



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LAS
ESPECIES DE *AMANITA* SECCIÓN
CAESAREAE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

SANTIAGO SÁNCHEZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL I. PIÑERO DALMAU

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 04 de abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del alumno **SANCHEZ RAMIREZ SANTIAGO** con número de cuenta **510007984** con la tesis titulada "**Sistemática molecular de las especies de Amanita de la sección *Caesareae***", realizada bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU:**

Presidente: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
Vocal: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Secretario: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Suplente: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Suplente: DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de mayo de 2011.

M: del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de enriquecer mi conocimiento científico mediante los excelentes cursos académicos que ofrece su planta académica de primerísimo nivel.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su Programa de Becas Nacionales que me dio confiablemente un ingreso durante el posgrado, y en este contexto me permitió crecer en lo personal, en lo social y en lo económico. También quisiera agradecer profundamente apoyos adicionales del Posgrado en Ciencias Biológicas (PAEP) y CONACYT (Becas Mixtas) por financiar una estancia de investigación en el extranjero, angular para la culminación de mi tesis y mi crecimiento académico.

Al Dr. Daniel Piñero Dalmau, mi tutor principal, quisiera expresarle mi más sincera y humilde gratitud; en primer lugar por confiar en las aspiraciones e inquietudes de un joven lacónico e impasible pero de fuertes convicciones. Y en segundo lugar, por ofrecer su total apoyo ante mis (espontáneas) decisiones, y también por compartir conmigo en todo momento sus opiniones siempre francas.

Al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, miembro de mi comité tutorial, me gustaría agradecerle enormemente por considerarme como uno más de sus pupilos, incluso antes de formar parte de mi comité. Nuestras largas pláticas y discusiones (micológicas en su mayoría) siempre resultaron enriquecedoras y mutuamente ilustrativas. Le agradezco su constante apoyo incondicional en lo personal y en lo académico, y sobretodo sus siempre inspirantes expectativas hacia mí.

A la Dra. Laura Guzmán Dávalos, también integrante de mi comité tutorial, me gustaría agradecerle el interés, el empeño, el compromiso y el completo profesionalismo que mostró ante mi proyecto de tesis y mis inquietudes como micólogo. A pesar de la distancia siempre estuvo presente (muy presente) en la conducción de un trabajo pequeño y ambicioso que pronto sobrepasó más de lo esperado.

Al Dr. Jean-Marc Moncalvo, aunque no es oficialmente un co-tutor, fungió como tal en el momento más adecuado. Gracias a él fue posible hacer crecer este trabajo a gran escala, sobretodo en la cantidad de datos, en la cantidad de muestras y en la calidad del análisis. También le agradezco extraordinariamente la paciencia, el apoyo y la ayuda desinteresada que siempre mostró hacia mí. También le debo en gran parte mi crecimiento científico. De igual manera quisiera agradecer a su personal técnico, MSc. Simona Margaritescu, que en el laboratorio me enseñó mucho más de lo que pude aprender y trabajó en mi proyecto como si fuera suyo.

Al Dr. Rodham E. Tullloss me gustaría agradecerle su inusitada hospitalidad y su interés por nuevas hipótesis y evidencias con respecto a *Amanita*. Siempre será para mí un regocijo discutir con él temas micológicos sobre *Amanita*.

Quisiera agradecer a los curadores y al personal técnico de los herbarios que aportaron entusiastamente muestras de valiosos especímenes. Ellos fueron: Biol. Florencia Ramírez Guillén (XAL), M. en C. Elvira Aguirre Acosta (MEXU), Biol. Lilia Pérez Ramírez (FCME) y M. en C. Ricardo Valenzuela Garza (ENCB).

A los sinodales que fungieron como jurado de examen de grado, el Dr. Roberto Garibay Orijel, la Dra. Margarita Villegas Ríos y la Dra. Gabriela Parra Olea, por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron enormemente el manuscrito de tesis.

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	8
2.1 <i>Morfotaxonomía y sistemática de la sección Caesareae</i>	8
2.2 <i>Biología de Amanita caesarea y especies afines</i>	12
2.3 <i>Marcadores moleculares y estudios filogenéticos sobre Amanita</i>	14
2.4 <i>Especie fúngica: el criterio filogenético y la concordancia genealógica</i>	17
3. Objetivos	20
4. Hipótesis	20
5. Materiales y métodos	21
5.1 <i>Material biológico</i>	21
5.2 <i>Extracción de ADN, protocolos de PCR y secuenciación</i>	21
5.3 <i>Alineamiento, particiones y preparación de las matrices de datos</i>	23
5.4 <i>Congruencia de datos y homogeneidad filogenética</i>	24
5.5 <i>Análisis filogenético</i>	24
6. Resultados	26
6.1 <i>Sistemática seccional</i>	26
6.2 <i>Estadísticos de matrices de datos y árboles</i>	28
6.4 <i>Variación de secuencias</i>	30
6.5 <i>Datos faltantes</i>	31
6.6 <i>Análisis filogenéticos</i>	31
7. Discusiones	33
7.1 <i>Delimitación de especies</i>	33
7.2 <i>Propuestas de código de barras</i>	38
7.4 <i>Caracteres morfológicos</i>	39
7.5 <i>Interpretaciones biogeográficas</i>	44
8. Conclusiones	48
9. Referencias	49
10. Apéndice de tablas y figuras	62

Resumen

La sección *Caesareae* comprende un grupo de especies de *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota) considerado monofilético, y que se caracterizan principalmente por la presencia de basidiosporas inamiloides, anillo y volva bien desarrollados, un píleo con estrías marginales y fíbulas en la base de los basidios. Estos hongos forman asociaciones simbióticas de tipo mutualista con plantas vasculares, denominadas ectomicorrizas, extendiéndose más allá de bosques templados y boreales en el hemisferio Norte. Algunas especies son consideradas de gran valor gastronómico y etnomicológico, repercutiendo en la economía y cultura local de algunas sociedades. El objetivo de este trabajo es utilizar un enfoque filogenético a través del análisis de secuencias múltiples de ADN para mejorar el conocimiento acerca de la historia evolutiva de este grupo, así como para determinar las relaciones evolutivas que existen entre las especies. Cuatro regiones genómicas (*ITS*, *LSU*, *RPB2*, *efl- α*) fueron amplificadas y secuenciadas de un total de 119 muestras que representan cerca de 50 especies de la sección. Las variantes analíticas incluyeron Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Análisis Bayesiano. Una prueba de homogeneidad particionada y análisis bayesianos independientes (por locus) revelaron congruencia filogenética entre regiones. Un análisis inicial, utilizando regiones conservadas (*LSU*, *RPB2*, exones de *efl- α*), delimitó los principales grupos considerados en este trabajo como subsecciones (*Caesarea*, *Albescens*, *Brevifulva*, *Calyptratoides*, *Murrilliana*). Después, las secuencias variables (*ITS* e intrones de *efl- α*) fueron incorporadas haciendo alineamientos por subsección, lo que llevó a la construcción de dos matrices. Los análisis filogenéticos revelaron que el arreglo subseccional es consistente con caracteres macroscópicos como lo son la coloración (pigmentos) y conformación (tamaño, forma) del basidioma, mientras que los caracteres microscópicos (estructura del subhimenio, tamaño de basidiosporas) eran homoplásicos a nivel subseccional. Comparativamente, se detectó mayor variación molecular en las regiones *ITS* y *efl- α* , las cuales pueden ser buenos códigos de barras en este grupo. Se delimitaron algunas especies con base en criterios integrativos (morfología, biogeografía, filogenia). Algunas especies resultaron ser nuevas para la ciencia. La mayoría de las especies filogenéticas encontradas coincide con un concepto morfológico, a excepción de un grupo diverso (*complex. hemibapha*) que necesita mayor análisis taxonómico y filogenético. Se detectaron patrones biogeográficos dentro de las subsecciones *Caesarea* y *Albescens*. En ambas se propone un origen Gondwánico, seguido

de una migración pasiva a través de la masa continental Índica hacia el Sureste Asiático durante el Eoceno. Debido a la ubicuidad de los miembros de la subsección *Caesarea* en el hemisferio Norte se asume que el grupo se diversificó rápidamente.

Abstract

Section *Caesareae* includes a group of species from the genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota) that are recognized mainly by having inamyloid spores, well-developed annulus and volva, marginal striations, and clamp connections at the base of the basidia. Previous studies have demonstrated that this group is monophyletic. Moreover, these fungi establish mutualistic symbiotic associations with woody plants, known as ectomycorrhizae, extending beyond temperate and boreal ecosystems in the Northern hemisphere. Some species are considered valuable gastronomic and ethnomycological resources, having a strong impact in local economical and cultural affairs for some societies. Our objective was to use a multigene phylogenetic approach to improve the knowledge on the evolutionary history within *Amanita* section *Caesareae*, and elucidate phylogenetic relationships among species. Four genomic regions (*ITS*, *LSU*, *RPB2*, *efl- α*) were amplified and sequenced from 119 samples that represent near 50 species of the section. Analytical approaches included Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian Inference. A partition homogeneity test and independent by-locus analyses revealed phylogenetic congruence between loci. An initial analysis, using only conserved regions (*LSU*, *RPB2*, *efl- α* exons), delimited the main groups considered here as subsections (*Caesarea*, *Albescens*, *Brevifulva*, *Calyptratoides*, *Murrilliana*). Variable regions (*ITS*, *efl- α* introns) were used when doing by-subsection homologous alignments, which lead to the construction of two separated matrices. Phylogenetic analyses revealed a subsectional arrangement consistent with macroscopic features such as basidiome coloration (pigmentation) and conformation (size, form), while microscopic characters (subhymenial structure, spore size) were homoplastic at a subsectional level. Comparatively, more molecular variation was detected within *ITS* and *efl- α* regions, markers that could function well as DNA barcodes. Some species were delimited based on integrative criteria (morphology, biogeography, phylogeny). New-to-science species were also found with this approach and new combinations suggested. One highly diverse group (*complex. hemibapha*) was detected within subsection *Caesarea* that certainly needs more taxonomic and phylogenetic exploration. Some biogeographic patterns were found within subsections *Caesarea* and *Albescens*. In both cases a Gondwanean origin is proposed, followed by a passive migration through the Indian continental landmass to Southeast Asia during the Eocene. Due to the ubiquity of members

of subsection *Caesarea* throughout the Northern hemisphere a rapid diversification process is assumed.

1. Introducción

Amanita Pers. es uno de los géneros mejor estudiados a nivel morfológico y molecular (Moreno et al., 2008). Los principales trabajos modernos sobre taxonomía y sistemática de *Amanita* han sido realizados por Singer (1951, 1986), Corner & Bas (1962), Bas (1969), y más recientemente por Yang (1997) y Tulloss (2009a). Los investigadores que han trabajado tanto aspectos moleculares como morfológicos en *Amanita* en general están de acuerdo con la clasificación infragenérica, que incluye la división del género en dos subgéneros: *Amanita* y *Lepidella* Corner & Bas, tres secciones (*Amanitae*, *Vaginatae* Corner & Bas, *Caesareae* Singer) pertenecientes al primero, y cuatro secciones (*Amidella*, *Lepidella*, *Phalloideae*, *Validae*) que pertenecen al segundo. Cada sección y subgénero tiene rasgos morfológicos particulares y su monofilia ha sido confirmada por estudios filogenéticos independientes de ADN ribosomal (Weiß et al., 1998; Drehmel et al., 1999; Moncalvo et al., 2000a, 2002; Zhang et al., 2004; Justo et al., 2010). Agrupaciones infraseccionales de *Amanita* sección *Caesareae* han sido exploradas en el rango informal de estirpe por Tulloss (2009b).

Las especies de *Amanita* son principalmente subcosmopolitas con un número estimado de entre 500 y 1000 especies (Yang, 2000; Tulloss, 2005), incluyendo especies alucinógenas, venenosas y comestibles. Además, su ecología compete a interacciones simbióticas mutualistas mediante la formación de ectomicorrizas en las raíces de plantas vasculares dentro de ecosistemas de bosque templado y boreales (Trappe, 1962; Molina et al., 1992; Yang et al., 1999; Dahlberg, 2001; Taylor & Alexander, 2005; Smith & Read, 2008).

Amanita caesarea (Scop.) Pers. es la especie tipo de la sección *Caesareae* y es considerada como un valioso recurso gastronómico en Europa. Otras especies de la sección, con parecido morfológico, se han descrito principalmente en Norte América, Asia, y África, y se han comparado con especies Europeas (Bas, 1977; Guzmán & Ramírez-Guillén, 2001). Adicionalmente, estas especies tienen un valor etnomicológico (Härkönen, 2002; Garibay-Orijel et al., 2007; Christensen et al., 2008) y económico como hongos silvestres comestibles (Yun & Hall, 2004, Boa, 2004). No obstante su cultivo o producción no ha sido posible hasta ahora debido a múltiples impedimentos relacionados con la biología misma de los hongos ectomicorrizógenos (Savoie & Largeteau, 2011). La sección *Caesareae* también incluye otras especies no comerciales que comparten una serie integrada de

caracteres macro y micromorfológicos que representan información taxonómica de gran relevancia. Todas las especies descritas en la sección y algunas provisionales se han colocado en grupos hipotéticos por estirpe, enfocados fuertemente en rasgos como la estructura del subhimenio, tamaño y forma de basidiospora, distribución de pigmentos en el basidioma, y consistencia/tinción del basidioma (Tulloss, 1998, 2009b).

En hongos, el uso de caracteres macro- y micromorfológicos ha estado tradicionalmente relacionado con la delimitación de especies (Petersen & Hughes, 1999; Taylor et al., 2000, 2006a, b). La aplicación de este tipo de reconocimiento, ha llevado a la idea generalizada de que existen especies cosmopóliticas con poca variación morfológica. No obstante, estudios filogenéticos con datos moleculares en macrohongos muestran continuamente que los endemismos son bastante comunes debido a una estructuración geográfica y la adaptación local (e.g. Vilgalys & Sun, 1994; Wu et al. 2000; Coetzee et al., 2000, 2001a, b; James et al., 2001; Shen et al., 2002; Chapela & Garbelotto, 2004; Zervakis et al., 2004; Frøslev et al., 2005, 2007; Geml et al., 2006, 2008; Taylor et al., 2006c; Hughes et al., 2007; Nuytnick & Verbeken, 2007; Nuytnick et al., 2007; Carriconde et al., 2008; Hedh et al., 2008; Moncalvo & Buchanan, 2008). En el pasado, se han utilizado con frecuencia nombres de especies de *Amanita* descritas en Europa para nombrar hongos fuera de este continente, donde con frecuencia las colecciones no se han estudiado a profundidad por micólogos especialistas en el grupo (Tulloss, 2005; Guzmán, 2008). La recurrencia en este patrón puede deberse en general a visitas de micólogos extranjeros a esos países (Kickx, 1841; Singer, 1957; Guzmán, 1998), en combinación con tendencias de convergencia de estructuras morfológicas.

Recientemente, un número considerable de estudios han utilizado enfoques multigénicos para el desarrollo de hipótesis filogenéticas en hongos, y sostienen que matrices concatenadas de loci ribosomales (*ITS/LSU*) y loci de copia única revelan ser más informativos que filogenias basadas en un sólo gen (O'Donnell et al., 1998a, b, 2004; Dettman et al., 2003; Bruns & Shefferson, 2004; Mathney, 2005; Matheny et al., 2006, 2007; Frøslev et al., 2005, 2007; Garnica et al., 2007; Geml et al., 2005, 2006, 2008; Oda et al., 2004; James et al., 2006; Wirtz et al., 2008). Incluso, algunas tendencias en perspectivas genómicas han probado ser significativamente precisas (Rokas et al., 2003; Taylor & Fisher, 2003). Con relación a la delimitación de especies, el criterio y el reconocimiento filogenético, en términos de concordancia genealógica (Avise & Ball,

1990; Baum & Shaw, 1995; Avise & Wollenberg, 1997; Shaw, 2001) ofrece ser un método prometedor y de gran utilidad para abordar temas evolutivos en hongos (Harrington & Rizzo, 1999; Taylor et al. 2000, 2006a, b; Burnett, 2003; Moncalvo, 2005; Giraud et al., 2008), como pueden ser evolución fenotípica, complejos de especies, especiación críptica y alopátrica, dispersión a larga distancia y adaptación ecológica. Además, el reconocimiento filogenético de especies puede ser mutuamente ilustrado revisando otro tipo de evidencias como la morfología, biogeografía y ecología (Dayrat, 2005; DeSalle et al., 2005).

Estas premisas justifican el uso de enfoques multigénicos y filogenéticos para probar hipótesis en sistemática, delimitación de especies, biogeografía, evolución molecular y morfológica. En este trabajo se tratan varios aspectos de la sistemática molecular para para abordar temas evolutivos relacionados con el género *Amanita* sección *Caesareae*.

2. Antecedentes

2.1 Morfotaxonomía y sistemática de la sección *Caesareae*

Amanita caesarea fue descrita por primera vez por Giovanni Antonio Scopoli en 1772, quien le dio el nombre de *Agaricus caesareus* Scop. A partir de su primera descripción se le colocó en varios géneros. J.-B. Lamarck la ubicó por primera vez en el género *Amanita* en 1783, sin embargo le dio otro epíteto específico, *aurantia*. No obtuvo su nombre científico actual hasta que el botánico C. H. Persoon, en 1801, la nombró como actualmente se le conoce: *Amanita caesarea*. No obstante otros botánicos y micólogos como C. E. O. Kuntze (1898), W. A. Murril (1913), y E. Horak (1968), la han sinonimizado en los géneros *Fungus*, *Venenarius* y *Volvamanita*, respectivamente.

A continuación se describen en detalle las principales características morfotaxonómicas del género y en particular de la sección *Caesareae*:

Desarrollo del cuerpo fructífero. Es hemiangiocárpico debido a que el himenio es endógeno y se exhibe justo antes de la esporulación. Esto se debe, en primera instancia, a que la volva está bien desarrollada. Esta característica es de considerable importancia debido a que en diferentes secciones, el desarrollo del primordio es variable. La diferencia radica en el desarrollo del bulbo inicial que gradualmente se desarrolla en distintos tejidos del cuerpo fructífero. En especies como *A. muscaria* (L.) Lam. y *A. rubescens* Pers., el desarrollo del primordio es excéntrico con respecto a la superficie superior del bulbo. Sin embargo, en *A. vaginata* (Bull.) Lam. y *A. caesarea* el desarrollo del primordio se lleva a cabo cerca del centro del bulbo. Este hecho, explica por qué estas últimas dos especies carecen de bulbo basal, en el basidioma maduro. La elongación del estípite también es variable dentro de las secciones y está relacionada con la formación de la volva y la presencia del bulbo. En este caso particular la diferencia entre las secciones *Amanitae*, *Vaginatae* y *Caesareae* es que en la primera, la elongación es apical sobre el bulbo primordial, lo que provoca la presencia del bulbo, y en la segunda y tercera la elongación es "total" ya que el estípite se desarrolla desde la base del primordio (Corner & Bas, 1962; Bas, 1969). Bas (1969) consideró que en términos "filogenéticos", la combinación más primitiva es un primordio excéntrico con estípite que se desarrolla de la base, (el crecimiento del estípite se desarrolla junto con el primordio en *A. vittadini* (Moretti.) Sacc.) seguido de un primordio excéntrico que tiene estípite con elongación apical (*A. muscaria*), y finalmente un primordio central con estípite con elongación total (*A. caesarea*).

Elementos del margen del píleo. Bas (1969) considera que hay una fuerte correlación entre la reacción de basidiosporas con la solución de Melzer y la sulcación del margen del píleo. El valor biológico del margen de las estrías tiene que ver con la facilitación de una extensión y crecimiento rápido del píleo, lo cual confiere al cuerpo fructífero una ventaja para la liberación exitosa de basidiosporas antes de exponerse a las condiciones ambientales. La sulcación del margen es una característica importante del subgénero *Amanita*. Sin embargo, también ocurre (en una medida menor) en especies del subgénero *Lepidella*. Ya que en la sección *Caesareae* y *Vaginatae*, la sulcación es una característica inherente, Bas (1977), Tulloss (2009b) y Guzmán & Ramírez-Guillén (2001), la utilizaron como un carácter importante para la segregación de especies y estirpes. Además, Bas (1969, 1977) considera que la medición del estriado debe estar calibrada en proporción al radio del píleo.

La volva. Dentro de los Agaricales la volva puede tener orígenes distintos; puede formarse a partir de: 1) el micelio circundante del primordio; 2) de hifas que crecen de partes del cuerpo fructífero juvenil; y 3) de la diferenciación temprana de la capa externa del velo universal del primordio (Bas, 1969; Singer, 1986; Alexopoulos et al., 1996). A esta última pertenece la volva de *Amanita*. La volva puede ser friable o fugaz, discreta, sacciforme, limbada o adnata. El tipo de volva friable es el más variable dentro del género y tiene que ver con los restos que quedan sobre el píleo. Los tipos de volva están directamente relacionados con la estructuración de las células del velo universal y el desarrollo del primordio. Dentro de la sección *Caesareae* la volva es sacciforme y se diferencia poco entre las especies. Sin embargo, dentro de la sección *Vaginatae*, Bas (1969) distinguió 4 tipos de volva presentes: 1) la volva membranosa, firme y sacciforme; 2) la volva suave, membranosa y felpada; 3) la volva submembranosa y subfriable; y 4) la volva flocosa-friable. También mencionó que existen estados intermedios entre los tipos de volva mencionados. Adicionalmente, una característica de la volva la cual Tulloss (2009b) considera que puede ser de importancia para la sección *Caesareae* (*sensu* Yang, 1997; Tulloss, 2009a) es el borde interno de la volva, y la extensión de la parte felpada del estípote. El análisis que hizo Bas (1969) sobre el borde interno es excelente y revelador. Él observó un patrón de localización y de origen del borde interno, relacionado con el desarrollo del basidioma. En especies con desarrollo excéntrico y elongación basal, el borde se ubica en múltiples parches adheridos debajo del anillo y sobre el estípote. En otras

especies, conforme la transición gradual ocurre hacia el desarrollo central y elongación total, el borde interno pasa a ser un parche único ubicado debajo del anillo, después sobre la porción central del estípote, y finalmente, sobre la parte basal del estípote. En especies con volva adnata circumsésil ocurre en el ángulo entre el estípote y la volva, y finalmente en especies con volva bien desarrollada en forma de saco puede ubicarse en el fondo de la volva, o internamente sobre la volva.

El velo parcial o anillo. El tejido primordial que se localiza entre las láminas primordiales y el estípote, generalmente se diferencia en un velo que cubre los bordes de las láminas jóvenes. Cuando el basidioma se desarrolla totalmente, el velo queda colgado sobre el estípote en forma de un anillo. Algunos autores como Corner & Bas (1962), Bas (1969), Yang (1997) y Tulloss (2009a), han considerado que en el caso de la sección *Vaginatae*, la diferenciación del velo queda abortada, por lo cual no se desarrolla, ni se aprecia en basidiomas maduros. Esto mismo ocurre en especies de las secciones *Lepidella* y *Amidella*. La presencia de un anillo membranoso es una característica fundamental para la separación de la sección *Caesareae* de la sección *Vaginatae*. El desarrollo del basidioma (en particular la extensión del píleo) también está directamente relacionado con el posicionamiento del anillo, lo cual es un carácter distintivo entre secciones. El anillo puede estar en una posición apical, medial o basal. Las características microscópicas del anillo no están bien estudiadas. Actualmente, hay una especie (*A. calyptroides* Peck) dentro de la sección *Caesareae* que presenta un anillo que se disuelve gradualmente sobre el estípote, ésta es una característica distintiva por la que Tulloss (2009b) la ubica en la estirpe *Calyptroides* (como único taxón).

Fíbulas. Son estructuras celulares que están relacionadas con el crecimiento y diferenciación de las hifas. En particular, están implicadas en la migración de uno de los núcleos a la célula que acaba de desarrollarse en un micelio dicariótico (Alexopoulos et al. 1996). Se ahí su nombre en inglés “clamp connections”. Las fíbulas pueden encontrarse en cualquier estructura celular, pero es más frecuente que se encuentren en la base de los basidios. Bas (1969) tomó en cuenta que las fíbulas están en proceso de perderse dentro del género *Amanita*. Comentó que mientras en algunas especies se pueden encontrar en cualquier parte del cuerpo fructífero y aparecer también en los basidios; en otras sólo se encuentra en los basidios; y en algunas no se encuentran en ninguna estructura celular. Otra cuestión en relación a las fíbulas en la base de los basidios, es que en los basidios viejos o

maduros la fíbula se pierde o puede crecer un nuevo basidio, distorsionado las estructuras, mientras que en basidios jóvenes siempre están presentes. Las fíbulas de los basidios son comunes dentro del subgénero *Amanita* en la sección *Caesareae* y es un carácter necesario para distinguir entre miembros de *Vaginatae* y *Caesareae*.

