



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
SISTEMÁTICA

Evaluación taxonómica de *Phaeoceros carolinianus* (Michx.) Prosk. y *P. laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta) con base en datos moleculares

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARIADNA IBARRA MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. CLAUDIO DELGADILLO MOYA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. GERARDO SALAZAR CHÁVEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD.MX. JUNIO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
SISTEMÁTICA

Evaluación taxonómica de *Phaeoceros carolinianus* (Michx.) Prosk. y *P. laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta) con base en datos moleculares

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARIADNA IBARRA MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. CLAUDIO DELGADILLO MOYA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. GERARDO SALAZAR CHÁVEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD.MX. JUNIO, 2016

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

OFICIO FCIE/DEP/333/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

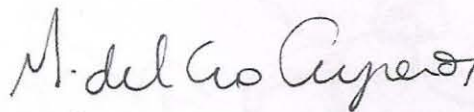
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de febrero de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del (la) alumno (a) **IBARRA MORALES ARIADNA** con número de cuenta **304547492** con la tesis titulada **“Evaluación taxonómica de *Phaeoceros carolinianus* (Michx.) Prosk. y *P. laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta) con base en datos moleculares”**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS**:

Presidente: DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ
Vocal: DRA. AURORA ZLOTNIK ESPINOSA
Secretario: DR. CLAUDIO DELGADILLO MOYA
Suplente: M. EN C. JAIME JIMÉNEZ RAMÍREZ
Suplente: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de junio de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) que encaminó este estudio.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca (número de registro 479713) que me apoyó en mi manutención mensual durante los dos años en que cursé la maestría.

A mi tutora, la Dra. Susana Valencia Avalos, por su invaluable apoyo en el planteamiento y elaboración del presente trabajo. Así como al resto de los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Claudio Delgadillo Moya y el Dr. Gerardo Salazar Chávez, por sus valiosas aportaciones durante la elaboración de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Susana Valencia Avalos, por su invaluable apoyo y orientación en la elaboración de ésta tesis.

Al Dr. Gerardo Salazar Chávez y a la Dra. Lidia Cabrera por orientarme en los análisis filogenéticos que llevé a cabo, enseñarme y apoyarme con las técnicas de extracción de ADN y de amplificación de los genes utilizados.

Al Dr. Claudio Delgadillo Moya por su valiosa orientación y correcciones en la elaboración del proyecto y el manuscrito de tesis.

A la Dra. Aurora Zlotnik y al Dr. Efraín Tovar por sus valiosos comentarios sobre el manuscrito de la tesis.

A la M. en B. María Eugenia Muñoz Díaz de León y al Taller de Plantas I y II por su apoyo en la observación e identificación del material recolectado.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, UNAM; así como también a la Dra. María Berenit Mendoza Garfías y al Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Biología, UNAM por su apoyo en el montaje, observación y obtención de fotografías de microscopía de barrido sin las cuales este estudio no hubiera podido llevarse a cabo.

A la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biología de la UNAM, en cuyas instalaciones se llevaron a cabo los estudios indispensables para la obtención de resultados de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermana, que siempre han estado ahí para apoyarme.

ÍNDICE

Lista de figuras y tablas.....	vi
a) Figuras.....	vi
b) Tablas.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
III. El concepto de especie.....	6
IV. Hipótesis.....	9
V. Objetivos.....	10
VI. Método general.....	11
a) Área de estudio.....	11
b) Procesamiento del material biológico.....	12
c) Observación de la morfología de las esporas.....	12
d) Identificación de morfoespecies en el material recolectado.....	13
e) Medición de caracteres morfológicos de las esporas y su análisis estadístico.....	13
f) Extracción de ADN.....	14
g) Amplificación de regiones seleccionadas mediante PCR.....	15
h) Secuenciación.....	16
i) Edición y alineamiento de secuencias.....	16
j) Obtención de secuencias de GenBank.....	16
k) Análisis filogenéticos.....	18
VII. Resultados.....	19
Morfoespecies identificadas.....	19
Caracteres morfológicos de las esporas.....	20
a) Estadística descriptiva.....	20
b) Análisis de componentes principales.....	22
c) MANOVA.....	25
d) Prueba de comparación <i>post-hoc</i> : la prueba de Scheffe.....	25
e) Análisis canónico discriminante.....	27
f) Análisis de agrupación.....	30
g) Clave para la identificación de las especies.....	32
Caracteres genéticos: rbcL y nad5.....	32
a) nad5.....	32
• Máxima parsimonia.....	32
• Inferencia bayesiana.....	34

b) rbcL.....	35
• Máxima parsimonia.....	35
• Inferencia bayesiana.....	37
c) Matriz concatenada: rbcL y nad5.....	38
• Máxima parsimonia.....	38
• Inferencia bayesiana.....	39
VIII. Discusión	41
Identificación de los ejemplares recolectados.....	41
Evaluación de caracteres morfológicos de las esporas.....	43
Evaluación de caracteres moleculares: nad5 y rbcL.....	44
IX. Conclusiones.....	50
X. Literatura citada.....	52

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

a) Figuras

		Pág	
Figura	1.	Localidades de colecta de plantas del género <i>Phaeoceros</i> .	11
Figura	2.	Esporas representativas de las especies identificadas pertenecientes al complejo <i>Phaeoceros laevis</i> – <i>P. carolinianus</i> . A-B. <i>P. laevis</i> de los Dinamos de Contreras, en el Distrito Federal. A. Cara distal. B. Cara proximal. C-D. <i>P. oreganus</i> de San Miguel Regla, Hidalgo. C. Cara distal. D. Cara proximal. E-F. <i>P. gualaquizanus</i> de Cuetzalan, Puebla. E. Cara distal. F. Cara proximal. G-H. <i>P. carolinianus</i> de El Águila, Chiapas. G. Cara distal. H. Cara proximal. I-J. <i>P. brevicapsulus</i> de Jalapa, Veracruz. I. Cara distal. J. Cara proximal. K-L. <i>P. pichinchensis</i> de los Dinamos de Contreras, en el Distrito Federal. K. Cara distal. L. Cara proximal.	19
Figura	3.	Gráfica de dispersión de los componentes PCI y PCII.	23
Figura	4.	Gráfica de dispersión de los componentes PCI y PCIII.	24
Figura	5.	Gráfica de dispersión de los componentes PCII y PCII.	25
Figura	6.	Gráfica de dispersión de las funciones canónicas R1 y R2.	29
Figura	7.	Gráfica de dispersión de las funciones canónicas R1 y R3.	30
Figura	8.	Árbol de agrupación utilizando el método UPGMA con distancias euclidianas cuadradas.	31
Figura	9.	Consenso estricto de los 76546 árboles más parsimoniosos para el gen nad5. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.	33
Figura	10.	Consenso estricto de los árboles obtenidos para el gen nad5 con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.	35
Figura	11.	Consenso estricto de los 93500 árboles más parsimoniosos para el gen rbcL. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.	36
Figura	12.	Consenso estricto de los árboles obtenidos para el gen rbcL con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.	38
Figura	13.	Uno de los 44000 árboles más parsimoniosos para la matriz concatenada. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.	39
Figura	14.	Consenso de mayoría de los árboles obtenidos para matriz concatenada con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.	40
Figura	15.	A-C. Esporas de <i>P. microsporus</i> de Panamá. A. Cara distal verrugosa. B. Esporas y pseudoeláteres en la cápsula. C. Tétrada con espora desprendida. D-F. Esporas de <i>P. laevis</i> de México. D-E. Esporas de la población 1. D. Cara proximal verrugosa. E. Cara distal espinosa. F. Espora de la población 13, cara distal espinosa.	46

b) Tablas

			Pág.
Tabla	1.	Localidades en donde fueron colectadas las poblaciones de antocerotes para este estudio, incluyendo el estado al que pertenecen, las coordenadas (latitud y longitud), así como la altura expresada en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).	11
Tabla	2.	Caracteres morfológicos medidos en las esporas fotografiadas del complejo <i>P. laevis</i> – <i>P. carolinianus</i> .	13
Tabla	3.	Primers utilizados para la PCR.	15
Tabla	4.	Primers utilizados solo para secuenciación.	16
Tabla	5.	Secuencias disponibles en GenBank de los géneros <i>Phaeoceros</i> , <i>Paraphymathoceros</i> y <i>Notothydas</i> del gen nad5.	17
Tabla	6.	Secuencias disponibles en GenBank de los géneros <i>Phaeoceros</i> , <i>Paraphymathoceros</i> y <i>Notothydas</i> del gen rbcL.	17
Tabla	7.	Especies de <i>Phaeoceros</i> encontradas en las localidades de colecta.	20
Tabla	8.	Estadísticas descriptivas de la matriz completa los datos registrados para nueve variables de caracteres morfológicos de las esporas de 16 poblaciones de seis especies del complejo <i>Phaeoceros laevis</i> – <i>P. carolinianus</i> de México.	20
Tabla	9.	Estadísticas descriptivas por población (mínimo, media y máximo) de cada variable, la media es el valor dentro de los paréntesis. Población 1 (<i>P. laevis</i>): Ciudad Universitaria, Distrito Federal; población 2 (<i>P. carolinianus</i>): El Águila, Chiapas; población 3 (<i>P. carolinianus</i>): Chignahuapan, Puebla; población 4 (<i>P. brevicapsulus</i>): Jalapa, Veracruz. Población 5 (<i>P. gualaquizanus</i>): Cuetzalan, Puebla; población 6 (<i>P. oreganus</i>): San Miguel Regla, Hidalgo; población 7 (<i>P. carolinianus</i>): Zempoala, Morelos; población 8 (<i>P. carolinianus</i>): Finca Argovia, Chiapas. Población 9 (<i>P. carolinianus</i>): Pico de Loro, Chiapas; población 12 (<i>P. pichinchensis</i>): 3er Dínamo, Magdalena Contreras, Distrito Federal; población 13 (<i>P. laevis</i>): 4to Dínamo, Magdalena Contreras, Distrito Federal; población 18 (<i>P. carolinianus</i>): Calnalli, Hidalgo. Población 19 (<i>P. carolinianus</i>): Puerto Soledad, Oaxaca; población 23 (<i>P. oreganus</i>): carretera Zitácuaro-Toluca, Edo. de México; población 24 (<i>P. oreganus</i>): Los Azufres, Michoacán; población 27 (<i>P. pichinchensis</i>): Ixtlán de Juárez, Oaxaca.	21
Tabla	10.	Estructura de los componentes principales generados en el PCA.	22
Tabla	11.	Correlación variable morfológica de las esporas-componente principal de las morfoespecies incluidas en la base de datos (complejo de especies <i>P. laevis</i> – <i>P. carolinianus</i>).	23
Tabla	12.	Distintas pruebas de significancia de MANOVA.	25
Tabla	13.	Prueba de Scheffe para el PC I. *valores con diferencias significativas.	26
Tabla	14.	Prueba de Scheffe para el PC II. *valores con diferencias significativas.	26

Tabla	15.	Prueba de Scheffe para el PC III. *valores con diferencias significativas.	26
Tabla	16.	Prueba de Scheffe para el PC IV. *valores con diferencias significativas.	27
Tabla	17.	Prueba de Scheffe para el PC V. *valores con diferencias significativas.	27
Tabla	18.	Matriz de clasificación.	28
Tabla	19.	Distancias cuadradas de Mahalanobis.	28
Tabla	20.	Matriz de estructura de los factores. Correlaciones variables-funciones canónicas.	28
Tabla	21.	Estructura de las funciones canónicas resultantes del análisis discriminante.	29
Tabla	22.	Comparación de los caracteres morfológicos de las esporas reportados por Hässel (1989) y los medidos en este estudio en <i>P. pichinchensis</i> .	41
Tabla	23.	Intervalos de diámetro de las esporas y altura de las espinas en <i>P. laevis</i> , <i>P. microsporus</i> y las poblaciones 1 y 13 de este estudio. Las medidas se encuentran en μm .	42

RESUMEN

El género *Phaeoceros* se caracteriza por poseer esporas amarillas, de ahí el nombre (*phaeo*: amarillo, *ceros*: cuerno), de 2 a 4 anteridios de pared irregular por cámara, talo gametofítico sólido y esporas con cíngulo ecuatorial, entre otras. A pesar de que la implementación de técnicas moleculares ha permitido desentrañar algunas de las relaciones en el género, muchas de éstas permanecen controversiales y han dado paso al surgimiento de nuevas interrogantes y a la redelimitación de algunos taxa. Éste es el caso del complejo *Phaeoceros laevis*- *P. carolinianus*, que ha sido examinado por varios científicos desde que Proskauer, en 1951, separó a estas dos especies con base, principalmente, en su condición sexual. A través de los años se han descrito varias especies dentro de este complejo. Algunos investigadores como Proskauer (1958), las consideran una sola especie (Schuster, 1992), mientras que otros las consideran especies diferentes (Hässel, 1989) con base, principalmente, en la ornamentación y morfología de las esporas.

