septiembre-1997 (GB). Trollhättan, Trollhättan, Göteborgsvagén, *LAS00-221*, 14-octubre-2000 (GB).

Melanoleuca grammopodia (Bull.) Murrill

POLONIA. Malopolskie: Kroszow, Moser 67287, 7-octubre-1967 (TENN). **SUECIA. Öland:** Mörbylånga, Algutsrum, Borgs ängar, LAS00-130, 13-septiembre-2000 (GB).

Melanoleuca polioleuca (Fries: Fries) Kühner & Maire

SUECIA. Bohuslän: Tjörn, Valla, Mjörn, Sundsby, LAS77-532, 25-septiembre-1977 (GB). **Västergötland:** Götene, Österplana, Kinnekulle, Österplana hed, LAS01-183, 29-septiembre-2001 (GB). Mariestad, Lugnås, Lugnåsberget, LAS85-292, 8-septiembre-1985 (GB).

Melanoleuca strictipes (P. Karst.) Jul. Schäff.

SUECIA. Västergötland: Grästorp, Flo, Hunneberg, Erdalen, LAS99-005, 6-julio-1999 (GB). Trollhättan, Norra Björke, Stora Brédang S, LAS06-163, 16-octubre-2006 (GB).

Melanoleuca stridula (Fr.) Singer

SUECIA. Bohuslän: Strömstad, Tjörnö, Sydkoster, Kilesand, LAS88-179, 16-octubre-1988 (GB). **Öland:** Mörbylånga, Hulterstad, NR Gössslunda, LAS07-009, 16-septiembre-2007 (GB)

Melanoleuca aff. cavipes

MÉXICO. Guerrero: Mpio. Leonardo Bravo, km 4.5 entre el Carrizal y Atoyac, Chichihualco, Rodríguez-García s/n, 6-agosto-1982 (FCME). **Jalisco:** Mpio. Cd. Guzmán, Cañón del Floripondio, J. Scöndube 89, 11-julio-1992 (IBUG).

Melanoleuca aff. exscissa

MÉXICO. Estado de México: Amecameca-Tlamacas, L. Guzmán-Dávalos 152, 26-julio-1979 (ENCB). Mpio. Amanalco, km 39 carretera Toluca-Amanalco-Valle de Bravo, Agua Bendita, J. Cifuentes 3445, 21-julio-1990 (FCME). **Michoacán:** Mpio. Angangueo, Llano de las Papas, Reserva Especial de la Biósfera de la Mariposa Monarca, J. Cifuentes 4157, 28-octubre-1998 (FCME). **Tlaxcala:** Mpio. Panotla, 1 km al E de San Francisco Temezontla, Hernández-Cuevas 2188, 27-julio-1992 (TLXM). Montoya-Esquivel 1282, 7-julio-1993 (TLXM).

Melanoleuca aff. polioleuca

MÉXICO. Distrito Federal: Del. Cuajimalpa, Zona oriental del Desierto de los Leones, Guzmán 4246, 13-mayo-1964 (ENCB). **Estado de México:** Parque Nacional de las Lagunas de Zempoala, carretera a Chalma, L. Guzmán-Dávalos 269, 1-agosto-1982 (ENCB). Volcán

Popocatepetl, *Jones 123*, junio-1972 (ENCB). La Marquesa, Parque Nacional Miguel Hidalgo, *Mitastein s/n*, 28-octubre-1970 (ENCB). Mpio. Amanalco, km 39 carretera Toluca-Amanalco-Valle de Bravo, Agua Bendita, *Ortega-Lechuga 2*, 7-julio-1990 (FCME). **Hidalgo:** San Miguel el Cerezo, Parque Nacional el Chico, *L. Guzmán-Dávalos 709*, 17-octubre-1982 (ENCB). Valle de los Enamorados, Parque Nacional el Chico, *M. Sánchez-García 32*, 22-septiembre-2008 (FCME). Mpio. Epazoyucan, Peñas Largas, *Medina y García 1182*, 17-agosto-1975 (ENCB). Mpio. Pachuca, km 10 carretera Pachuca-Tampico, Parque Nacional el Chico, *Pérez-Ramírez 533*, 18-agosto-1987 (FCME). **Michoacán:** Desviación hacia Angangueo, cerro de la pirámide, ladera sur, *J. Cifuentes 577*, 29-julio-1980 (FCME). Mpio. Angangueo, km 3.5 de la desviación a Tlalpujahuá carretera el Oro-Angangueo, *Sánchez-Espinosa y Villarruel-Ordaz 698*, 5-agosto-1999 (FCME). Reserva Especial de la Biósfera de la Mariposa Monarca, *Juárez, Martínez y Montañez 331*, 18-agosto-2000 (FCME). *Álvarez, Busto y Montañez 369*, 22-septiembre-2000 (FCME). Mpio. Ciudad Hidalgo, km 186, carretera Toluca-Morelia, *Márquez V. L. s/n*, 29-julio-1983 (FCME). Mpio. Zinapécuaro, Laguna Larga Zona de Protección Forestal los Azufres, *Bulnes y J. Cifuentes 2695*, 25-julio-1987 (FCME). **Puebla:** Mpio. Teziutlán, Finca la Magdalena al S de Teziutlán, *Ramírez-Guillén 392*, 23-octubre-2002 (XAL). **Tlaxcala:** Mpio. Tlaxco, El Rosario km 4.5, Parque Recreativo el Rodeo, *Hernández-Muñoz 350*, 12-junio-1992 (FCME). **Veracruz:** Parque Nacional Cofre de Perote, Conejos a la Cumbre, *Murrieta 1025*, 2-septiembre-2006 (XAL).

***Melanoleuca* sp1**

MÉXICO. Querétaro: Entre San Juan del Río y Querétaro, *Guzmán 11494*, 3-julio-1974 (ENCB). **Veracruz:** Carretera Puebla-Xalapa, cerca de la desviación a Oriental, límite con Puebla, antes de Totalco, *Guzmán 19274*, 4-julio-1981 (ENCB).

***Melanoleuca* sp2**

MÉXICO. Jalisco: Mpio. Zapopan, en un jardín del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), las Agujas Nextipac, *M. G. Buenrostro 36*, 19-julio-1994 (IBUG). *G. López-Damián 50*, 12-julio-1999 (IBUG). *M. R. Sánchez-Jácome 966*, 16-julio-2001 (IBUG). Km 120 carretera Guadalajara-Autlán, el Mirador, Sierra Quila, *O. Vargas 265*, 7-agosto-1999 (IBUG).

***Melanoleuca* sp3**

MÉXICO. Guerrero: Mpio. Chilpancingo de los Bravo, cañada de la perra, Omiltemi, *Luna G. s/n*, 10-julio-1985 (FCME).

***Melanoleuca* sp4**

ESTADOS UNIDOS. Florida: Alachua County, Gainesville, *Murrill 19927*, 6-junio-1939 (TENN). *LRH16302*, 27-marzo-1944 (TENN).

***Melanoleuca* sp5**

MÉXICO. Estado de México: Antigua carretera México-Río Frío, cerca de Llano Grande, *Guzmán 7540*, 10-agosto-1969 (ENCB).

***Melanoleuca* sp6**

ESTADOS UNIDOS. Idaho: Kootenai County, Beauty Creek Drainage, Coeur d'Alene, *TFB5597*, 23-septiembre-1992 (TENN).

***Melanoleuca* sp7**

ESTADOS UNIDOS. Tennessee: Sevier County, Gatlinburg, Great Smoky Mountain National Park (GSMNP) near mount LeConte, *LRH20176*, 15-septiembre-1951 (TENN). *LRH21486*, 8-agosto-1954 (TENN).

***Melanoleuca* sp8**

ESTADOS UNIDOS. South Carolina: Fairfield County, Winnsboro, C. Lyles 32, 23-mayo-1966 (TENN). **Tennessee:** Knox County, Knoxville, University of Tennessee campus, *LRH20806*, 5-mayo-1953 (TENN). *RHP25590*, 21-junio-1963 (TENN). *E. Badham 113*, summer 1977 (TENN). *A. D. Sime 9948*, 19-agosto-1998 (TENN). Timberlake road, *LRH20410*, 31-mayo-1952 (TENN). *LRH26047*, 29-abril-1969 (TENN). Hesler's house, *LRH26268*, 16-julio-1964 (TENN).

***Melanoleuca* sp9**

SUECIA. Böhuslan: Tänum, Tänum, Kragenäs, *LAS85-142A*, 17-agosto-1985 (GB).

***Melanoleuca* sp10**

ESTADOS UNIDOS. Tennessee: Knox County, Knoxville, *LRH16740*, 29-marzo-1945 (TENN).
Utah: Weber County, Ogden, Pingree Park, *Rogerson 4108*, 30-agosto-1971 (TENN).