Basidiosporas. Son de suma importancia taxonómica dentro del género. La reacción amiloide sobre las paredes de las basidiosporas, al agregar el reactivo de Melzer es posible distinguir entre los subgéneros *Amanita* y *Lepidella*. No obstante, otros caracteres, junto con éste, también igualmente determinantes (Yang, 1997; Yang et al. 1999). Bas (1969, 1977) llegó a la conclusión de que el tamaño de las basidiosporas es un carácter importante para la identificación de especies y estirpes. También, mencionó que dentro de la sección *Vaginatae* existen especies con los tamaños basidiosporales más pequeños y más grandes del género (de 4.5-5.5 x 4-5 hasta 16 x 15 μm). En la sección *Amidella* las basidiosporas son característicamente baciliformes. La medida de las basidiosporas también está relacionada con el número de mediciones por ejemplar. Bas (1969, 1977) mide 10 basidiosporas cuando los tamaños son fijos; sin embargo pueden medirse hasta 25 en casos cuando el tamaño es variable. Tulloss (2009a, b) hace mediciones en 100 basidiosporas por ejemplar. Bas (1969, 1977) también indica una medida para determinar el número de ejemplares por el número de basidiosporas medidas, por ejemplo: 40/4 si midió 10 basidiosporas en cuatro ejemplares. El coeficiente basidiosporal (Q) es una medida que se refiere a la división de la longitud entre la anchura de las basidiosporas. Esta medida también está relacionada directamente con la forma de las basidiosporas (globosa, subglobosa, ampliamente elipsoide, elipsoide, alongada, cilíndrica y baciliforme) (Bas, 1969). Guzmán & Ramírez-Guillén (2001) hicieron una separación de especies (especialmente mexicanas) con base únicamente en el tamaño de las basidiosporas, separado especies como *A. basii* Guzmán & Ram.-Guill. de *A. caesarea*; y *A. yema* Guzmán & Ram.-Guill. de *A. tecomate* Guzmán & Ram.-Guill., sólo por una diferencia de 1 o 2 μm de diferencia en el tamaño entre ambas. Tulloss (2009b) toma como un carácter indispensable la longitud de las basidiosporas y el Q, para separar especies de la estirpe *Hemibapha sensu* Tulloss.

Subhimenio. En especies de *Amanita* el subhimenio generalmente está bien desarrollado, una o dos veces más grueso que el himenio. Los tipos de células subhiménicas son variables dentro del género, y pueden distinguirse en los siguientes tipos: 1) ramosa

(células delgadas y ramificadas); 2) ramosas-infladas (infladas y ramificadas); 3) coraloideas (con forma muy irregular, con más proyecciones que conexiones); y 4) celulares (de elipsoides a isodiamétricas). Las formas celulares son más comunes en *Amanita*, mientras que las otras formas ocurren en diferentes secciones de *Lepidella* (Bas, 1969). Bas (1969) postuló que existe una tendencia "filogenética" en relación a la combinación del tipo de subhimenio, de basidios y la presencia de fíbulas. Él opinó que la tendencia es de basidios largos con fíbulas y subhimenio grueso ramoso (primitivos), hacia basidios cortos sin fíbulas y subhimenio no tan grueso pero del tipo celular. Tulloss (2009b) y Guzmán & Ramírez-Guillén (2001) describen tanto en la estirpe *Caesarea* como en *Hemibapha*, un subhimenio pseudoparenquimatoso, diferenciándose en que la primera estirpe presenta de 3(-5) células, mientras que la segunda presenta de 3(-1) células. Otra estirpe de la sección es *Calyptroderma*, la cual también se diferencia del resto debido a que las especies no presentan un subhimenio pseudoparenquimatoso, en su lugar hay una red de hifas ramificadas de segmentos hifales relativamente cortos que se encuentran parcialmente inflados o en algunos casos no inflados (Tulloss, 2009b).

Pigmentación y coloración. En *Amanita* la pigmentación por lo general es celular y proviene de la vacuola. Cabe hacer notar que en el subgénero *Lepidella* hay muchas especies sin pigmentación, y si la presentan, se concentra en la volva o en la volva y pileipelis; los colores brillantes son escasos. En cambio, en el subgénero *Amanita*, las especies sin pigmentación son raras. La pigmentación se concentra en el pileipelis con mayor frecuencia, y con menos, en el pileipelis y la volva; los colores brillantes son abundantes. El color del píleo es una característica muy importante para distinguir entre especies de la sección *Vaginatae* y también lo es para las de la estirpe *Hemibapha* (Tulloss, 2009b) en la sección *Caesareae*. Sin embargo la coloración del píleo es sumamente variable dentro de especies como en algunas de la estirpe *Caesarea* y *Hemibapha*, por lo cual en algunos casos puede ser un carácter polimórfico.

2.2 Biología de *Amanita caesarea* y especies afines

Amanita caesarea, al igual que la mayoría de las especies del género, es micorrizógena (Trappe, 1962; Singer, 1986; Yang et al., 1999; Meotto et al., 1999; Daza et al., 2006), es decir, forman asociaciones simbióticas de tipo mutualista con plantas vasculares. Por lo menos en *A. caesarea* s. s. se ha reportado su asociación con diferentes especies de árboles,

tales como: *Castanea sativa*, *Castanopsis carlesii*, *C. hystrix*, *Fagus sylvatica*, *Pinus strobus*, *P. virginiana*, *Quercus baronii*, *Q. faginea*, *Q. liaotungensis*, *Q. lusitanica*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica*, *Q. robur* y *Q. suber* (Trappe 1962; Meotto et al. 1997; Yang et al. 1999; González et al. 2002). Las asociaciones con plantas vasculares pueden variar según la especie de hongo y depende mucho de la ubicación geográfica, por ejemplo en México se reportaron miembros de la sección *Caesareae* en bosques de *Abies*, *Quercus* y *Pinus* (Pérez-Silva, 1981; Guzmán & Ramírez-Guillén, 2001). En Tailandia, Sanmee et al. (2008) los citaron en bosques de *Fagaceae* y *Dipterocarpaceae*. En general, las especies de este grupo se podrán encontrar más comúnmente en asociación con plantas vasculares de las familias *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* y *Dipterocarpaceae*.

Como todos los hongos ectomicorizógenos (ECM), las especies de la sección necesitan establecer una relación simbiótica con algún hospedero de su preferencia para poder completar su ciclo vital. Generalmente se pueden identificar tres fases en su ciclo de vida: 1) una etapa vegetativa que corresponde al crecimiento hifal en el suelo; 2) una etapa simbiótica en la cual se establece la asociación micorrízica; y 3) una etapa reproductiva que lleva al desarrollo de esporomas y la liberación de meiosporas (Murat et al., 2008).

La mayoría de las raíces de plantas ECM, a tan sólo unos días de emerger, se encuentran ya colonizadas por hongos ECM (Taylor & Alexander, 2005; Smith & Read, 2008). Las micorrizas son estructuras de vida corta que se regeneran anualmente durante el periodo de crecimiento. Estas estructuras se distribuyen verticalmente a profundidades ocupadas principalmente por raíces en la llamada rizósfera. Sin embargo, la gran mayoría se ubican en los horizontes más someros del suelo, donde los procesos de mineralización son más activos (Taylor & Bruns, 1999). Por lo general, el 90% de las micorrizas se encuentra en los 10 cm superiores del perfil edáfico en suelos boreales. El tejido fúngico en raíces micorrízicas representa de 10 a 100 veces más que los esporomas, de biomasa fúngica total, incluso sin considerar el extenso micelio extra-radicular (Dahlberg et al., 1997; Dahlberg, 2001).

En la simbiosis está implicada la disponibilidad y el flujo de nutrientes en el ecosistema de bosque templado y boreal (Kernaghan, 2005). Particularmente, las asociaciones simbióticas favorecen la captación hídrica y el suministro de minerales esenciales –como fósforo y nitrógeno– a través de las ectomicorrizas en las raíces de plantas vasculares (Read & Pérez-Moreno, 2003; Taylor & Alexander, 2005; Smith &

Read, 2008). Recíprocamente el hospedero abastece al hongo de carbohidratos y otros fotosintatos (Nehls et al., 2001; Nehls et al., 2007).

Como la mayoría de los basidiomicetos, también presentan reproducción heterotálica, es decir que la anastomosis (fusión de hifas) se lleva a cabo entre hifas genéticamente diferentes (Bos, 1996; Debaud et al., 1999; Moore & Novak-Frazer, 2002; Burnett, 2003). Este mecanismo ha resultado en la evolución de genes de apareamiento multialélicos, conocidos en inglés como *mating types*. En algunas especies se han reportado miles de alelos. Los genes de dos loci no-ligados, conocidos como *A* y *B*, determinan el *mating type* en el hongo. Estos genes codifican feromonas péptidas y receptores transmembranales implicados en el proceso sexual (Kronstad & Staben, 1997; Brown & Casselton, 2001; Moore & Novak-Frazer, 2002).

Utilizando como modelo el hongo ectomicorrizógeno *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. el ciclo vital de un basidiomiceto ectomicorrizógeno es el siguiente (Marmeisse et al., 2004): la germinación de basidiosporas produce un micelio homocariótico. Éste tiene crecimiento limitado pero se ha descubierto que también tiene la capacidad de micorrizar plántulas (Debaud et al., 1988). El apareamiento entre dos hifas homocarióticas compatibles con alelos diferentes en *A* y *B*, tiene como resultado la formación de un dicarion que generalmente se caracteriza por la presencia de fibulas. Este micelio tiene dos núcleos haploides por célula. El micelio dicariótico normalmente crece en el sustrato hasta colonizar la raíz de la plántula de *Pinus pinaster*. Bajo condiciones apropiadas de luz y temperatura, en aprox. 3–6 meses posteriores a la formación de ectomicorrizas, procederá la formación de basidiomas esporulantes. En los probasidios, que se forman sobre la superficie de las láminas, los dos núcleos haploides se fusionan para formar un núcleo diploide, el cual se transforma en cuatro basidiosporas meióticas haploides que son liberadas en el hábitat circundante (Marmeisse et al., 2004).

2.3 Marcadores moleculares y estudios filogenéticos sobre *Amanita*

La mayoría de los estudios filogenéticos sobre *Amanita* están basados en marcadores ribosomales. Tales marcadores se resumen a diferentes componentes del paquete de genes ribosomales nucleares y mitocondriales. Los nucleares incluyen la subunidad pequeña 18S (*nSSU*), la subunidad grande 28S (*nLSU*), la región del espacio interno transcrito (*ITS*), la cual incluye tres loci: *ITS1*, subunidad 5.8S, e *ITS2* (del extremo 5' al 3'), y por último la

región del espacio intergénico (*IGS*). Cada uno de esta batería de genes tiene su propia tasa evolutiva, por lo cual, cada uno tiene un alcance filogenético diferente. Por ejemplo, el *SSU* tiene una tasa evolutiva más lenta que el *LSU*, es decir es un gen más conservado, así que una filogenia usando este gen podría resolver preguntas pertinentes con la relación evolutiva entre órdenes y clases. El *LSU* es una región más conservada que los *ITS1* e *ITS2*, y tiene un alcance filogenético a nivel de familias y géneros, no obstante, en el *LSU* existen dos dominios divergentes (D1 y D2) cercanos a la terminal 5', los cuales pueden tener resolución infragenérica. Los *ITS* y el *IGS* son los genes más variables dentro del complejo ribosomal. La tasa evolutiva del *ITS* ha llevado su implementación para la resolución de preguntas interespecíficas, y el *IGS* para la resolución de preguntas intraespecíficas. Los genes ribosomal mitocondriales son menos conservados que sus parálogos nucleares, éstos incluyen la subunidad pequeña mitocondrial (*mSSU*) y la subunidad grande mitocondrial (*mLSU*) (Hillis & Davis, 1988; White et al., 1990; Bruns et al., 1991, 1992; Hillis & Dixon, 1991; Gardes & Bruns, 1993; Buscot et al., 2000; Moncalvo et al., 2000a; Berbee & Taylor, 2001).

Los estudios de filogenia molecular en *Amanita* hasta ahora han sido de tres tipos: a) sobre sistemática y biogeografía (Lim & Jung, 1998; Weiß et al., 1998; Drehmel et al., 1999; Oda et al., 1999, 2004; Zhang et al., 2004), b) sobre evolución molecular (Moncalvo et al., 2000a) y, c) sobre filogeografía (Geml et al., 2006, 2008). De los estudios de sistemática molecular destaca el de Drehmel et al. (1999), ya que utilizaron como marcador el *LSU* probando las hipótesis de la clasificación tradicional basada en morfología hechas por Bas (1969) y Singer (1986), relacionadas con la división en dos subgéneros *Amanita* y *Lepidella*, y las subsecciones. Este trabajo y los de Weiß et al. (1998), en el cual también se empleó el *LSU*, y Oda et al. (1999) que utilizaron la región *ITS*, corroboraron la existencia de una clasificación infragenérica con siete secciones propuestas inicialmente por Singer (1951, 1986). En el género *Amanita* el *ITS* debe de manejarse con cuidado, la variación en las secuencias puede provocar alineamientos azarosos que lleven a filogenias imprecisas. Un ejemplo de ello es el trabajo de Lim & Jung (1998). Otros estudios más recientes como el de Zhang et al. (2004) ya incluyen la combinación de datos, ellos utilizaron tanto *LSU* como *ITS* para corroborar estudios sistemáticos anteriores y ampliar la discusión hacia posibles patrones biogeográficos encontrados en la filogenia. El estudio de Moncalvo et al. (2000a) es un trabajo muy completo donde se comparan las tasas y modos de evolución

entre los genes *LSU* nuclear y *SSU* mitocondrial de varias especies de *Amanita* (muchas de éstas incluidas en el trabajo de Drehmel et al., 1999). Comprueban que ambos genes tienen tasas diferentes y no pueden ser combinados en análisis filogenéticos. Oda et al. (2004), a raíz de su trabajo previo, deciden profundizar en la relación entre *A. muscaria* y *A. pantherina* (DC.) Krombh, dos especies muy parecidas entre sí. Utilizando *ITS* y β -*tubulina*, un gen protéico, dan mayor resolución a la separación entre ambas especies y concluyen una serie de hipótesis biogeográficas acerca del lugar de especiación, grupos biogeográficos y rutas de dispersión. Finalmente, Geml et al. (2006, 2008) toman como modelo a *A. muscaria*, una especie aparentemente cosmopolita y morfológicamente uniforme, para combinar estudios de genética molecular de poblaciones, filogeografía y ecología. Por medio de una batería de cuatro genes (*ITS*, *LSU*, β -*tubulina*, *efl- α*) proponen la región Beringia como lugar de origen de la especie, debido a que es en esta región donde se registró el mayor número de haplotipos y diversidad genética. Se encontró una estructura filogeográfica compleja caracterizada por especies crípticas y relacionada con microambientes generados, a su vez, por periodos glaciales intermitentes.

Los artículos de Geml et al. (2006, 2008) son un claro ejemplo de la magnitud de un trabajo que incluya secuencias múltiples de ADN. El proyecto AFTOL (Assembling Fungal Tree of Life) apoyado por la NSF (National Science Foundation) ha generado una cantidad enorme de información relacionada con temas evolutivos en hongos (Blackwell et al., 2006; McLaughlin et al., 2009). Productos concretos relacionados con este proyecto pueden encontrarse en el número 6 del volumen 98 de *Mycologia*. El ensamblaje del nuevo conocimiento evolutivo en hongos no pudo haber sido posible sin el desarrollo de marcadores moleculares con buena resolución filogenética. Aparte de los conocidos ribosomales, se han desarrollado las subunidades I y II de la RNA polimerasa (Liu et al., 1999; Matheny, 2005; Matheny et al., 2002, 2007), el factor de elongación 1- α (O'Donnell et al., 1998a; Rehner & Buckley, 2005; Matheny et al., 2007), un gen mitocondrial de la ATP sintetasa, *atp6* (Kretzer & Bruns, 1999; Robison et al., 2001) para cerca de 1500 especies de hongos, representantes de todos los grupos de taxa en *Fungi* (McLaughlin et al., 2009). Adicionalmente, algunos micólogos han utilizado y desarrollado otras regiones, como el gen de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Den Bakker et al., 2004), el de la β -*tubulina* (Thon & Royse, 1999; Begerow et al., 2004) y genes de actina (Tarka et al., 2000; Helgason et al., 2003), no incluidos como parte del AFTOL. Una

segunda fase del AFTOL (AFTOL2) tiene como objetivos resolver nodos problemáticos dentro de diferentes grupos de hongos. Para ello consideran el uso de 71 genes, en particular aquellos que sean aptos para realizar análisis filogenómicos a gran escala (McLaughlin et al., 2009; <http://www.aftol.org>).

La transición de genes ribosomales a aquellos que codifican para proteínas es inminente. El "caballito de batalla" en la sistemática fúngica claramente es el *ITS*, sobretodo para resolver cuestiones de especies relacionadas. Sin embargo, a pesar de ser una región fácil de trabajar, tiene serias deficiencias, en particular el alineamiento, lo que dificulta la selección de un grupo externo y la implementación del concepto mismo de homología. Otro contratiempo es que en algunos grupos puede ser extremadamente variable o completamente invariable. Problemas similares ocurren en genes ribosomales estructurales como el *LSU* y el *SSU* (Bruns & Shefferson, 2004). En cambio, los genes que codifican para proteínas son más fáciles de alinear debido a que están restringidos a un marco abierto de lectura (ORFs, open reading frame). Además, no son tan conservados como los ribosomales estructurales debido a que es el producto (proteína) lo que está sujeto a selección, en lugar de la secuencia nucleotídica en sí. Esta diferencia hace que sean marcadores sumamente versátiles, debido a que se pueden emplear para determinar relaciones filogenéticas a un nivel mayor utilizando la secuencia aminoacídica, y para relaciones filogenéticas a un nivel menor aprovechando la variación en terceras posiciones de codones e intrones (Berbee & Taylor, 2001; Bruns & Shefferson, 2004).

2.4 Especie fúngica: el criterio filogenético y la concordancia genealógica

En general se considera que las especies son entidades naturales que surgen a partir de eventos de especiación (Mayden, 2002). El reconocimiento de especies es una iniciativa humana que es esencial para el subsecuente estudio de procesos evolutivos implicados en la especiación. La correcta "colocación" de un individuo dentro de una especie es un prerequisite para estudios del modo de reproducción, hibridización, flujo génico y selección. Tradicionalmente, todas las especies fúngicas se reconocían a través de la morfología (Petersen & Hughes, 1999; Taylor et al., 2000, 2006a, b). Ahora que sabemos que los hongos son fenotípicamente plásticos y comúnmente presentan estructuras convergentes (Bruns et al., 1991; Hibbett et al., 1997; Burnett, 2003; Bridge et al., 2005; Moncalvo, 2005) es necesario buscar nuevas formas de reconocimiento. Una opción obvia

sería el criterio biológico de especie, llevando a cabo pruebas de interfertilidad o compatibilidad somática (Petersen & Hughes, 1999). No obstante, un gran obstáculo resulta del hecho de que sólo el ~11% de las especies de hongos han sido cultivadas, y el ~20% no se reproduce sexualmente (Ainsworth et al., 2001). Un enfoque reciente y muy utilizado es la implementación del Reconocimiento Filogenético de Especie (PSR), con el cual es posible inferir aislamiento genético mediante la concordancia genealógica de múltiples loci conocido como GCPSR (Baum & Shaw, 1995; Avise & Wollenberg, 1997;; Taylor et al., 2000, 2006a, b; Shaw, 2001).

Para aplicar cuidadosamente el GCPSR, no sólo es necesario encontrar varias regiones genómicas con suficiente polimorfismo para construir genealogías bien soportadas, sino también, es necesario construir un acervo de muestras o individuos que cubran la distribución de algún grupo de hongos. Una vez obtenidos los datos de secuencias, las filogenias resultantes pueden compararse para descubrir la transición desde la concordancia entre filogenias construidas con distintos marcadores (debido a la pérdida de variación ancestral la cual es específica para cada linaje, causada por el aislamiento genético) hasta el conflicto entre filogenias (por la migración entre poblaciones) y así eventualmente reconocer especies. El reconocimiento de especies por concordancia genealógica ha tenido un impacto dramático en la taxonomía fúngica (Taylor et al., 2006a).

Encontrar especies mediante el GCPSR, frecuentemente se encuentra relacionado con alguna estructura geográfica que indica endemismos (Taylor et al., 2006a, b; Lumbsch et al., 2008). Sin embargo, no siempre es la regla y ejemplo de esto es el estudio de Pringle et al. (2005) donde se encuentran sólo dos especies filogenéticas a nivel mundial en *Aspergillus fumigatus* Fresen. No obstante, la mayoría de los estudios filogenéticos en hongos señalan claros patrones filogeográficos, en especial cuando están involucradas especies emparentadas, complejos de especie, o una sola especie. En muchas ocasiones estas especies resultan ser crípticas (Taylor et al., 2006b), es decir, son especies en algunos casos incipientes que no son aparentes aplicando otras formas de reconocimiento como el morfológico o biológico (Brickford et al., 2006). Si consideramos que el reconocimiento morfológico, con ~100,000 especies descritas (Kirk et al., 2008), es la principal herramienta para reconocer especies fúngicas, entonces ¿dónde está el resto del 1.5 millón de especies estimadas (Hawsworth, 2001)? Este problema está siendo resuelto en varias perspectivas: a) la búsqueda y aparición de especies crípticas y alopátricas producto de

análisis filogenéticos, b) el sondeo de diversidad fúngica bajo tierra, haciendo análisis filogenéticos de clones edáficos, y c) ampliando el conocimiento micológico de regiones inexploradas (e.g. trópicos) utilizando códigos de barras genéticos (Hawksworth, 2004; J.-M. Moncalvo, *com. pers.*). En todos los casos se hace uso de PSR y el GCPSR.

Más allá de la discusión de criterios, el GCPSR y otros enfoques genético-poblacionales pueden ser de gran utilidad cuando hablamos de criterios operacionales para definir unidades prácticas en ecología y conservación (Sites & Crandall, 1997; Sites & Marshall, 2003, 2004). Recientemente surgió un interés por ampliar las fronteras de la delimitación de especies, estableciendo así una *taxonomía integrativa*. Este enfoque busca reunir la mayor cantidad de datos y evidencia relacionada con una especie para poder asumir su individualidad evolutiva y como unidad operativa. La evidencia generalmente engloba datos moleculares, filogenéticos, genéticos, biogeográficos, ecológicos, etológicos, y morfológicos que sirven como indicadores para definir fronteras entre especies (Dayrat, 2005; Will et al., 2005; Fonseca et al., 2008; Padial et al., 2008). Diferentes tipos de evidencias pueden proyectarse como hipótesis corroborables y de soporte multilateral, dependiendo de la biología del organismo y de los procesos de especiación implicados (DeSalle et al., 2005).

3. Objetivos

3.1 Proponer un sistema clasificatorio subseccional para la sección *Caesareae* basado en un análisis filogenético con secuencias de regiones conservadas (*LSU*, *efl- α* exones, *RPB2*).

3.2 Delimitar especies en la sección utilizando además de inferencias filogenéticas evidencia complementarias como la morfología y/o distribución geográfica.

3.3 Proponer marcadores como código de barras para la sección.

3.4 Comparar los caracteres morfológicos utilizados en propuestas clasificatorias anteriores con las filogenias moleculares.

3.5 Proponer algunos patrones biogeográficos.

4. Hipótesis

La morfología característica de las estirpes y especies de la sección *Caesarea* no necesariamente debe ser consistente con las relaciones filogenéticas basadas en ADN. No obstante, el análisis de secuencias es capaz de revelar información acerca de la historia evolutiva del grupo, como lo pueden ser el establecimiento de grupos monofiléticos, la delimitación especies y el surgimiento de nuevas hipótesis biogeográficas.

5. Materiales y métodos

5.1 Material biológico

Se obtuvieron tejidos fúngicos a partir de ejemplares de especies conocidas de la sección *Caesareae* depositadas en varios herbarios micológicos (tabla 1). El número de muestras seleccionadas para la extracción de ADN fue de 119, de las cuales 106 correspondieron a especies previamente descritas y/o en proceso de descripción, y 14 a seis posibles especies nuevas aun sin describir. Adicionalmente, se incluyeron en los análisis todas aquellas secuencias depositadas en GenBank relacionadas con la sección *Caesareae* (tabla 2). De este grupo de secuencias, algunas muestras ambientales (e.g. ectomicorrizas, clones de suelo) que tuvieron un puntaje alto en nBLAST, fueron consideradas como pertenecientes a la sección. Las tablas 1 y 2 contienen todas las muestras utilizadas en el trabajo, así como datos acerca de su ubicación geográfica, herbario, colector y número de colector, y regiones genómicas secuenciadas. La mayoría de las especies están descritas (y/o información relacionada con su descripción se puede encontrar) detalladamente en la página web <http://www.amanitaceae.org/?section%20Caesareae>.

5.2 Extracción de ADN, protocolos de PCR y secuenciación

El ADN fue extraído utilizando diferentes métodos, desde métodos estandarizados con CTAB (Zolan & Pukkila, 1986) o SDS (Lee & Taylor, 1990) a paquetes de extracción como el Plant DNeasy mini prep de QIAGEN (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), y un novedoso método de extracción en placa de 96 pozos para material fúngico herborizado descrito a detalle en Dentinger et al. (2010). El método requiere de muy poco tejido (~10 mg) por pozo y está basado en enzimas digestivas, amortiguadores de extracción, y una placa especial (PALL) con un filtro de fibra de vidrio que funciona como matriz para capturar las moléculas de ADN. Para poder llevar a cabo este método fue necesaria la utilización de una bomba de vacío y una estructura de soporte para la succión; también se utilizó una centrífuga de placa. La mayoría del ADN fue diluido a 1:10 en agua MiliQ.