En este trabajo se evaluaron estadísticamente 9 caracteres morfológicos de las esporas de 16 poblaciones recolectadas en el centro de México, dichos caracteres son la base de la delimitación de las especies en este complejo, y se contrastaron los resultados obtenidos con los clados recuperados en análisis filogenéticos de secuencias de ADN (genes *nad5* y *rbcL*). Para esto se analizaron las secuencias de los individuos recolectados bajo los criterios de Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana. Se incluyeron otras especies de *Phaeoceros*, *Notothydas* y *Paraphymathoceros* como grupo externo, así como también se incluyeron secuencias disponibles en GenBank de especies del complejo *P. laevis* - *P. carolinianus* de otras regiones del mundo.

Los análisis estadísticos de la morfología de las esporas revelaron que no hay agrupaciones discretas que permitan discriminar a las morfoespecies con claridad, sin embargo, en los análisis de componentes principales se observa una tendencia de *P. laevis*, *P. pichinchensis* y *P. oreganus*. El MANOVA revela que existen diferencias significativas y la prueba post-hoc de Scheffé muestra diferencias significativas entre algunas de las especies con el resto. En el análisis de agrupación las distintas morfoespecies están representadas en distintos grupos, excepto en el caso de *P. carolinianus* y *P. oreganus*, donde existe conflicto en la delimitación de las mismas. Los análisis moleculares tuvieron muy poca resolución, los individuos de las morfoespecies se encuentran revueltos en distintos clados, la única especie que se mantiene en el mismo clado en la filogenia de ambos genes y con la matriz concatenada es el que se encuentra formado por los individuos de dos poblaciones identificados como *P. laevis* (mexicano) y *P. microsporus* de Panamá, cuya relación con *P. laevis* europeo, sin embargo, no se resuelve. Aunque parecen existir tendencias que separan las morfoespecies en los análisis estadísticos de los caracteres de las esporas, los límites entre las especies no son claros y se ha detectado una gran cantidad de variación morfológica en estas morfoespecies, que podría llegar a formar un continuo si se analizaran una mayor cantidad de muestras. Es en el caso de las dos poblaciones de *P. laevis* donde las evidencias son suficientes para proponerla como una especie aparte del resto de las especies mexicanas consideradas en este estudio, ya que tanto su condición sexual (dioica), como los caracteres morfológicos de las esporas y las filogenias moleculares analizadas indican una segregación del resto de las especies. En cuanto al resto de las morfoespecies evaluadas, los datos

morfológicos indican que presentan diferencias significativas en los caracteres de las esporas, lo que sería una primera evidencia de que representan especies distintas. Sin embargo, esto no se encuentra respaldado por la evidencia molecular. La falta de evidencia molecular no significa que no sean especies distintas.

ABSTRACT

The genus *Phaeoceros* has been named after its yellow spores (*phaeo*: yellow, *ceros*: horn) and it is also characterized by possessing 2-4 antheridia of irregular wall cells per antheridial chamber, solid gametophyte thalli and spores with equatorial girdle. Even though the implementation of molecular techniques has allowed to unveil some of the phylogenetic relations of the genus, many others remain controversial and had raised new questions and lead to the re delimitation of some taxa. This is the case of the species complex *Phaeoceros carolinianus* – *P. laevis*, that has been studied by scientists since Proskauer in 1951 recognized this two as different species based, mainly, in its sexual condition. Many species of this complex has been described through the years. Some scientists like Proskauer (1958), consider them as a single species, while others consider them distinct species based, mainly, in the morphology and ornamentation of spores.

In this study, I statistically evaluated 9 morphological characters of the spores from 16 populations collected in central Mexico, such characters are the base of the species complex delimitation. These results were compared with the recovered clades from phylogenetic analysis of DNA sequences (*nad5* and *rbcL* genes). The phylogenetic analysis was carried out under the maximum parsimony and Bayesian inference criteria. The outgroup was composed by other species of the genus *Phaeoceros*, as well as species of the genus *Notothydas* and *Paraphymathoceros*. Available sequences in GenBank of the species complex *P. carolinianus* – *P. laevis* from other countries were included in the phylogenetic analysis.

The statistical analysis of the spore morphology characters revealed that no discrete groups are formed that allow differentiating the morphospecies clearly, even though in the principal component analysis there is a tendency to differentiate *P. laevis*, *P. pichinchensis* and *P. oreganus* from the rest of the morphospecies. The MANOVA reveals that there are significant differences amongst the morphospecies studied and the Scheffe *post-hoc* test shows significant differences in some of the morphospecies. Morphospecies are represented in different groups in the grouping analysis, apart from *P. carolinianus* and *P. oreganus*, which populations remain in conflict in the same group. The molecular analysis had little resolution, the individuals that represented the morphospecies were scattered amongst the clades, the only clade that remained the same clade in the three analysis (*rbcL*, *nad5* and concatenate) is the one integrated by *P. laevis* (Mexican) and *P. microsporus* (Panamá), which relation with the European *P. laevis* remains unsolved.

Despite there seem to be tendencies that differentiate morphospecies in the statistical analysis of the spore characters, the limits between the species are not clear and a great amount of morphological variation was found, that could lead to a continuum in morphological traits if a bigger sample was studied. It is in the case of the two populations of *P. laevis* where there is enough evidence to consider it as a different species from the rest of the Mexican morphospecies included in this study; this based on its sexual condition (dioic), the morphological characters of the spores and the molecular phylogenies studied that indicate a segregation from the rest of the species.

Regarding the rest of the morphospecies evaluated, the morphological data show significant differences in spore characters, which would comprise evidence that they are different species. Nevertheless, this is not supported by molecular evidence. The lack of molecular evidence does not necessarily mean that the morphospecies are not different species.

I. INTRODUCCIÓN

Las relaciones filogenéticas entre las hepáticas, antocerotes, musgos y traqueofitas, han sido controversiales a lo largo de la historia (Qiu *et al.*, 2006). Previo a los análisis moleculares existían hipótesis contradictorias acerca de la posición filogenética de cada uno de los grupos de briofitas. Algunos investigadores consideraban a los musgos como el grupo hermano de las traqueofitas (Mishler & Churchill, 1984; Kenrick & Crane, 1997), mientras que en otros estudios se colocaba a los antocerotes (Campbell, 1924; Smith, 1955; Goffinet, 2000). Sin embargo, los consensos recientes basados en análisis moleculares (Carafa *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006; Renzaglia *et al.*, 2009) ubican a los antocerotes como los parientes vivos más cercanos a las plantas vasculares. Hay varias características morfológicas y fisiológicas, como la posición de los gametangios, el tipo de unión entre esporofito y gametofito, el esporofito fotosintético relativamente independiente en términos nutricionales, y los contenidos de xilano en las paredes de los pseudoeláteres y las esporas (Qiu *et al.*, 2006), que apoyan la posición de los antocerotes como grupo hermano de las traqueofitas. Se les confiere así una gran importancia evolutiva, cuyo estudio aportaría evidencia para entender la transición de las plantas no vasculares hacia las plantas vasculares.

Los antocerotes se caracterizan por tener un gametofito taloide simple sin diferenciación histológica, excepto cuando se presentan cavidades esquizogénicas de mucílago en *Anthoceros*, *Folioceros* y algunas especies de *Dendroceros* (Renzaglia & Vaughn, 2000); en éste último también se presenta un distintivo nervio central y alas monostromáticas (Schuster, 1992). El gametofito taloide puede presentar asociación con cianobacterias del género *Nostoc*, que se establecen dentro del talo vía apical a través de poros ventrales (Renzaglia, 1978). Las células del gametofito generalmente poseen un solo cloroplasto (excepto en algunos géneros como *Megaceros* o *Nothoceros* donde se pueden presentar dos o más), que frecuentemente tiene un pirenoide incluido (Schofield, 1985). A diferencia del esporofito, donde por lo general sólo las células del tejido asimilativo son fotosintéticas, todas las células del gametofito poseen cloroplastos (Villarreal *et al.*, 2010). Los gametangios se encuentran inmersos dentro del talo; sin embargo, los arquegonios son considerados de origen exógeno ya que se desarrollan a partir de células superficiales para ser finalmente hundidos en el tejido del talo (Renzaglia & Vaughn, 2000), mientras que los anteridios son considerados de origen endógeno (Schuster, 1992), ya que se originan a partir de células subepidérmicas para finalmente localizarse dentro de cámaras internas del talo (Renzaglia & Vaughn, 2000).

Proskauer (1951) describió dos tipos de anteridios que diferencian a los géneros *Anthoceros* y *Phaeoceros*: El primero posee anteridios cuyas paredes están formadas únicamente por cuatro filas de células, mientras que los anteridios de *Phaeoceros* poseen una pared formada por células con arreglo irregular. Los anteridios son expuestos al ambiente externo hasta que el primer anteridio de la cámara anteridial alcanza la madurez, lo que causa que el techo de la cámara se rompa (Renzaglia, 1978). El número de anteridios por cámara anteridial tiende a variar por género. En contraste, los arquegonios parecen presentar una anatomía uniforme en todos los géneros (en la mayoría se encuentran cinco células del canal del cuello, salvo en *Notothylas*, en donde no se han observado más de tres (Renzaglia, 1978)).

Aunque el gametofito por sí solo es suficiente para diferenciar a los antocerotes de otras plantas, es el esporofito el que presenta las características más distintivas. El esporofito, que por lo general es un cilindro verde y alargado que se proyecta dorsalmente en ángulo casi recto respecto al gametofito (salvo en *Notothylas*, donde es más pequeño y crece adpreso al talo), es el resultado de la fecundación de la oosfera y del posterior desarrollo del cigoto (Renzaglia, 1978).

La primera división del cigoto es longitudinal y, posteriormente, durante el desarrollo del embrión surgen dos tejidos: el endotecio y el anfitecio. El endotecio da lugar a la columela en el esporofito maduro, cuando ésta existe (Renzaglia, 1978). Esto es diferente a la mayoría de los musgos y de las hepáticas en las que el cigoto sufre una primera división transversal y el endotecio da lugar al tejido esporógeno (salvo en *Sphagnum*) (Renzaglia & Vaughn, 2000). El anfitecio, por su parte, se divide para formar el tejido esporógeno y la pared de la cápsula. Durante el desarrollo del embrión ocurre un crecimiento de tejido gametofítico que rodea al embrión, dicho crecimiento forma un involucre protector que en la mayoría de los taxones se rompe con la continua maduración del esporofito (con excepción de algunas especies de *Notothylas* en las que el esporofito nunca se alarga lo suficiente como para romper y sobresalir del involucre (Renzaglia, 1978); este involucre permanece como un cilindro que rodea la base del esporofito (Renzaglia & Vaughn, 2000).

El esporofito maduro tiene forma de aguja o cuerno, a lo que deben el nombre la división y la mayoría de los géneros (“ceros”= cuerno). Está conformado en su mayor parte por una región central portadora de esporas que está embebida en el talo del gametofito a través de un pie bulboso (Renzaglia, 1978). En el pie bulboso del esporofito hay un meristemo intercalar que permite el continuo crecimiento de la cápsula y, consecuentemente, una continua producción de esporas y pseudoeláteres alrededor de la columela (Cargill *et al.*, 2005).

II. ANTECEDENTES

Los antocerotes conforman la división Anthocerotophyta, que incluye entre 200 – 250 especies en todo el mundo, distribuidas en 2 clases, 5 órdenes y 14 géneros: *Anthoceros*, *Dendroceros*, *Folioceros*, *Hattorioceros*, *Leiosporoceros*, *Megaceros*, *Mesoceros*, *Nothoceros*, *Notothylas*, *Paraphymatoceros*, *Phaeoceros*, *Phaeomegaceros*, *Phymatoceros* y *Sphaerosporoceros* (Hässel, 2006; Duff *et al.*, 2007).