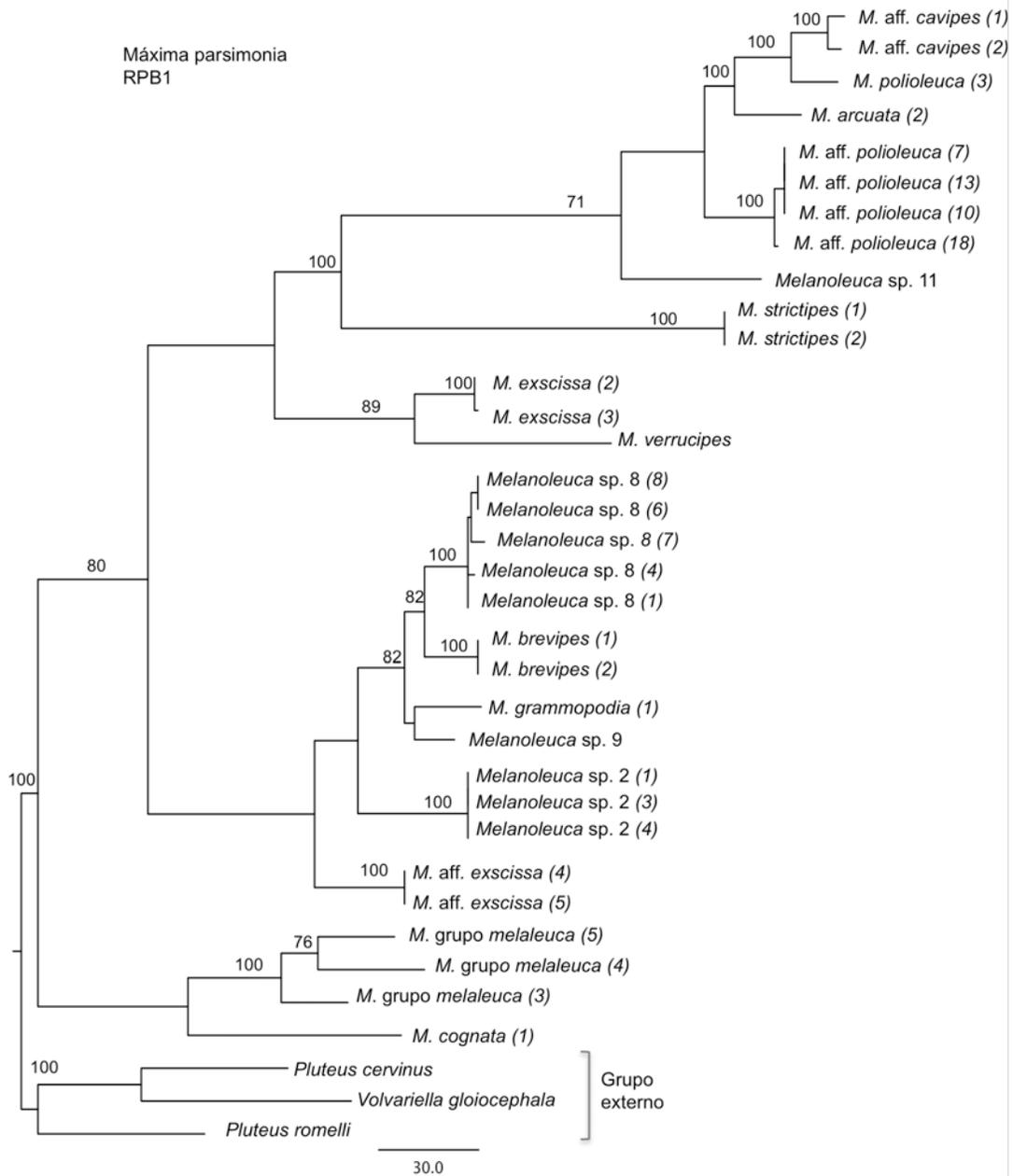
***Melanoleuca* sp11**

ARGENTINA. Chubut: Parque Nacional los Alerces Esquel Futaleufu, *RHP8331*, 9-mayo-1996 (TENN)

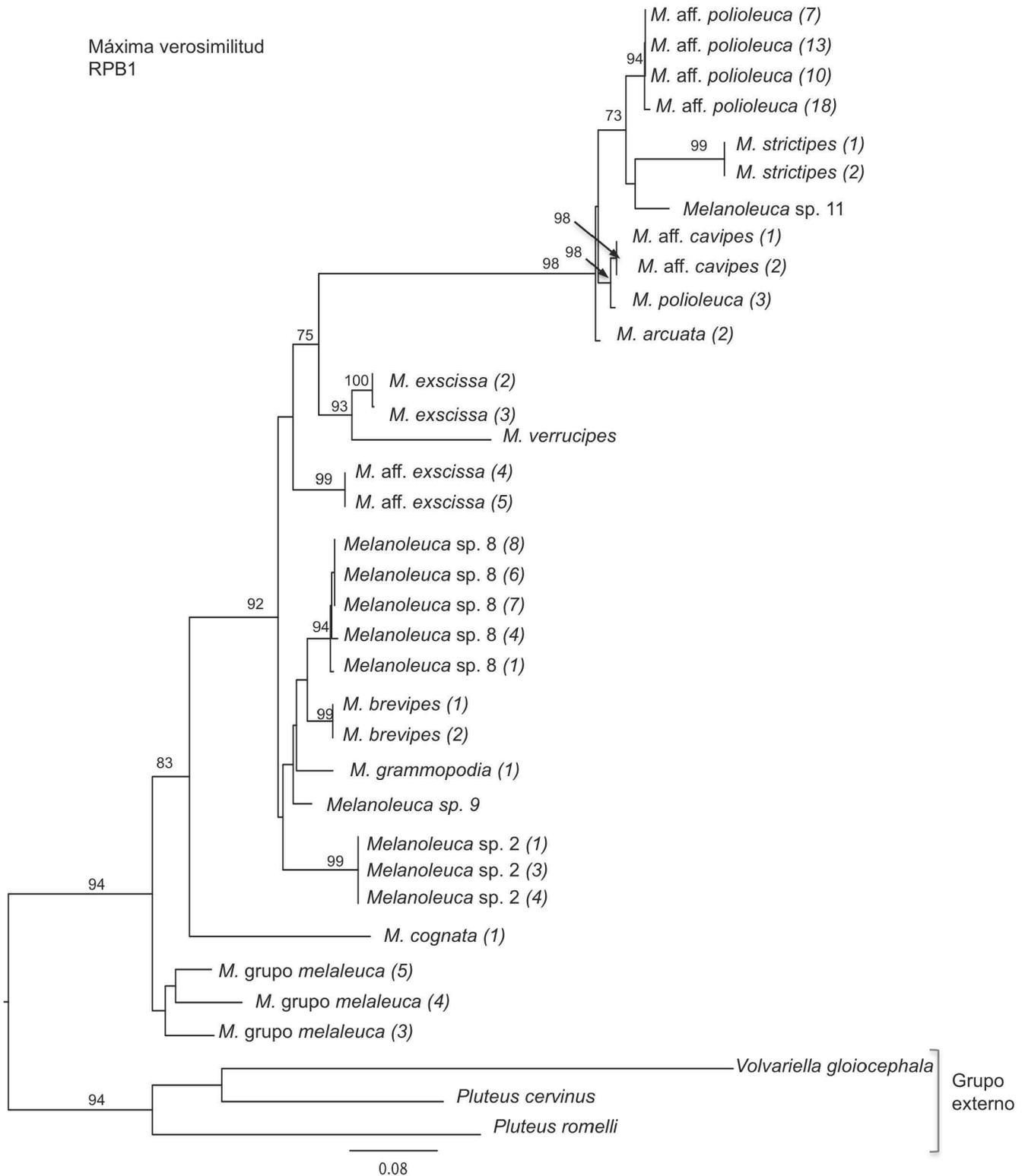
Melanoleuca* grupo *melaleuca

ESTADOS UNIDOS. Alaska: Anchorage County, Anchorage, Pop Carr Park, *TFB8206*, 17-septiembre-1995 (TENN). Juneau County, Juneau, Bridget Point State Park, *TFB8241*, 22-septiembre-1995 (TENN). **Idaho:** Kootenai County, Beauty Creek Drainage, Coeur d'Alene, *TFB5599*, 23-septiembre-1993 (TENN). **MÉXICO. Estado de México:** El Capulín, Nevado de Toluca, *J. Cifuentes 2005-292*, 2-septiembre-2005 (FCME). **Michoacán:** Mpio. Angangueo, Reserva Especial de la Biósfera de la Mariposa Monarca (REBMM), *Ruan, González y Montañez 320*, 18-agosto-2000 (FCME). **Tlaxcala:** 5-6 km al E de San Francisco Xavier Mina, ladera SE del Volcán la Malinche, Parque Nacional la Malinche, *Montoya-Esquivel 1404*, 16-junio-2005 (TLXM). **SUECIA. Gotland:** Gotland, Viklau, nära fornborgen VSV Viklaus kyrka, *LAS00-194*, 22-septiembre-2000 (GB).