Los pares de iniciadores que fueron utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron los siguientes: ITS1f y ITS4b (Gardes & Bruns, 1993) para la región *ITS1-5.8S-ITS2* (*ITS*); LROR y LR5 (Vilgalys & Hester, 1990) para *LSU*; -6BF y -7.1R (Matheny, 2005) para *RPB2*; y EF1-983F (GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT) y EF1-1567R (ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT) (S. Rehner, *no pub.*) para

efl- α . Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ L conteniendo 1.0 μ L de amortiguador 10X PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM de cloruro de potasio, 2.5 mM de cloruro de magnesio, gelatina al 0.1%, albúmina sérica bovina 1.6 mg/mL), 1.6 μ L de dNTPs (1.24 mM de cada dNTP), 0.2 μ L de cada iniciadores (10 μ M), 0.1 μ L de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 μ L ADN muestra y 4.9 μ L de agua estéril MiliQ. Tres protocolos "touchdown" con condiciones de termociclado (Eppendor Mastercycler EP Gradient) particulares fueron empleados para la amplificación de todos los loci. Para *ITS* y *LSU* las condiciones consistieron de un ciclo a 94°C por 2 min; cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 60°C (0.5 min), y 72°C (1 min); 25 ciclos a 94°C (0.5 min), 55°C (0.5 min), y 72°C (1 min); y 10 ciclos a 72°C por 10 min. Para *efl- α* consistió de un ciclo a 94°C por 2 min; cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 60°C (0.5 min), y 72°C (1 min); cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 58°C (0.5 min), y 72°C (1 min); cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 56°C (0.5 min), y 72°C (1 min); 15 ciclos a 94°C (0.5 min), 54°C (0.5 min), y 72°C (1 min); y 10 ciclos a 72°C por 10 min. Y para *RPB2* las condiciones fueron un ciclo a 94°C por 2 min; cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 62°C (0.5 min), y 72°C (1 min); cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 60°C (0.5 min), y 72°C (1 min); cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 58°C (0.5 min), y 72°C (1 min); cinco ciclos a 94°C (0.5 min), 56°C (0.5 min), y 72°C (1 min); 10 ciclos a 94°C (0.5 min), 54°C (0.5 min), y 72°C (1 min); y 10 ciclos a 72°C por 10 min. En ocasiones *RPB2* fue amplificado utilizando las condiciones de *efl- α* . Todos los productos de PCR fueron "limpiados" o purificados a través de un método enzimático que digiere ADN de cadena sencilla (iniciadores) y dímeros. El método se conoce como Exo-Sap y consiste de dos enzimas una exonucleasa y una fosfatasa. Esta técnica es de muy bajo costo, efectiva y muy rápida (tiempo aprox. para 48 muestras es de 0.75-1 hora). Este método se encuentra descrito en Dentinger et al. (2010). Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con BigDye Terminator kit y secuenciados en un secuenciador de Applied Biosystems de 48 capilares. Las secuencias fueron editadas con el software Sequencher 3.0 de GeneCodes. Las secuencias ITS fueron delimitadas utilizando los motivos CATT- (en la porción SSU) y -GACCT (en la porción LSU) para evitar repetir caracteres y sólo incluir las regiones ITS1-5.8-ITS2 (Dentinger et al., 2010).

5.3 Alineamiento, particiones y preparación de las matrices de datos

Con el fin de abordar la sistemática seccional y la delimitación de especies dentro de la sección fue utilizada una matriz de datos que consistió de sólo las regiones conservadas *LSU*, *efl- α* (exones) y *RPB2*. Las secuencias fueron alineadas inicialmente con el programa MUSCLE 3.6 (Edgar, 2004), para después finalizar el alineamiento ajustando inconsistencias de manera manual utilizando SE-AL (Rambaut, 2007: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).

La región *ITS* se considera un locus altamente variable interespecíficamente (Bruns et al., 1991; Gardes et al., 1991; Chen et al., 1992; Farmer & Sylvania, 1998; Buscot et al., 2000) y puede resultar difícil de alinear, sobretodo con un grupo externo (Bruns & Shefferson, 2004). Ciertamente *Amanita* es un caso de ello y como prueba se encuentran estudios filogenéticos imprecisos sobre *Amanita* (ver Lim & Jung, 1998; Oda et al. 1999). Adicionalmente, el *LSU* ribosomal ha sido reportado como altamente divergente en *Amanita* por Moncalvo et al. (2000b).

Una vez finalizado el análisis filogenético previo (ver secciones temáticas 5.4 y 6.1) los principales grupos o clados fueron establecidos (de aquí en adelante se les llamará subsecciones). Alineamientos independientes de *ITS* e intrones de *efl- α* fueron agregados por subsección. Los datos totales, es decir de todas las regiones (*ITS*, *LSU*, *efl- α* y *RPB2*) fueron agregados en dos matrices una con los datos de la subsección *Caesarea* y otra con los datos de la subsecciones *Albescens*, *Brevifulva*, *Calyptroides* y *Murrilliana* (ver sección temática 6.1). Los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo por separado en cada conjunto de datos. Este esquema de preparación de matrices fue implementado con la finalidad de mejorar la homología en secuencias variables, incrementar la resolución filogenética, y elucidar relaciones recientes de divergencia.

En las tres matrices los datos fueron particionados para los subsecuentes análisis filogenéticos, excepto para Máxima Parsimonia (MP) (ver sección temática 5.5). Para Máxima Verosimilitud (ML) fue utilizado un esquema de partición simple, es decir, el propio límite de cada región. El conjunto de datos seccional fue particionado en 3 (*LSU*, exones de *efl- α* , *RPB2*), mientras que las dos matrices fueron particionadas en 5, incluyendo las regiones variables (*ITS* e intrones de *efl- α*). Particiones adicionales por codón fueron utilizados para *efl- α* y *RPB2* en el Análisis Bayesiano (BA) en cada matriz. El mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada partición (ver tabla 3) fue

seleccionado a través de Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) y PAUP* (Swofford, 2002). En la figura 1 se aprecia un diagrama de flujo donde se detallan aspectos del manejo de las matrices de datos y los diferentes enfoques para los análisis de cada matriz.

5.4 Congruencia de datos y homogeneidad filogenética

Se tomaron en cuenta dos enfoques diferentes para medir la homogeneidad entre genes o particiones. Uno fue el método de Farris et al. (1995), el cual se conoce como Prueba de Homogeneidad por Partición (PHT), que mide estadísticamente la longitud de ramas (o pasos) en los árboles de parsimonia producidos por los diferentes loci. El segundo enfoque fue invocar el criterio de combinación condicional (Bull et al., 1993; Huelsenbeck et al., 1996), haciendo análisis independientes de cada locus así como la utilización de algún estadístico de soporte de ramas (de Queiroz, 1993) para evaluar la congruencia.

Para llevar a cabo las pruebas se tomaron 25 muestras (las cuales tenían íntegros los cuatro loci) con cuatro particiones (*ITS*, *LSU*, *efl- α* , *RPB2*), éstas fueron analizadas independientemente con inferencia Bayesiana (500,000 generaciones) en MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Los árboles consenso de mayoría, con valores de probabilidad posterior (pp) como indicadores de soporte, fueron comparados topológicamente en cada corrida (figura 2). En el segundo enfoque se llevó a cabo una PHT, (Farris et al., 1995; Baker & Lutzoni, 2002) con PAUP* (Swofford, 2002) utilizando 1000 pseudo-réplicas, 10 secuencias de adición al azar y el algoritmo de bisección-reconexión-de-árbol (TBR).

5.5 Análisis filogenético

Tres tipos de análisis filogenéticos fueron llevados a cabo para cada una de las matrices de datos: MP, ML, BA. Para MP fue utilizado el software PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) sin pesos y sin orden mediante una búsqueda heurística con 1000 réplicas de adición de secuencias al azar, árbol al azar construidos en stepwise, algoritmo TBR para intercambio de ramas, *MAXTREES* limitado a 10,000 y *MULTREES* inhabilitado. Las regiones ambiguas o indels (inserción/delección) fueron considerados como datos faltantes. El MP bootstrapping fue realizado con 1000 réplicas, cada una con 100 réplicas de adición de secuencias al azar. El análisis ML fue llevado a cabo con RAxML 7.0.4 (Stamatakis, 2006a) aplicando el algoritmo para bootstrap rápido mediante aproximaciones CAT

(Stamatakis, 2006b) especificando 1000 réplicas e imprimiendo las biparticiones finales al mejor árbol de ML encontrado en la versión de particiones del programa GARLI 0.97 (D. Zwickl, https://www.nescent.org/wg_garli/Partition_testing_version), en el cual se estimaron todos los parámetros del modelos GTR para cada partición en 10 búsquedas. El BA fue llevado a cabo en el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) especificando 1,000,000 generaciones, muestreando cada 100 generaciones, dos corridas independientes y 4 Cadenas Markov Monte Carlo (MCMC) para cada corrida. El 25% de los árboles iniciales fueron descartados para llevar a cabo los cálculos de probabilidad posterior y el árbol consenso de 50% de mayoría. Secuencias de *LSU* de *A. aff. vaginata* y *A. amerimuscaria* Tulloss & Geml *nom. prov.* fueron utilizadas para enraizar el conjunto de datos seccional. Estudios moleculares anteriores (Weiß et al., 1998; Drehmel et al., 1999; Moncalvo et al., 2000a, 2002; Zhang et al., 2004) han mostrado que las secciones *Amanitae* y *Vaginatae* son grupos hermanos de la sección *Caesareae* en el subgénero *Amanita*.

6. Resultados

6.1 Sistemática seccional

La sección *Caesareae* tiene actualmente 89 nombres de taxa descritos, en vías de publicación y en vías de descripción según Tulloss (2009a). De éstos, seis son nombres provisionales (*nom. prov.*) y 21 tienen un nombre críptico (*Amanita* sp. ###). En el presente trabajo se encontraron 54 taxa representados, en general, por grupos monofiléticos, nodos terminales divergentes y especies alopátricas. En la figura 3, aparecen ramas altamente soportadas (>95%) por su consistencia filogenética. Estas ramas principales, reflejan grupos naturales o clados y deben considerarse como tales. Por este motivo, se sugiere la clasificación de éstos grupos en el rango sistemático formal de subsección. Se encontró un patrón general basado principalmente en los pigmentos de los basidiomas como un atributo morfológico sólido (sinapomorfia) en la subdivisión seccional, en lugar de la anatomía microscópica que se contemplaba en clasificaciones morfológicas infraseccionales previas. Otros caracteres macromorfológicos, propios de cada subsección, resultaron igualmente ilustrativos. La figura 4 muestra una matriz de datos morfológicos extrapolada al filograma seccional de la figura 3. A continuación se describe brevemente cada subsección.

Subsección *Caesarea*. Este grupo monofilético incluye a todos los hongos de rasgos "caesaroides" con pigmentos celulares brillantes en el píleo como anaranjado, rojo, amarillo, y/o otros tonos de éstos colores. A estos pigmentos se les conoce como betaláinicos y producen colores entre el espectro de rojo y amarillo (figura 4). La especie Europea *A. caesarea* pertenece a este grupo, junto con otras especies similares localizadas en América (*A. arkansana* H. R. Rosen, *A. basii*, *A. calyptroderma* G. F. Atk. & V. G. Ballen, *A. ichtyroballen* Tulloss *nom. prov.*, *A. garabitoana* Tulloss, Halling & G. M. Muell. *nom. prov.*, *A. jacksonii* Pomerl.), Asia (*A. cinnamomescens* Tulloss et al. *nom. prov.*, *A. hemibapha sensu lato*, *A. hemibapha* subsp. *ochracea* Zhu L. Yang, *A. javanica* (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda, *A. similis* Boedijn) y África (*A. mafingensis* Härk. & Saarim. in Härk., Saarim. & Mwasumbi, *A. masasiensis* Härk. & Saarim. in Härk., Saarim. & Mwasumbi, *A. tanzanica* Härk. & Saarim. in Härk., Saarim. & Mwasumbi). Además, muchas –si no es que todas– son especies comestibles y tienen un valor gastronómico, económico y etnobiológico a escala local y regional. La filogenia y las relaciones entre especies de este grupo pueden apreciarse en la figura 5. Se puede concluir que las especies con el epíteto específico *hemibapha* corresponden a una diversidad

subestimada de especies. Algunas especies también presentan pigmentos pardos como *A. similis*, *A. hemibapha* subsp. *ochracea* y *A. cinammomescens*.

Subsección *Albescens*. Este grupo incluye especies que generalmente carecen de pigmentos y tienen basidiomas de tamaño regular (diámetro del píleo: ~100-200 mm). Algunas presentan tenues tonos de color café o grises sobre el disco central del píleo. Muchas, tienen el contexto del píleo engrosado, y la totalidad presenta de una estructura del subhimenio pseudoparenquimatoso de una a tres células (figura 4). Las especies de este grupo se consideraban anteriormente como miembros de la estirpe *Hemibapha* s. Tulloss. Los integrantes de esta subsección son comestibles, particularmente la especie Africana *A. zambiana* Pegler & Pearce y la especie Asiática *A. chepangiana* Tulloss & Bhandary. Las relaciones entre especies de este grupo pueden apreciarse en la figura 6.

Subsección *Brevifulva*. Este es un grupo sumamente interesante en términos de evolución morfológica. Básicamente puede subdividirse en tres grupos bien delimitados morfológicamente. Uno está representado sólo por *A. torrendii* Justo, un hongo secotioide (gasteroide) de ambiente mediterráneo. Otro grupo incluye especies Asiáticas (*A. yuaniiana* Zhu L. Yang, *A. esculenta* Hongo & I. Matsuda) y Americanas (*A. spreata* (Peck) Sacc., *A. belizeana* Tulloss & Vincent *nom. prov.*, *A. recutita sensu* Coker) que característicamente presentan abundantes pigmentos pardos, tanto en el píleo como en el estípite. El último consiste comúnmente de especies con basidiomas pequeños (*A. virginiana* (Murrill) Murrill, *A. ristichii* Tulloss, *A. incarnatifolia* Zhu L. Yang, *A. longistriata* (S. Imai) E.-J. Gilbert, *A. roseolamellata* A. E. Wood) con píleos de menos de 90-100 mm de diámetro, y tienen el inusual rasgo de láminas con tonos rosados. Los basidiomas generalmente son blancos con tonos pardos sobre el píleo, a excepción de *A. ristichii* que es completamente blanca. Dentro de este grupo también se encuentra *A. banningiana* Tulloss *nom. prov.* que presenta pigmentos amarillos sobre el píleo. Las relaciones entre especies pueden apreciarse en la figura 6.

Subsección *Calytratoides*. Esta subsección tiene pocos representantes conocidos, de los cuales hasta ahora sólo se han reportado en el O de EUA y México. No obstante, *A. calytratoides* Peck, especie en la que se basa la subsección, tiene atributos morfológicos únicos, entre ellos, una forma de estípite que asemeja una vela y un anillo que se "disuelve" en él. La población más conocida de *A. calytratoides* se encuentra en California, EUA, sin

embargo, se han encontrado ejemplares en México Central (Tlaxcala) que corresponden a la descripción original (ver discusión y figura 6).

Subsección *Murrilliana*. Este grupo aparece en la parte basal del filograma seccional (figura 3), enraizado con secuencias de *LSU*. Geográficamente, las especies de este grupo se han encontrado en el E de EUA, en el E de Canadá, en México y Japón. Sólo *A. murrilliana* Singer y *A. imazekii* T. Oda, C. Tanaka & Tsuda son especies válidamente publicadas. Sin embargo, existe una especie mexicana sin describir informalmente conocida como *Amanita* sp. M36. Algunos caracteres distintivos de la subsección son la amplia unión de la volva al estípote, el estípote proporcionalmente más delgado en el ápice (cerca del píleo) que en la base (cerca de la volva), pigmentos grisáceos y/o cafés sobre el disco central del píleo, y un color blanco generalizado del basidioma. Ver figura 6.

6.2 Estadísticos de matrices de datos y árboles

La matriz de datos seccional, que consiste de *LSU*, *efl- α* exones y *RPB2*, aportó por cada región información relacionada con los caracteres y sitios nucleotídicos. La región *LSU* consistió de un total de 936 caracteres, de los cuales 197 fueron sitios parsimoniosamente informativos, 36 fueron autapomórficos y 703 fueron constantes; Las regiones codificantes (exones) de *efl- α* consistieron de un total de 481 caracteres, de los cuales 143 fueron parsimoniosamente informativos, 9 autapomórficos y 329 constantes; y la de *RPB2* consistió de 683 caracteres, de los cuales 213 fueron parsimoniosamente informativos, 8 autapomórficos y 462 constantes. La matriz que contiene especies de la subsección *Caesarea*, tuvo para la región *ITS*, un total de 700 caracteres, de los cuales 144 fueron parsimoniosamente informativos, 16 fueron autapomórficos y 540 fueron constantes. Las regiones no-codificantes (intrones) de *efl- α* tuvieron un total de 98 caracteres, de los cuales 55 fueron parsimoniosamente informativos, 10 autapomórficos y 33 constantes. En el caso de la tercera matriz, que contiene especies de las subsecciones *Murrilliana*, *Calyptratoides*, *Albescens* y *Brevifulva*, la región *ITS* tuvo de un total de 685 caracteres, 196 parsimoniosamente informativos, 16 autapomórficos y 473 constantes; los intrones de *efl- α* consistieron de 116 caracteres, de los cuales 72 fueron parsimoniosamente informativos, 9 autapomórficos y 35 constantes. Para estos dos conjuntos de datos, sólo se reportan en este trabajo las regiones de *ITS* e intrones de *efl- α* , debido a que las otras regiones ya se mencionaron al describir las características del conjunto de datos seccional.

Con el propósito de comparar las capacidades de función como código de barras dentro de la región *ITS*, fue evaluada la contribución individual del *ITS1* y *ITS2*. En la matriz de la subsección *Caesarea*, el *ITS1* consistió de 357 caracteres, de éstos 83 fueron parsimoniosamente informativos, 6 autapomórficos y 268 constantes; en contraste, el *ITS2*, de un total de 186 caracteres, 52 fueron parsimoniosamente informativos, 9 autapomórficos y 125 constantes. El tercer conjunto de datos tuvo para el *ITS1* 325 caracteres, de éstos 111 fueron parsimoniosamente informativos, 8 autapomórficos y 206 constantes; el *ITS2* tuvo 203 caracteres, 78 parsimoniosamente informativos, 7 autapomórficos y 118 constantes. La diferencia de sitios parsimoniosamente informativos, entre los dos conjuntos de datos puede deberse a que en el primero sólo representa una sola subsección, y el siguiente conjunto de datos contiene cuatro subsecciones (mayor variación de secuencias). No obstante, es claro que el *ITS1* aporta mayor cantidad de información filogenética, y puede ser utilizado en casos donde el ADN este altamente degradado.

En el caso de los árboles filogenéticos, el análisis de MP del conjunto de datos seccional encontró 358 árboles igualmente parsimoniosos de 1326 pasos, índice de consistencia (CI) de 0.5486, índice de retención (RI) de 0.8739 e índice de retención reescalado (RC) de 0.4791; el análisis de MP en la subsección *Caesarea* encontró 445 árboles igualmente parsimoniosos con 790 pasos, un CI de 0.7304, un RI de 0.8842 y un RC de 0.6458; el análisis de MP para el tercer conjunto de datos encontró 981 árboles igualmente parsimoniosos de 1275 pasos, CI de 0.7, RI de 0.89 y RC de 0.6273. Dentro de cada conjunto de datos los árboles tuvieron parámetros similares. En el caso de los análisis de ML, el mejor árbol de ML, para el conjunto de datos seccional, tuvo un valor de verosimilitud de -9754.4821 lnL; el mejor árbol de la subsección *Caesarea* tuvo -8501.902 lnL; y el mejor árbol del tercer conjunto de datos alcanzó un valor de -10477.407 lnL.

La tabla 3 contiene información relacionada con la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica y los esquemas de partición de datos que fueron utilizados para los análisis de ML y BA. El Criterio Informativo de Akaike (AIC) y la Prueba Jerárquica de Tasas de Verosimilitud (hLRT) fueron utilizadas para seleccionar comparativamente el mejor modelo. Es posible observar patrones dentro de cada una de las regiones y en cada esquema de partición. Se ha reportado que AIC tiende a favorecer modelos complejos en comparación con hLRT (Posada & Crandall, 1998; Johnson & Omland, 2004); esta tendencia también es aparente en los datos de la tabla 3.

6.4 Variación de secuencias

Las regiones con mayor variación de secuencias fueron el *ITS*, *efl- α* y *RPB2*. La variación encontrada en la región *LSU* fue principalmente de mutaciones puntuales y de indels de unos cuantos pares de bases. El modelo de sustitución en esta región indica una desviación hacia mutaciones transicionales C-T y A-G. El tipo de variación observado en la región *ITS* consistió de mutaciones indels con variación de longitud, e inversiones cortas. Dentro de las secuencias de la subsección *Caesarea* se encontró una inserción relativamente larga (~100 pb) en todas las especies no-basales incluyendo a todas las especies Americanas. Predeciblemente, mucha de la variación en las regiones codificantes de *efl- α* y *RPB2* se encontró en las terceras posiciones de los codones. Una tendencia hacia mutaciones transicionales C-T y A-G también fue registrada en la primera y tercera posición de codones, tanto en *efl- α* como en *RPB2*. Las segundas posiciones tuvieron menos variación en ambas regiones. Se encontraron dos intrones cortos (~50-60 pb) dentro de la región *efl- α* , los cuales en conjunto con las terceras posiciones de codones, confirieron suficiente variación para la resolución filogenética a nivel de especie (figura 2). Se encontró variación intragenómica en la región *ITS* en algunos taxa (*A. jacksonii*, *A. calyptroides*, *A. javanica*). Otros autores también encontraron variación intragenómica del *ITS* en géneros como *Lactarius* (Nuytink & Verbeken, 2007), *Xerocomus* (Taylor et al., 2006c) y en miembros gasteroides y secuestrados de *Amantia* (Justo et al., 2010). Mathney et al. (2007) también reportan que encontraron heterogeneidad en la longitud del *ITS* en 20% de los taxa muestreados en una filogenia multigénica de basidiomicetos. En este trabajo se incluyeron también dos secuencias clonadas de un espécimen de *A. cf. similis* (093) de Vietnam (figura 5), las cuales tuvieron una variación en la longitud del *ITS* de unos cuantos pares de bases. Es probable que esta variación se deba a alelos o polimorfismos de diferentes poblaciones que estuvieron aisladas y que recientemente se han hibridizado. Estos polimorfismos pueden encontrarse en estados homocigotos en individuos de las poblaciones que permanecen aisladas o sin flujo génico. Otra posibilidad es que dentro del genoma haploide haya cambios mutacionales en alguna de las copias del complejo de genes ribosomales. No se encontró paralogía ni pseudogenes en las secuencias utilizadas.

6.5 Datos faltantes

Los efectos de datos faltantes en filogenética ya han sido estudiados por Wiens (2003, 2006). La tabla 1 muestra las especies y los ejemplares utilizados, al igual que las secuencias obtenidas para cada uno. Puede notarse que hay secuencias que no fueron obtenidas para algunas especies y muestras. Además, algunas secuencias, principalmente de *ITS* y *LSU*, pero también en *efl- α* , se encuentran fragmentadas o incompletas debido a diversos factores, desde variación intragenómica hasta problemas técnicos en la secuenciación y ADN de baja calidad. En la mayoría de las muestras fue posible obtener *ITS* y *LSU*, las cuales tienen en este trabajo un porcentaje de datos faltantes del ~15%. En las regiones que codifican para proteínas (*efl- α* y *RPB2*) hubo dificultades para obtener secuencias, probablemente debido a que son genes de copia única, aunado a que los iniciadores utilizados para su amplificación son degenerados e inespecíficos. Éstos tuvieron un porcentaje del 54% (*efl- α*) y 67% (*RPB2*) de datos faltantes. Sin embargo, algunas simulaciones en computadora realizadas por Wiens (2003, 2006) y los resultados en este trabajo presentados, demuestran que aún con altos porcentajes de datos faltantes, la precisión filogenética continua siendo consistente, posicionado a dichos taxa dentro de una topología filogenética esperada. Caracteres faltantes en las regiones *ITS*, *efl- α* y/o *RPB2* no reflejaron "disturbios" filogenéticos, en parte debido a que estos loci contienen suficientes caracteres parsimoniosamente informativos a lo largo de su extensión; intrones y terceras posiciones en genes protéicos e *ITS1-ITS2* para el rDNA. No obstante, no ocurrió lo mismo con secuencias de *LSU*, las cuales tienen menos caracteres variables parsimoniosamente informativos. Algunas muestras que sólo tuvieron *LSU* (e.g. secuencias de GenBank) o que únicamente tenían fragmentos de *LSU* (~300-400 pb) con frecuencia aparecieron basales o segregados cercanamente de su clado correspondiente. Un ejemplo conspicuo es el clado de *A. caesarea* en la figura 5.