A pesar de su importancia evolutiva, el grupo no ha sido revisado con detalle taxonómicamente a nivel mundial. Hay pocas floras bien documentadas y no existen estudios filogenéticos disponibles a nivel de especie. Los registros actuales probablemente sólo reflejan las áreas de fácil acceso para el ser humano o que han sido exploradas por briólogos, y no la verdadera distribución y diversidad del grupo. Además, debido al escaso conocimiento de su diversidad, la delimitación de especies y el establecimiento de sus relaciones filogenéticas es problemática (Villarreal *et al.*, 2010).

Bharadwaj (1981) propuso algunos caracteres anatómicos y morfológicos de los antocerotes que podrían ayudar a delimitar especies, y grupos supraespecíficos:

- Caracteres para la delimitación de familia: Presencia o ausencia de cavidades esquizogénicas en el talo, cápsula postrada o erecta, células de los pseudoeláteres elongadas o isodiamétricas.
- Caracteres para la delimitación de géneros: Diferencias en la naturaleza y la cantidad de engrosamiento de la pared interior en las células de los pseudoeláteres, diferencias en la estructura interna del talo y la presencia o ausencia de una costa central en el talo.
- Caracteres para la delimitación sub-genérica: Naturaleza del patrón escultural de la espora o forma de los elemento esculturales.
- Caracteres para la delimitación de especies, grupos sub-específicos y variedades: Diferenciación sexual y algunos caracteres de las esporas, como son la media de altura/ancho de los elementos esculturales a lo largo del ecuador, si están presentes, para delimitación de especies; y media de la altura del anteridio maduro, media del diámetro ecuatorial de la espora, distribución o densidad de los elementos esculturales en la cara distal de la espora, media de la longitud de un pseudoeláter completo, estructura de la pared de la cápsula, y densidad y altura de los estomas cuando están presentes para distinguir subespecies y variedades cuando es necesario.

Hässel (1976) impulsó el uso de caracteres esporofíticos en los antocerotes, donde evidenció que, debido a su gametofito taloide, los ejemplares de herbario disponibles son difíciles de manipular y de comparar con otros ejemplares para propósitos de identificación. En un estudio de las especies de *Notothylas* en Argentina, Hässel (1976), examinó en los ejemplares tipo los siguientes caracteres: la forma y presencia de engrosamiento en las células de las capas internas y externas de la pared de la cápsula, la ornamentación de las esporas, y la relación del tamaño de los pseudoeláteres con el diámetro de las esporas. Encontró que todos estos caracteres tenían importancia específica y valor práctico. Además de su trabajo con el género *Notothylas*, Hässel (1984, 1987, 1989, 1990) realizó tratamientos taxonómicos

basados en caracteres de esporas y pseudoeláteres para las especies americanas de *Anthoceros*, *Folioceros* y *Phaeoceros*.

El género *Phaeoceros* se caracteriza por poseer esporas amarillas, de ahí el nombre (*phaeo*: amarillo, *ceros*: cuerno), de 2 a 4 anteridios de pared irregular por cámara, talo gametofítico sólido y esporas con cíngulo ecuatorial, entre otras (Proskauer, 1951; Hässel, 1988). Este género ha sufrido numerosas modificaciones; de él se han segregado nuevos géneros como *Phymatoceros* y *Phaeomegaceros* (Duff *et al.*, 2007), debido, principalmente, a los avances moleculares. A pesar de que la implementación de técnicas moleculares ha permitido desentrañar algunas de las relaciones en el género, muchas de éstas permanecen controversiales (Duff. *et al.*, 2007) y han dado paso al surgimiento de nuevas interrogantes y a la redelimitación de algunos taxa. Éste es el caso del complejo *Phaeoceros laevis*-*P. carolinianus*, que ha sido examinado por varios científicos (Schuster, 1992; Thompson, 1997; Stotler *et al.*, 2005; Dauphin *et al.*, 2006) desde que Proskauer, en 1951, separó a estas dos especies con base, principalmente, en su condición sexual.

El mismo Proskauer (1958), posteriormente, puso en duda la permanencia de ambas como especies distintas y optó por tratarlas como dos subespecies de *Phaeoceros laevis*, donde *Phaeoceros laevis* subsp. *carolinianus* era de amplia distribución, mientras que *P. laevis* subsp. *laevis* se restringía al continente europeo.

A través de los años se han descrito varias especies dentro de este complejo. Algunos investigadores como Proskauer (1958), las consideran una sola especie (Schuster, 1992), mientras que otros las consideran especies diferentes (Hässel, 1989) con base, principalmente, en la ornamentación y morfología de las esporas.

Hässel (1989) distingue un grupo de especies americanas con base en los caracteres de la superficie distal de las esporas. Éste engloba las siguientes especies del complejo *Phaeoceros laevis*-*P. carolinianus*: *P. austroandinus* Hässel, *P. breviscapsulus* (Steph.) Hässel, *P. carolinianus*, *P. flexivalvis* (Nees & Gott.) Hässel, *P. gualaquizanus* (Steph.) Gradst., *P. huebschmannii* Hässel, *P. microsporus* (Steph.) Hässel, *P. mohrii* (Aust.) Hässel, *P. oreganus* (Aust.) Hässel, *P. pichinchensis* (Spruce) Hässel y *P. wrightii* (Steph.) Hässel. El trabajo de Hässel (1989) considera 11 especies del complejo, sin incluir a *P. laevis* por el estado dudoso de su distribución en el continente americano. Sin embargo, Hässel (1987) no descarta la posibilidad de que la distribución geográfica de estos taxa sea más amplia, y señala que se requiere examinar con detalle los ejemplares de herbario de Norteamérica para determinar la presencia de las especies y su correcta distribución. Hasegawa (1991) revisó material proveniente de Chapulhuacan, Hidalgo, México que parece confirmar la presencia de *P. laevis* en el país.

Hässel (1987), documentó también que las esporas de *Phaeoceros laevis* y *P. carolinianus* son muy distintas y pueden ser fácilmente identificadas bajo el microscopio electrónico de barrido (MEB) y por tanto deben ser consideradas como distintas especies y no tan solo subespecies. En *P. laevis*, las esporas y pseudoeláteres están mucho más coloreados, las esporas son pequeñas, las caras proximales están cubiertas densamente con verrugas observadas fácilmente con microscopía óptica y las espinas de la superficie distal se extienden hasta el borde, y son vistas con claridad por la cara proximal. En *P. carolinianus*,

las esporas son más grandes, las caras proximales triangulares son cóncavas con pocas verrugas centrales, la superficie distal aparece donde la marca trilete claramente termina y las espinas distales son escasamente visibles desde la cara proximal. En contraste, Schuster (1992) debate que el concepto de especies de Hässel deriva exclusivamente de diferencias en la exina de las esporas; éstas, más aún, están casi exclusivamente basadas en colecciones tipo y no en un estudio de series de poblaciones. Schuster (1992) considera que las opciones en la clave americana y las imágenes de las esporas que en ella se incluyen, tienen diferencias insignificantes y no convincentes, y considera que las diferencias en los tamaños de las esporas son mínimas; por tanto Schuster coincide con la última postura de Proskauer al ubicar ambos taxa como subespecies de *P. laevis*, pero señala que el trabajo de Hässel permitió ver el problema de los límites de las especies con mayor claridad, aunque no está resuelto y aún es controversial.

Por su parte, Thompson (1997) realizó un estudio de la variación en la ornamentación de las esporas con 30 poblaciones monoicas (*P. carolinianus* y afines) de Estados Unidos. Midió el diámetro de las esporas, el ancho de la marca trilete, el número de verrugas en la cara proximal y la longitud y densidad de espinas en la cara distal. Estos datos lo llevaron a discernir tan sólo dos posibles patrones en las esporas entre poblaciones:

- a. Cada área triangular de la cara proximal de la espora con más de 30 verrugas (promedio: más de 40) dispersas uniformemente sobre toda la cara interna. *P. oreganus*
- b. Cada área triangular de la cara proximal de la espora con menos de 30 verrugas (promedio: 20 ó menos) usualmente \pm agrupadas en el centro de la cara. *P. carolinianus*.

El complejo de especies comprende un grupo caracterizado por esporas amarillas y espinosas (en la cara distal), que incluye las mencionadas con anterioridad y otras especies alrededor del mundo. La circunscripción de estas especies se ha basado principalmente en características de las esporas tales como dimensiones y ornamentación (Hässel 1989; Schuster, 1992). En México, de acuerdo con Stotler & Crandall-Stotler (2005), Hassel (1989) y Schuster (1992), existen varios de los elementos que integran el complejo de especies *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus*, como son: *P. carolinianus*, *P. mohrii*, *P. oreganus*, *P. laevis* y *P. breviscapsulus*.

III. EL CONCEPTO DE ESPECIE

Al considerar la variación morfológica del complejo, debemos preguntarnos si en realidad lo que podría ser una especie polimórfica (con plasticidad fenotípica) son de hecho varias especies, o viceversa. Debido a que las especies son la unidad evolutiva y taxonómica, su delimitación, aunque compleja, es importante si queremos desenredar los fenómenos y procesos que las rodean. Por tanto, el concepto de especie es central en la sistemática. Sin embargo, el número de conceptos de especie en la literatura varía de 7 a 22 dependiendo la forma en que los conceptos sean divididos y agrupados (Cain, 1954; Mayden, 1997).

Se distinguen principalmente dos tipos de conceptos de especie (Mayden, 1997; De Queiroz, 1998, 2005, 2007; Wiley & Lieberman, 2011): los ontológicos y los epistemológicos (u operacionales). Las tendencias más recientes acerca de los conceptos de especie (De Queiroz, 2007; Barret & Freudstein, 2011), han optado por enfocarse en conceptos ontológicos para definir a las especies. Considerando, entonces, a las especies como entidades reales que existen aunque no las percibamos, es necesario evaluar las diferencias en los conceptos de especie y su diversidad.

Entre los conceptos “generales” u ontológicos están aquellos que tratan acerca de los procesos que dan lugar a las especies, como podrían ser el concepto evolutivo de especie (Simpson, 1961; Wiley, 1978), el concepto cohesivo de Templeton (1989) y el concepto general de linaje (De Queiroz, 1998) donde, en general, se trata a las especies como linajes que evolucionan de manera independiente, siendo esta la propiedad inherente de las especies. Los conceptos ontológicos, entonces, definen a las especies con base en los procesos naturales que les dieron origen.

En contraste, los conceptos operacionales o epistemológicos definen a las especies con base en uno o varios criterios, y aunque en la epistemología operacional se encuentra embebida una ontología particular, las entidades o propiedades reconocidas están definidas por la operación empleada. Así que, si hay dos conceptos epistemológicos válidos para el reconocimiento de las especies, entonces hay dos clases de especies (Wiley & Lieberman, 2011). Más aún, la coexistencia de distintas clases de especies, que pueden incluso no ser compatibles, pone en duda que tales clases sean una consecuencia de los procesos naturales.

La mayoría de los conceptos en la literatura actual son conceptos operacionales, debido probablemente a que los científicos tienen diferentes tipos de evidencia acerca de los organismos que investigan, por lo que usan diferentes criterios cuando intentan probar si un grupo de individuos se encuentra formando un grupo natural, o real, de organismos, producto de procesos biológicos de diversificación. Entre los conceptos operacionales se encuentran el concepto biológico de especie (Wright, 1940; Mayr, 1942; Dobzhansky, 1950), el concepto tipológico (Mayr 1969; Lincoln *et al.* 1982) o morfológico de especie y el concepto ecológico (Van Valen, 1976; Andersson, 1990; Ridley, 1993).

De Queiroz (2007) considera que la razón por la que las distintas epistemologías llevan a conceptos incompatibles de especie es porque varios factores involucrados en la divergencia de los linajes surgen en distintos momentos durante el proceso de especiación,

es decir, cuando se vuelven fenotípicamente distintos, incompatibles reproductivamente, ecológicamente distintos, genéticamente distantes; estos factores no ocurren en todas las especies y tampoco ocurren al mismo tiempo ni en un orden establecido. Estos factores varían dependiendo de las capacidades de dispersión de los organismos, la aparición o desaparición de barreras geográficas, la capacidad de colonización de nuevos ambientes, el tamaño de las poblaciones, el tipo de reproducción y la tasa de evolución de los caracteres. También intervienen las presiones ambientales y selección natural, y la capacidad de las poblaciones a adaptarse. El surgimiento y la temporalidad de estos factores durante el proceso de especiación depende, en gran medida, de los patrones o modos a través de los cuales cada especie surge (alopátrida, parapátrida, simpátrida, entre otras), así como de la biología de los organismos en cuestión.