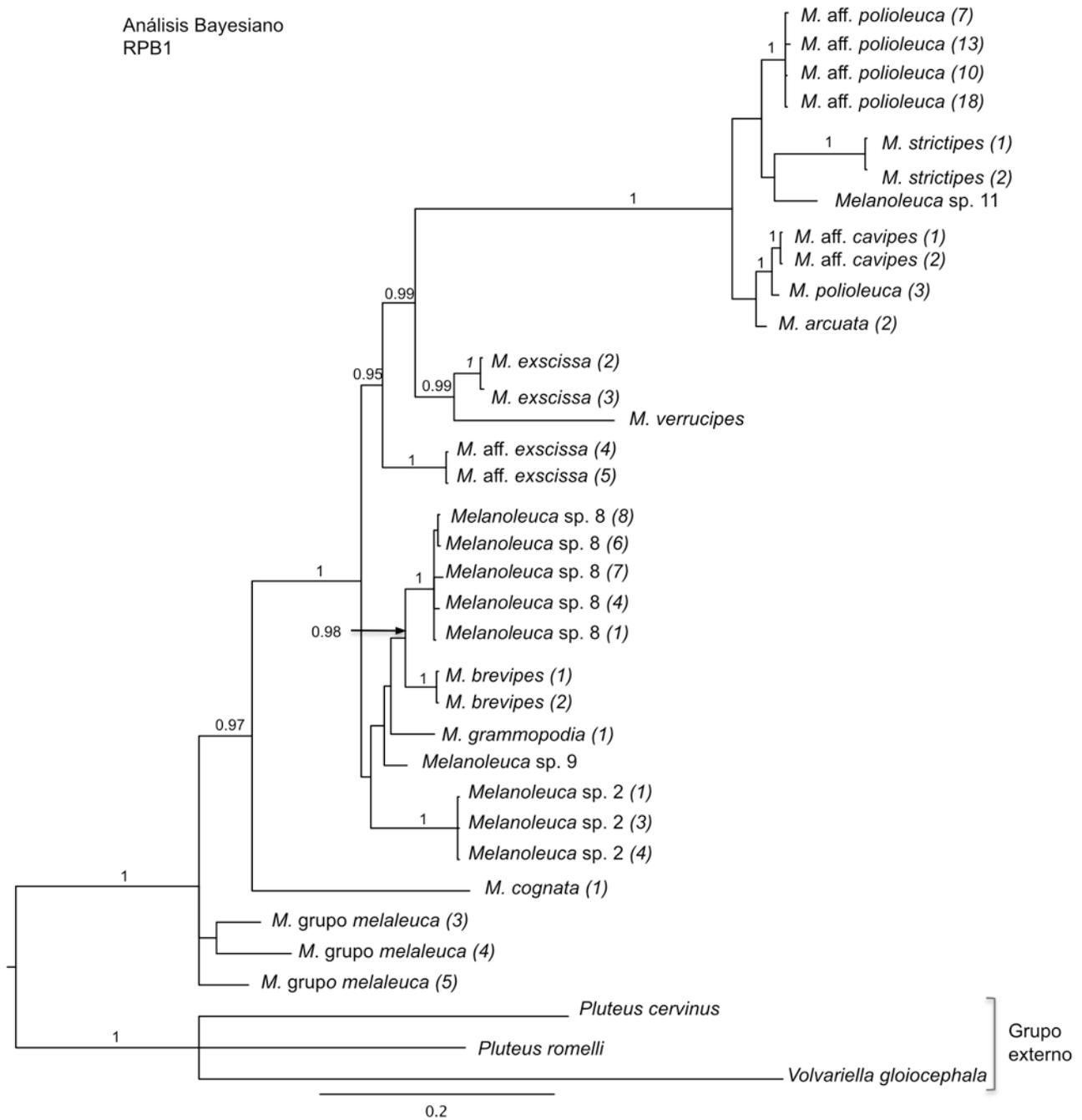
Anexo 2. Árboles filogenéticos obtenidos de cada matriz mediante los tres criterios utilizados en este trabajo (MP, ML, AB).



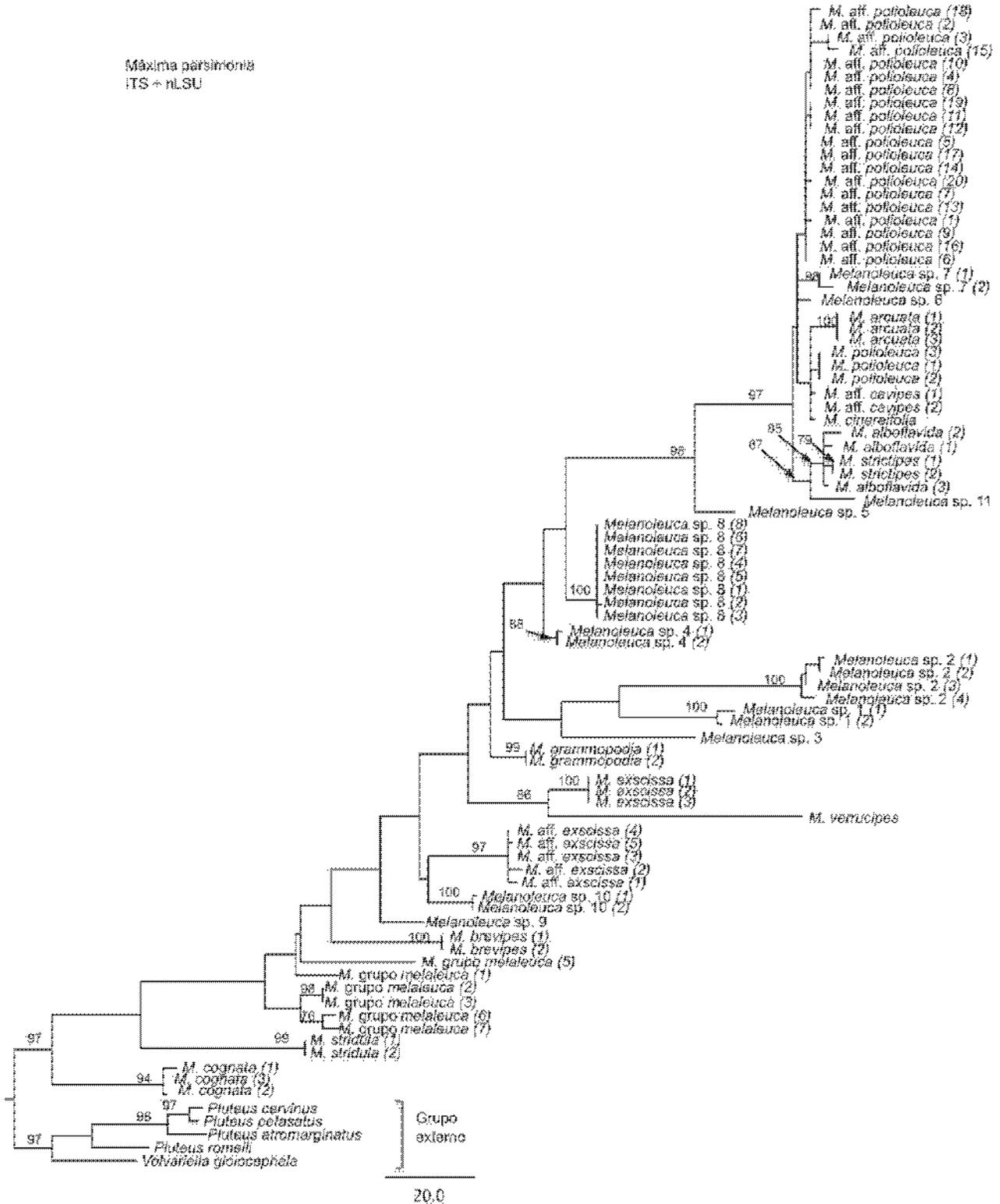
Uno de los 161 árboles más parsimoniosos obtenido a partir del análisis de RPB1. Los valores de bootstrap ≥ 70 se indican arriba de las ramas (L = 976, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.5337, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.4663, RI = 0.8054, RC = 0.4572).



Árbol obtenido mediante el criterio de máxima verosimilitud a partir del análisis de RPB1 (modelo evolutivo TN+I+G, $-lnL = 5229.45785$). Los valores de bootstrap ≥ 70 se indican arriba de las ramas.