6.6 Análisis filogenéticos

Tanto el PHT como los análisis BA independientes para cada región (figura 2) no mostraron conflicto filogenético real. El PHT resultó con un valor de *P* de 0.062, a pesar de que el valor sugerido debería estar dentro de un rango de 0.01 a 0.05 (Baker & Lutzoni, 2002), el obtenido es un valor razonable considerando que todas las regiones varían en sus tasas evolutivas y en las presiones evolutivas que las gobiernan, además de que el PHT se

basa en parsimonia y no en un modelo de sustitución nucleotídica. Adicionalmente, los valores de soporte en los BA independientes (figura 2) son altos a lo largo de todas las regiones, soportando los mismos clados e indicando homogeneidad filogenética entre genes. A su vez, los análisis filogenéticos principales (MP, ML, BA) no fueron indicativos de conflicto. Sin embargo, el árbol generado por MP (no mostrado) no fue congruente con los de ML y BA en la posición y relación basal de los clados principales o subsecciones. Por ejemplo, el clado de la subsección *Albescens* se encontró posicionado cerca del grupo externo en el análisis de MP, mientras que en ML apareció cercano a la subsección *Caesarea*. Además el árbol consenso de mayoría (BA) muestra politomías cuando hay inconsistencias en cuanto a la posición de los nodos (figura 3). Esto indica que la relación basal de las subsecciones no es clara, y se traduce en valores de soporte de ramas reducidos. A pesar de las inconsistencias basales, el soporte de ramas, en todos los análisis, fue superior al 95% en los clados subseccionales (figura 3). Los árboles de los conjuntos de datos subdivididos (figuras 5 y 6) no muestran cambios topológicos en los diferentes análisis realizados. Particularmente, en los árboles del tercer conjunto de datos (figura 6), los valores de soporte fueron superiores al de los del conjunto de datos seccional (figura 3), lo que indica que las mejoras en el alineamiento de *ITS* e intrones de *efl- α* optimizaron significativamente la resolución filogenética. En contraste, el árbol de la subsección *Caesarea* (figura 5), obtuvo relativamente bajos valores de soporte (<60% para algunos clados) en el análisis bootstrap de ML. Es probable que estos valores de soporte estén relacionados con incongruencias en las aproximaciones CAT usadas en RAxML. No obstante, no ocurrió lo mismo con los análisis de bootstrap de MP y las probabilidades posteriores en el BA, dado que los valores de soporte superaron el 80%.

Los árboles presentados (figuras 3, 5 y 6) son árboles bayesianos de consenso de mayoría donde el grosor de las ramas indica el nivel de soporte en fracción de probabilidad posterior. En estos árboles también se indican valores de bootstrap ML y MP para la mayoría de las ramas en las figuras 5 y 6, y en la figura 3, sólo se indican en las ramas subseccionales, en la rama seccional y en las relaciones basales entre subsecciones.

7. Discusión

7.1 Delimitación de especies

Considerando que los objetivos primordiales de la sistemática son 1) descubrir y describir especies, y 2) determinar sus relaciones evolutivas (Sites & Marshall, 2003, 2004; Wiens, 2007), no es un objetivo de investigación común evaluar niveles medio (seccional) y bajo (especies) de relaciones filogenéticas en un mismo estudio (Barraclough, 2010). La posibilidad de explorar ambos objetivos simultáneamente yace en la naturaleza evolutiva de las regiones genómicas que se están utilizando. Loci variables y conservados frecuentemente aportan información diferente sobre la historia evolutiva de un organismo (Hillis & Davis, 1988; Bruns et al., 1991; Hillis & Dixon, 1991; Berbee & Taylor, 2001). En este estudio se han considerado las regiones *LSU*, *RPB2* y los exones de *efl- α* como regiones conservadas, y han sido utilizadas para inferir la sistemática seccional. Al agregar secuencias de regiones variables, *ITS* y los intrones de *efl- α* , a matrices subdivididas por parentesco, los alineamientos homólogos mejorados permiten la determinación de relaciones entre especies.

Recientemente se ha propuesto la *taxonomía integrativa* (Dayrat, 2005; Will et al., 2005; Fonseca et al., 2008; Padial et al., 2008), la cual se refiere al uso de múltiples perspectivas complementarias para la exploración de límites en especies. Incluidas dentro de estas perspectivas, todo tipo de evidencia biológica puede ser utilizada para la diagnosis y la delimitación de especies. La ecología, genética de poblaciones, filogenia, morfología, etología, biogeografía y otras disciplinas pueden explorarse de manera independiente o en combinación como evidencia e indicadores de los límites entre especies. Kohn (1992) exhortó a los micólogos a buscar caracteres que aporten "resolución" a la delimitación de especies, sugiriendo desde rasgos anatómicos, citológicos, genéticos, ontogenéticos, moleculares y otros. Además de un enfoque filogenético multigénico, en este trabajo también se incluye evidencia morfológica y biogeográfica como indicadores de límites de especies (DeSalle et al., 2005; Mejía et al., 2011). No obstante, se le ha dado mayor peso a la evidencia molecular. Harrington & Rizzo (1999), Taylor et al. (2000, 2006a, b), Moncalvo (2005) y Giraud et al. (2008) revisaron los criterios y procesos de especiación más significativos en hongos, y concuerdan en que un enfoque filogenético, con perspectiva genealógica (Avice & Ball, 1990; Baum & Shaw, 1995; Avice & Wollenberg, 1997; Shaw, 2001) empleando múltiples loci, podría ser la mejor manera para determinar

especies fúngicas, e identificar linajes evolutivos cohesivos en hongos. Varios estudios (véase Frøslev et al., 2007; Geml et al., 2005, 2006, 2008; Hedh et al., 2008 para basidiomicetos; Koufopanou et al., 2001; Dettman et al., 2003; Johnson et al., 2005; Wirtz et al., 2008; para ascomicetos; O'Donnell et al., 1998a, b, 2004; Fournier et al., 2005 para hongos anamóficis) han tenido éxito utilizando este enfoque, en particular cuando hay niveles de homoplasia altos y convergencia fenotípica (Frøslev et al., 2007), o cuando se trata con hongos que se reproducen asexualmente (O'Donnell et al., 1998a, b, 2004).

En las figuras 5 y 6 se pueden apreciar las relaciones filogenéticas entre especies, especies putativas, especies incipientes, y probablemente entre especies crípticas dentro de las subsecciones. Dentro de la subsección *Caesarea* (figura 5), un grupo monofilético que incluye a *A. jacksonii* llama la atención, ya que es un linaje separado tanto por evidencia molecular, morfológica y biogeográfica. Además, pueden observarse dentro del clado, especies incipientes –especies muy relacionadas entre sí en las cuales existe un proceso de divergencia relativamente reciente, pueden considerarse como poblaciones con alta diferenciación genética– (figuras 3 y 7, *Amanita* sp. T31, *Amanita* sp. F11) separadas por su distribución y en algunos casos morfología. Desafortunadamente, el árbol consenso de la figura 5 tiende a colapsar ramas, y el patrón de bifurcación dentro del clado no es observable. No obstante, los árboles de MP y ML si revelan este patrón anidado de bifurcación (figura 7). *Amanita jacksonii* sólo se encuentra en América y tiene un conjunto de caracteres como estípites alargados, píleo proporcionalmente pequeño, estrías marginales largas, coloración del basidioma (rojo) y subhimenio de 3 (-1) células, que ligado a la divergencia molecular, es indicativo de un linaje evolutivo cohesivo. De manera similar, el mismo patrón ocurre en *A. arkansana*, *A. basii*, *A. calyptroderma*, *A. ichthyroballen*, *A. garabitoana*, *A. caesarea*, y otras especies.

Amanita calyptroderma y *A. ichthyroballen* tienen la misma distribución geográfica, además de una morfología muy similar, incluso a la segunda se le ha considerado como variedad amarilla de primavera de *A. calyptroderma*. No obstante, existen diferencias morfológicas, tales como tonos más pálidos y el característico olor a pez en *A. ichthyroballen*, además de la diferencia estacional en producción de basidiomas, otoño e invierno en la primera, y primavera en la segunda (Atkinson, 1909), son indicadores sugestivos de que pueden ser consideradas especies distintas. La divergencia filogenética entre ambas es clara en este estudio, incluso se hipotetiza que podrían tener una historia

biogeográfica independiente (ver sección temática 7.3); no obstante, son especies con distribución homopátrica (tienen la misma distribución geográfica; Espinosa et al., 2002, 2006) en el O de EUA.

De manera diferente, *A. caesarea* y *A. basii*, presentan la misma morfología, y por tal motivo, durante mucho tiempo se consideró la presencia de *A. caesarea* tanto en Europa, donde fue descrita originalmente, como en América (Guzmán & Ramírez-Guillén, 2001). Dentro de este contexto, la única diferencia morfológica entre *A. caesarea* y *A. basii* según Guzmán & Ramírez-Guillén, es el tamaño de esporas, indicando que la segunda presenta basidiosporas más pequeñas en un rango de 1(-2) micrones. A juzgar por los resultados que muestran una fuerte divergencia filogenética (figura 5) y la obvia distribución disyunta (Europa y América), la posición de ambas especies en el filograma también sugiere que podrían tener historias biogeográficas independientes. Esta evidencia no sólo es indicativa de que en México no existe *A. caesarea*, sino que hay una clara convergencia morfológica entre ambas especies. Tulloss (2005) consideró a *A. basii* como especie válida, a pesar de que hay muy poca diferencia morfológica entre ambas especies, debido a que se encuentran separadas por el océano Atlántico. *Amanita basii* es una morfoespecie Mexicana, que junto con otras (*A. laurae* Guzmán & Ram.-Guill., *A. tecomate* Guzmán & Ram.-Guill., *A. tullossii* Guzmán & Ram.-Guill., *A. yema* Guzmán & Ram.-Guill.) se describieron dentro del "complex. caesarea" en el trabajo de Guzmán & Ramírez-Guillén (2001). A pesar de no haber secuenciado los tipos nomeclaturales de las especies descritas en Guzmán & Ramírez-Guillén (2001), si fueron identificados ejemplares (ver notas al final de la tabla 1) con base en su clave taxonómica. En este marco, no hubo evidencia molecular que respalde tal delimitación ya que estas muestras resultaron ya sea en los clados de *A. basii* o de *A. jacksonii*. No obstante cabe posibilidad de una excepción, (*A. cf. laurae*, que resultó dentro del clado de *A. cochiseana*) una muestra proveniente de Jalisco, México, la cual exhibió divergencia temprana con respecto al resto del grupo (figura 5) que se distribuye en el Norte de México y Suroeste de EUA. Este ejemplar (038; tabla 1; figura 5) presenta un subhimenio pseudoparenquimatoso, a diferencia de *A. cochiseana* que lo tiene como una red ramificante de hifas cortas (no pseudoparenquimatoso), y es posible que corresponda al taxón *A. laurae*, ya que concuerda tanto en distribución como en morfología con lo descrito por Guzmán & Ramírez-Guillén (2001). *Amanita laurae*, *A. tecomate* y *A. yema* deben estudiarse con mayor profundidad, incluyendo estudios de morfología, biogeografía y

filogenia molecular, para poder determinar si corresponden especies “reales”. Otro grupo, en este trabajo considerado como *A. cf. hayahyuy* D. Arora & Shepard, presentó suficiente variación molecular como para representar un grupo monofilético a nivel de especie (figura 5). Los ejemplares de este grupo se encontraban etiquetados como *A. jacksonii* o *A. tullossii*. Sin embargo, *A. hayahyuy* presenta un color ocre o café en el centro del píleo, decolorándose en amarillo hacia el margen conforme madura el basidioma. El estípite presenta decoraciones amarillentas sobre el estípite y en una etapa temprana en el desarrollo el estípite es pálido (Shepard et al., 2008). Es factible que esta especie se distribuya en el Sur de México, probablemente en los estados de Oaxaca, Veracruz y Chiapas, Estado en el que fue descrita. *Amanita cf. hayahyuy* se encuentra relacionada filogenéticamente con *A. garabitoana*, que se encuentra en Costa Rica. *Amantia garabitoana* y *A. arkansana* se describieron como morfoespecies, en estos casos la evidencia molecular y biogeográfica respaldan el diagnóstico morfológico.

En la figura 5, aparecen varios nodos terminales bajo la etiqueta *hemibapha s.l.* a lo largo de la filogenia de la subsección *Caesarea*. Desde la descripción de *A. hemibapha* (Berk. & Broome) Sacc. se han descrito otras variedades morfológicas y subespecies por otros autores como *A. hemibapha* subsp. *similis* (Beodjin) Corner & Bas y *A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner & Bas, las cuales fueron elevadas al rango de especie (*A. similis* Beodjin y *A. javanica* (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka, Tsuda) por Oda et al. (1999), por medio de evidencia molecular utilizando secuencias *ITS*. A su vez, Yang (1997) describió *A. hemibapha* var. *ochracea* Zhu. L. Yang en la provincia de Yunnan, China, común en el Suroeste de China. A pesar de que las muestras de esta variedad sólo fueron secuencias *LSU*, hubo algunas mutaciones puntuales (haplotipos) que la separaron de otras especies de *hemibapha*. Además presenta caracteres morfológicos particulares que la distinguen. Por estas razones se propone que sea elevada al rango de especie, pero incluyendo regiones más variables como *ITS* o *ef1- α* . Cabe resaltar la similitud morfológica y la estrecha relación filogenética entre *A. ochracea* y *A. cinnammomesces*, al igual que su cercana distribución. Takahashi (2004) describió una especie en el Suroeste de Japón que asemeja a *A. hemibapha*, pero con un notorio anillo color rojo, este taxón fue nombrado como *A. rubromarginata* Har. Takah. Estos son claros ejemplos de que existe una gran diversidad morfológica, taxonómica y filogenética en las especies de *hemibapha sensu lato*. Sanmee et al. (2008) concuerdan en que este taxón requiere de una revisión taxonómica profunda. En

este estudio fueron identificadas al menos seis especies filogenéticas bajo alguna denominación de *hemibapha* en Asia. Considerarlas como "*complex. hemibapha*" es una sugerencia, hasta que se profundice en su taxonomía.

Por otro lado, la subsección *Albescens* (figura 6) contiene especies filogenéticamente delimitadas, algunas como *A. zambiana* y *A. egregia* presentan apomorfías anatómicas particulares (estructura del basidioma), una distribución disyunta (África, Australia), y divergencia molecular. En la especie Asiática *Amanita* sp. Thai3, a pesar de no ser un taxón formalmente descrito, también se observa delimitado por el mismo tipo de evidencia. No obstante, otras como *A. chepangiana* y *A. princeps* Corner & Bas parecen estar cercanamente relacionadas y deben de considerarse con cuidado al ser identificadas, sobretodo porque son homopátricas. Tulloss y Arora (no publicado) notaron otras especies similares a Thai3, nombradas temporalmente como Thai1 y Thai2, que sin duda podrían pertenecer a esta subsección (Tulloss, 2009a).

Dentro de la subsección *Brevifulva* también fueron encontrados linajes aislados genética y biogeográficamente, correspondientes a descripciones morfológicas. Como ejemplos de especies bien delimitadas en esta subsección se encuentran *A. torrendii*, *A. spreata*, *A. yuani* y *A. esculenta*; o *A. ristichii*, *A. virginiana* y *A. banningtoniana* (ver sección temática 7.3).

También fueron encontradas especies nuevas para la ciencia (tabla 1: 107-119). Muchas especies ya habían sido anotadas como nuevas por R. E. Tulloss y otros colaboradores, por tener atributos morfológicos particulares que sugerían su segregación de otras especies similares (las especies nombradas *Amanita* sp. ###). Por lo menos fueron identificadas 6 especies nuevas, las cuales fueron soportadas por datos moleculares. Es importante mencionar que también fueron incluidas secuencias de muestras ambientales de suelo o de raíces micorrizadas que fueron encontradas en GenBank (tabla 2), bajo una búsqueda BLAST. Todas las muestras coincidieron con alguna especie ya descrita, excepto la muestra "clon sin cultivar de *Amanita*" (Malasia) con el número 153, es probable que esta muestra ambiental no identificada corresponda a una nueva especie en ésta área no descrita aún, o a alguna no incluida en el análisis. En el contexto de varios artículos recientemente publicados (Anderson & Cairney, 2004; O'Brien et al., 2005; Porter et al., 2008; Schmidt et al., 2008; Geml et al., 2009), los hongos que se encuentran en el substrato (en forma de micelio) son responsables de una parte mayoritaria de la diversidad de

especies (filogenética) del ecosistema. Además, es más probable que se encuentren ahí nuevos grupos de hongos que anteriormente no se contemplaban. Al llevar a cabo análisis filogenéticos que incluyan secuencias de muestras sin identidad taxonómica, pero con similitud nucleotídica, es considerable que se pueda inferir más acerca de la morfología de esa muestra en particular. Por ejemplo, saber que la muestra 153 pertenece a la subsección *Albescens* puede ayudar a la rápida identificación que representen la misma especie *in situ*, ya que se esperaría encontrar características morfológicas compartidas por la subsección (basidioma blanco, píleo de > de 100 mm de diámetro, subhimenio de 3(-1) células).

7.2 Propuestas de código de barras

Particularmente, las regiones *ITS* y *efl- α* , fueron las más aproximadas a funcionar como código de barras de ADN (Herbert & Gregory, 2005; Little & Stevenson, 2007). Como se mencionó anteriormente, en algunas muestras de ADN altamente degradado sólo fue posible obtener ya sea el *ITS1* o el *ITS2*, o bien fragmentos del *ITS*, en ocasiones también debido a cromatogramas con poca resolución. Sin embargo, los resultados demuestran que incluso secuencias fragmentadas tienen suficiente información para resolver su colocación en el clado correspondiente. Los resultados sugieren que el *ITS1* es más informativo en la sección *Caesareae* que el *ITS2*, y puede ser utilizado eficientemente como código de barras en ejemplares tipo muy antiguos en los cuales se espera que el ADN esté degradado. El *ITS* es una región del genoma que se encuentra en copias múltiples, por lo cual es fácil de amplificar y secuenciar (White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993; Buscot et al., 2000), además de ser propuesto anteriormente como un buen marcador de código de barras en hongos (Druzhinina et al., 2005; Kõljalg et al., 2005). Los análisis filogenéticos individuales (por región, figura 2) revelan la utilidad del *efl- α* para la delimitación de especies; de hecho este marcador fue esencial para distinguir algunas especies que no eran tan evidentes con *ITS*, y así confiriendo un valor de soporte elevado en clados a nivel de especie. A las regiones variables (intrones y terceras posiciones de codones) en *efl- α* se les puede atribuir la capacidad de resolución. Como antecedente de la eficiencia de *efl- α* , Geiser et al. (2004) lo utilizaron como marcador de código de barras en especies de *Fusarium*. Rehner & Buckley (2005) también enfatizaron en el uso de *efl- α* para distinguir especies en *Beauveria*, reportando que son más informativas que *ITS*. En nuestro estudio, tanto la región *ITS* como la de *efl- α* resultaron buenos marcadores a nivel de especies que

sin duda podrían funcionar como códigos de barras de ADN debido a la informatividad inherente de las propias secuencias. Otros autores también reportan la eficacia de estos dos marcadores en otros grupos de hongos (véase O'Donnell et al., 1998a, b; Peintner et al., 2003; Geiser et al., 2001a, b, 2004; Geml et al., 2005, 2006, 2008; Rehner & Buckley, 2005), sobretodo en análisis de relaciones filogenéticas de especies cercanas.

Aunque aquí se discute principalmente el poder de resolución filogenética de estas regiones también deben de considerarse las limitaciones operacionales y metodológicas de cada una. A pesar de que la región *ITS* es reconocida por ser fácil de amplificar, se han reportado (ver resultados 6.4) complicaciones en la secuenciación. Algunos reportan variación intragenómica (Taylor et al., 2006c; Nuytink & Verbeken, 2007; Justo et al., 2010), incluso Mathney et al. (2007) reportó este tipo de variación en un 20% de los basidiomicetos muestreados. La región *ITS* generalmente presenta un número considerable de indels lo que dificulta su alineamiento y homología (Álvarez & Wendel, 2003; Bruns & Shefferson, 2004). Además, aunque poco estudiado el efecto en hongos, las regiones *ITS1* e *ITS2* pueden formar estructuras secundarias, que en el momento de la secuenciación pueden causar heterogeneidad. Los genes protéicos resultan mejores en cuanto a los cromatogramas y alineamiento, sin embargo la gran desventaja recae en la dificultad para amplificar muestras herborizadas antiguas, con ADN degradado, y en el diseño de los iniciadores, los cuales comúnmente son degenerados en las segundas y terceras posiciones de codones.

7.3 Caracteres morfológicos

Inferir un patrón evolutivo en el fenotipo o en la morfología de hongos no es tarea fácil, y generalmente no es certero. Esto se debe principalmente a la alta plasticidad fenotípica y la común convergencia morfológica en hongos (Bruns et al., 1991; Hibbett et al., 1997; Petersen & Hughes, 1999; Burnett, 2003; Moncalvo, 2005). Tradicionalmente los micólogos se han esforzado en buscar caracteres morfológicos lo suficientemente robustos para visualizar patrones filogenéticos. Bas (1969) hizo una enmienda del género *Amanita* dividiéndolo en dos subgéneros (*Amanita* y *Lepidella*) basado en la reacción amiloide (reactivo de Melzer) de basidiosporas. Esta división infragenérica se corroboró por métodos moleculares utilizando genes ribosomales (Drehmel et al., 1999; Oda et al., 1999; Moncalvo et al., 2000a, 2002; Zhang et al., 2004). Otras inferencias relacionadas con

tendencias filogenéticas también fueron hechas por Bas (1969, 1977), indicando patrones ontogenéticos de los basidiomas en los diferentes grupos de *Amanita*, implicados en el desarrollo de estructuras características dentro del género; como lo son la presencia de anillo y volva, escamas en el píleo, decoraciones en el estípite, umbo y estrías. Además también sugirió tendencias filogenéticas de caracteres microscópicos como fibulas en la base de los basidios, forma-tamaño de basidiosporas y la estructura del subhimenio. Básicamente, el análisis de estos caracteres ontogenéticos y filogenéticos (en el sentido de Bas) dio como resultado el arreglo infragenérico de siete secciones, las cuales también han sido corroboradas como grupos monofiléticos a través de filogenias moleculares (Weiß et al., 1998; Drehmel et al., 1999; Oda et al., 1999; Moncalvo et al., 2000a, 2002; Zhang et al., 2004). Yang (1997) realizó una exploración taxonómica profunda del género *Amanita*, enmendado lo propuesto por Bas (1969) y Corner & Bas (1962) con respecto al arreglo infragenérico, además comenta que el género carece de suficientes caracteres morfológicos como para utilizarse en cladística.

A partir de los estudios de morfotaxonomía modernos realizados por Tulloss (2009b) la sección *Caesareae* se ha reorganizado en 10 estirpes con base en caracteres tanto macro como microscópicos. Las estirpes *Oleosa*, *Grandis* y *Torrendii* comprenden a las especies secuestradas (gasteroides) de clima mediterráneo. Recientemente, un estudio realizado por Justo et al. (2010) analiza filogenéticamente el género incluyendo a especies gasteroides como *A. grandis* (Bougher) Justo, *A. inclulta* (Bougher) Justo, *A. pseudoinclulta* Justo, *A. grandispora* (G.W. Beaton, Pegler, T.W.K. Young) Justo, *A. oleosa* (Bougher & T. Lebel) Justo y *A. torrendii*, las cuales anteriormente se consideraban dentro de los géneros *Amarrendia* Bougher & T. Lebel y *Torrendia* Bres. Su estudio sugiere que la gasteromicetización en *Amanita* tuvo orígenes múltiples, indicando una clara convergencia de estructuras morfológicas, probablemente desarrolladas debido al clima árido de las regiones mediterráneas y Australianas. En su trabajo el único clado anidado dentro de la sección *Caesarea* es el de *A. torrendii*. En trabajos previos (Moncalvo et al., 2002) se determinó que *A. torrendii* estaba filogenéticamente relacionada con la sección *Caesarea*, por ello se asumió que las otras especies gasteroides también lo estaban (Tulloss, 2009b). En este trabajo se determinó que dentro de la sección, *A. torrendii* se encuentra más relacionada con la subsección *Brevifulva* a diferencia de Tulloss (2009b) que contemplaba una relación más estrecha con la estirpe *Caesarea*.

La estirpe con mayor diversidad y mayor número de especies es *Hemibapha*, y la única característica en común es una estructura del subhimenio de 3(-1) células. Como se aprecia en la figura 4, esta característica es sumamente homoplásica dentro de la sección, ya que se presenta en cuatro (*Albescens*, *Brevifulva*, *Murrilliana*, *Caesarea*) de cinco subsecciones. Las estirpes *Caesarea* y *Calyptroderma* tienen mucho en común, sin considerar que *A. spreata*, dentro de la estirpe *Caesarea*, es la única que carece de pigmentos betalaínicos. El resto de las especies de estas dos estirpes sí presentan este tipo de pigmentos y una macromorfología muy similar (figura 4). El argumento de Tulloss (2009b) para separarlas radica en la diferencia estructural del subhimenio. Parece ser que el subhimenio es una estructura celular con alta plasticidad que podría estar relacionada con el tipo de ambiente. Es notable las especies que presentan un subhimenio de 3(-1) células predominan en ambientes tropicales o muy húmedos (cerca del 90% de las especies con este tipo de subhimenio habitan en el SE Asiático), mientras que otras (como *A. basii*, *A. caesarea* y *A. spreata*), que presenta una estructura del subhimenio de 5(-3) células, habitan en bosques de pino y encino en climas templados de América y Europa. El subhimenio de la estirpe *Calyptroderma* se caracteriza por ser una red ramificante de hifas cortas, es decir, no es pseudoparenquimatoso. Las especies que presentan este tipo de subhimenio (*A. calyptroderma*, *A. cochiseana*, *A. ichthyroballen* de la subsección *Caesareae*, y *A. calyptratoides* de la subsección *Calyptratoides*), hasta ahora sólo se han encontrado en el E y S de EUA (California, Washington, Oregon, Nuevo México, Arizona) y N de México (Chihuahua); sin embargo no comparten una historia evolutiva común, por lo que se sugiere que este rasgo pudo surgir independientemente en cada una.

Las especies de la subsección *Albescens* fueron consideradas como miembros de píleo blanco de la estirpe *Hemibapha* por la presencia de un subhimenio de 3(-1) células (figura 4). No obstante, este rasgo (la carencia de pigmentos) resultó ser una sinapomorfía en la subsección. Algunas especies, como *A. princeps*, presentan pálidos tonos café en el centro del píleo. La tendencia a generar basidiomas grandes (> de 100 mm de diámetro en el píleo) es común dentro de ésta subsección.