Por tanto, los conceptos generales, que definen a las especies con base en los procesos que les dieron origen, proveen las bases a partir de las cuales los conceptos operacionales, que buscan detectar los patrones resultantes de dichos procesos, pueden ser aplicados. Bajo esta perspectiva ontológica, los criterios utilizados en los conceptos operacionales se vuelven criterios secundarios, que pueden proveer evidencia de una separación de linaje. Por tanto, todas las propiedades o atributos son relevantes, como líneas de evidencia, para el problema de delimitación de especies.

Estas líneas de evidencia, sin embargo, no son infalibles, ya que la presencia de uno de estos atributos es evidencia positiva de la existencia de diferentes especies; mientras que la ausencia de líneas de evidencia no significa que no puedan ser especies diferentes (De Queiroz, 2007). Este tratamiento de las líneas de evidencia pone en perspectiva el verdadero problema en la delimitación de especies que radica en cuántos atributos o líneas de evidencia son en realidad necesarios y suficientes (o de qué tipo), para marcar los límites interespecíficos.

El problema de la delimitación de especies se ha retomado en la actualidad (Padial, *et al.*, 2010; Barrett & Freudenstein, 2011; Puillandre *et al.*, 2012), y la problemática de cuántas y cuáles líneas de evidencia son suficientes para delimitar a las especies aún persiste. Sin embargo, parece haber un consenso en torno a los métodos de delimitación que integran varias líneas de evidencia, donde por lo menos dos caracteres de valor taxonómico se consideran necesarios para diferenciar dos especies (Padial *et al.*, 2010). Además, se debe considerar si las diferencias se presentan en poblaciones que habitan en simpatria o si el carácter en cuestión está ligado al aislamiento reproductivo (en individuos con reproducción sexual). Cuando sólo se encuentra un carácter de valor taxonómico, las tendencias recientes postulan a los individuos como una sola especie, o como dos especies potenciales, hasta que no se encuentre más evidencia (Padial *et al.*, 2010).

Por estas razones, en este proyecto se utilizaron marcadores moleculares provenientes de distintos genomas que por tanto representan líneas de evidencia independientes entre ellos. También se consideraron aspectos de la morfología de las esporas (que son la base actual de la delimitación de especies en el género), así como la condición sexual, que aunque como tal solo es capaz de discriminar dos grandes grupos dentro del complejo (poblaciones monoicas y dioicas), puede servir como evidencia auxiliar. No se consideraron otras características morfológicas de gametofito y esporofito, como sus dimensiones, forma y grosor del talo, así

como la presencia de tubérculos debido al elevado nivel de plasticidad que estas plantas pueden presentar como respuesta a distintas condiciones ambientales (Proskauer, 1958).

La delimitación de las especies, entonces, se llevó a cabo buscando dos o más líneas de evidencia positivas concordantes, que indiquen los límites de las especies. Para poder realizar hipótesis acerca de las especies que comprenden este complejo se usó una aproximación a la taxonomía integrativa por congruencia, que busca concordancia al combinar datos de distintas líneas de evidencia, como son datos moleculares y morfológicos, y que es considerada como una de las rutas más confiables para identificar especies (Padiál *et al.*, 2010; Puillandre *et al.*, 2012). Una de las mayores ventajas de la taxonomía integrativa por congruencia es que promueve la estabilidad taxonómica, ya que la mayoría de los taxónomos estarían de acuerdo en la validez de una especie que está apoyada por varias líneas de evidencia que no estén ligadas; sin embargo, su mayor limitante es el riesgo de subestimar el número de especies, ya que los procesos de especiación no siempre van acompañados de cambios en los caracteres a todos los niveles y las tasas de cambio son heterogéneas.

Por lo tanto, ni la evidencia morfológica ni la molecular por sí solas son infalibles. De hecho, la evidencia morfológica puede estar sujeta a fuertes influencias ambientales, o la tasa a la que evolucionan los caracteres morfológicos es distinta, aún entre ellos, y mas aún puede variar con respecto a la genética. Es por todas estas ventajas y desventajas de las distintas fuentes de evidencia que el mejor enfoque para delimitar a las especies es utilizar varias de éstas y no restringirse a una sola.

IV. HIPÓTESIS

Se espera que las morfoespecies se recuperen en clados distintos dentro de la filogenia y que estos clados sean consistentes con los límites reconocidos por Hässel (1987, 1989); esto debido a las considerables diferencias que presentan en la ornamentación de las esporas, el tamaño de las mismas y la condición sexual.

V. OBJETIVOS

- Evaluar la utilidad de los caracteres morfológicos cuantitativos de las esporas del complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* en la circunscripción de las especies del complejo.
- Evaluar la utilidad de caracteres moleculares, tales como los genes *rbcL* y *nad5*, en la circunscripción de las especies del complejo.
- Analizar la circunscripción de las especies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* con base en los caracteres morfológicos de las esporas y de las agrupaciones filogenéticas obtenidas con los caracteres moleculares.

VI. MÉTODO GENERAL

a) Área de estudio

El material biológico utilizado en este estudio fue colectado por la autora en el centro (Hidalgo, Morelos, Distrito Federal, Puebla, Michoacán y el Estado de México) y en el sur (Chiapas, Oaxaca y Veracruz) del país (Fig. 1, Tabla 1).

Tabla 1. Localidades en donde fueron colectadas las poblaciones de antocerotes para este estudio, incluyendo el estado al que pertenecen, las coordenadas (latitud y longitud), así como la altura expresada en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

Estado	Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altura (m.s.n.m)
Distrito Federal	Ciudad Universitaria	19°19'33.7"	99°10'35.4"	2286
	3er Dinamo	19° 16' 48.7"	99° 16' 40.6"	2917
	4to Dinamo	19° 16' 01.5"	99° 17' 46"	3120
	Bosque de Tlalpan	19° 17' 34"	99° 11' 40"	2358
Puebla	Chignahuapan	19° 50' 21.23"	97° 59' 08.98"	2282
	Cuetzalan	20° 02' 02.04"	97° 31' 08.7"	885
Hidalgo	San Miguel Regla	20° 12' 42"	98° 33' 20"	2130
	Calnali	20° 20' 45"	98° 13' 35.1"	1535
Estado de México	Carretera Zitácuaro-Toluca	19° 25' 44"	100° 10' 6.3"	2715
Morelos	Zempoala	19° 02' 42"	99° 19' 03"	3091
Michoacán	Los Azufres	19° 45' 22.14"	100° 41' 14.5"	2382
Guerrero	Buнавista de Cuellar	18° 27' 32"	99° 22' 60"	1389
Veracruz	Jalapa	19° 30' 38.2"	96° 56' 42.8"	1325
Oaxaca	Puerto Soledad	18° 9' 52"	96° 59' 56"	2360
	Ixtlán de Juárez	17° 18' 54.68"	96° 28' 59.1"	1964
Chiapas	Finca Argovia	15° 07' 35.3"	92° 17' 35.3"	637
	El Águila	15° 06' 6"	92° 11' 17"	1124
	Pico de Loro	15° 03' 25"	92° 05' 58.5"	1425

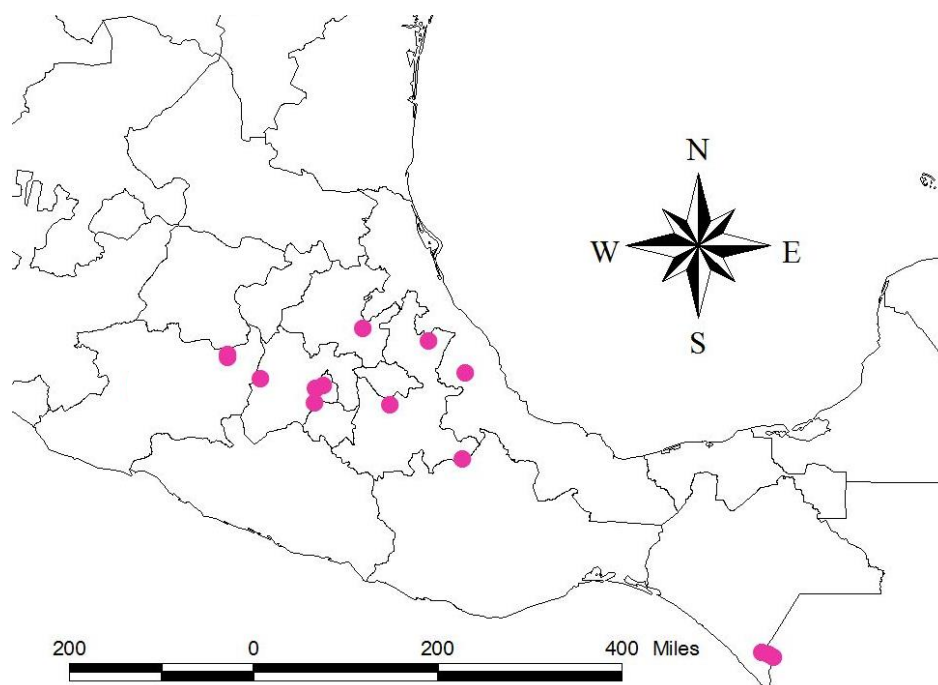


Figura 1. Localidades de colecta de plantas del género *Phaeoceros*.

Las plantas recolectadas fueron fotografiadas en el sitio. Se extrajeron del sustrato utilizando espátulas y se colocaron en recipientes de plástico cerrados para su traslado y posterior procesamiento en el laboratorio. Para cada muestra recolectada se anotaron los siguientes datos: nombre de la localidad, coordenadas, altitud y fecha de colecta.

b) Procesamiento del material biológico

En el laboratorio, las plantas se limpiaron utilizando pinceles y agua corriente para retirar el sustrato de la región ventral del gametofito. Las muestras que generalmente se encuentran agrupando varios individuos formando tapetes, se separaron con la ayuda de pinzas y agujas de disección. Posteriormente con la utilización de microscopios estereoscópicos y ópticos, se identificó el material a nivel de género y se seleccionó el correspondiente al género *Phaeoceros*, para lo cual se examinó, principalmente, el número de anteridios y la estructura de éstos (cuando se encontraron presentes), la anatomía del talo gametofítico, la forma y disposición del esporofito, la coloración de esporas y los pseudoeláteres, la presencia de un cíngulo ecuatorial en las esporas y la presencia de estomas en la pared de la cápsula.

A continuación se observaron, a través del microscopio óptico y estereoscópico, las características morfológicas y anatómicas de varios individuos de cada población, que ayudaron a discernir características más específicas como la condición sexual (monoico o dioico) y la ornamentación de las esporas. Esta última permitió ubicarlas dentro del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

Las muestras recolectadas, una vez examinadas morfológicamente en el laboratorio, fueron colocadas, en parte, en bolsas de plástico cerradas con silica gel, etiquetadas con la clave de la población para utilizarse posteriormente para la extracción de ADN. La otra parte de la muestra se prensó en papel. Estas últimas, una vez secas, se depositaron en sobres de papel rotulados y cerrados como voucher de cada población. Los respaldos de las plantas recolectadas fueron depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME).

c) Observación de la morfología de las esporas

De las poblaciones identificadas tentativamente como parte del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*, se tomaron treinta esporas por población (cuando fue posible), los cuales fueron montados en portamuestras para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB), y sus datos se utilizaron para el posterior análisis estadístico. Para obtener las esporas, los esporofitos fueron rasgados utilizando agujas anatómicas y pinzas, y las esporas se distribuyeron por la cinta adhesiva del portamuestras con ayuda de un pincel.

En aquellos casos en los que la ornamentación de las esporas no era clara bajo el microscopio óptico, se tomó un esporofito por población para su observación al MEB. Si al observar las esporas se identificaba a la población como parte del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*, se procedía a montar otros dos esporofitos para completar el total de tres por población.

Una vez montadas las esporas en el portamuestras, fueron cubiertas con oro en una ionizadora Denton Vacuum DESK-II. Las observaciones se realizaron en el microscopio

electrónico de barrido de la Facultad de Ciencias (Jeol JSM 5310LV) y en el MEB del Instituto de Biología (Hitachi S-2460N). Se tomaron imágenes de diez esporas por esporofito, cinco de la cara distal y cinco de la cara proximal. En total, se observaron y fotografiaron 406 esporas.

d) Identificación de morfoespecies en el material recolectado

Debido a que las morfoespecies están descritas, principalmente, con base en la ornamentación de las esporas, la identificación del material biológico se basó en el trabajo de Hässel (1987, 1989) que describe la ornamentación de las esporas del género *Phaeoceros* para el continente americano.

e) Medición de caracteres morfológicos de las esporas y su análisis estadístico

A partir de las imágenes obtenidas con MEB, se realizaron mediciones de los caracteres de las esporas (Tabla 2).