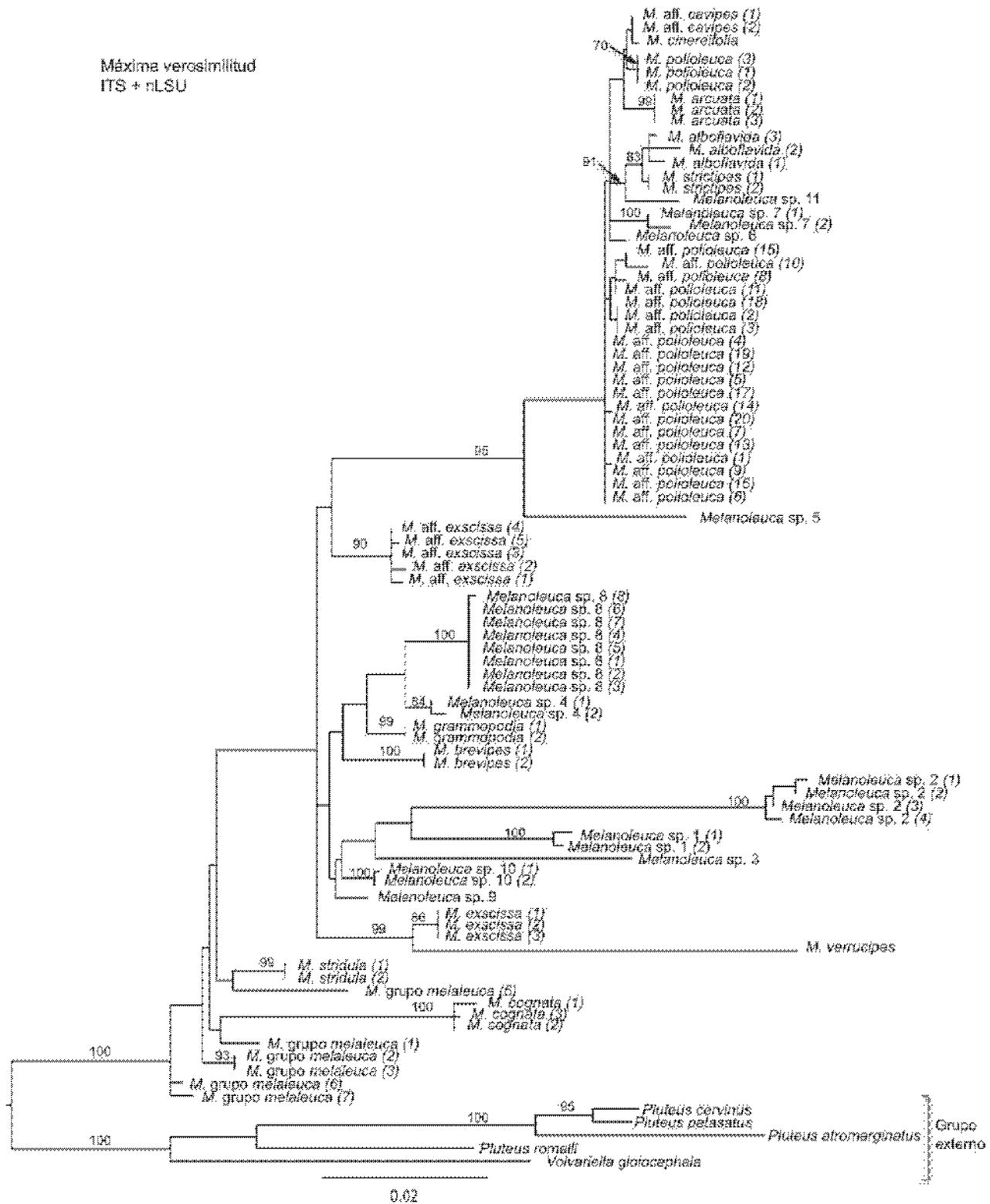


Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de la región RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P4, en la que se separaron cuatro regiones: intrón y cada una de las posiciones del exón (1^a, 2^a y 3^a).



Uno

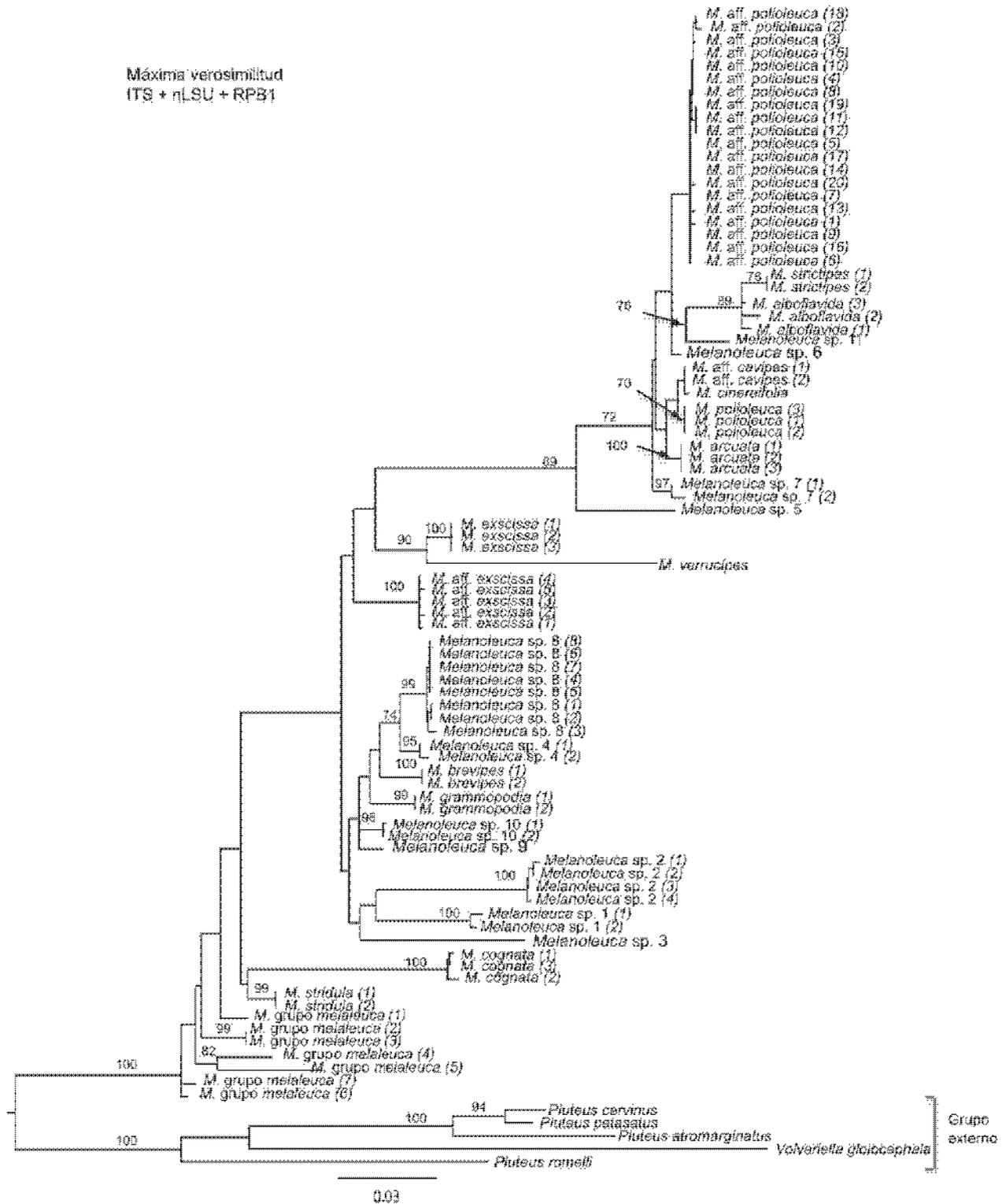
de los 148 árboles más parsimoniosos de los genes ribosomales: ITS+nLSU. Los valores de bootstrap ≥ 70 se indican arriba de las ramas (L = 721, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.4875, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.4125, RI = 0.8753, RC = 0.5014).