La subsección *Brevifulva* contiene las especies con mayor divergencia morfológica dentro de la sección, por un lado está *A. torrendii*, que como ya se mencionó es una forma secuestrada, y es un ejemplo claro de plasticidad fenotípica. Al parecer la filogenia (figura 6) muestra que *A. torrendii* divergió tempranamente dentro de la subsección. Por otro lado,

se encuentran dos subgrupos, uno con una fuerte tendencia a la producción de pigmentos pardos (*A. belizeana*, *A. esculenta*, *A. recutita*, *A. spreta*, *A. yuani*), tanto en el píleo como en el estípite. Con base en los resultados, no parece razonable que esta característica sea producto de una condición ambiental; ya que es una característica sinapomórfica (figuras 4 y 6). Coker (1917) reconoció similitudes morfológicas entre *A. recutita* y *A. spreta*. Los resultados muestran que en efecto están relacionadas (figura 6). No obstante, la primera presenta una característica sumamente inusual, el estípite presenta consistencia de madera, es decir, es notablemente rígido. Tulloss (2009b) consideró, debido al peculiar rasgo, a este taxón como el único integrante de su estirpe *Chambersiana*. *Amanita recutita* se ha recolectado en ambientes poco comunes como sustratos arcillosos en bosques de encinos, curiosamente la especie *A. pubescens sensu* Coker (sección *Amanitae*) crece en el mismo hábitat y presenta la misma característica de rigidez en el estípite. Así que tal vez esta condición esté sujeta a variables ambientales. El otro grupo de la subsección *Brevifulva*, contiene especies con basidiomas pequeños (< 100 mm diámetro en píleo), láminas con tonos rosados, y píleo blanco o con tonos pardos. La excepción a la regla dentro de este grupo es *A. bannigiana*, la cual tiene píleo con tonos amarillos (betaláinicos) y es mayor en tamaño con respecto al resto (figura 4). Es probable que el desarrollo de pigmentos amarillos haya surgido de manera independiente al de la subsección *Caesarea*. A pesar de que el grupo “pardo” y el grupo “blanco de láminas rosadas” se encuentran fuertemente delimitados por su macromorfología, una especie Australiana (ver siguiente sección temática) *A. roseolamellata*, presenta rasgos de ambos grupos; un píleo color café grisáceo, estípite blanco, y láminas rosadas. Su posición filogenética aparece entre los dos grupos (figura 6), por lo que sus características podrían asemejarse a las un ancestro común entre ambos clados.

La estirpe *Calyptratoides sensu* Tulloss) corresponde a la de este trabajo descrita subsección *Calyptratoides*, en la cual el único miembro es *A. calyptratoides*. Esta subsección se encuentra en una posición casi basal en la filogenia (figuras 3 y 6). La subsección que resultó más basal dentro de la sección *Caesareae* fue la subsección *Murrilliana* (figuras 3 y 6). En este grupo las especies descritas incluyen a *A. murrilliana* del E de EUA y *A. imazekii* de Japón. Estas dos especies comparten varias características morfológicas en común, ambas tienen un píleo con centro color café, haciéndose más pálido conforme se acerca a los bordes hasta llegar al blanco, el estípite es alargado y

carece de pigmentos, y es más delgado cerca del píleo y más ancho hacia la volva. Tulloss (2009a, b) notó que la base del estípite está ampliamente unida a la volva, rasgo inusual dentro de la sección, ya que en la mayoría de los taxa, la volva se une sólo en la parte más basal del estípite. Este grupo se consideraba dentro de la estirpe *Hemibapha* debido a sus integrantes presentan un subhimenio de 3(-1) células.

En resumen, muchos clados basales contienen especies con un basidioma de color blanco, con tonos grisáceos o color café sobre el píleo, y un estípite alargado, lo que indica que un ancestro remoto, común para toda la subsección, pudiera haber tenido una morfología similar. Es notoria la presencia de pigmentos brillantes y atractivos betaláinicos (rojos-violáceos y amarillos, o tonos intermedios como el naranja, Strack et al., 2003) en la subsección *Caesarea*. Es claro que en la sección hay una cantidad enorme de convergencia anatómica, al igual que plasticidad fenotípica, sin embargo la presencia de pigmentos betaláinicos en el basidioma es una clara condición sinapomórfica en la subsección *Caesarea*. Los caracteres micromorfológicos parecen ser de gran utilidad en la delimitación y segregación de especies, mas no en la formación de grupos de inclusión (monofiléticos). Por otro lado, las características macromorfológicas, como la presencia y el tipo de pigmentos, al igual que la conformación del basidioma como estructura, han resultado ser de mayor utilidad para la inclusión de alguna especie de la sección *Caesareae* dentro de las subsecciones.

El tamaño y forma esporal es un caracter ampliamente utilizado en la taxonomía de hongos, y *Amanita* no es la excepción. Los trabajos de Bas (1969, 1977) y Guzmán & Ramírez-Guillén (2001) son claros ejemplos de la importancia dada al tamaño esporal en *Amanita*. Tulloss (2005) discutió ampliamente algunas tendencias en *Amanita* relacionadas con factores ambientales y la ubicación geográfica de los taxa. Básicamente, expone los patrones biogeográficos, en varios taxa de *Amanita*, relacionados con la frecuencia de basidiosporas subglobosas en taxa boreales, alpinos y subárticos, y de basidiosporas baciliformes, alongadas o cilíndricas en taxa templados, tropicales y subtropicales. También mencionó que taxa con basidiosporas pequeñas son más abundantes en los trópicos. La forma de la basidiosporas también está implicada en la velocidad de liberación al medio. En este caso esporas subglobosas tienden a ser liberadas más rápidamente que esporas baciliformes. La discusión sobre la variación en el tamaño y forma esporas que hace Tulloss (*op. cit.*) hacen alusión a que es un caracter enteramente dependiente de la

adaptación local de los taxa en *Amanita*, y a pesar de que es un rasgo sumamente plástico para utilizarse en sistemática, es un buen indicador del hábitat de una especie.

7.4 Interpretaciones biogeográficas

El estudio de los procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, es un campo relativamente nuevo y emergente dentro de la micología (Lumbsch et al., 2008). Pese a que tradicionalmente se consideraba que las especies de hongos tenían distribución cosmopolita o subcosmopolita, se ha descubierto que muchas se encuentran delimitadas geográficamente, y en otras con relativamente poca variación morfológica se han encontrado taxa crípticos (Koufopanou et al., 2001; Dettman et al., 2003; Dunham et al., 2003; Geml et al., 2006, 2008; Le Gac et al., 2007; Carriconde et al., 2009).

A los clados a los que fue posible dar una mayor interpretación en relación a patrones biogeográficos fueron las subsecciones *Caesarea* y *Albescens*. Sin embargo, en la subsección *Brevifulva* también se reconocen algunos patrones. Dado que las especies de dicha subsección se encuentran mayoritariamente en el hemisferio Norte, y la más basal (*A. torrendii*) se localiza en el mediterráneo Europeo, es factible que este grupo sea Laurásico. También es posible ver claros patrones de vicarianza en especies emparentadas, como *A. yuaniana* y *A. esculenta*, y *A. spreata*, *A. recutita* y *A. belizeana* un clado Asiático y otro Americano. Paradójicamente, *Amanita roseolamellata* se encuentra en Australia de origen Gondwánico; en este caso se podría suponer que hubo dispersión de larga distancia desde el SE Asiático. Por el momento, proponer una hipótesis acerca de la historia biogeográfica de este taxón resulta difícil, sobretodo porque sólo se emplearon secuencias de *ITS*.

En lo que respecta a la subsección *Caesareae*, es posible inferir patrones biogeográficos, particularmente relacionados con procesos de dispersión y vicarianza en el hemisferio Norte. Es notable que el clado más basal de la subsección se encuentra en África. *Amanita mafingensis* fue una de las especies con mayor variación a nivel molecular (longitud de ramas) en todos los loci analizados. Una hipótesis probable podría ser que la subsección *Caesarea* haya tenido un origen Gondwanico (figura 8, café), y posteriormente se haya diversificado y dispersado rápidamente en el SE de Asia. Este tipo de patrón de dispersión ha sido reconocido anteriormente por Hosaka et al. (2008) en Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota) y Matheny et al. (2009) en un estudio biogeográfico de un grupo de hongos ectomicorrizógenos pertenecientes a la familia Inocybaceae

(Agaricales). El escenario más probable es que la dispersión hacia el S de Asia haya ocurrido por medio de la migración de una (o varias) poblaciones provenientes del paleotrópico (Africa-India), al derivar la masa subcontinental Índica durante el Eoceno (50-55 Ma), aproximándose al SE Asiático (figura 8, café). La cantidad de especies y su abundancia en el hemisferio Norte es indicativo de un proceso de rápida diversificación. Un claro ejemplo de esta diversificación, como ya se mencionó, es el "*complex. hemibapha*" (figura 5; figura 8, verde) y la cantidad de especies filogenéticas. La dispersión, el crecimiento de las poblaciones y el proceso de especiación tuvo que haber sido significativamente rápido, como para que varios linajes se expandieran a América vía beringia, y más aún para que un linaje cruzara transatlánticamente a América a través de puentes terrestres desde Europa. Cabe la posibilidad de que la subsección *Caesarea* se haya diversificado en el hemisferio norte mediante animales fungívoros que propiciaron la dispersión de basidiosporas. Burnett (2003) mencionó que se han encontrado basidiosporas fúngicas en las heces de una gran cantidad de animales, incluyendo insectos, nemátodos, mamíferos y aves, estas últimas en particular pueden transportar a través de largas distancias basidiosporas viables genéticamente distintas. Otros autores también han notado este efecto benéfico de zoocoria entre los hongos y la fauna (Hubert et al., 2003; Lilleskov & Bruns, 2005).

La figura 8 resume los principales patrones biogeográficos encontrados en la subsección *Caesarea*, y esquematiza las rutas de distribución hipotéticas de diferentes linajes. Por lo menos tres linajes migraron independientemente a través de tierras beringias hacia el continente Americano. Uno de estos linajes (figura 8, naranja), el que corresponde a *A. calyotroderma*, *A. arkansana*, *A. garabitoana*, *A. cochiseana* y *A. basii*, sólo contiene especies Americanas que se encuentran en el O y S de Norteamérica; otro linaje (figura 8, amarillo) corresponde a *A. icthyroballen*, que guarda mayor relación con especies de Siberia (*A. caesaroides*) y China (*A. hemibapha s.l.*), formando con ellas un grupo monofilético. Dentro de este mismo clado, se encuentran especies del O de China (*A. ochracea*) y Pakistán (*A. cinnamomesces*) por lo que es posible que se hayan expandido linajes no sólo de Asia a América, como en el caso de *A. icthyroballen*, sino hacia el occidente Asiático. El tercer linaje (figura 8, rojo) se refiere a *Amanita* sp. AR1, la cual se localiza en Arkansas, EUA. A pesar de que hay una tendencia en este clado (clado *jacksonii-caesarea*, figura 5; figura 8, rojo) de dispersión hacia Eurasia y hacia el E

Americano, esta especie y *A. jacksonii* son las únicas especies Americanas que pertenecen a este clado, y ya que *Amanita* sp. AR1 aparece basal, la hipótesis más parsimoniosa es que haya llegado a América vía Beringia, mucho antes que *A. jacksonii*. No obstante su posición en el árbol no es tan clara, ya que tiene bajos indicadores de soporte, y bien podría formar parte del clado del O Americano. El único linaje que con mayor certeza se puede decir que llegó a América a través de puentes terrestres transatlánticos es *A. jacksonii*, que además es un claro ejemplo de especiación vicariante con *A. caesarea*.

La historia evolutiva de las especies Americanas parece estar ligada a periodos de glaciación. Linzer et al. (2008) también han descrito, en el hongo patógeno de pinos *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., una separación de linajes Americanos en E y O, sin embargo su hipótesis respalda una sola migración beringia a través de la cual la especie llegó tanto al E como al O de EUA, posteriormente expandiéndose a México, como refugio glacial, y después reestableciéndose de nuevo en Norteamérica. Geml et al. (2006, 2008) también reportan la separación de clados geográficos en el E y O de América en estudios filogeográficos de *A. muscaria*. Dado que Geml et al. (*op. cit.*) proponen la región beringia como el lugar de origen de la especie, sugieren que ocurrieron eventos de expansión hacia Eurasia y América en repetidas ocasiones dando lugar a procesos de adaptación local. En el caso de *A. muscaria*, sucedieron varios eventos de especiación críptica en el O Americano, particularmente en Santa Cruz, California. También sostienen que la especie se dispersó antes del periodo glacial del Pleistoceno, en el cual los procesos de adaptación local llevaron a la especiación alopátrica regional. En nuestro estudio, patrones similares de expansión hacia Mesoamérica (México y Centroamérica), parecen haber ocurrido tanto en *A. jacksonii* en el E, como en el clado del O Americano. Ambos linajes (E y O) convergen en el Sur de México, como también lo señalaron Linzer et al. (2008) para *H. annosum*, a través de la Eje Neovolcánico de México y la Sierra Madre del Sur. Es posible que haya habido recolonización de linajes durante periodos más cálidos hacia el Norte desde el S de México y Centroamérica, probablemente durante la intermitencia de periodos glaciales en el Pleistoceno. Dado que las especies de Centroamérica (*A. garabitoana*) y S de México (*A. cf. hayalyuy*) aparecen basales a *A. basii* y *A. cochiseana*, especies que se distribuyen en el Centro, NO de México y SO de EUA, la idea de recolonización hacia el Norte es factible. Esta hipótesis también es contemplada por Linzer et al. (2008). Tulloss (2005) mencionó que hay una fuerte afinidad en taxa de *Amanita* entre las Montañas Chiricahuas en el SE de

EUA y la Sierra Madre Occidental en México. También sugiere que la Sierra Madre Occidental pudo haber jugado un papel de corredor entre Centroamérica y Norteamérica. En este trabajo se mencionan otras hipótesis que pueden correlacionarse en el presente estudio. Una de éstas es el límite de distribución Centroamericano en algunos grupos de *Amanita*; en donde la ausencia de especies de *Pinus* al S de Nicaragua y El Salvador (Perry, 1991; Perry et al., 1998), la reciente (en términos geológicos) aparición del istmo, y la “reciente” migración de *Quercus* hacia Sudamérica (Hooghiemstra, 2006), son factores que restringen la presencia de taxa de *Amanita*.

Otro patrón de vicarianza es observable en especies Japonesas, como en el caso de *A. rubromarginata*, *A. similis*, *A. javanica* y *A. hemibapha* s.l. (clado caesarea-jacksonii). En lo que respecta a *A. rubromarginata*, no se ha descrito una especie similar en áreas continentales. Sin embargo en las siguientes tres, han sido descritas especies morfológicamente similares tanto en regiones continentales de Asia como en Japón. Por lo anterior, es posible que la mayoría de las morfoespecies Asiáticas, reconocidas en Japón (o viceversa) sean especies vicariantes, pero sin diferenciación morfológica. Adicionalmente, Tulloss (2005) notó la similitud de taxa de *Amanita* sección *Amanitae* en la región del SE de China tiene una similitud de taxa del 50% con Japón, en la sección *Validae* la similitud es del 70%; mayor que otras regiones Asiáticas como India y Pakistán.

Aparentemente, las especies de la subsección *Albescens* son, al igual que la subsección *Caesarea*, de origen Gondwánico. La misma hipótesis de dispersión vía India durante el Eoceno también se sostiene en este trabajo. La distribución de las especies conocidas está restringida a África, Sureste Asiático (India, Tailandia, Camboya, Laos, Malasia, China) y Australia. El clado Africano (*A. zambiana*) y el clado Australiano (*A. egregia*) están bien delimitados filogenéticamente. Sin embargo, parece haber dos linajes en el Sureste Asiático, uno relacionado con *A. chepangiana* y *A. princeps*, y el otro relacionado con *Amanita* sp. Thai3. A diferencia de la subsección *Caesarea*, *Albescens* no se diversificó ni se expandió a través de Asia, América y Europa.

8. Conclusiones

- Los análisis filogenéticos multigénicos subdividen a la sección *Caesareae* en cinco subsecciones: *Caesarea*, *Albescens*, *Brevifulva*, *Calyptratoides*, *Murrilliana*.
- Caracteres macromorfológicos relacionados con la conformación (color, estructura, tamaño) del basidioma son congruentes con el arreglo por subsección.
- La convergencia morfológica es común en el grupo sobre todo a nivel micromorfológico; sin embargo, es de gran utilidad para la diferenciación de especies. En particular, la convergencia en la estructura del subhimenio de 1-3 células tuvo que haber surgido independientemente mínimo 9 veces; la de 3-5 células al menos 3 o 4 veces; y la de subhimenio no pseudoparenquimatoso al menos 4. En el caso de los caracteres macroscópicos, los pigmentos betalaínicos podrían haberse desarrollado mínimo 2 veces.
- Dentro de la subsección *Caesarea*, las especies consideradas como *A. hemibapha sensu lato* son filogenéticamente diversas. Es probable que exista un complejo y múltiples especies crípticas en la región del SE de Asia.
- Se contempla un origen Gondwánico para las subsecciones *Caesarea* y *Albescens*.
- Aparentemente la subsección *Caesarea* se diversificó en el hemisferio norte.
- Las regiones *ITS* y *efl- α* resultaron más factibles para utilizarse como código de barras de ADN.

9. Referencias

- Ainsworth, G.C., Kirk, P.M., Bisby, G.R., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford, EUA. CABI Bioscience. 650p.
- Alexopolous, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology*. 4ta ed. Wiley. EUA. 868p.
- Álvarez, I., Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6(8): 769-779.
- Atkinson, G.F. 1909. A remarkable *Amanita*. *Botanical Gazette* 48(4): 283-293.
- Avise, J.C., Ball, M.R. 1990. Principles of geneological concordance in species concepts and biological taxonomy. In: Futuyma, D., Antonovics, J. (Eds.) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Reino Unido. p 45-67.
- Avise, J.C., Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 7748-7755.
- Bas, C. 1969. Morphology and subdivisión of *Amanita* and a monograph of its section *Lepidella*. *Persoonia* 5: 285-579.
- Bas, C. 1977. Species concepts in *Amanita* section *Vaginatae*. In: H. Clémencón (Ed.) *The species concept in Hymenomycetes*. Bibl. Mycol. 61 J. Cramer, Vaduz. p 79-91.
- Baker, F.K., Lutzoni, F.M. 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 51(4): 625-637.
- Barraclough, T.G. 2010. Evolving entities: towards a unified framework for understanding diversity at the species level higher levels. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365: 1801-1813.
- Baum, D.A., Shaw, K.L. 1995. Geneological perspectives on the species problem. In: Hoch, P.C., Stephenson, A.G. (Eds.) *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 53. p 289-303.
- Begerow, D., John, B., Oberwinkler, F. 2004. Evolutionary relationships among b-tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycol. Res.* 108: 1257-1263.
- Berbee, M.L., Taylor, J.W. 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In: McLaughlin, D., McLaughlin, E., Lemke, P. (Eds.) *The Mycota: systematics and evolution*. Springer-Verlag, Berlín. p 229-245.
- Blackwell, M., Hibbett, D.S., Taylor, J.W., Spatafora, J.W. 2006. Research coordination networks: a phylogeny for the kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98(6): 829-837.
- Boa, E. 2004. *Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people*. Non-Wood Forest Products 17, Food Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 141p.
- Brickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I. 2006. Cryptic species as a window on biodiversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22(3): 148-155.

- Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J. 2005. The impact of molecular data in fungal systematics. *In*: Callow, A.J. (Ed.) *Advances in Botanical Research: incorporating advances in plant pathology*. Elsevier, 42. 10.1016/S0065-2296(05)42002-9
- Bruns, H.T., White, T. J., Taylor, J. W. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- Bruns, H.T., Vilgalys, R., Barns, S.M., Gonzalez, D., Hibbett, D.S., Lane, J.J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T.M., Weisburg, W.G., Sogin, M.L. 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1(3): 231-241.
- Bruns, T.D., Shefferson, R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can. J. Bot.* 82: 1122-1132.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L., Waddell, P.J. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42(3): 384-397.
- Burnett, J. 2003. *Fungal Populations and Species*. Oxford University Press. Reino Unido. 348p.
- Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in the ecosystem. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 601-614.
- Carriconde, F., Gardes, M., Jargeat, P., Heilmann-Clausen, J., Mouhamadou, B., Gryta, H. 2008. Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*. *Microb. Ecol.* doi: 10.1007/s00248-008-9370-2.
- Chapela, I.H., Garbelotto, M. 2004. Phylogeography and evolution in matsutake allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia* 96(4): 730-741.
- Chen, W., Hoy, J.W., Schneider, R.W. 1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp. Mycol.* 16: 22-34.
- Coetzee, M.P., Wingfield, B.D., Harrington, T.C., Dalevi, D., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J. 2000. Geographical diversity of *Armillaria mellea* s. s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 92: 105-113.
- Coetzee, M.P., Wingfield, B.D., Harrington, T.C., Steimel, J., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J. 2001a. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Mol. Ecol.* 10: 387-396.
- Coetzee, M.P.A., Wingfield, B.D., Bloomer, P., Ridley, G.S., G. A. Kile, M. J. Wingfield. 2001b. Phylogenetic relationships of Australian New Zealand *Armillaria* species. *Mycologia* 93: 887-896.
- Coker, W.C. 1917. The amanitas of the eastern United States. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 33: i + 1-88.
- Corner, E.J.H. & Bas, C. 1962. The genus *Amanita* in Singapore Malaya. *Persoonia* 2(3): 241-304.
- Christensen, M., Bhattarai, S., Devkota, S., Larsen, H.O. 2008. Collection and use of wild edible fungi in Nepal. *Econ. Bot.* 62(1): 12-23.
- Dahlberg, A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol.* 150: 555-562.

- Dahlberg, A., Jonsson, L., Nylund, J-E. 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old Norway spruce forest in south Sweden. *Can. J. Bot.* 8: 1323-1335.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc. Lon.* 85: 407-415.
- Daza, A., Manjón, J.L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santamaría, C. 2006. Effect of carbon and nitrogen sources, pH, and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza* 16: 133-136.
- Debaud, J.C., Gay, G., Prevost, A., Lei, J., Dexheimer, J. 1988. Ectomycorrhizal ability of genetically different homokaryotic and dikaryotic mycelia of *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol.* 108: 323-328.
- Debaud, J.C., Marmeisse, R., Gay, G. 1999. Intraespecific genetic variation and populations of ectomycorrhizal fungi. In: A. Varma, B. Hock (Eds.), *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology, Function and Biotechnology*, 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlín. p 75-110.
- Den Bakker, H.C., Zuccarello, G.C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E., 2004. Evolution and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Leccinum*. *New Phytol.* 163: 201-215.
- Dentinger, B.M., Margaritescu, S., Moncalvo, J.-M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Mol. Ecol. Res.* 10(4): 628-633.
- de Queiroz, A. 1993. For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* 42(3): 368-372.
- DeSalle, R., Egan, M.G., Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1905-1916.
- Dettman, J.R., Jacobson, D.J., Turner, E., Pringle, A., Taylor, J.W. 2003. Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora* comparing methods of species recognition in a model eukaryote. *Evolution* 57(12): 2721-2741.
- Drehmel, D., Moncalvo, J-M., Vilgalys, R. 1999. Molecular phylogeny of *Amanita* based on large-subunit ribosomal DNA sequences: implications for taxonomy and character evolution. *Mycologia* 91(4): 610-618.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komón, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocera*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 813-828.
- Dunham, S.M., O'Dell, T.E., Molina, R. 2003. Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveal a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadenes* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycol. Res.* 107(10): 1163-1177.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids. Res.* 32(5): 1792-97.
- Espinosa, D., Morrone, J.J, Llorente, J., Flores, O. 2002. *Introducción al análisis de patrones en biogeografía histórica*. Prensa de las Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 139p.

- Espinosa, D., Llorente, J., Morrone, J.J. 2006. Historical biogeography patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *J. Biogeogr.* 33: 1945-1958.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Farmer, D.J., Sylvia, D.M. 1998. Variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 102(7): 859-865.
- Fonseca, G., Derycke, S., Moens, T. 2008. Integrative taxonomy in two free-living nematode species. *Biol. J. Linn. Soc. Lon.* 94: 737-753.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., Brygoo, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251-1267.
- Frøslev, T.G., Matheny, P.B., Hibbett, D.S. 2005. Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): a comparison of RPB1, RPB2 and ITS phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37(2): 602-618.
- Frøslev, T.G., Jeppesen, T.S., Læssøe, T., Kjøller, R. 2007. Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 217-227.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D., Taylor, J.W. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Garibay-Orijel, R., Caballero, J., Estrada, A., Cifuentes, J. 2007. Understanding cultural significance, the edible mushrooms case. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3:4.
- Garnica, S., Weiss, M., Walther, G., Oberwinkler, F. 2007. Reconstructing the evolution of agarics from nuclear gene sequences and basidiospore ultrastructure. *Mycol. Res.* 111(9): 1019-1029.
- Geiser, D.M., Dorner, J.W., Horn, J.W., Taylor, J.W. 2001a. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Gen. Biol.* 31: 169-179.
- Geiser, D.M., Juba, J.H., Wang, B., JeVers, S.N. 2001b. *Fusarium hostae* sp. nov., a relative of *F. redolens* with a *Gibberella* teleomorph. *Mycologia* 93: 670-678.
- Geiser, D.M., Jiménez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kulda, G.A., O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110: 743-479.
- Geml, J., Davis, D.D., Geiser, D.M. 2005. Phylogenetic analyses reveal deeply divergent species lineages in the genus *Sphaerobolus* (Phallales: Basidiomycota). *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 313-322.
- Geml, J., Laursen, A., O'Neill, K., Nusbaum, H.C., Taylor, D.L. 2006. Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Mol. Ecol.* 15: 225-239.