Tabla 2. Caracteres morfológicos medidos en las esporas fotografiadas del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

Caracteres medidos en las esporas fotografiadas	Unidades
Diámetro mayor	µm
Diámetro menor	µm
Relación diámetro mayor/diámetro menor	Relación
Densidad de espinas o báculos distales	Número de espinas en en un área de 10µm ²
Altura de las espinas o báculos distales	µm
Ancho del cíngulo ecuatorial	µm
Ancho de la marca trilete	µm
Cantidad total de verrugas en las áreas proximales triangulares	Número de verrugas
Diámetro de las verrugas proximales	µm

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para examinar si existen diferencias significativas entre las morfoespecies con los caracteres analizados y qué caracteres son mejores para discriminar entre morfoespecies.

Los datos de todas las muestras analizadas fueron anotados en una tabla de Excel, que incluyó las medidas de los caracteres enlistados en la tabla 2, tomados de 406 imágenes del MEB. Debido a que las unidades en las que se encontraban las variables (µm, densidad, número de verrugas) no eran comparables y a que las varianzas de las variables eran muy distintas, se normalizaron los datos (media=0, var=1). Una vez transformados los datos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para sintetizar en un número menor de variables el mayor porcentaje de la variación y como método exploratorio para observar la distribución en el espacio de las observaciones con las variables creadas. La matriz obtenida en el PCA fue utilizada para realizar un análisis multivariado de varianza (MANOVA), que contrasta la hipótesis nula de que los vectores de las medias de todos los grupos son iguales y/o provienen de la misma población. Posteriormente se identificó en qué grupos se producen las diferencias significativas que llevaron a rechazar la hipótesis nula del análisis de MANOVA. Para ello, se aplicó una prueba Post Hoc de Sheffe para cada factor; esta prueba es muy conservadora pero ideal cuando el número de muestras es desigual, como es el caso.

Además se realizó un análisis discriminante canónico con los datos de la matriz sin normalizar. Éste se usa principalmente para clasificar individuos o unidades experimentales en dos o más grupos definidos y para desarrollar reglas que conducen a clasificar las unidades experimentales en los diferentes grupos.

También se llevó a cabo un análisis de agrupamiento con la matriz normalizada. Dicho análisis comprende técnicas que producen clasificaciones a partir de datos que, inicialmente, no estaban clasificados. Se utilizó un algoritmo de agrupamiento jerárquico en árbol; el propósito de este algoritmo es juntar observaciones en grupos sucesivamente más grandes, usando alguna medida de similitud o distancia. Se utilizó el método no ponderado de agrupamiento pareado usando la media aritmética (UPGMA por sus siglas en inglés), y la medida de distancia utilizada fue distancia euclideana cuadrada. En este método de promedios pareados sin peso, la distancia entre dos grupos se calcula como la distancia promedio entre todas las parejas de observaciones en los dos grupos distintos. Este método es muy eficiente tanto cuando las observaciones forman grupos naturales distintos, como cuando forman grupos elongados en cadena. En su libro, Sneath y Sokal (1973) introdujeron la abreviación UPGMA (por sus siglas en inglés, unweighted pair-group method using arithmetic averages) para este método. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en Statistica v10.

Se elaboró una clave de identificación para las especies mexicanas del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* con base, principalmente, en los caracteres medidos de las esporas (Tabla 2).

f) Extracción de ADN

El ADN total fue extraído usando el procedimiento 2x CTAB (Doyle & Doyle, 1987), con adición de 2% de polivinilpirrolidona (PVA). Se llevó a cabo la extracción de tres esporofitos de cada población (donde fue posible, se utilizaron los mismos esporofitos de los que se tomaron las esporas).

Previo a la extracción se etiquetaron tubos Eppendorf de 1.5 ml con la clave de cada individuo. Asimismo, se añadió al tampón CTAB 0.4% de 2-mercaptoetanol, y se precalentó esta mezcla en baño maría a 65°C. Posteriormente, se colocó tejido de cada muestra en el tubo correspondiente, se agregaron 50 µl de la mezcla de CTAB más 2-mercaptoetanol a cada tubo, y el tejido se maceró. Una vez maceradas las muestras, se agregaron los 450 µl del tampón de CTAB restantes a cada tubo y se incubaron a 65°C durante 30 min.

La extracción se realizó utilizando 500 µl de SEVAG, dejando escapar el gas. Posteriormente se colocaron los tubos sobre un agitador a intensidad moderada (entre 80 y 110 oscilaciones) durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 9000 RPM durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa clara (superior) a un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio y correctamente etiquetado.

El ADN fue precipitado al adicionar a cada tubo 2/3 partes el volumen de isopropanol absoluto a -20°C, invirtiendo suavemente el tubo varias veces hasta observar la precipitación como un enturbiamiento. Se dejaron reposar las mezclas extracto-alcohol por una hora a -

20°C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 13000 RPM durante 5 minutos y se descartó el líquido, cuidando de no desechar el precipitado. Se lavó el ADN con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 13000 RPM durante 3 minutos y se descartó el alcohol, cuidando de nuevo no perder el precipitado. Los extractos se secaron en una centrífuga de vacío por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 30 µl de buffer EB y se los mantuvo a -20°C.

g) Amplificación de regiones seleccionadas mediante PCR

Para seleccionar las regiones a amplificar se realizó una búsqueda en GenBank para determinar la cantidad de especies de *Phaeoceros* previamente secuenciadas. A partir de estos resultados se concluyó que, a pesar de ser genes codificantes, las únicas dos regiones que tenían suficiente representación a nivel mundial de especies del complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* eran una región de cloroplasto: el gen *rbcL*, y una región de mitocondria: el gen *nad5*.

Los genes se amplificaron en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) usando el “Taq PCR Core Kit” de Qiagen ajustado a reacciones de 25 µL y con la adición de 1 µl de suero de albúmina bovina (BSA).

Antes de iniciar la amplificación, se etiquetaron los tubos de 0.2 ml con la clave de cada muestra, se realizaron los cálculos para preparar la mezcla “maestra” para cada gen (*nad5* y *rbcL*) que contenía los siguientes reactivos (el volumen indicado es para cada muestra):

- H₂O: 19.875 µl
- 10×: 2.5 µl
- BSA: 1 µl
- Dntp: 0.5 µl
- Primer F: 0.25 µl
- Primer R: 0.25 µl (los primers utilizados para la PCR se muestran en la Tabla 3)
- MgCl₂: 0.5 µl
- Taq: 0.125 µl

Estos volúmenes fueron multiplicados por el número de muestras por gen a amplificar y un control negativo, más un 5-10% adicional. Estos reactivos se adicionaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml etiquetado con el nombre de cada gen. Una vez agregados todos los reactivos a cada mezcla “maestra”, se centrifugaron rápidamente a 13000 RPM. Posteriormente, se repartieron 23.5 µl en cada tubo que iba a contener ADN, y 25 µl en los controles negativos. Posteriormente se añadió 1.5 µl del ADN correspondiente a cada tubo.

Tabla 3. Primers utilizados para la PCR.

Gen	Nombre del primer	Secuencia	Dirección	Referencia
rbcL	rbcLF	gtc acc aca aac gga rac taa agc	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007
	rbcLHR	ctt tcc ata ctt crc aag cag c	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007
nad5	K5	ata tgt ctg agg atc cgc ata g	5'-3'	Steinhauser <i>et al.</i> , 1999
	L5	ttt ggc caa gga tcc tac aaa	5'-3'	Steinhauser <i>et al.</i> , 1999

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR 9700 de Applied Biosystems®. Se programó el termociclador para 28-32 ciclos con los siguientes detalles del programa:

- Desnaturalización a 94°C por 2 minutos.
- Desnaturalización a 94°C por 1 minuto.
- “Annealing” a 48-50°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 2:30 minutos.
- Extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para comprobar la amplificación se corrió un gel (1% agarosa) cargando los productos de cada PCR en la cámara de electroforesis. Los tubos con los productos de la PCR fueron almacenados a 4°C.

h) Secuenciación

Las reacciones de secuenciación cíclica fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología, UNAM. Cada gen se secuenció en cuatro partes, por lo que se utilizaron otros dos primers por gen, además de los utilizados para la PCR (Tabla 4).

Tabla 4. Primers utilizados solo para secuenciación.

Gen	Nombre del primer	Secuencia	Dirección	Referencia
rbcL	471F	caa ggt cca cct cat ggt a	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007
	660R	aac gat ctc tcc aac gca	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007
nad5	410F	cta ygg tma cag cag gcg t	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007
	610R	att cct gtg gtt gcc cgc	5'-3'	Duff <i>et al.</i> , 2007

i) Edición y alineamiento de secuencias

Los cromatogramas obtenidos fueron editados con el programa BioEdit versión 7.1.3.0 (Hall, 1999) y las secuencias se alinearon visualmente para la construcción de las matrices de datos.

j) Obtención de secuencias de GenBank

Para ampliar el área geográfica de los individuos incluidos en el estudio molecular, se hizo una búsqueda en GenBank de las especies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* de los genes nad5 y rbcL. Se identificaron 23 secuencias útiles en este estudio del gen nad5 (Tabla 5) y 23 secuencias del gen rbcL (Tabla 6).

Tabla 5. Secuencias disponibles en GenBank de los géneros *Phaeoceros*, *Paraphymathoceros* y *Notothylas* del gen nad5.

Especie	Acceso	País	Publicación
<i>Notothylas breutelii</i>	DQ845719	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Notothylas dissecta</i>	JX872474	Panamá	Villarreal & Renner, 2012
<i>Notothylas javanica</i>	DQ845720	Panamá	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Notothylas orbicularis</i>	DQ845718	Panamá	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros cf. bolussii</i>	JX872481	Sudáfrica	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros brevicapsulus</i>	JX872480	Cuba	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros carolinianus</i>	KF482264	Sao Tome & Principe	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros dendroceroides</i>	KF482265	Panamá	Villarreal & Renner, 2013
<i>Phaeoceros engelii</i>	JX872482	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros evanidus</i>	JX872483	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros flexivalvis</i>	JX872484	República Dominicana	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros himalayensis</i>	JX872485	Nepal	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros inflatus</i>	JX872486	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros laevis</i>	DQ845721	Portugal	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros microsporus</i>	JX872487	Panamá	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros minutus</i>	JX872488	Sudáfrica	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros mohrii</i>	DQ845724	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros oreganus</i>	JX885644	EUA	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros perpusillus</i>	KF482266	Tailandia	Villarreal & Renner, 2013
<i>Paraphymatoceros diadematus</i>	JX872477	Chile	Villarreal & Renner, 2012
<i>Paraphymatoceros hallii</i>	JX872478	EUA	Villarreal & Renner, 2012
<i>Paraphymatoceros pearsonii</i>	AY894802	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Paraphymatoceros proskaueri</i>	JX872479		Villarreal & Renner, 2012

Tabla 6. Secuencias disponibles en GenBank de los géneros *Phaeoceros*, *Paraphymathoceros* y *Notothylas* del gen rbcL.