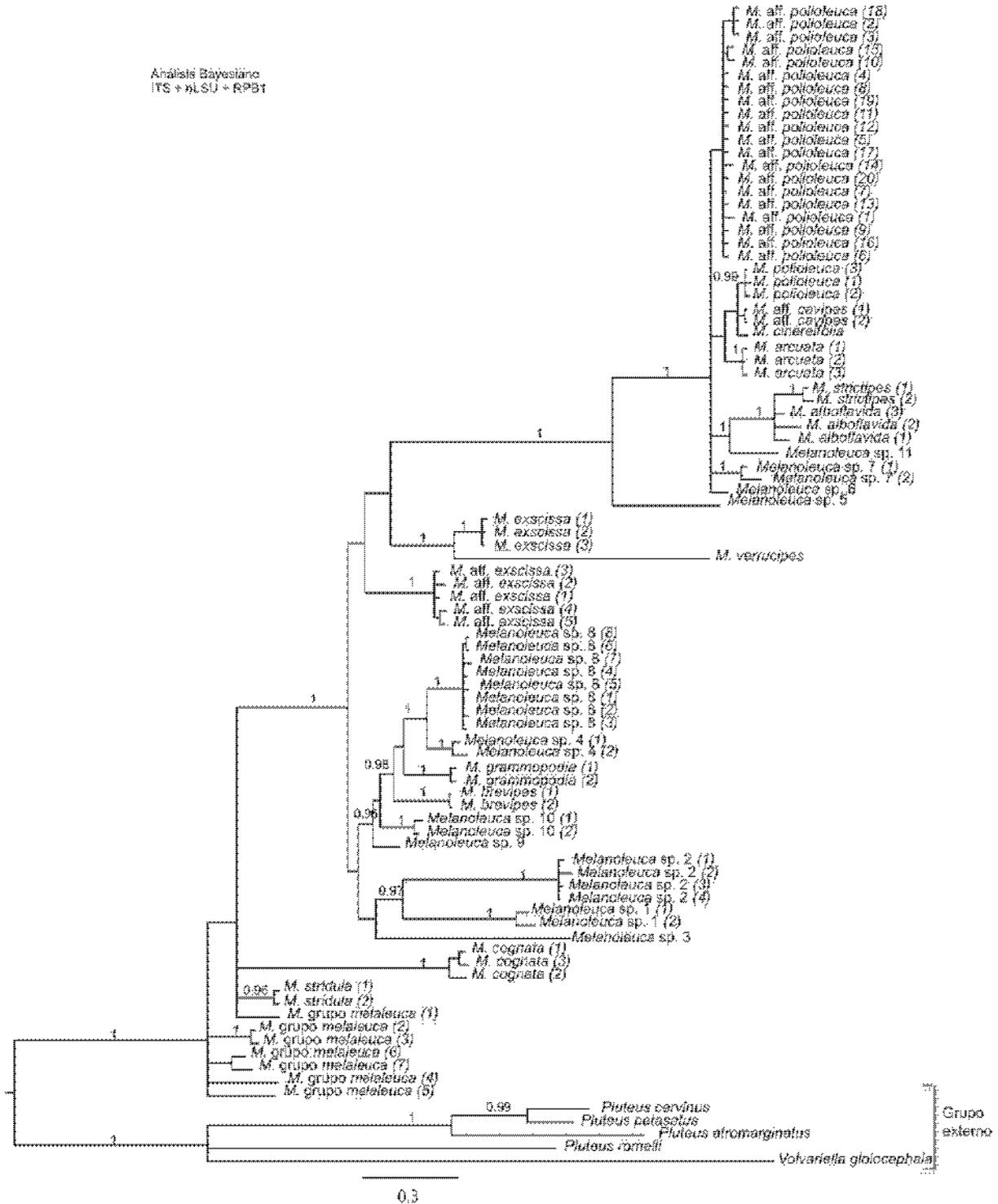
Árbol obtenido mediante el análisis de máxima verosimilitud de los genes ribosomales: ITS+nLSU (modelo evolutivo TPM+I+G, -lnL = 6714.05802). Los valores de bootstrap ≥ 70 se indican arriba de las ramas.



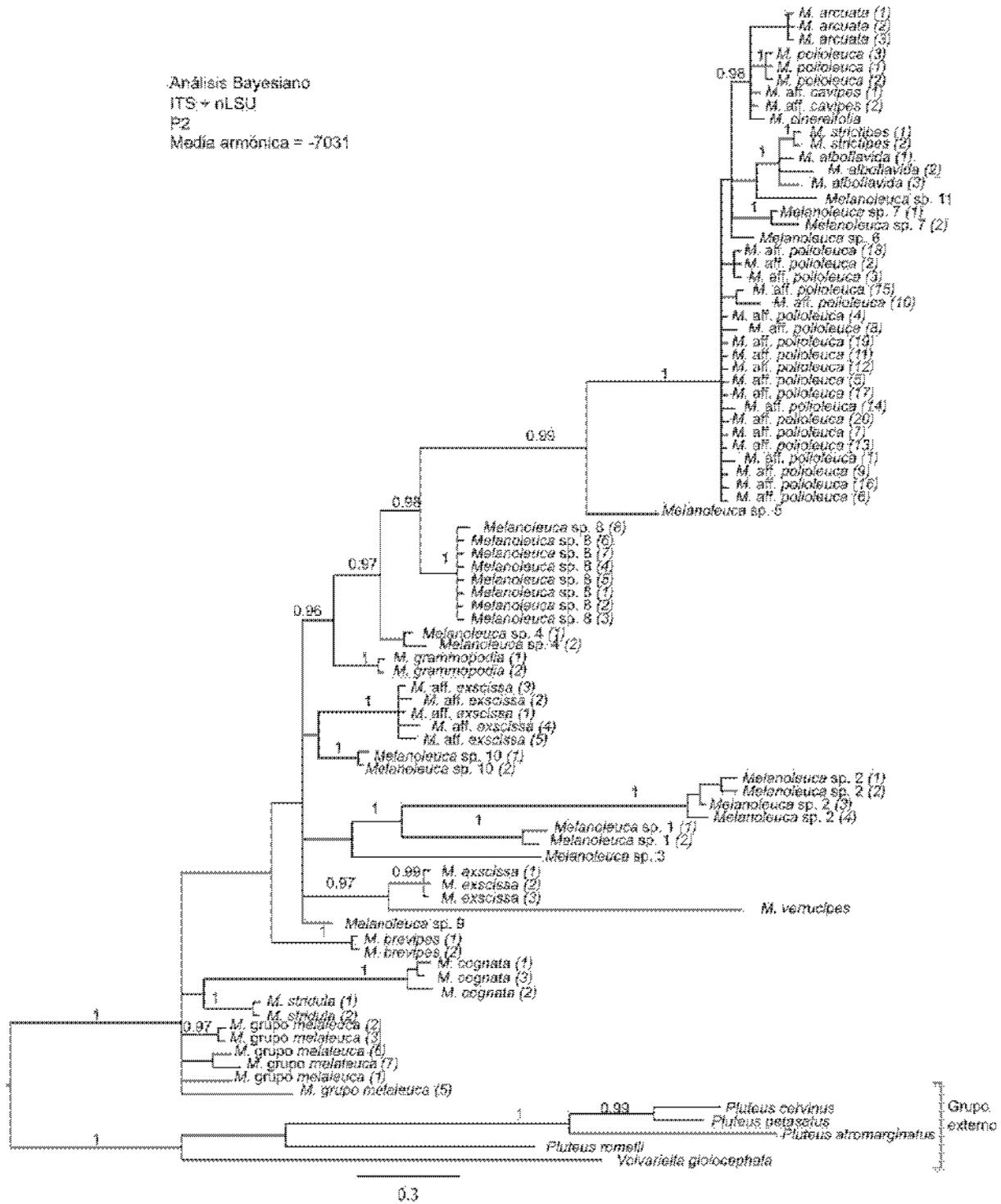
Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de los genes ribosomales: ITS+nLSU. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P3, en la que se separaron tres regiones: ITS, LSU y 5.8S.



Árbol obtenido mediante el análisis de máxima verosimilitud de las regiones: ITS+nLSU+RPB1 (modelo evolutivo TN+I+G, $-lnL = 12200.32763$). Los valores de bootstrap ≥ 70 se indican arriba de las ramas.