- Geml, J., R. Tulloss, E., Laursen, G.A., Sazanova, N.A., Taylor, D.L. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 694-701.
- Geml, J., Laursen, G.A., Timling, I., McFarl, J., Booth, M.G., Lennon, N., Nusbaum, C., Taylor, D.L. 2009. Molecular phylogenetic biodiversity assessment of arctic and boreal ectomycorrhizal *Lactarius* Pers. (Russulales; Basidiomycota) in Alaska, based on soil and sporocarp DNA. *Mol. Ecol.* 18: 2213-2227.
- Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D.M., Hood, M.E. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45: 791-802.
- González, V., Arenal, F., Platas, G., Esteve-Raventós, F., Peláez, F. 2002. Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA. *Mycol. Res.* 106:903-910
- Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi in Mexico. *Biodiv. Conserv.* 7: 369-384.
- Guzmán, G. 2008. Análisis de los estudios sobre los macromycetes de México. *Rev. Mex. Micol.* 28: 7-15.
- Guzmán, G., Ramírez-Guillén, F. 2001. *The Amanita caesarea-complex*. Bibliotheca Mycologica-187, J. Cramer, Berlin.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. *Mycol. Res.* 150(12): 1422-1432.
- Hawksworth, D.L. 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud. Mycol.* 50: 9-18.
- Harrington, T.C., Rizzo, D.M. 1999. Defining species in the Fungi. In: J. J. Worrall (Ed.) *Structure Dynamics of Fungal Populations*. Kluwer, The Netherlands. p 43-72.
- Härkönen, M. 2002. Mushroom collection in Tanzania and Hunan (Southern China): Inherited wisdom and folklore of two different cultures. In: R. Watling, J.C. Frankl, A.M. Ainsworth, S. Isaac, G.H. Robinson (Eds.) *Tropical Mycology Vol. I, Macromycetes*. CABI International. Londres, Reino Unido. p 149-166.
- Hedh, J., Samson, P., Erl, S., Tunlid, A. 2008. Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycol. Res.* 112: 965-975.
- Helgason, T., Watson, I.J., Young, J.P.W. 2003. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 127-132.
- Herbert, P.D.N., Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5): 852-859.
- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred by ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12002-12006.
- Hillis, D.M., Davis, S.K. 1988. Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* 37(1): 63-66.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66(4): 411-453.

- Hooghiemstra, H. 2006. Immigration of oak into northern South America: a paleo-ecological Document. *In*: M. Kappelle (Ed.) Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak Forests, Ecological Studies 185. Springer. DOI: 10.1007/3-540-28909-7
- Hosaka, K., Castellano, M.A., Spatafora, J.W. 2008. Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycol. Res.* 112: 448-462.
- Huelskenbeck, J.P., Bull, J.J., Cunningham, C.W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.* 11, 152-158.
- Hughes, K.W., Petersen, R.H., Mata, J.L., Psurtseva, N.V., Kovalenko, A.E., Morozoba, O.V., Lickey, E.B., Cifuentes-Blanco, J., Lewis, D.P., Nagasawa, E., Halling, R.E., Takehashi, S., Aime, M.C., Bau, T., Henkel, T. 2007. Megacollybia (Agaricales). *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 45: 1-57.
- Hubert, J., Stejskal, V., Kubátová, A., Munzbergová, Z., Váňová, M. & Ždárková, E. 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Exp. Appl. Acarol.* 29: 69-87.
- James, T.Y., Moncalvo, J.-M., Li, S., Vilgalys, R. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G-H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schußler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Stridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B. Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Johnson, J.B., Omland, K.S. 2004. Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology Evolution.* 19(2): 101-108.
- Johnson, J.A., Harrington, T.C., Engelbrecht, C.J.B. 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycologia* 97: 1067-1092.
- Justo, A., Morgenstern, I., Hallen-Adams, H.E., Hibbett, D.S. 2010. Convergent evolution of sequestrate forms of *Amanita* under Mediterranean climate. *Mycologia* doi:10.3852/09-191.
- Kernaghan, G. 2005. Mycorrhizal diversity: Cause and effect. *In*: International Symposium on Impacts of Soil Biodiversity on Biogeochemical Processes in Ecosystems, Taiwán. *Pedobiol.* 49: 511-520.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10a ed, CABI, Wallingford. 640p.
- Kohn, L.M. 1992. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank resolution. *Mycologia* 84(2): 139-153.

- Koufopanou, V., Burt, A., Szaro, T., Taylor, J.W. 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* 18: 1246-1258.
- Kõljalg, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.N., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Vrålstad, T., Ursing, B. M. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 166: 1063-1068.
- Kretzer, A.M., Bruns, T.D. 1999. Use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 483-492.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: M.A. Innis, D.H. Gelf, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Nueva York. p 282-287.
- Le Gac, M., Hood, M.E., Fournier, E., Giraud, T. 2007. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00002.x
- Lilleskov, E.A., Bruns, T.D. 2005. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97 (4): 762-769.
- Lim, Y.W., Jung, H.S. 1998. Phylogenetic relationships of *Amanita* species based on ITS1-5.8S-ITS2 region sequences. *J. Microbiol. (Korea)* 36(3): 203-207.
- Linzer, R.E., Orosina, W.J., Gonthier, P., Bruhn, J., Laflamme, G. 2008. Inferences on the phylogeography of the fungal pathogen *Heterobasidion annosum*, including evidence of interespecific horizontal genetic transfer and of human-mediated, long-range dispersal. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46: 844-862.
- Liu, Y.L., Whelen, S., Hall, B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1799-1808.
- Little, D.P., Stevenson, D. Wm. 2007. A comparison of algorithms for the identification of specimens using DNA barcodes: examples from gymnosperms. *Cladistics* 23: 1-21.
- Lumbsch, H.T., Buchanan, P.K., May, T.W., Mueller, G.M. 2008. Phylogeography and biogeography of fungi. *Mycol. Res.* 112: 423-424.
- Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambilliotte, R., Sentenac, H., Combier, J.P., Melayah, D., Fraissinet-Tachet, L., Debaud, J.C. 2004. *Hebeloma cylindrosporum* – a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol.* 163: 481-498.
- Matheny, P.B. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 1-20.
- Matheny, P.B., Liu, Y.J., Ammirati, J.F., Hall, B.D. 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *Am. J. Bot.* 89(4): 688-698.
- Matheny, P.B., Curtis, J. M., Hofstetter, V., Aime, M.C., Moncalvo, J.-M., Ge, Z.-W., Yang, Z.-L., Slot, J.C., Ammirati, J.F., Baroni, T.J., Bougher, N.L., Huges, K.W., Lodge, D.J., Kerrigan, R.W., Seidl, M.T., Aanen, D.K., DeNitis, M., Daniele, G.M., Desjardin, D.E., Kropp, B.R., Norvell, L.L., Parker, A.,

- Vellinga, E.C., Vilgalys, R., Hibbett, D.S. 2006. Major clades of Agaricales: A multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98(6): 982-995.
- Matheny, P.B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J.M., Lim, Y.W., Nilsson, R.H., Hughes, K.W., Hoffsetter, V., Ammirati, J.F., Schoch, C.L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D.J., Wilson, A.W., Frøslev, T., Ge, Z.-W., Kerrigan, R.W., Slot, J.C., Yang, Z.-L., Baroni, T.J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M. T., Vauras, J., Hibbett, D.S. 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Mol. Phylogenet. Evol.* 43: 430-451.
- Matheny, P.B., Aime, M.C., Bougler, N.L., Buyck, B., Desjardin, D.E., Horak, E., Kropp, B.R., Lodge, D.J., Soyong, K., Trappe, J.M., Hibbett, D.S. 2009. Out of the Paleotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family *Inocybaceae*. *J. Biogeogr.* 36: 577-592.
- Mayden, R.L. 2002. On biological species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish Fish.* 3: 171-196.
- McLaughlin, D.J., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., Spatafora, J.W., Vilgalys, R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol.* 17(11): 488-497.
- Mejía, L.C., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., White, J.F. 2011. New species, phylogeny, host associations and geographic distribution of genus *Cryptosporella* (Gnomoniaceae, Diaporthales). *Mycologia* 103(2): 379-399.
- Meotto, F., Mello, A., Nosenzo, C., Vezzola, V. 1997. Morphological and molecular characterization of *Amanita caesarea* ectomycorrhizas. *Allionia* 35: 87-93
- Meotto, F., Pellegrino, S., Bounous, G. 1999. Evolution of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. Synthetic ectomycorrhizae on European chesnut (*Castanea sativa* Mill.) seedlings under field conditions. *Acta Hortic.* 494: 201-204
- Molina, R., Massicotte, H., Trappe, J.M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: Community-ecological consequences and practical implications. In: M.F. Allen (Ed.) *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, EUA. p 357-423.
- Moncalvo, J-M. 2005. Molecular systematics: major fungal phylogenetic groups and fungal species concepts. In: J. P. Xu (Ed.) *Evolutionary Genetics of Fungi*, Horizon Scientific Press, Norfolk. p 1-33.
- Moncalvo, J-M., Buchanan, P.K. 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the South Hemisphere in *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycol. Res.* 112: 425-436.
- Monclavo, J-M., Drehmel, D., Vilgalys, R. 2000a. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16(1): 48-63.
- Moncalvo, J-M., Lutzoni, F., Rehner, S.A., Johnson, J., Vilgalys, R. 2000b. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 49(2): 278-305.

- Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Aime, M.C., Hofstetter, V., Verduin, S.J.W., Larsson, E., Baroni, T.J., Thorn, R.G., Jacobsson, S., Clémenceçon, H., Miller, O.K. 2002. On hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 357-400.
- Moore, D., Novak-Frazer, A. 2002. *Essential Fungal Genetics*. Springer-Verlag, New York, EUA. 357p.
- Moreno G., Platas, G., Peláez, F., Bernedo, M., Vargas, A., Daza, A., Santamaría, C., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Manjón, J.L. 2008. Molecular phylogenetic analysis shows that *Amanita ponderosa* and *A. curtipes* are distinct species. *Mycol. Progress* 7: 41-47.
- Murat, C., Mello, A., Abbà, S., Vizzini, A., Bonfante, P. 2008. Edible mycorrhizal fungi: Identification, life cycle, and morphogenesis. In: A. Varma (Ed.) *Mycorrhiza*, Springer-Verlag, Berlín. p 707-732.
- Nehls, U., Mikolajewski, S., Magel, E., Hampp, R. 2001. The role of carbohydrates in ectomycorrhizal functioning: gene expression and metabolic control. *New Phytol.* 150: 533-541.
- Nehls, U., Grunze, N., Willmann, M., Reich, M., Küster, H. 2007. Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in the ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68: 82-91.
- Nuytnick, J., Verbeken, A., Miller, S.L. 2007. Worldwide phylogeny of *Lactarius* section *Deliciosi* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 99(6): 820-832.
- Nuytinck, J., Verbeken, A. 2007. Species delimitation and phylogenetic relationships in *Lactarius* section *Deliciosi* in Europe. *Mycol Res* 111: 1285-1297.
- O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J.-M. Moncalvo, R. Vilgalys. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9): 5544-5550.
- Oda, T., Tanaka, C., Tsuda, M. 1999. Molecular phylogeny of Japanese *Amanita* species based on nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Mycoscience* 40: 57-64.
- Oda, T., Tanaka, C., Tsuda, M. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. *Mycol. Res.* 108(8): 885- 896.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90(3): 465-493.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama diseases of banana: Concordant evidence from nuclear mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41: 600-623.
- Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., Köhler, J., Vilà, C., Chaparro, J.C., De la Riva, I., 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zool. Scr.* 38(4): 431-447.
- Peintner, U., Moser, M.M., Thomas, K.A., Manimohan, P. 2003. First records of ectomycorrhizal *Cortinarius* species (Agaricales, Basidiomycetes) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. *Mycol. Res.* 107: 485-494.

- Pérez-Silva, E. 1981. Nuevos registros de *Amanita* de la sección *Caesareae* (Agaricales) para México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 16: 141-149.
- Perry, J.P. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, EUA. 231p.
- Perry, J.P., Graham, A., Richardson, M.D. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. In: M.D. Richardson (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Reino Unido. p 137-149.
- Petersen, R.H., Hughes, K.W. 1999. Species and speciation in mushrooms. *BioScience* 49(6): 440-452.
- Porter, T.M., Skillman, J.E., Moncalvo, J-M. 2008. Fruiting body and soil rDNA sampling detects complementary assemblage of Agaricomycotina (Basidiomycota, Fungi) in hemlock-dominated forest plot in southern Ontario. *Mol. Ecol.* 17: 3037-3050.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latgé, J.P., Taylor, J.W. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59(9): 1886-1899.
- Rehner, S.A., Buckley, E., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-98.
- Rokas A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 427: 798-804.
- Robison, M.M., Chiang, B., Horgen, P.A. 2001. A phylogeny of the genus *Agaricus* based on mitochondrial *atp6* sequences. *Mycologia* 93: 30-37.
- Read, D.J., Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance?. *New Phytol.* 157: 475-492.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sanmee, R., Tullos, R.E., Lumyong, P., Dell, B., Lumyong, S. 2008. Studies on *Amanita* (Basidiomycetes: Amanitaceae) in Northern Thailand. *Fungal Diversity* 32: 97-123.
- Savoie, J-M., Largeteau, M.L. 2011. Production of edible mushrooms in the forest: trends in development of a mycosilviculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 971-979.
- Schmidt, S. K., Wilson, K.L., Meyer, A.F., Schadt, C.W., Porter, T.M., Moncalvo, J-M. 2008. The missing fungi: new insights from culture-independent molecular studies of soil. In: K. Zengler (Ed.) *Accessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to Organisms Genomes Back*. ASM Press, Washington D.C. p 55-65.
- Singer, R. 1951. The Agaricales in modern taxonomy (mushrooms). *Lilloa* 22: 5-832.
- Singer, R. 1957. Fungi mexicani, series prima-Agaricales. *Sydowia* 11(1-6): 354-374.
- Singer, R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*, 4ta ed. Koeltz Science, Koenigstein. 912p.
- Sites, J.W., Crandall, K.A. 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conserv. Biol.* 11(6): 1289-1297.

- Sites, J.W., Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 462-470.
- Sites, J.W., Marshall, J.C. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 199-227.
- Shaw, K.L. 2001. The genealogical view of speciation. *J. Evol. Biol.* 14: 880-882.
- Shen, Q., Geiser, D.M., Royse, D.J. 2002. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals species partition separating eastern North American and Asian isolates. *Mycologia* 94(3): 472-482.
- Smith, S.E, Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ra Ed. Academic Press, Londres, Reino Unido. 787p.
- Stamatakis, A. 2006a. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa Mixed Models. *Bioinformatics* 22(21): 2688-90.
- Stamatakis, A. 2006b. Phylogenetic models of rate heterogeneity: A high performance computing perspective. *In: Proc. of IPDPS2006*, Rhodos, Greece.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62: 247-269.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi, H. 2004. Two new species of Agaricales from southwestern islands of Japan. *Mycoscience* 45: 372-376.
- Tarka, M.T., Vasara, R., Gorfer, M., Raudaskoski, M. 2000. Molecular characterization of actin genes from homobasidiomycetes: two different actin genes from *Schizophyllum commune* and *Suillus bovinus*. *Gene* 251: 27-35.
- Taylor, A.F.S., Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19(3): 102-112.
- Taylor, A.F.S., Hills, A.E., Simonini, G., Both, E.E., Eberhardt, U. 2006c. Detection of species within the *Xerocomus subtmentosus* complex in Europe using rDNA-ITS sequences. *Mycol. Res.* 110:276-287.
- Taylor, J.W., Bruns, T.D. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* 8: 1837-1850.
- Taylor, J.W., Fisher, M.C. 2003. Fungal multilocus sequence typing – it's not just for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 351-356.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, M.D., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31: 21-32.
- Taylor, J.W., Turner, E., Dettman, J., Johannesson, H. 2006a. Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. *In: G.M. Gadd, S.C. Watkinson P.S. Dyer (Eds.) Fungi in the Environment*. Cambridge University Press, Reino Unido. p 313-339.

- Taylor, J.W., Turner, E., Townsend, J., Dettman, J.R., Jacobson, D. 2006b. Eukariotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom fungi. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361: 1947-63.
- Thon, M.R., Royse, D.J. 1999. Partial beta-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycologia* 91: 468-474.
- Trappe, J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606.
- Tulloss, R.E. 1998. Provisional world key to species closely related to *Amanita hemibapha* with notes on the slender Caesar's mushrooms of eastern North America. *McIlvainea* 13(1): 46-53.
- Tulloss, R.E. 2005. *Amanita*-distribution in the Americas with comparison to Eastern and southern Asia notes on spore character variation with latitude and ecology. *Mycotaxon* 93: 189-231.
- Tulloss, R.E. 2009a. Studies in the *Amanitaceae* (Ed. R.E. Tulloss). <http://www.amanitaceae.org/?Home> Consulta: 30 de Marzo del 2011.
- Tulloss, R.E. 2009b. Notes on *Amanita* section *Caesareae*, *Torrendia*, *Amarrendia* (Agaricales, Amanitaceae) with provisional division into strips and annotated world key to species of the section. In: Studies in the *Amanitaceae* <http://www.amanitaceae.org/content/uploaded/pdf/hemibkey.pdf> Consulta: 6 de Abril 2011.
- Vilgalys, R., Sun, B.L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 4599-4603.
- Vilgalys, R., Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172(8): 4238-46.
- Weiβ, M., Yang, Z.-L., Oberwinkler, F. 1998. Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. *Can. J. Bot.* 76(7): 1170-1179.
- Wiens, J.J. 2003. Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. *Syst. Biol.* 52(4): 528-538.
- Wiens, J.J. 2006. Missing data and the design of phylogenetic analyses. *J. Biomed. Inform.* 39: 34-42.
- Wiens, J.J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst. Biol.* 56(6): 875-878.
- Will, K. W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5): 844-851.
- Wirtz, N., Printzen, C., Lumbsch, H.T. 2008. The delimitation of Antarctic and bipolar species of the neopogonoid *Usnea* (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. *Mycol. Res.* 112: 472-484.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1991. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelf, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York. p 315-322.
- Wu, Q.-X., Mueller, G.M., Lutzoni, F.M., Huang, Y.-Q., Guo, S.-Y. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationships of Eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species (Fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17(1): 37-47.
- Yang, Z.-L. 1997. *Die Amanita-Arten von Sudwestchina*. Biblioth. Mycol. 170: i-ii, 1-240.

- Yang, Z-L. 2000. Species diversity of the genus *Amanita* (Basidiomycetes) in China. *Acta Bot. Yunn.* 22(2): 135-142.
- Yang, Z-L., Weiß, M., Kottke, I., Oberwinkler, F., Nehls, U., Guttenberg, M., Hampp, R. 1999. *Amanita*. In: J.W.G. Cairney, S.M. Chambers (Eds.) *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile*. Springer-Verlag, Berlín. p 201-230.
- Yun, W., Hall, I.R. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82(8): 1063-73.
- Zervakis, G.I., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology* 150: 715-726.
- Zhang, L., Yang, J., Yang, Z. 2004. Molecular phylogeny of Eastern Asian species of *Amanita* (Agariacales, Basidiomycota): taxonomic and biogeographic implications. *Fungal Diversity* 17: 219-238.
- Zolan, M.E., Pukkila, P.J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 195-200.

10. Apéndice de Tablas y Figuras

Tabla 1. Muestras incluidas en los análisis filogenéticos. En la tabla se indica la especie y localización geográfica de cada muestra, los datos del voucher y la región genómica obtenida. Herbarium Roosveltensis Amanitarum (H.R.A.), Herbario de la Facultad de Ciencias UNAM (FCME), Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Royal Ontario Museum Fungarium (TRTC), Herbario Nacional de México UNAM (MEXU), Herbario del Instituto de Ecología, A.C. (XAL), U.S. National Fungus Collections (BPI), Kanagawa Prefectural Museum of Natural History (KPM), Chiang-Mai University Herbarium (CMU).

No.	Especies	Ubicación Geográfica	Herbario y/o No. de Acceso	Colector y/o No. Colector	LSU	ITS	ef1- α	RPB2
001	<i>A. arkansana</i> H. R. Rosen	Texas, EUA	H.R.A. 283-5	D.P. Lewis 5302	X	X	X	X
002	<i>A. arkansana</i>	Texas, EUA	H.R.A. 354-9	D.P. Lewis 6321	X	X	X	X
003	<i>A. arkansana</i>	Texas, EUA	H.R.A. 139-10	J. Justice & A. Norarevian	X	X	X	X
004	<i>A. banningiana</i> Tulloss <i>nom. prov.</i>	Connecticut, US	H.R.A. 065-5	A.E. Bessette	X	X	X	
005	<i>A. banningiana</i>	New Jersey, US	H.R.A. 030-4	S. Kirby 8-31-91-SK1	X	X	X	
006	<i>A. basii</i> Guzmán & Ram.-Guill. ϑ	Mexico City, MEX	FCME	S. Sánchez S-32	X	X		X
007	<i>A. basii</i> †	Michoacán, MEX	FCME	S. Sánchez S-38	X	X		
008	<i>A. basii</i>	Puebla, MEX	FCME	S. Sánchez S-44	X	X	X	X
009	<i>A. basii</i>	Tlaxcala, MEX	H.R.A. 291-10	A. Kong Luz & A. Montoya	X	X		
010	<i>A. basii</i>	Edo. de México, MEX	H.R.A. 260-6	RET 7-5-96-C	X	X		
011	<i>A. basii</i> *	Tlaxcala, MEX	ENCB	Gonzalez 13		X		
012	<i>A. basii</i> +	Jalisco, MEX	ENCB	O. Rodriguez 1648	X	X		
013	<i>A. belizeana</i> Tulloss & Vincent <i>nom. prov.</i>	BELIZE	H.R.A. 094-5	M. A. Vincent [MAV 6034]	X	X	X	X
014	<i>A. caesarea</i> (Scop.) Pers	Cozenza, ITALIA	H.R.A. 142-9	C. Lavorato	X			
015	<i>A. caesarea</i>	Cozenza, ITALIA	H.R.A. 4271-1	C. Lavorato	X	X	X	
016	<i>A. caesarea</i>	Cozenza, ITALIA	H.R.A. 450-3	C. Lavorato	X	X		
017	<i>A. caesarea</i>	Cozenza, ITALIA	H.R.A. 036-2	C. Lavorato 910915-06	X	X	X	X
018	<i>A. caesaroides</i> Lyu. N. Vassilieva	Yunnan, CHINA	H.R.A. 356-10	D. Arora 02-107	X	X	X	
019	<i>A. calypratoides</i> Peck	California, EUA	MEXU	RET 1-14-93-Bpp (24314)	X			
020	<i>A. calypratoides</i>	Tlaxcala, MEX	H.R.A. 292-1	A. Gerenday	X	X	X	X
021	<i>A. calypratoides</i>	California, EUA	H.R.A. 382-8	D. Rust	X	X		X
022	<i>A. calypratoides</i>	California, EUA	H.R.A. 273-7	D. Parker	X	X	X	X
023	<i>A. calypratoides</i>	California, EUA	-----	T. Paulitz		X		
024	<i>A. calyptroderma</i> G. F. Atk. & V. G. Ballen	Oregon, EUA	H.R.A. 385-3	Dick Bishop	X	X		
025	<i>A. calyptroderma</i>	Washington, EUA	H.R.A. 389-4	J. E. Lindgren 05-501	X	X		
026	<i>A. calyptroderma</i>	Washington, EUA	H.R.A. 389-5	J. E. Lindgren 05-502	X	X	X	X