Especie	Acceso	País	Publicación
<i>Notothylas breutelii</i>	AY463054	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Notothylas dissecta</i>	JX872434	Panamá	Villarreal & Renner, 2012
<i>Notothylas javanica</i>	DQ845664	Panamá	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Notothylas orbicularis</i>	AY463055	Panamá	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros cf. bolussii</i>	JX872440	Sudáfrica	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros brevicapsulus</i>	JX872439	Cuba	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros carolinianus</i>	KF482290	Sao Tome & Principe	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros dendroceroides</i>	KF482291	Panamá	Villarreal & Renner, 2013
<i>Phaeoceros engelii</i>	JX872441	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros evanidus</i>	JX872442	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros flexivalvis</i>	JX872443	República Dominicana	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros himalayensis</i>	JX872444	Nepal	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros inflatus</i>	JX872445	Australia	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros laevis</i>	DQ845673	Portugal	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros microsporus</i>	JX872446	Panamá	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros minutus</i>	JX872447	Sudáfrica	Villarreal & Renner, 2012
<i>Phaeoceros mohrii</i>	DQ845672	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros oreganus</i>	DQ845661	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaeoceros perpusillus</i>	KF482292	Tailandia	Villarreal & Renner, 2013
<i>Phaeoceros tenuis</i>	JX872448	México	Villarreal & Renner, 2012
<i>Paraphymatoceros diadematus</i>	JX872438	Chile	Villarreal & Renner, 2012
<i>Paraphymatoceros pearsonii</i>	DQ845668	EUA	Duff <i>et al.</i> , 2007
<i>Paraphymatoceros proskaueri</i>	EU283415	EUA	Crandall-Stotler <i>et al.</i> , 2008

k) Análisis filogenéticos

A partir de las secuencias alineadas, se construyó una matriz de datos para *rbcL*, otra para el *nad5* y una tercera matriz concatenada de los dos genes (*rbcL* y *nad5*). Se incluyeron como grupo externo, secuencias de otra especie de *Phaeoceros* (*P. tenuis*), así como secuencias de *Paraphymathoceros* (*P. pearsonii*) y *Notothylas* (*N. orbicularis*), así como las secuencias descargadas de GenBank antes mencionadas (Tablas 5 y 6).

Para obtener las hipótesis filogenéticas, las matrices se analizaron utilizando dos métodos de reconstrucción filogenética: máxima parsimonia e inferencia bayesiana. La búsqueda bajo el criterio de máxima parsimonia se llevó a cabo con el programa PAUP versión 4.0beta (Swofford, 2003) y el análisis de inferencia bayesiana se realizó con Mr. Bayes versión 3.2.3 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

El criterio de parsimonia es simple, no paramétrico y asume que un árbol que minimiza los cambios (pasos) es la mejor estimación de la filogenia (Page & Holmes, 1998). La inferencia bayesiana es un método paramétrico y probabilístico que permite una reconstrucción más precisa de la filogenia al corregir múltiples eventos de mutación en un mismo sitio al incorporar modelos de evolución molecular (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

En los análisis de máxima parsimonia se llevó a cabo una búsqueda heurística con adición aleatoria de terminales e intercambio de ramas “tree-bisection-reconnection” (TBR) de 1000 réplicas, caracteres no ordenados y de igual peso (Fitch, 1971). Para estimar el soporte de los clados se llevó a cabo un análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) de 200 repeticiones de 20 réplicas cada una.

Para el método probabilístico se hicieron tres particiones correspondientes a las posiciones de los codones (1a, 2da y 3era) de cada gen. Posteriormente se eligieron los mejores modelos de evolución molecular, los cuales fueron calculados con jModelTest versión 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) bajo el criterio de Información Akaike (1974).

En los análisis con inferencia bayesiana se crearon, para las matrices *rbcL* y *nad5*, tres particiones considerando la posición del codón (1a, 2da y 3era). Para la matriz concatenada se crearon seis particiones (tres por gen). Se aplicaron los modelos seleccionados para cada posición de los codones en cada gen. Para cada matriz se llevaron a cabo dos análisis paralelos, con cuatro cadenas de Markov Montecarlo, que corrieron 5000000 de generaciones y obteniendo muestras cada 200 generaciones. La convergencia se evaluó con Tracer versión 1.5.

VII. RESULTADOS

Morfoespecies identificadas

Con base en las claves de Hässel (1987, 1989) para el género *Phaeoceros* se identificaron siete especies, seis de las cuales pertenecen al complejo de *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* (Fig. 2, Tabla 7):

- *P. brevicapsulus* (Fig. 2 I-J),
- *P. carolinianus* (Fig. 2 G-H),
- *P. gualaquizanus* (Fig. 2 E-F),
- *P. laevis* (Fig. 2 A-B),
- *P. oreganus* (Fig. 2 C-D),
- *P. pichinchensis* (Fig. 2 K-L).

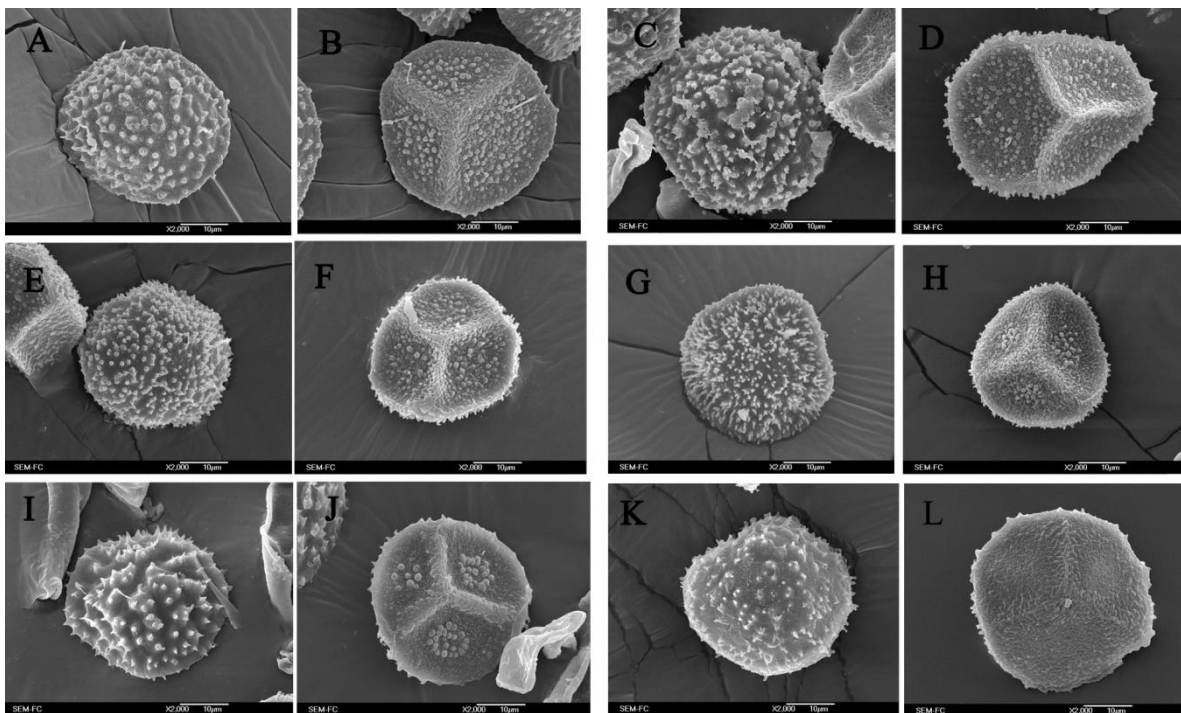


Fig 2. Esporas representativas de las especies identificadas pertenecientes al complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus*. **A-B.** *P. laevis* de los Dinamos de Contreras, en el Distrito Federal. **A.** Cara distal. **B.** Cara proximal. **C-D.** *P. oreganus* de San Miguel Regla, Hidalgo. **C.** Cara distal. **D.** Cara proximal. **E-F.** *P. gualaquizanus* de Cuetzalan, Puebla. **E.** Cara distal. **F.** Cara proximal. **G-H.** *P. carolinianus* de El Águila, Chiapas. **G.** Cara distal. **H.** Cara proximal. **I-J.** *P. brevicapsulus* de Jalapa, Veracruz. **I.** Cara distal. **J.** Cara proximal. **K-L.** *P. pichinchensis* de los Dinamos de Contreras, en el Distrito Federal. **K.** Cara distal. **L.** Cara proximal.

La otra especie encontrada del género corresponde a *Phaeoceros tenuis*, la cual fue considerada como grupo externo en el análisis filogenético con datos moleculares. También se incluyeron como grupos externos *Paraphymatoceros pearsonii* y *Notothydas orbicularis* (Tabla 7).

Tabla 7. Especies de *Phaeoceros* encontradas en las localidades de colecta.

Especie	Estado	Localidad	Colector y No. de colecta	
<i>Phaeoceros brevicapsulus</i>	Veracruz	Jalapa	A. Ibarra-Morales (AIM) #24	
<i>Phaeoceros carolinianus</i>	Chiapas	El Águila	AIM #13b	
		Finca Argovia	AIM #34	
		Pico de Loro	AIM #35	
	Oaxaca	Puerto Soledad	AIM #15	
	Puebla	Chignahuapan	AIM #44a	
<i>Phaeoceros gualaquizanus</i>	Puebla	Morelos	Zempoala	AIM #37
		Puebla	Cuetzalan	AIM #30
<i>Phaeoceros laevis</i>	Distrito Federal	Ciudad universitaria (CU)	AIM #2a	
		4to Dinamo	AIM #41	
<i>Phaeoceros oreganus</i>	Hidalgo	San Miguel Regla	AIM #5	
	Edo de México	Carretera Zit-Tol	AIM #49a	
	Michoacán	Los Azufres 1	AIM #46	
<i>Phaeoceros pichinchensis</i>	Distrito Federal	Dinamos	AIM #43b	
	Oaxaca	Ixtlán	AIM #50	
<i>Phaeoceros tenuis</i>	Distrito Federal	Bosque de Tlalpan	AIM #40	
	Hidalgo	Calnalli	Alexis Cruz s.n.	
<i>Notothylas orbicularis</i>	Guerrero	Buenavista	AIM #18b	
<i>Paraphymatoceros pearsonii</i>	Distrito Federal	Bosque de Tlalpan	AIM #39	

Caracteres morfológicos de las esporas

a) Estadística descriptiva

La matriz de datos incluyó un total de 406 observaciones por carácter pertenecientes a 16 poblaciones de seis especies del complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* (Tablas 8 y 9). Se consideraron nueve variables de caracteres morfológicos de las esporas.

Tabla 8. Estadísticas descriptivas de la matriz completa los datos registrados para nueve variables de caracteres morfológicos de las esporas de 16 poblaciones de seis especies del complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* de México.

Variable	N	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Est.
Diámetro máximo	406	36.6	27.2	50	4.3
Diámetro mínimo	406	33.2	24.5	43.2	3.8
Diámetro máx/ Diámetro mín	406	1.1	1	1.4	0.1
Longitud espinas distales	406	1.5	0.6	3.8	0.5
Densidad espinas distales	406	22.6	9	57	9.5
Número total de verrugas prox	406	73.5	0	340	66.5
Ancho de marca trilete	406	3	0.7	5.9	0.9
Ancho de cíngulo ecuatorial	406	1.9	0.5	5.2	0.6
Diámetro de verrugas proximales	406	1	0	2.4	0.5

Tabla 9. Estadísticas descriptivas por población (mínimo, media y máximo) de cada variable, la media es el valor dentro de los paréntesis. Población 1 (*P. laevis*): Ciudad Universitaria, Distrito Federal; población 2 (*P. carolinianus*): El Águila, Chiapas; población 3 (*P. carolinianus*): Chignahuapan, Puebla; población 4 (*P. brevicapsulus*): Jalapa, Veracruz.

Variable	1	2	3	4
Diámetro máximo	33.1(38.6)43.1	27.2(31.6)35.9	35.5(40.1)44.8	28.6(31.9)35.9
Diámetro mínimo	31.03(35.8)39.6	25.5(29.5)32.8	31.4(36.4)41.4	26.5(29.6)32.8
Diam máx/ Diam mín	1(1.1)1.2	1(1.1)1.2	1(1.1)1.3	1(1.1)1.3
Longitud espinas distales	0.7(1.67)2.8	0.7(1.8)3	0.9(1.8)3.8	0.9(2)3.7
Densidad espinas distales	9(13.5)19	11(36.8)57	13(20.3)29	10(13.6)21
Número total de verrugas proximales	148(222.9)340	0(23.8)48	46(71)113	33(46.8)62
Ancho de marca trilete	2.1(3.4)5.5	2.1(3.3)4.1	2.8(3.6)4.5	2.8(3.3)4.5
Ancho de cíngulo ecuatorial	1.9(2.1)3.8	1(2)3.4	1.4(2.2)3.1	1.4(2.1)2.8
Diámetro verrugas proximales	0.8(1)1.4	0.7(1.2)1.7	0.5(1.2)2.1	1(1.4)2.4

Tabla 9 (continuación). Población 5 (*P. gualaquizanus*): Cuetzalan, Puebla; población 6 (*P. oreganus*): San Miguel Regla, Hidalgo; población 7 (*P. carolinianus*): Zempoala, Morelos; población 8 (*P. carolinianus*): Finca Argovia, Chiapas.