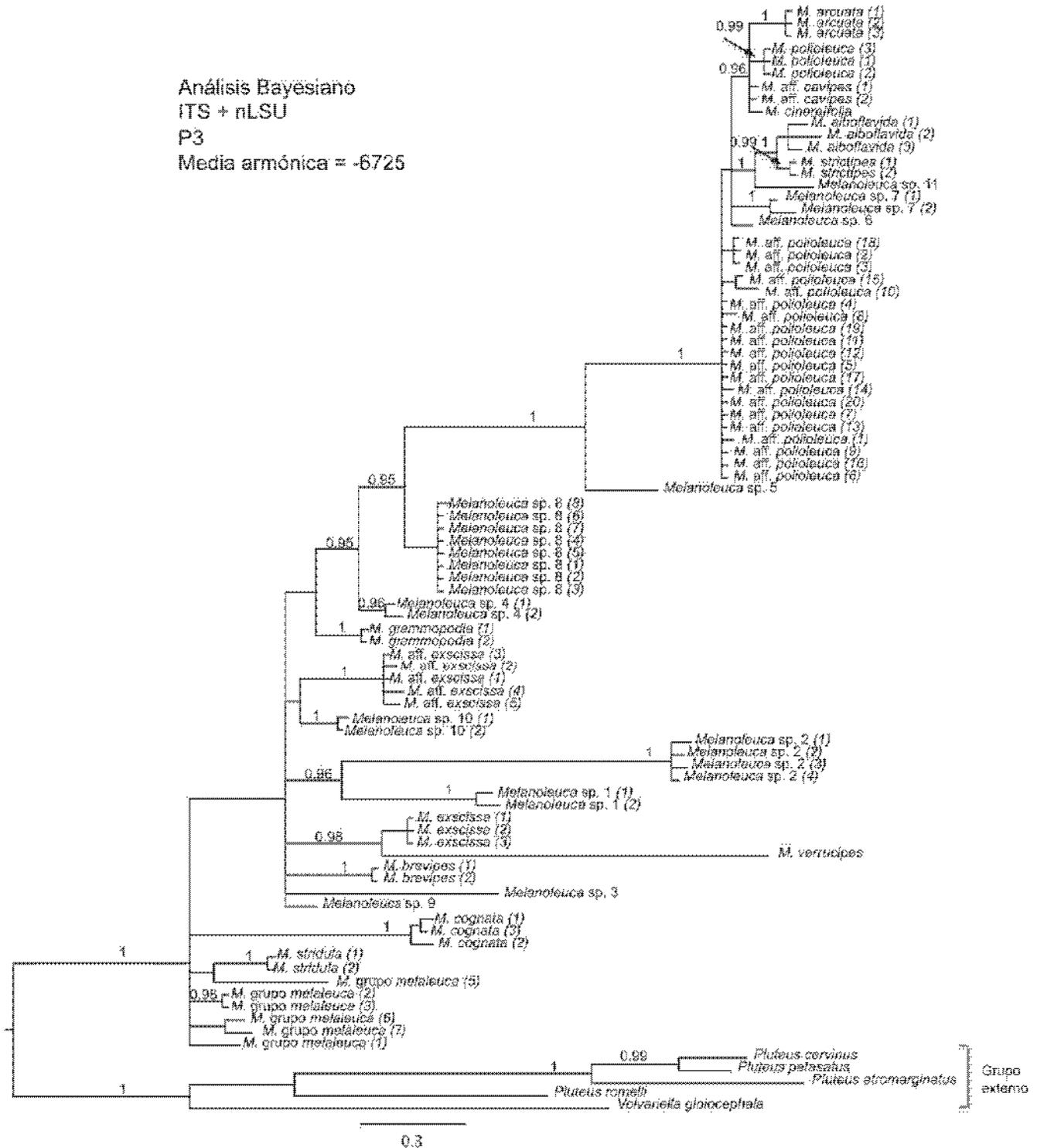


Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P8, en la que se separaron seis regiones: LSU, ITS, 5.8S, RPB1-intrón, RPB1-exón 1ª y 2ª posición y RPB1-exón 3ª posición.

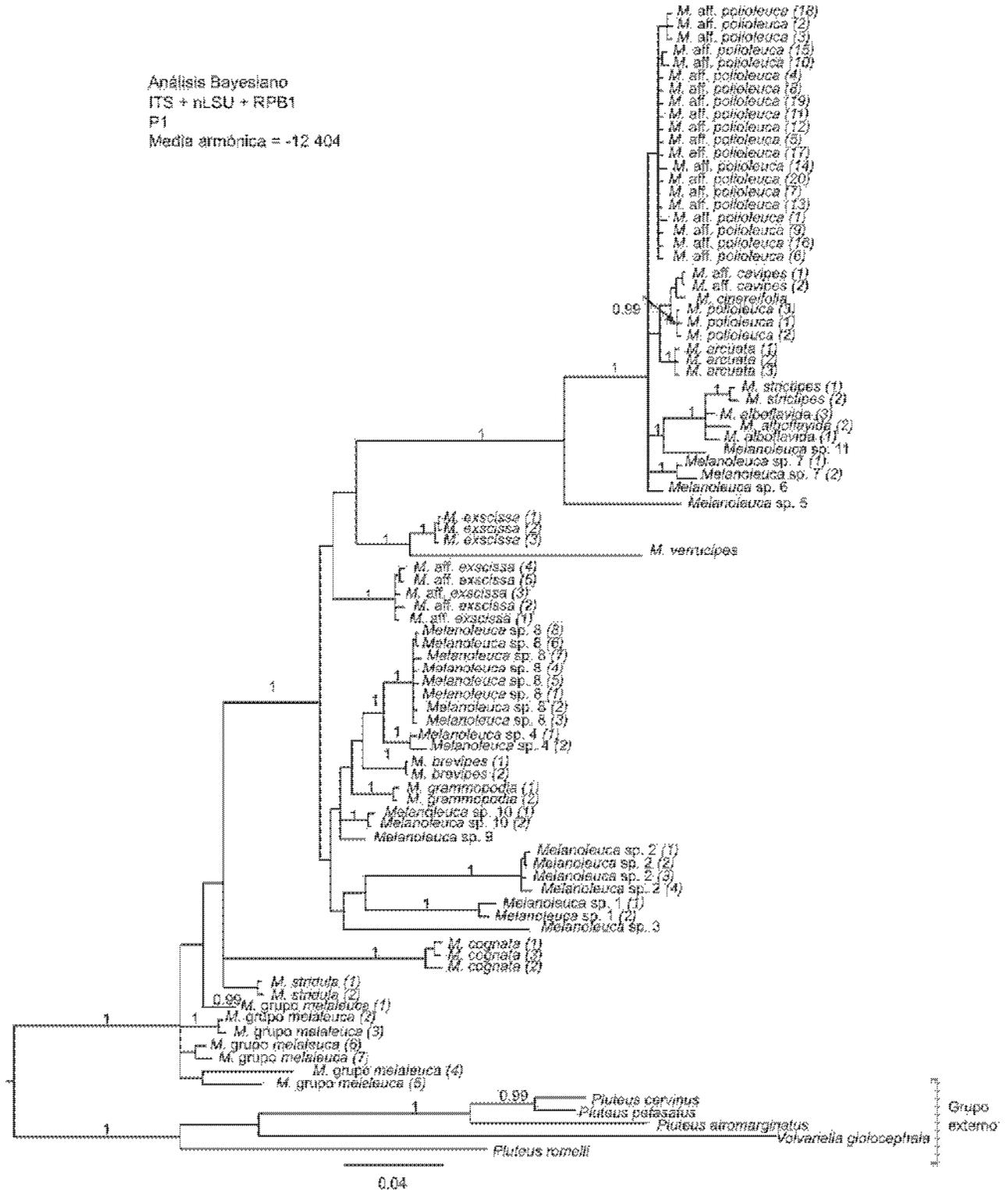


Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de los genes ribosomales: ITS+nLSU. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P2, en la que se separaron dos regiones: ITS (región completa, incluyendo 5.8S) y LSU.

Análisis Bayesiano
ITS + nLSU
P3
Media armónica = -6725

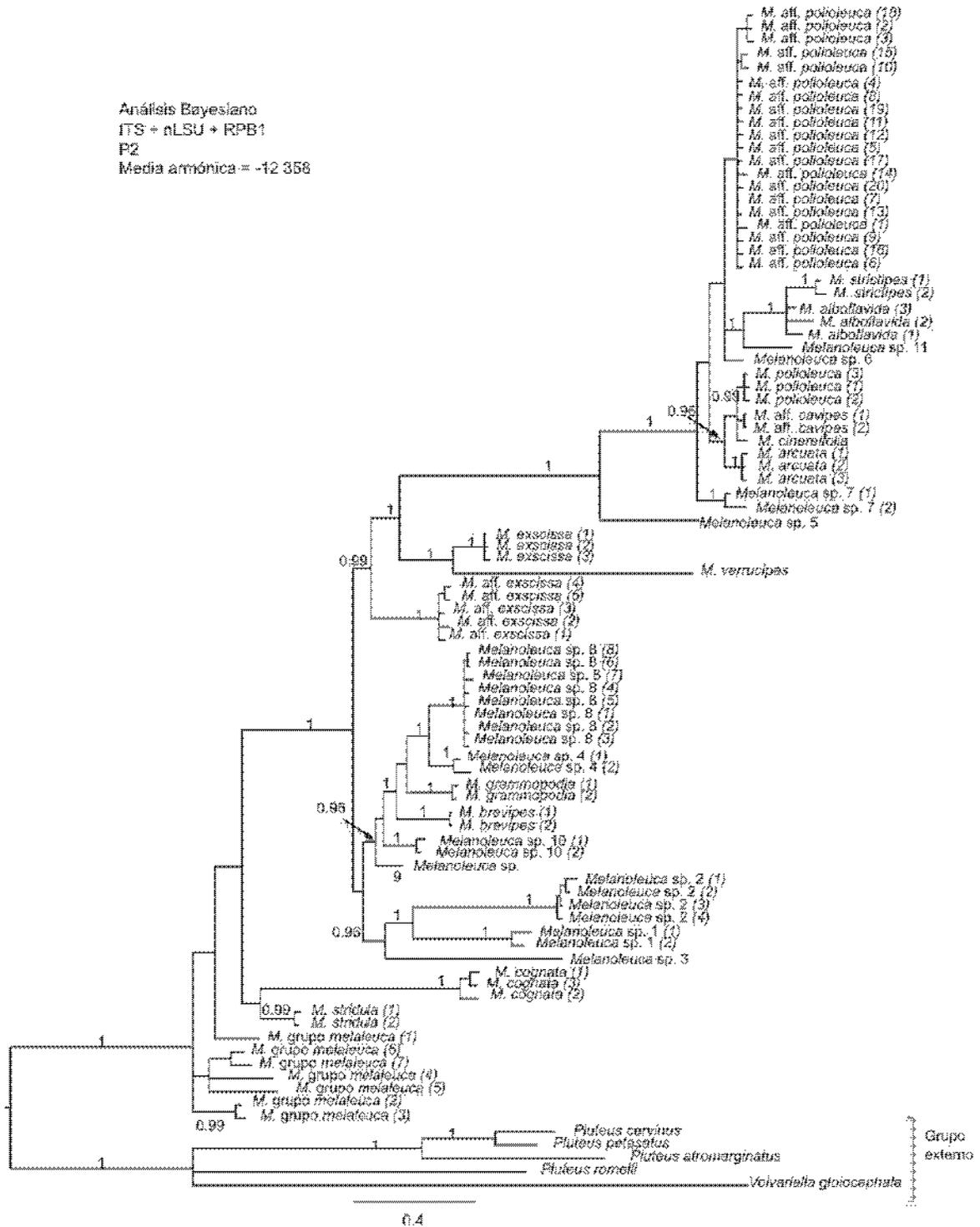


Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de los genes ribosomales: ITS+nLSU. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P3, en la que se separaron tres regiones: ITS (1 y 2), LSU y 5.8S.