027	<i>A. calyptroderma</i>	Washington, EUA	H.R.A. 389-9	J. E. Lindgren 05-503	X	X		
028	<i>A. calyptroderma</i>	California, EUA	H.R.A. 092-6	J. E. Lindgren 05-504	X	X		
029	<i>A. calyptroderma</i>	Washington, EUA	H.R.A. 385-7	J. E. Lindgren 00-31	X	X	X	X
030	<i>A. calyptroderma</i>	Washington, EUA	H.R.A. 385-4	J. E. Lindgren 92-69	X	X	X	X
031	<i>A. chepangiana</i> Tulloss & Bhandary	NEPAL	H.R.A. 154 (p)	Sanjib	X		X	
032	<i>A. cf. chepangiana</i>	TAILANDIA	TRTC	J.-M. Moncalvo JM03/154	X	X	X	
033	<i>A. cinnamomescens</i> Tulloss <i>et al. nom. prov.</i>	PAKISTAN	H.R.A. 314-5	A. N. Khalid	X	X		
034	<i>A. cinnamomescens</i>	PAKISTAN	H.R.A. 317-5	A. N. Khalid 68000	X	X	X	X
035	<i>A. cinnamomescens</i>	PAKISTAN	H.R.A. 159-9	A. N. Khalid 95810		X		
036	<i>A. cinnamomescens</i>	PAKISTAN	H.R.A. 311-10	A. N. Khalid 481994[a]		X		
037	<i>A. cochiseana</i> Tulloss <i>nom. prov.</i>	Chihuahua, MEX	FCME	S. Sánchez S-31	X	X	X	
038	<i>A. cf. laurae</i> Guzmán & Ram.-Guill.	Jalisco, MEX	XAL	Guzmán 21975	X	X		
039	<i>A. cochiseana</i>	Arizona, EUA	H.R.A.	R. Redman s.n. [CMP1606]	X	X	X	X
040	<i>A. cochiseana</i>	Arizona, EUA	H.R.A.	A. Ortiz s.n. [CMP3701]	X	X		X
041	<i>A. cochiseana</i> (NM7)	New Mexico, EUA	H.R.A. 072-5	M. L. McKee <i>et al.</i>	X	X	X	X
042	<i>A. egregia</i> Reid	AUSTRALIA	H.R.A. 136-7	D. Arora A-32	X	X		X
043	<i>A. esculenta</i> Hongo & I. Matsuda	TAILANDIA	TRTC	J.-M. Moncalvo CMU46102	X			
044	<i>A. esculenta</i>	TAILANDIA	TRTC-150406	J.-M. Moncalvo CMU4695	X	X	X	
045	<i>A. esculenta</i>	TAILANDIA	TRTC-150410	J.-M. Moncalvo CMU4699	X	X		
046	<i>A. garabitoana</i> Tulloss, Halling & G. M. Muell. <i>nom. prov.</i>	COSTA RICA	H.R.A. 333-2	R.E. Halling 6-25-95-H		X		
047	<i>A. garabitoana</i>	COSTA RICA	H.R.A. 333-6	C. Shanks <i>et al.</i> , 6-16-95-C	X	X	X	X
048	<i>A. garabitoana</i>	COSTA RICA	H.R.A.	J. P. Schmit 475	X	X		
049	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	TAILANDIA	TRTC-150286	J.-M. Moncalvo JM03/131	X	X	X	
050	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	TAILANDIA	TRTC-150422	J.-M. Moncalvo CMU46111	X	X		
051	<i>A. hemibapha</i> (Berk. & Broome) Sacc.	Kerala, INDIA	H.R.A. 342-8	K. B. Vrinda 625	X	X	X	
052	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	TAILANDIA	TRTC	J.-M. Moncalvo JM03/159	X	X	X	
053	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	JAPON	H.R.A. B382	-----	X			
054	<i>A. hemibapha</i> (Berk. & Broome) Sacc.	TAILANDIA	H.R.A. 349-5	D. Arora	X	X		
055	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	INDIA	BPI	HPUB 560		X		
056	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	Yunnan, CHINA	H.R.A. 0257-8	D. Arora	X		X	
057	<i>A. ichtyroballen</i> Tulloss <i>nom. prov.</i>	Washington, EUA	H.R.A. 385-2	J. E. Lindgren 93-07	X	X	X	X
058	<i>A. ichtyroballen</i>	Oregon, EUA	H.R.A. 385-9	J. E. Lindgren 93-04	X	X		
059	<i>A. ichtyroballen</i>	Oregon, EUA	H.R.A. 385-6	J. E. Lindgren 93-03	X	X	X	X
060	<i>A. ichtyroballen</i>	Washington, EUA	H.R.A. 281-9	M. Beug	X	X	X	X
061	<i>A. ichtyroballen</i>	California, EUA	H.R.A. 084-7	D. Arora	X	X		
062	<i>A. jacksonii</i> Pomerleau δ	Oaxaca, MEX	FCME-21652	Villanueva- Jimenez 242	X	X	X	X
063	<i>A. jacksonii</i> +	Oaxaca, MEX	FCME-21550	Luna-Gonzalez 10	X	X	X	
064	<i>A. jacksonii</i>	Québec, CANADA	-----	DD16	X			

065	<i>A. jacksonii</i>	New York, EUA	H.R.A. 0154-10	R. E. Tulloss	X		X	
066	<i>A. jacksonii</i>	Texas, EUA	H.R.A. 354-8	D. P. Lewis 6357	X	X	X	
067	<i>A. jacksonii</i>	Nebraska, EUA	H.R.A. 315-8	C. Carlson	X		X	
068	<i>A. jacksonii</i>	Hidalgo, MEX	H.R.A. 252-9	A. Estrada Torres	X	X	X	
069	<i>A. jacksonii</i>	New York, EUA	H.R.A. 154-10	-----	X		X	
070	<i>A. jacksonii</i>	Massachusetts, EUA	H.R.A.	M. A. & R. E. Tulloss	X	X	X	X
071	<i>A. jacksonii</i>	North Carolina, EUA	GSMNP FU-0229	R. E. & S. E. K. Tulloss	X	X	X	X
072	<i>A. jacksonii</i>	North Carolina, EUA	H.R.A. 109-4	AVFD [GSMNP FU-0150]	X	X	X	
073	<i>A. jacksonii</i>	North Carolina, EUA	GSMNP FU-0223	E. Rothberger & T. Rey	X	X	X	
074	<i>A. jacksonii</i>	Québec, CANADA	GSMNP FU-0150	AVFD	X			
075	<i>A. jacksonii</i> *	Veracruz, MEX	XAL	Chacón 5895	X	X	X	
076	<i>A. cf. javanica</i> (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda	Dalat, VIETNAM	TRTC-157120	B. M. Dentinger		X		
077	<i>A. cf. javanica</i>	Dalat, VIETNAM	TRTC-157127	B. M. Dentinger		X		
078	<i>A. mafingensis</i> Härk. & Saarim.	Zambia, AFRICA	H.R.A. 345-9	D. Arora	X	X		
079	<i>A. mafingensis</i>	Zambia, AFRICA	H.R.A. 348-9	D. Arora	X	X		
080	<i>A. masasiensis</i>	Zambia, AFRICA	H.R.A. 348-3	D. Arora	X		X	
081	<i>A. masasiensis</i>	Zambia, AFRICA	H.R.A. 344-5	D. Arora 00-318	X	X		
082	<i>A. masasiensis</i>	Zambia, AFRICA	H.R.A. 348-2	D. Arora 00-452	X	X	X	
083	<i>A. murrilliana</i> Singer	North Carolina, EUA	H.R.A. 278-1	A. Stanley 758	X	X	X	X
084	<i>A. murrilliana</i>	Québec, CANADA	H.R.A. 251-4	Y. Lamoureux 2866	X	X		
085	<i>A. murrilliana</i>	Tennessee, EUA	H.R.A. 374-2	J. Carrera	X			
086	<i>A. hemibapha</i> var. <i>ochracea</i> Zhu. L. Yang	Yunnan, CHINA	H.R.A. 258-1	D. Arora	X			
087	<i>A. princeps</i> Corner & Bas	TAILANDIA		D. Arora	X	X	X	
088	<i>A. princeps</i>	TAILANDIA		D. Arora	X	X	X	
089	<i>A. recutita sensu</i> Coker	Oklahoma, EUA	H.R.A. AROH1	G. L. Ovrebo	X	X	X	
090	<i>A. ristichii</i> Tulloss	Maine, EUA	H.R.A. 124-10	S. S. Ristich	X	X		
091	<i>A. ristichii</i>	Québec, CANADA	H.R.A. 096-1	P. Ray & L. Bushey 1885	X	X	X	X
092	<i>A. rubromarginata</i> Har. Takahashi	Okinawa, JAPON	KPM NC-0011979	H. Takahashi	X	X		
093	<i>A. cf. similis</i> Boedijn	Dalat, VIETNAM	TRTC-157090	B. M. Dentinger		X		
094	<i>A. spreta</i> (Peck) Sacc.	EUA	H.R.A.			X	X	X
095	<i>A. spreta</i>	EUA	H.R.A.		X	X	X	X
096	<i>A. spreta</i>	EUA	H.R.A.		X	X		
097	<i>A. tanzanica</i> Härk. & Saarim.	Zambia, AFRICA	H.R.A. 346-7	D. Arora	X	X		
098	<i>A. cf. hayalyuy</i> D. Arora & Shepard	Oaxaca, MEX	FCME-15194	Villanueva-Jimenez 81	X	X	X	
099	<i>A. cf. hayalyuy</i>	Veracruz, MEX	ENCB	Ventura 11546		X		
100	<i>A. virginiana</i> (Murrill) Murrill	Connecticut, EUA	H.R.A. 268-10	D. Lewis	X			X
101	<i>A. virginiana</i>	EUA	H.R.A.		X	X	X	
102	<i>A. virginiana</i>	Tennessee, EUA	H.R.A. 374-2	S. S. Ristich	X	X		X

103	<i>A. yuaniana</i> Zhu. L. Yang	Yunnan, CHINA	H.R.A. 257-8	D. Arora	X		X	
104	<i>A. zambiana</i> Pegler & Pearce	Zambia, AFRICA			X	X		X
105	<i>A. zambiana</i>	Burundi, AFRICA			X	X	X	X
106	<i>A. zambiana</i>	Zimbabwe, AFRICA				X		
	Especies no descritas (<i>cryptonom. temp.</i>)							
107	<i>Amanita</i> sp. 53	New York, EUA	H.R.A. 383-2	Horman	X			
108	<i>A. sp. AR1</i>	Arkansas, EUA	H.R.A. 373-9	L. McGarrah	X	X	X	X
109	<i>A. sp. F11</i>	Florida, EUA	H.R.A. 138-1	A. Norarevian	X	X	X	
110	<i>A. sp. F11</i>	Florida, EUA	H.R.A. 138-2	A. Norarevian	X	X	X	X
111	<i>A. sp. M36</i>	Tlaxcala, MEX	H.R.A. 293-4	A. Kong Luz	X	X	X	
112	<i>A. sp. M36</i>	Tlaxcala, MEX	H.R.A. 293-3	D. P. Lewis	X	X	X	X
113	<i>A. sp. T31</i>	Texas, EUA	H.R.A. 365-1	D. P. Lewis 6189	X	X	X	X
114	<i>A. sp. Thai3</i>	TAILANDIA	TRTC-150285	J.-M. Moncalvo JM03/130		X		
115	<i>A. sp. Thai3</i>	CAMBODIA	H.R.A. 350-7	D. Arora 00-10		X		
116	<i>A. sp. Thai3</i>	Nakhon, THAI	H.R.A. 351-7	D. Arora 98-35	X	X	X	X
117	<i>A. sp. Thai3</i>	LAOS	H.R.A. 350-1	D. Arora 99-332	X	X	X	X
118	<i>A. sp. Thai3</i>	NEPAL	CMU	MC06		X		
119	<i>A. sp. Thai3 (princeps)</i>	TAILANDIA	H.R.A. 356-5	D. Arora	X	X	X	
	Grupo externo							
120	<i>A. amerimuscaria</i> Tulloss & Geml <i>nom. prov.</i>	MEXICO	FCME	S. Sánchez	X			
121	<i>A. aff. vaginata</i>	MEXICO	FCME	S. Sánchez	X			

∅ Identificada como *A. caesarea* (Scop.) Pers.

† Identificada como *A. yema* Guzmán & Ram.-Guill.

* Identificada como *A. tecomate* Guzmán & Ram.-Guill.

+ Identificada como *A. laurae* Guzmán & Ram.-Guill.

Tabla 2. Grupo de secuencias del GeneBank, las cuales pertenecen a la sección *Caesareae*, y/o aparecieron como producto de una búsqueda en nBLAST, en el caso de muestras ambientales o sin etiqueta apropiada que obtuvieron un alto puntaje.

No.	Especies	Etiqueta de GeneBank	Ubicación	Voucher	LSU	ITS	RPB2
124	<i>A. caesarea</i> (Scop.) Pers	----	ITALIA	C. Bas 7989 (L)	AF024443		
125	<i>A. caesarea</i>	----	ESPAÑA	AH 31721		AY486237	
126	<i>A. calyptroderma</i> G. F. Atk. & V. G. Ballen	<i>A. lanei</i>	California, EUA	src437		DQ974693	
127	<i>A. calyptroderma</i>	<i>A. lanei</i>	California, EUA	07036	GQ250415	GQ250400	GQ401358
128	<i>A. chepangiana</i> Tulloss & Bhandary	----	Sichuan, CHINA	HKAS 34218	AF024445		

129	<i>A. esculenta</i> Hongo & I. Matsuda	-----	Sichuan, CHINA	HKAS 34169		AY436451	
130	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	-----	Yunnan, CHINA	HKAS 38416		AY436460	
131	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	subsp. <i>hemibapha</i>	JAPON	LEM960078		AB015699	
132	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	-----	Yunnan, CHINA	-----		FJ375334	
133	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	-----	Nan, TAILANDIA	CUB:Microbiology M2		AB458888	
134	<i>A. hemibapha sensu lato</i>	subsp. <i>javanica</i>	TAILANDIA	-----		AB451969	
135	<i>A. ichtyroballen</i> Tulloss nom. prov.	aff. <i>lanei</i>	California, EUA	07020	GQ250416	GQ250401	GQ401359
136	<i>A. ichtyroballen</i>	<i>A. lanei</i>	California, EUA	src644		EF559283	
137	<i>A. imazekii</i> T. Oda, C. Tanaka & Tsuda	<i>A. chepangiana</i>	CHINA	HKAS 25772		AY436450	
138	<i>A. imazekii</i>	-----	JAPON	FB-24749 (CBM)		AB038767	
139	<i>A. incarnatifolia</i> Zhu. L. Yang	-----	CHINA	HKAS 29519	AF024459		
140	<i>A. jacksonii</i> Pomerleau	-----	New Hampshire, EUA	HKAS 34041		AY436461	
141	<i>A. jacksonii</i>	-----	EUA	TV96/1	AF097376		
142	<i>A. jacksonii</i>	<i>Amanita</i> sp.	Guerrero, MEX	MHM124		EU569230	
143	<i>A. javanica</i> (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda	<i>A. hemibapha</i> subsp. <i>javanica</i>	JAPON	LEM970513		AB015698	
145	<i>A. longistriata</i> (Imai) Gilbert	-----	JAPON	LEM950067		AB015678	
146	<i>A. hemibapha</i> subsp. <i>ochracea</i> Zhu. L. Yang	<i>A. hemibapha</i> subsp. <i>ochracea</i>	CHINA	HKAS 29522	AF024458		
147	<i>A. roseolamellata</i> A. E. Wood	-----	AUSTRALIA	-----		AY194980	
148	<i>A. similis</i> Boedijn	<i>A. hemibapha</i> subsp. <i>similis</i>	TAILANDIA	LEM960013		AB015697	
149	<i>A. torrendii</i> Justo	-----	ESPAÑA	LOU-Fungi 18202	GQ925368	GQ925387	
150	<i>A. torrendii</i> Justo	-----	ESPAÑA	LOU-Fungi 17408	GQ925369	GQ925386	
151	<i>A. yuaniiana</i> Zhu. L. Yang	-----	Yunnan, CHINA	HKAS32491		AB039792	
152	<i>A. yuaniiana</i>	-----	Yunnan, CHINA	HKAS29516	AF024488	AY436479	
	Muestras ambientales						
153	-----	Uncultured <i>Amanita</i> clone	MALAYSIA	LH1		GQ268548	
154	<i>A. ichtyroballen</i> Tulloss nom. prov.	Uncultured <i>Amanita</i> isolate	California, EUA	JMU1_1		GU183957	
155	<i>A. basii</i> Guzmán & Ram.-Guill.	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Amanita</i>) clone	Guerrero, MEX	M70C8		FJ196897	
156	<i>A. banningiana</i> Tulloss nom. prov.	Uncultured fungus	Ohio, EUA	S0739		FM999619	

Tabla 3. Matrices y particiones utilizadas para los análisis de Máxima Verosimilitud y Análisis Bayesiano. Se muestran los mejores modelos para cada partición seleccionados por hierarchical Likelihood Test Ratio y Akaike Informative Criterion para cada partición.

Set de datos	Muestra	Sitios	Esquema de partición MV	Mejor modelo para MV †hLRT / *AIC	Esquema de partición de datos para AB	Mejor modelo para AB †hLRT / *AIC
Seccional	118	2103	LSU <i>ef1-α</i> exones RPB2	TrN+I+G† / TIM+I+G* TrN+I+G† / TrNef+I+G* TrN+I+G† / TrNef+I+G*	LSU <i>ef1-α</i> 1er posición de codón <i>ef1-α</i> 2da posición de codón <i>ef1-α</i> 3er posición de codón RPB2 1er posición de codón RPB2 2da posición de codón RPB2 3er posición de codón	----- F81+I+G† / TrN+I+G* JC+I+G† / TVM+I+G* HKY+G† / TVM+G* TrN+G† / TrN+I* F81+G† / TVM+I* TrNef† / TrNef*
Subsección <i>Caesareae</i>	98	2863	ITS <i>ef1-α</i> intrones LSU <i>ef1-α</i> exones RPB2	HKY+G† / TVM+G* HKY+G† / HKY+G* TrN+I+G† / GTR+I+G* TrN+G† / TrNef+I+G* K80+G† / K80+I*	ITS <i>ef1-α</i> intrones LSU <i>ef1-α</i> 1er posición de codón <i>ef1-α</i> 2da posición de codón <i>ef1-α</i> 3er posición de codón RPB2 1er posición de codón RPB2 2da posición de codón RPB2 3er posición de codón	----- ----- ----- F81+I+G† / TIM+I+G* HKY† / TVM* JC† / K81uf+I* HKY† / TIM* JC† / TrN* K80† / K80*
Subsecciones <i>Murrilliana</i> , <i>Calyptratoides</i> , <i>Albescens</i> , <i>brevifulva</i>	54	2859	ITS <i>ef1-α</i> intrones LSU <i>ef1-α</i> exones RPB2	HKY+G† / GTR+I+G* HKY+G† / HKY+G* TrN+I+G† / TIM+I+G* TrN+G† / TrNef+G* TrNef+G† / TrNef+G*	ITS <i>ef1-α</i> intrones LSU <i>ef1-α</i> 1er posición de codón <i>ef1-α</i> 2da posición de codón <i>ef1-α</i> 3er posición de codón RPB2 1er posición de codón RPB2 2da posición de codón RPB2 3er posición de codón	----- ----- ----- F81+I+G† / F81+I* HKY† / K81uf+G* JC+I+G† / TVM+I* TrN+G† / TrN+I* F81+I† / K81uf+I* TrNef† / TIMef*

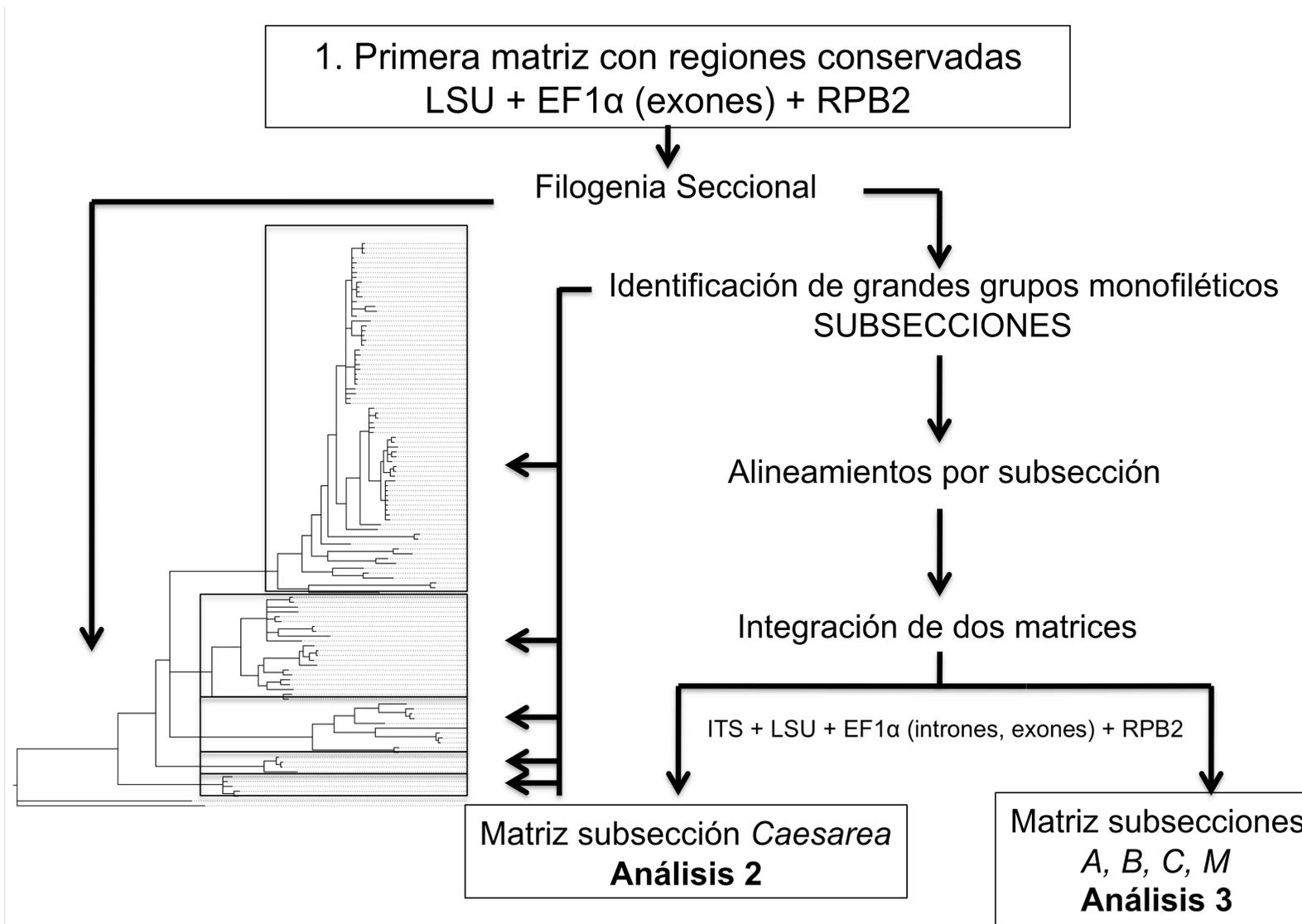


Figura 1. Diagrama de flujo donde se indica el procedimiento y manejo de matrices de datos, y subsecuentes análisis. El primer cuadro en la parte superior fue el primer paso donde una matriz inicial alineada con regiones conservadas fue utilizada para llevar a cabo la sistemática seccional. En seguida fueron identificados los principales grupos, en los cuales se realinearon los datos incluyendo regiones variables. Dos matrices fueron integradas para llevar a cabo subsecuentes análisis. *A: Albescens, B: Brevifulva, C: Calyptrotoides, M: Murrilliana.*

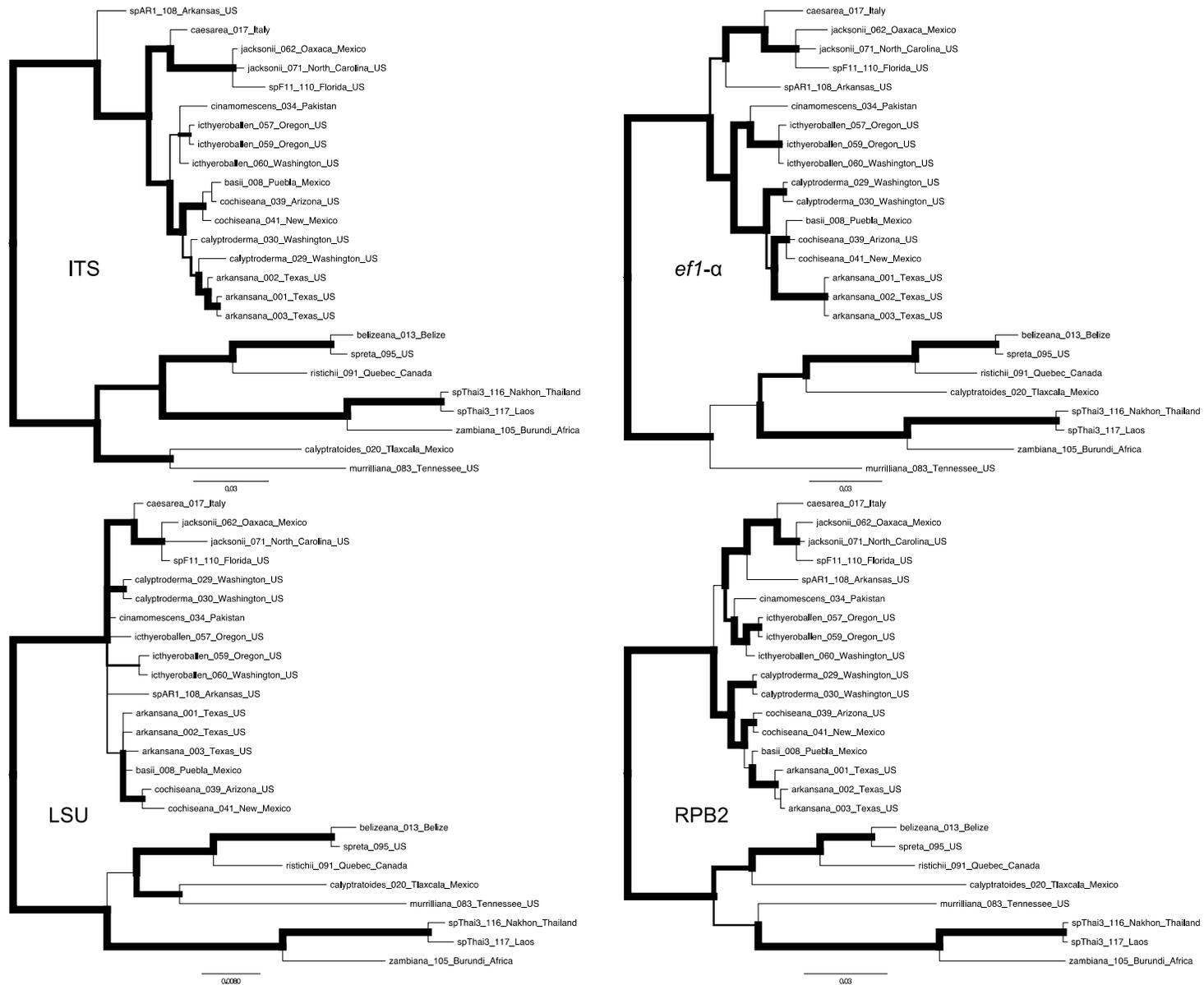


Figura 2. Análisis bayesianos independientes (por locus) aplicando el criterio de combinación condicionada. Grosor de ramas indica nivel de soporte en probabilidad posterior (máximo grosor igual a 1.0 de probabilidad posterior).