Variable	5	6	7	8
Diámetro máximo	27.6(32.6)37.2	37.9(42.2)50	31(37.2)43.1	30.7(33.8)36.2
Diámetro mínimo	26.5(30.1)35.5	33.8(38.4)43.2	27.2(34.1)39.6	27.6(31.1)34.5
Diam máx/ Diam mín	1(1.1)1.3	1(1.1)1.3	1(1.1)1.3	1(1.1)1.3
Longitud espinas distales	0.7(1.1)1.9	0.9(1.5)1.9	0.7(1.5)2.8	0.9(1.3)1.9
Densidad espinas distales	17(33.7)48	14(21.1)26	11(20.3)33	21(31.4)43
Número total de verrugas proximales	35(105.6)169	66(112.8)216	0(41.3)62	5(18.4)30
Ancho de marca trilete	1(2.4)3.4	2.1(3)3.8	2.8(3.2)3.8	1.7(2.5)3.8
Ancho de cíngulo ecuatorial	0.5(1.4)2.4	1.4(2.2)3.1	1.2(2)2.8	1.7(2)2.4
Diámetro verrugas proximales	0.7(1.1)1.7	1(1.5)2.3	0.7(1)1.7	0.7(0.9)1.4

Tabla 9 (continuación). Población 9 (*P. carolinianus*): Pico de Loro, Chiapas; población 12 (*P. pichinchensis*): 3er Dínamo, Magdalena Contreras, Distrito Federal; población 13 (*P. laevis*): 4to Dínamo, Magdalena Contreras, Distrito Federal; población 18 (*P. carolinianus*): Calnalli, Hidalgo

Variable	9	12	13	18
Diámetro máximo	28.3(30.1)31	33.5(38.2)46.5	32.2(36.6)39.5	31(33.6)39.2
Diámetro mínimo	27.2(28.2)29.3	29.1(35.1)43.1	30.1(33.9)36.4	27.1(30)32.3
Diam máx/ Diam mín	1(1.1)1.1	1(1.1)1.2	1(1.1)1.2	1(1.1)1.2
Longitud espinas distales	0.7(1.3)1.9	0.6(0.9)1.5	0.9(1.9)2.7	0.9(1.3)2.1
Densidad espinas distales	27(32.3)41	9(13.3)22	10(14.5)19	13(17.6)24
Número total de verrugas proximales	42(53.8)66	0(0)0	124(153.7)211	23(38.6)52
Ancho de marca trilete	1.7(2.7)3.8	0.7(3.1)5.9	1.5(3.3)4.3	2.4(3.1)3.6
Ancho de cíngulo ecuatorial	1.4(1.8)2.4	0.9(1.4)2.1	1.3(2.7)5.2	0.9(1.6)2.1
Diámetro verrugas proximales	0.7(1.1)1.7	0(0)0	0.9(1.1)1.7	0.6(1)1.4

Tabla 9 (continuación). Población 19 (*P. carolinianus*): Puerto Soledad, Oaxaca; población 23 (*P. oregonus*): carretera Zitácuaro-Toluca, Edo. de México; población 24 (*P. oregonus*): Los Azufres, Michoacán; población 27 (*P. pichinchensis*): Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Variable	19	23	24	27
Diámetro máximo	27.7(33.4)37.8	34.9(39.6)43	32.5(40)48.4	34.5(40.1)44
Diámetro mínimo	24.5(28.8)33.7	29.4(35.1)38.8	29.8(34.3)39.5	31.1(35.8)39
Diam máx/ Diam mín	1(1.2)1.4	1(1.1)1.3	1(1.2)1.4	1(1.1)1.3
Longitud espinas distales	0.7(1.3)2.2	0.7(1.2)1.8	0.7(1.3)1.9	0.8(1.5)2.7
Densidad espinas distales	15(20.9)29	15(27.4)40	19(27.1)35	13(26.6)43
Número total de verrugas proximales	11(31.9)47	40(113.6)238	33(76.5)113	0(3.7)14
Ancho de marca trilete	1(2.6)4.5	1.06(2.8)3.9	0.8(2.1)3.8	2.1(3.7)5.3
Ancho de cíngulo ecuatorial	0.8(1.9)2.9	0.8(1.4)2.1	0.8(1.6)2.7	0.8(1.6)3.4
Diámetro verrugas proximales	0.7(1.2)1.6	0.7(1.2)1.8	0.6(1.2)1.6	0(0.4)1.4

b) Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) de los caracteres de las esporas mostró que 80.56 % de la variación morfológica de las esporas puede ser explicada por los primeros cinco componentes principales (Tabla 10). El PC I explica 24.47% de la variación total, el PC II explica 19.77%, el PC III explica 14.94%, el PC IV explica 12.11 % y el PC V explica el 9.26% de la variación total.

Tabla 10. Estructura de los componentes principales generados en el PCA.

Componente principal (PC)	Eigenvalor	Eigenvalor acumulado	% Total de variación	% de variación acumulado
I	2.202781	2.202781	24.47535	24.4753
II	1.779747	3.982529	19.77497	44.2503
III	1.344667	5.327196	14.94075	59.1911
IV	1.089931	6.417127	12.11034	71.3014
V	0.833161	7.250288	9.25734	80.5588
VI	0.717637	7.967925	7.97374	88.5325
VII	0.643471	8.611396	7.14968	95.6822
VIII	0.386293	8.997689	4.29215	99.9743
IX	0.002311	9	0.02568	100

La correlación variable-componente principal que resultó del análisis de los caracteres de las esporas indica que el diámetro máximo, el diámetro mínimo y el número total de verrugas proximales están correlacionados negativamente con el PC I, mientras que la densidad de espinas distales se encuentra correlacionada de forma positiva (Tabla 11). En cuanto al PC II, la longitud de espinas distales, el ancho del cíngulo ecuatorial y el diámetro de las verrugas proximales están correlacionadas positivamente, mientras que el diámetro máximo está correlacionado de forma negativa (Tabla 11). En el PC III, la relación diámetro máximo/diámetro mínimo y el diámetro de las verrugas proximales están correlacionados de forma positiva, mientras que el ancho de la marca trilete está correlacionado negativamente (Tabla 11). En el PC IV la relación diámetro máximo/diámetro mínimo está correlacionado positivamente (Tabla 11). En el PC V el ancho del cíngulo ecuatorial está correlacionado negativamente (Tabla 11).

Tabla 11. Correlación variable morfológica de las esporas-componente principal de las morfoespecies incluidas en la base de datos (complejo de especies *P. laevis* – *P. carolinianus*). En color rojo se encuentran las principales variables representadas en cada componente.

	PC I	PC II	PC III	PC IV	PC V	PC VI	PC VII	PC VIII	PC IX
Diámetro máximo	-0.691	-0.6	0.326	0.13	-0.127	-0.131	-0.053	-0.048	0.032
Diámetro mínimo	-0.774	-0.471	-0.002	-0.355	-0.135	-0.156	-0.048	-0.08	-0.031
Diám máx/ Diám mín	0.104	-0.238	0.544	0.795	0.018	0.041	-0.007	0.04	-0.019
Longitud espinas distales	-0.367	0.506	-0.318	0.289	-0.237	-0.142	-0.584	0.08	-0.000
Densidad espinas distales	0.504	0.034	0.321	-0.193	-0.729	-0.195	0.087	0.165	-0.000
Número total de verrugas proximales	-0.575	0.379	0.439	-0.224	0.117	0.333	0.026	0.397	-0.000
Ancho marca trilete	-0.405	-0.012	-0.526	0.304	-0.411	0.439	0.323	-0.027	0.000
Ancho cíngulo ecuatorial	-0.428	0.524	-0.09	0.209	0.1	-0.54	0.429	0.067	-0.000
Diámetro verrugas proximales	-0.218	0.682	0.51	-0.089	-0.135	0.144	0.009	-0.424	0.000

La gráfica de dispersión de los componentes PC I y PCII (Fig. 3) muestra a las observaciones de *P. pichinchensis* (circunscrito por el círculo naranja) con una tendencia a formar un grupo distinto del resto en el cuadrante inferior, determinado por el PCII con un diámetro de esporas elevado, baja longitud de espinas distales, cíngulo ecuatorial relativamente angosto y el diámetro pequeño de sus verrugas proximales (en el eje de las y).

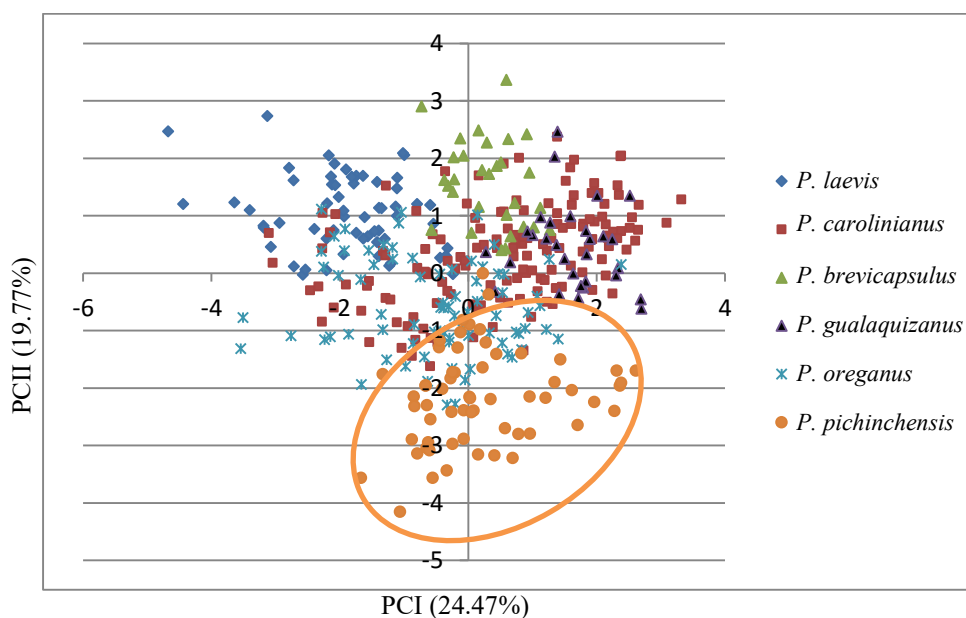


Fig. 3. Gráfica de dispersión de los componentes PCI y PCII (cada punto representa una espóra de un individuo muestreado y su posición con respecto a los componentes PCI y PCII).

La gráfica de dispersión de los componentes PC I y PCIII (Fig. 4) muestra a las observaciones de *P. laevis* y *P. oreganus* (circunscrito por el círculo azul) con una tendencia a formar un grupo distinto del resto en el cuadrante superior izquierdo, determinado por el elevado diámetro de sus esporas, baja densidad de espinas distales y un número elevado de verrugas proximales (eje de las x), así como también por diámetro elevado de las verrugas proximales, una elevada relación diámetro máximo/diámetro mínimo y una marca trilete relativamente angosta (en el eje de las y).

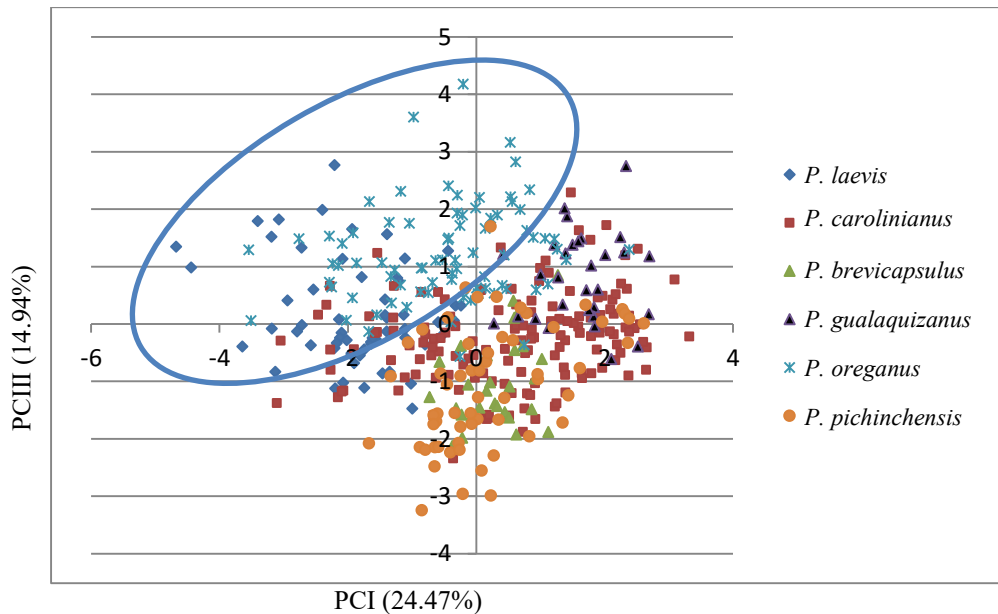


Fig. 4. Gráfica de dispersión de los componentes PCI y PCIII (cada punto representa una espora de un individuo muestreado y su posición con respecto a los componentes PCI y PCIII).