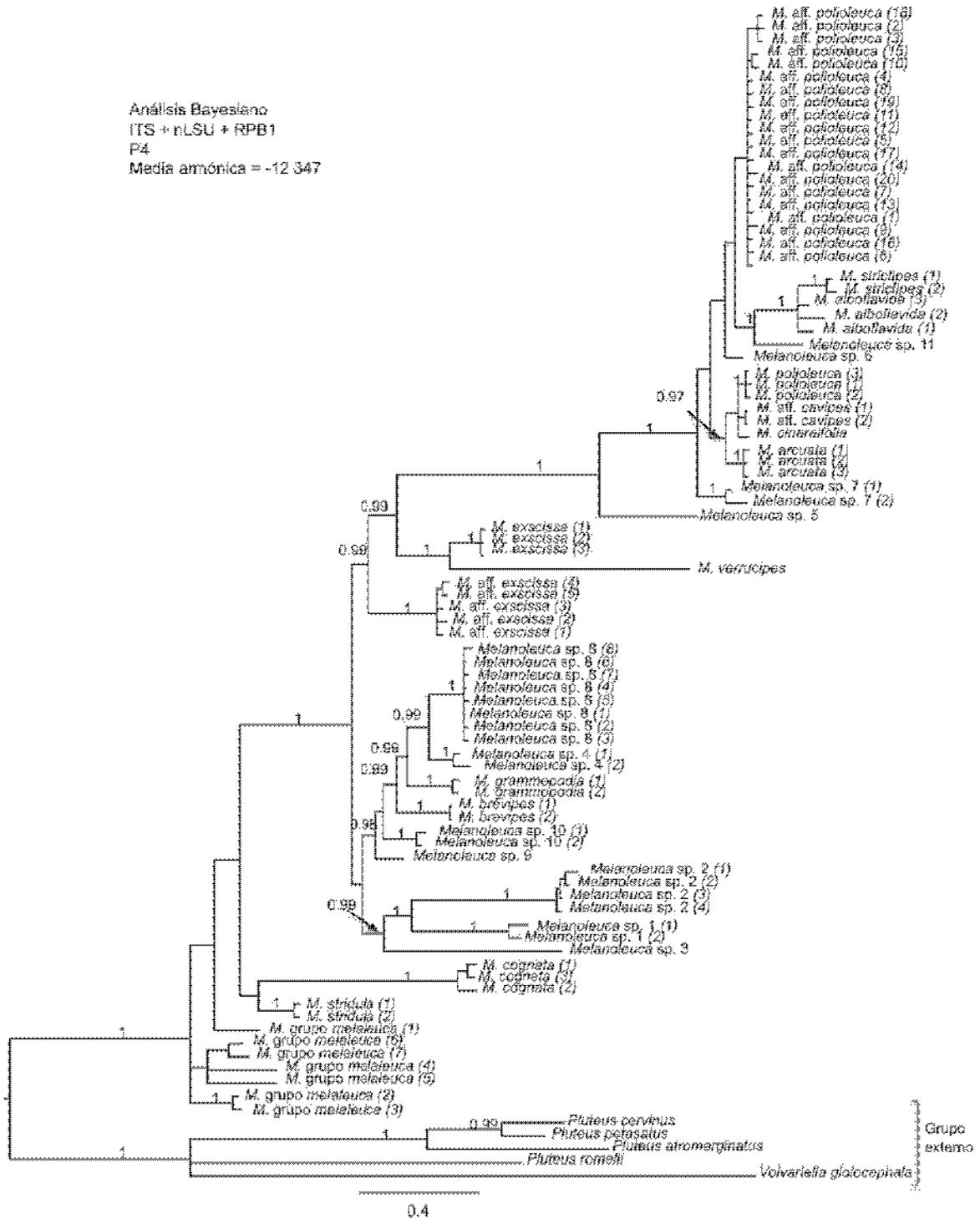
Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. En este caso no se hizo ninguna partición (P1).

Análisis Bayesiano
 ITS + nLSU + RPB1
 P2
 Media armónica = -12 358



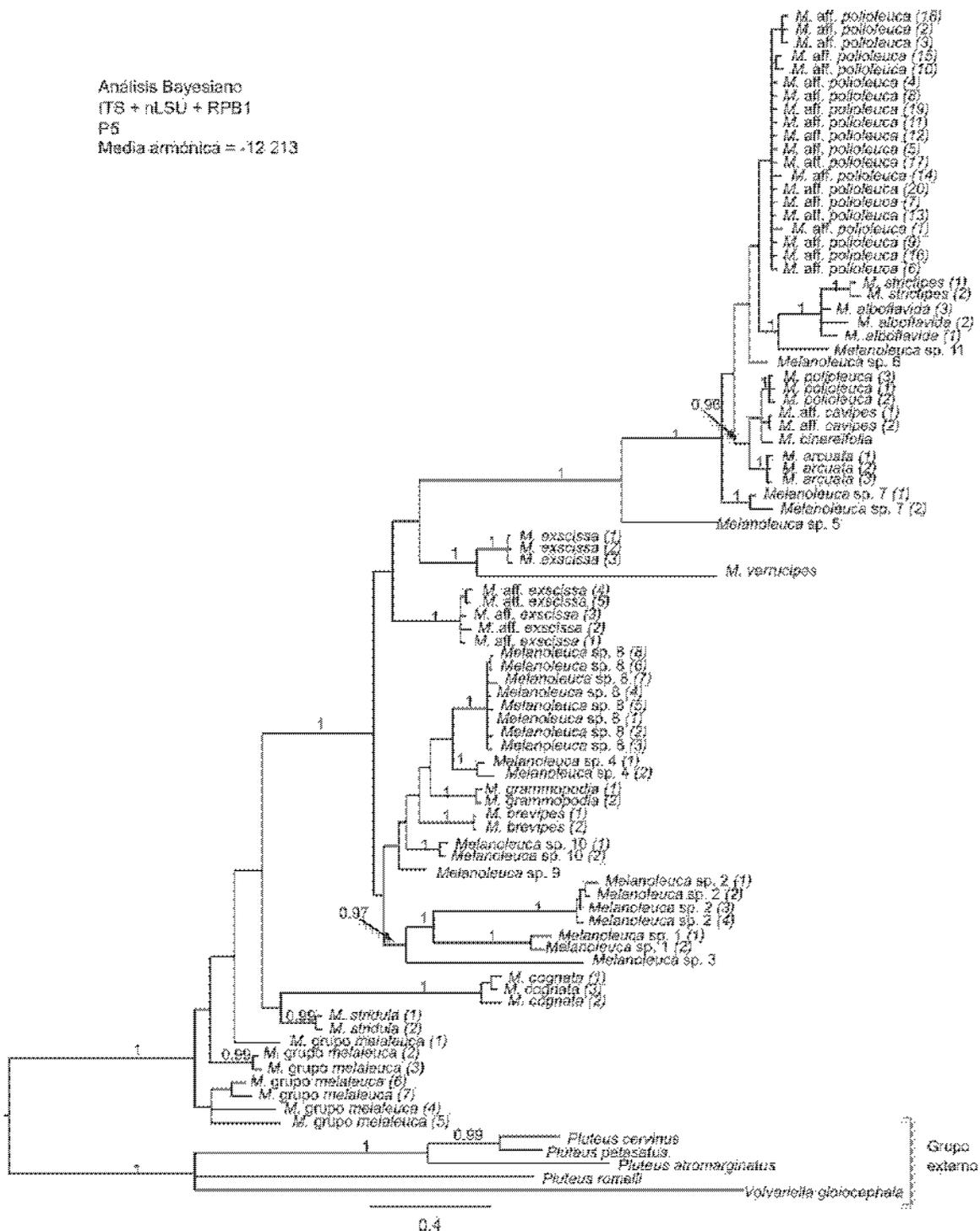
Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P2, en la que se separaron tres regiones: LSU, ITS (región completa, incluyendo 5.8s) y RPB1.