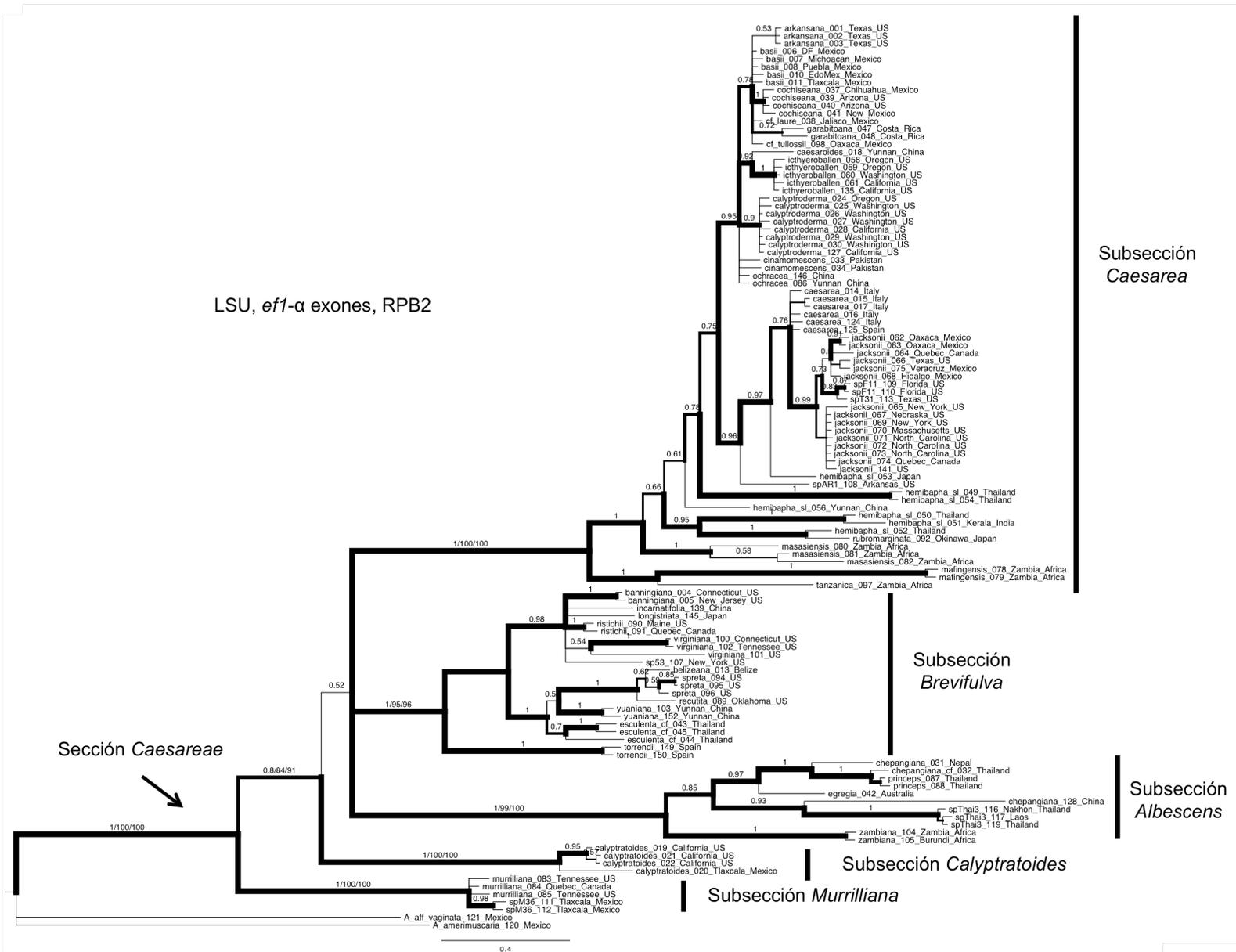


Figura 3. Árbol Bayesiano de consenso de mayoría para el conjunto de datos seccional que incluye las regiones *LSU*, exones de *efl-α* y *RPB2*. Aquí se delimitan los principales grupos monofiléticos o subsecciones indicados con líneas verticales. En cada rama se muestran los valores de soporte de probabilidad posterior, y sólo en ramas subseccionales y basales valores adicionales de bootstrap ML y MP.

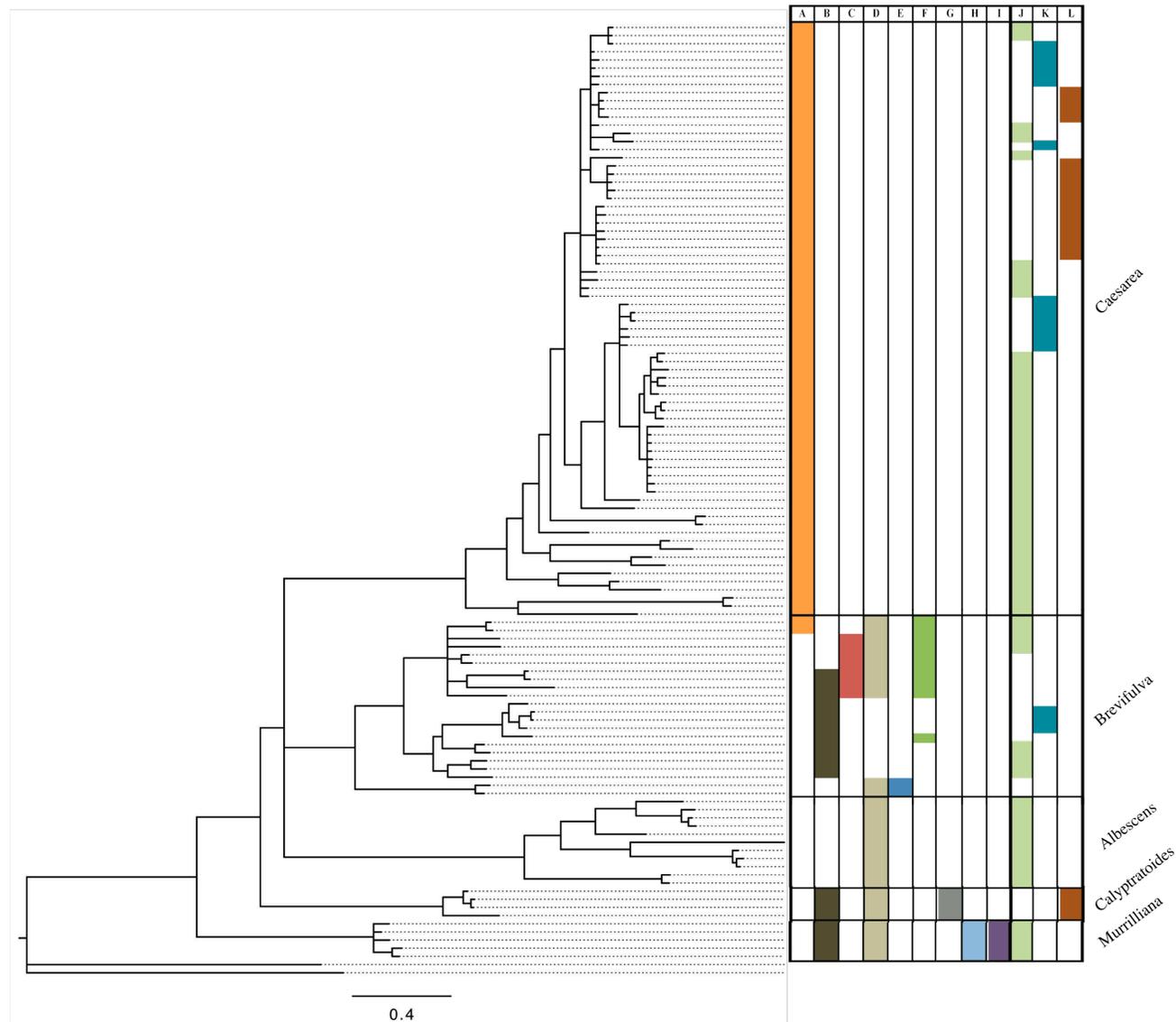


Figura 4. Árbol consenso de mayoría para el conjunto de datos seccional (figura 1) con matriz de datos morfológicos. De las letras A a la I son caracteres macromorfológicos; y de la J a la K son caracteres micromorfológicos. A) presencia de pigmentos betaláinicos, B) presencia de pigmentos pardos (melanina), C) presencia de láminas rosadas, D) presencia de estípites pálidos (sin o con pocos pigmentos), E) basidioma sequestre, F) basidioma menor a 100 mm de diámetro, G) velo que se "disuelve" en el estípite, H) volva adherida al estípite, I) estípite proporcionalmente más delgado en el ápice que en la base, J) subhimenio de 1-3 células (pseudoparenquimatoso), K) subhimenio de 3-5 células (pseudoparenquimatoso), L) subhimenio como una red ramosa de hifas cortas (no pseudoparenquimatoso).

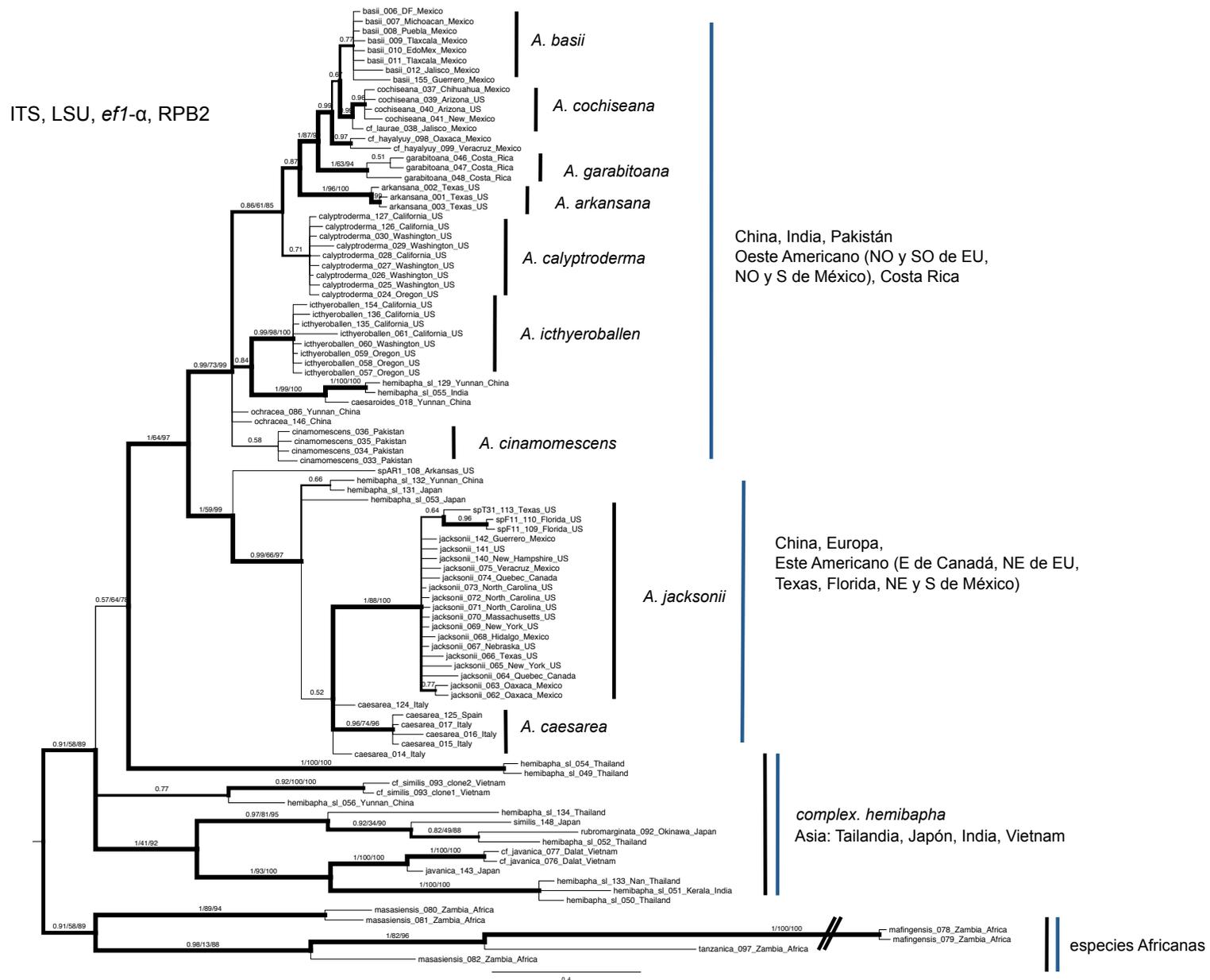


Figura 5. Árbol bayesiano de consenso de mayoría para el conjunto de datos de la subsección *Caesarea*. Las líneas verticales negras delimitan especies monofiléticas, las líneas azules indican distribución geográfica de clados (grupos sinapomórficos). Los valores de soporte indicados son probabilidad posterior, bootstrap ML y MP.

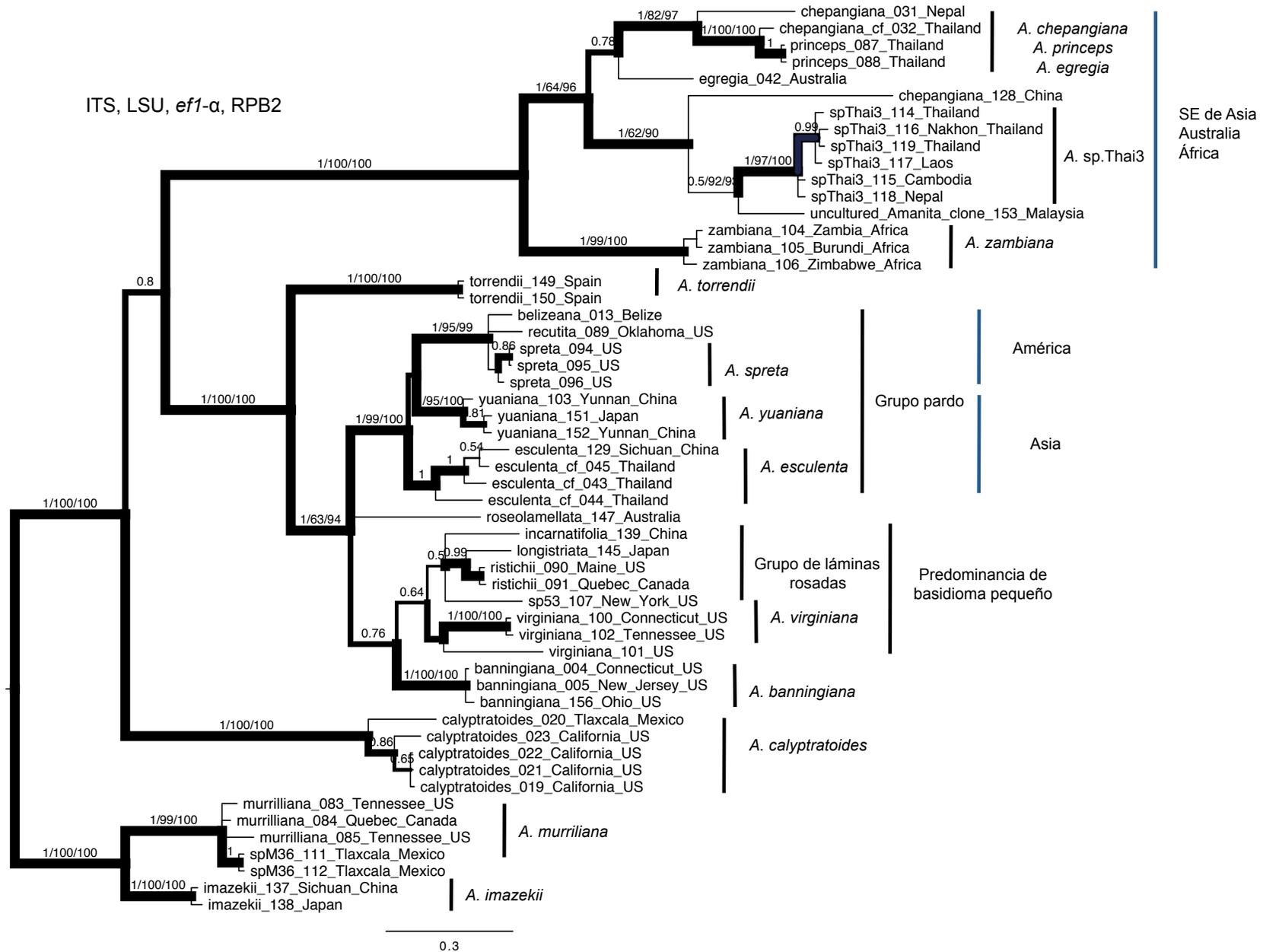


Figura 6. Árbol bayesiano de consenso de mayoría del tercer conjunto de datos donde se incluyen sólo las secciones *Albescens*, *Brevifulva*, *Calypratoides* y *Murrilliana*. Ver pie de figura anterior para mayor información.

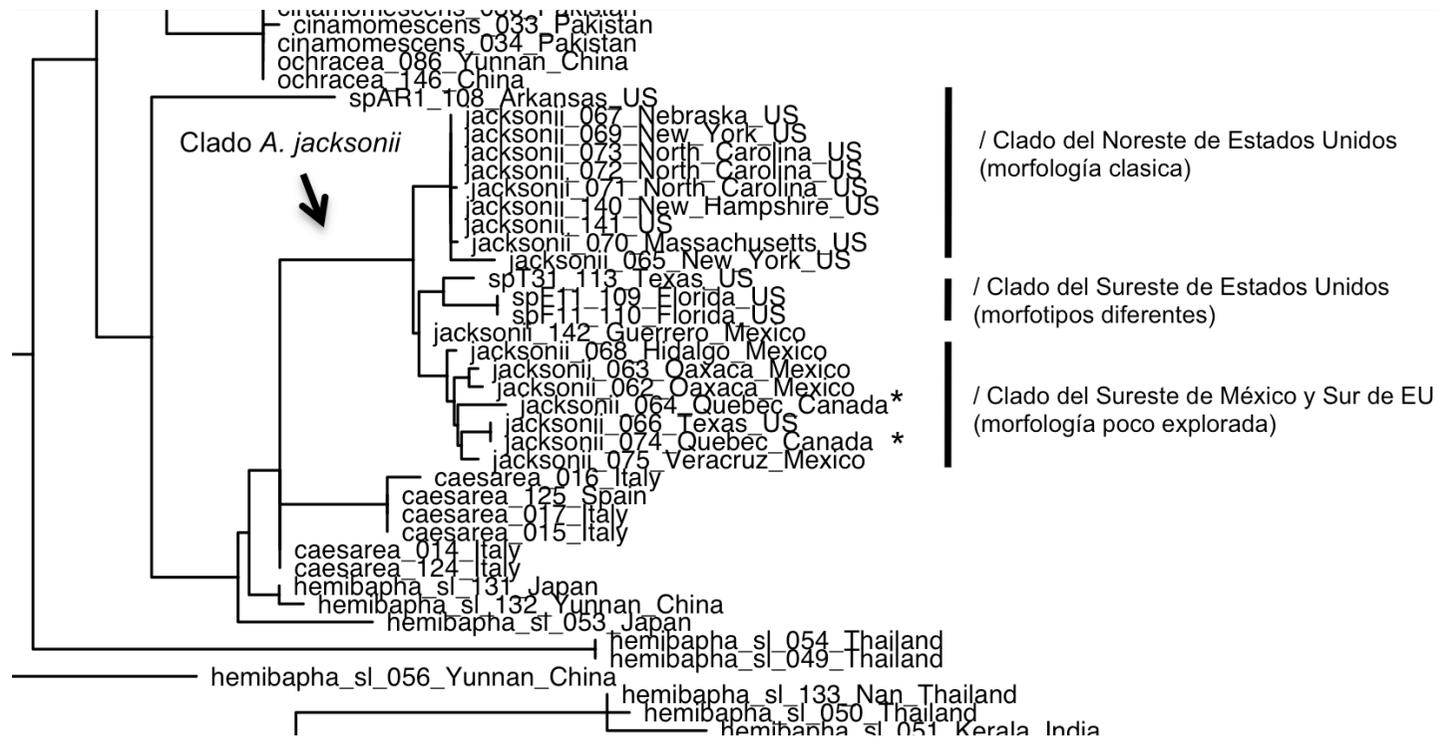


Figura 7. Recorte del mejor árbol por Máxima Verosimilitud que muestra especies incipientes dentro del clado de *A. jacksonii*. Los grupos se dividen de acuerdo a su distribución. Excepto en muestras de Quebec la región LSU (*) donde no hubo congruencia.

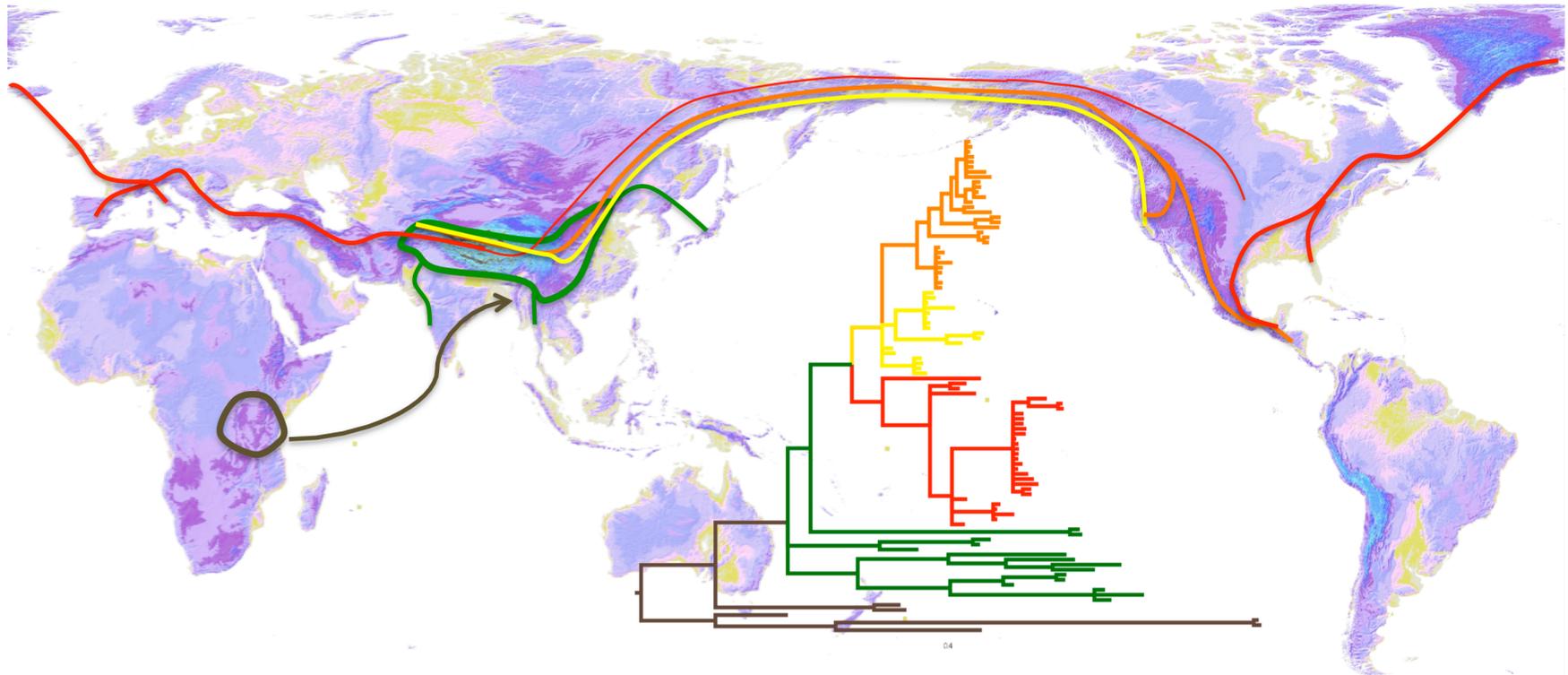


Figura 8. Principales patrones biogeográficos observados en la subsección *Caesareae*. El árbol mostrado es el mismo de la figura 2, pero aquí los colores representan la distribución geográfica de los linajes. El mapa es una representación orográfica del mundo. El clado café (más basal) contiene especies Africanas, la flecha ejemplifica la hipótesis de migración a través de India durante el Eoceno. Los clados verdes son especies Asiáticas, el polígono verde del mapa ejemplifica una posible área de distribución para las especies de estos clados. Asimismo, algunas líneas que salen del polígono se refiere a posibles rutas de dispersión. El clado rojo se refiere a las especies que está más relacionadas con *A. caesarea*, como *A. jacksonii*, los trazos rojos ejemplifican una hipótesis de la expansión geográfica de este grupo. Los clados amarillo y naranja son linajes que llegaron a América a través de Beringia.