Análisis Bayesiano
 ITS + nLSU + RPB1
 P4
 Media armónica = -12.347

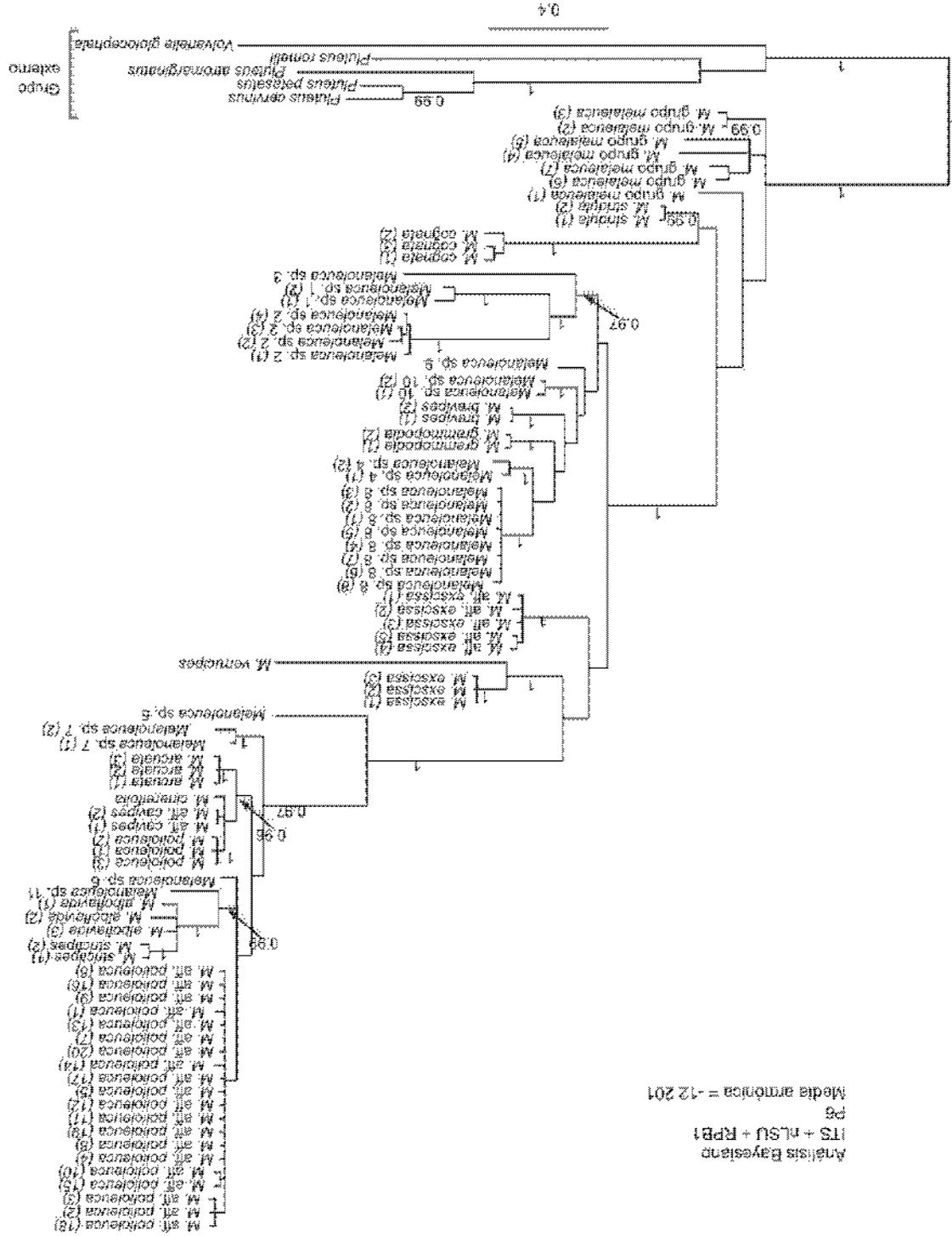


Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P4, en la que se separaron cuatro regiones: LSU, ITS (completo, incluyendo 5.8S), RPB1-intrón y RPB1-exón.

Análisis Bayesiano
 ITS + nLSU + RPB1
 P5
 Media armónica = -12 213



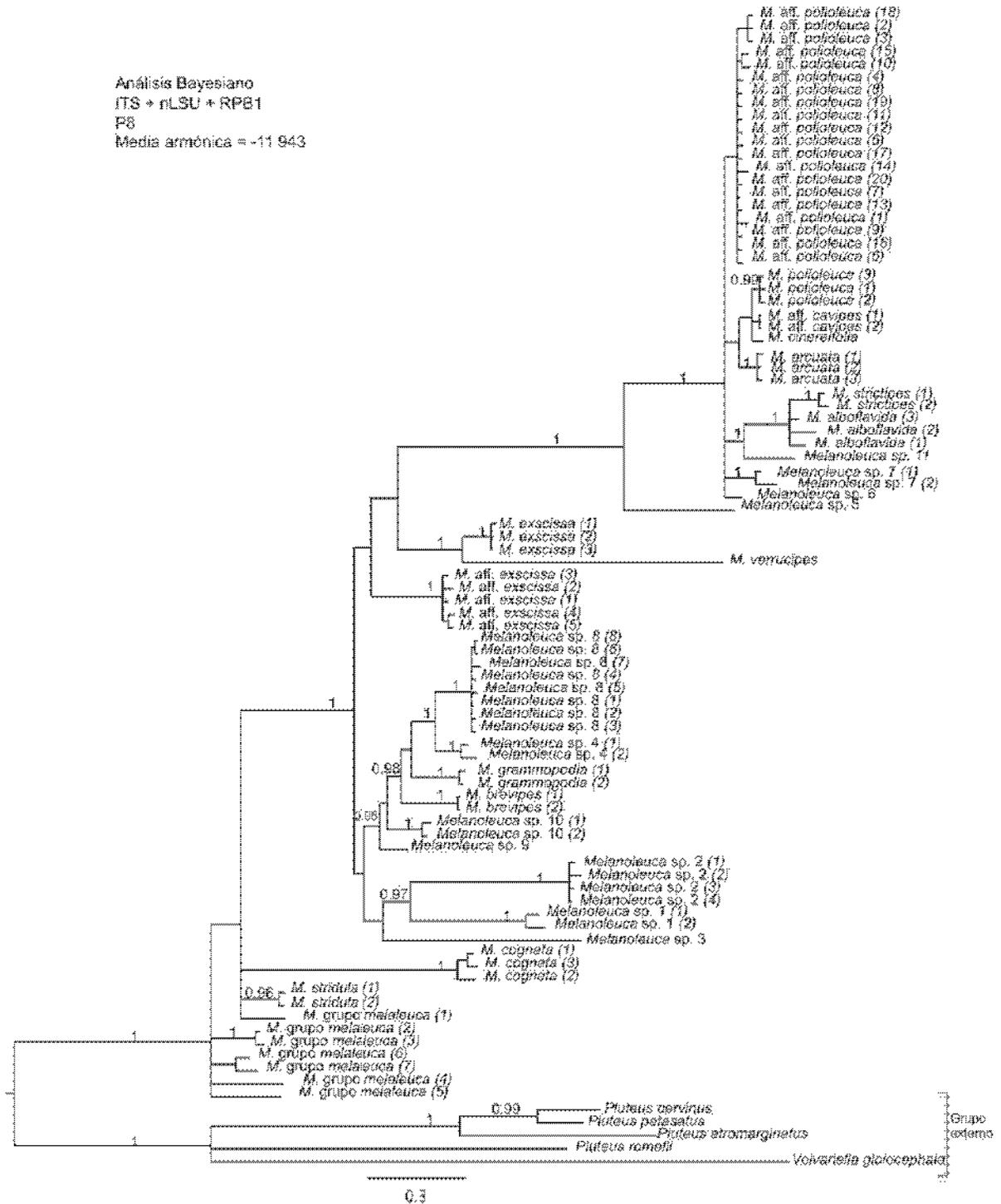
Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P5, en la que se separaron cinco regiones: LSU, ITS (completo, incluyendo 5.8S), RPB1-intrón, RPB1-exón 1^a y 2^a posición y RPB1-exón 3^a posición.



Análisis Bayesiano
ITS + nLSU + RPB1
P6
Media aritmética = -12.201

Arbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P6, en la que se separaron seis regiones: LSU, ITS (completo, incluyendo 5.8S), RPB1-intrón y cada una de las posiciones del exón (1ª, 2ª y 3ª).

Análisis Bayesiano
 ITS + nLSU + RPB1
 P8
 Media armónica = -11 943



Árbol consenso de mayoría del 50% obtenido mediante el análisis Bayesiano de las regiones: ITS+nLSU+RPB1. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican arriba de las ramas. La estrategia de partición utilizada fue la P8, en la que se separaron seis regiones: LSU, ITS, 5.8S, intrón, RPB1-exón 1^a y 2^a posición y RPB1-exón 3^a posición.