La gráfica de dispersión de los componentes PC II y PCIII (Fig. 5) muestra a las observaciones de *P. pichinchensis* (dentro del círculo naranja) con una tendencia a formar un grupo distinto del resto en el cuadrante inferior izquierdo, determinado por una baja longitud de espinas distales, un bajo diámetro de verrugas proximales, un cingulo ecuatorial relativamente angosto y un diámetro de las esporas elevado (en el eje de las x), así como también una baja relación diámetro máximo/diámetro mínimo y una relativamente angosta marca trilete (en el eje de las y).

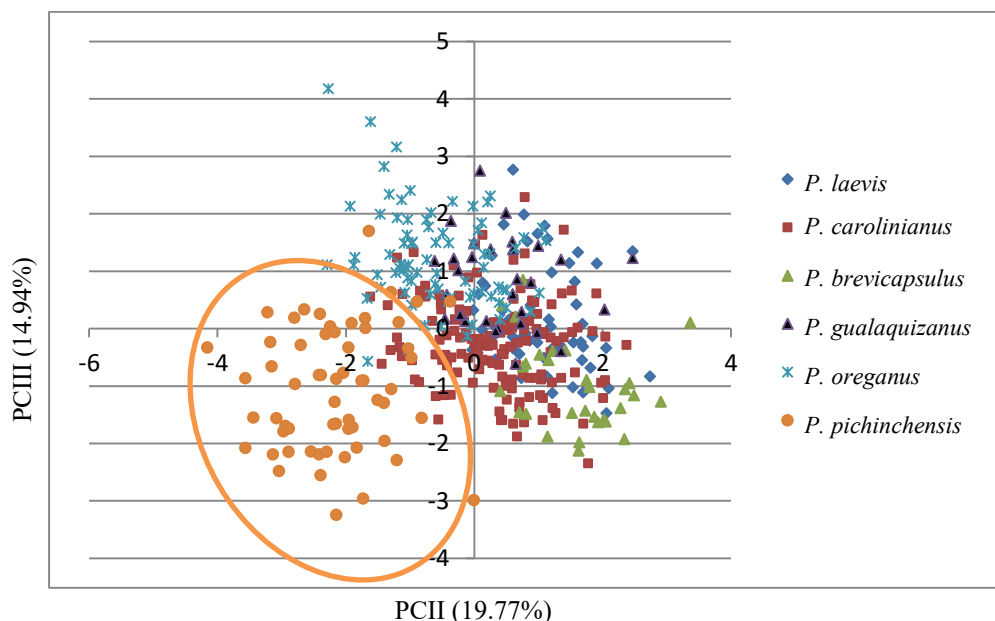


Fig. 5. Gráfica de dispersión de los componentes PCII y PCIII (cada punto representa una espora de un individuo muestreado y su posición con respecto a los componentes PCII y PCIII).

c) MANOVA

La hipótesis de que existen diferencias significativas entre las esporas de las especies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* se puso a prueba utilizando un MANOVA. De éste análisis se obtuvo una Wilks $\lambda=0.065$ $F=63.92$, $p<0.0001$ (Tabla 12), lo que significa que la media de los caracteres medidos de la morfología de las esporas son significativamente diferentes entre por lo menos una de las especies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

Tabla 12. Distintas pruebas de significancia de MANOVA (se incluyen las pruebas de Wilks λ , Pillai's, Hotelling y Roy's).

Prueba	Valor	F	p
Wilks λ	0.065	63.92	0.000
Pillai's	1.764	43.63	0.000
Hotelling	4.791	75.59	0.000
Roy's	2.813	225.07	0.000

d) Prueba de comparación *post-hoc*: la prueba de Scheffe

Como el MANOVA reveló diferencias significativas entre las medias de por lo menos una especie, se realizó la prueba *post-hoc* de Scheffe, para identificar qué grupos poseen medias diferentes entre sí (Tablas 13, 14, 15, 16 y 17).

En los resultados obtenidos para el PC I (Tabla 13), las especies *P. laevis*, *P. gualaquizanus* y *P. oreganus* muestran diferencias significativas en sus medias (valores con asterisco) con respecto al resto de las especies.

Tabla 13. Prueba de Scheffe para el PC I. *valores con diferencias significativas al nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Especie	<i>P. laevis</i>	<i>P. carolinianus</i>	<i>P. brevicapsulus</i>	<i>P. gualaquizanus</i>	<i>P. oreganus</i>	<i>P. pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>		0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
<i>P. carolinianus</i>	0.00*		0.96	0.00*	0.00*	0.61
<i>P. brevicapsulus</i>	0.00*	0.96		0.00*	0.04*	1
<i>P. gualaquizanus</i>	0.00*	0.00*	0.00*		0.00*	0.00*
<i>P. oreganus</i>	0.00*	0.00*	0.04*	0.00*		0.02*
<i>P. pichinchensis</i>	0.00*	0.61	1	0.00*	0.02*	

La prueba de Scheffe para el PC II (Tabla 14) revela diferencias significativas entre *P. oreganus* y *P. pichinchensis* y el resto de las especies del análisis. Además, *P. gualaquizanus* presenta diferencias significativas con todas las especies, excepto con *P. carolinianus*, cuyo valor $p=0.99$. *P. brevicapsulus* también presenta diferencias significativas con respecto al resto de las especies, excepto con *P. laevis*, cuyo valor $p=0.12$.

Tabla 14. Prueba de Scheffe para el PC II. *valores con diferencias significativas al nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Especie	<i>P. laevis</i>	<i>P. carolinianus</i>	<i>P. brevicapsulus</i>	<i>P. gualaquizanus</i>	<i>P. oreganus</i>	<i>P. pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>		0.00*	0.12	0.04*	0.00*	0.00*
<i>P. carolinianus</i>	0.00*		0.00*	0.99	0.00*	0.00*
<i>P. brevicapsulus</i>	0.12	0.00*		0.00*	0.00*	0.00*
<i>P. gualaquizanus</i>	0.04*	0.99	0.00*		0.00*	0.00*
<i>P. oreganus</i>	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*		0.00*
<i>P. pichinchensis</i>	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	

La prueba de Scheffe para el PC III (Tabla 15) revela diferencias significativas entre *P. laevis* y *P. carolinianus* con el resto de las especies del análisis, excepto entre ellos, cuyo valor $p=0.07$. Además, *P. brevicapsulus* presenta diferencias significativas con todas las especies excepto con *P. pichinchensis*, cuyo valor $p=1$. Asimismo, *P. gualaquizanus* presenta diferencias significativas con el resto de las especies excepto con *P. oreganus*, cuyo valor de $p=0.36$.

Tabla 15. Prueba de Scheffe para el PC III. *valores con diferencias significativas al nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Especie	<i>P. laevis</i>	<i>P. carolinianus</i>	<i>P. brevicapsulus</i>	<i>P. gualaquizanus</i>	<i>P. oreganus</i>	<i>P. pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>		0.07	0.00*	0.04*	0.00*	0.00*
<i>P. carolinianus</i>	0.07		0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
<i>P. brevicapsulus</i>	0.00*	0.00*		0.00*	0.00*	1
<i>P. gualaquizanus</i>	0.04*	0.00*	0.00*		0.36	0.00*
<i>P. oreganus</i>	0.00*	0.00*	0.00*	0.36		0.00*
<i>P. pichinchensis</i>	0.00*	0.00*	1	0.00*	0.00*	

La prueba de Scheffe para el PC IV (Tabla 16) revela pocas diferencias significativas, principalmente entre *P. laevis* y *P. brevicapsulus*. *P. carolinianus* presenta diferencias significativas con *P. gualaquizanus* y *P. oreganus*. *P. gualaquizanus* también presenta diferencias significativas con *P. brevicapsulus* y *P. pichinchensis*. *P. oreganus* muestra diferencias significativas con *P. brevicapsulus*.

Tabla 16. Prueba de Scheffe para el PC IV. *valores con diferencias significativas al nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Especie	<i>P. laevis</i>	<i>P. carolinianus</i>	<i>P. brevicapsulus</i>	<i>P. gualaquizanus</i>	<i>P. oreganus</i>	<i>P. pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>		0.17	0.04*	0.06	1	0.54
<i>P. carolinianus</i>	0.17		0.75	0.00*	0.01*	1
<i>P. brevicapsulus</i>	0.04*	0.75		0.00*	0.01*	0.7
<i>P. gualaquizanus</i>	0.06	0.00*	0.00*		0.13	0.00*
<i>P. oreganus</i>	1	0.01*	0.01*	0.13		0.19
<i>P. pichinchensis</i>	0.54	1	0.7	0.00*	0.19	

La prueba de Scheffe para el PC V (Tabla 17) revela también pocas diferencias significativas, *P. laevis* presenta diferencias significativas con *P. carolinianus*, *P. gualaquizanus* y *P. oreganus*. Así como también *P. brevicapsulus* presenta diferencias significativas con *P. carolinianus*, *P. gualaquizanus* y *P. oreganus*. *P. pichinchensis* es el único que no muestra diferencias significativas en la comparación con el resto de las especies del complejo.

Tabla 17. Prueba de Scheffe para el PC V. *valores con diferencias significativas al nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Especie	<i>P. laevis</i>	<i>P. carolinianus</i>	<i>P. brevicapsulus</i>	<i>P. gualaquizanus</i>	<i>P. oreganus</i>	<i>P. pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>		0.00*	1	0.01*	0.00*	0.08
<i>P. carolinianus</i>	0.00*		0.00*	1	1	0.36
<i>P. brevicapsulus</i>	1	0.00*		0.04*	0.00*	0.25
<i>P. gualaquizanus</i>	0.01*	1	0.04*		1	0.85
<i>P. oreganus</i>	0.00*	1	0.00*	1		0.63
<i>P. pichinchensis</i>	0.08	0.36	0.25	0.85	0.63	

e) Análisis canónico discriminante

El análisis discriminante se realizó también con la base de datos de los caracteres morfológicos de las esporas de individuos de diferentes morfoespecies del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus*. Este análisis arrojó una matriz de clasificación (Tabla 18) en la que, de acuerdo con las variables y observaciones proporcionadas, un 87.9% de las observaciones se clasificaron correctamente dentro de la morfoespecie identificada. Todas las observaciones correspondientes a *P. laevis* se clasificaron correctamente, sin embargo, cinco observaciones de *P. oreganus* fueron clasificadas como *P. laevis*. En el caso de *P. carolinianus*, el 89.8% de sus observaciones se clasificaron correctamente, sin embargo, cuatro observaciones de *P. brevicapsulus*, cinco de *P. gualaquizanus*, nueve de *P. oreganus* y cinco de *P. pichinchensis* se clasificaron como *P. carolinianus*. Un 86.67% de las observaciones de *P. brevicapsulus* se clasificó correctamente, sin embargo, cinco observaciones de *P. carolinianus* fueron clasificadas como *P. brevicapsulus*. En el caso de *P. gualaquizanus*, un 80% de las observaciones correspondientes a esta especie fueron clasificadas correctamente, sin embargo, tres observaciones de *P. carolinianus* y tres de *P. oreganus* se clasificaron como *P. gualaquizanus*. En cuanto a *P. oreganus*, un 77.21% de las observaciones correspondientes a esta especie fueron clasificadas correctamente, sin embargo, cinco observaciones correspondientes a *P. carolinianus*, una a *P. gualaquizanus* y una a *P. pichinchensis* se clasificaron como *P. oreganus*. Por último, las observaciones correspondientes a *P. pichinchensis* fueron clasificadas correctamente en un 90% de los casos, sin embargo, dos observaciones de *P. carolinianus* y una de *P. oreganus* fueron clasificadas como *P. pichinchensis*.

Tabla 18. Matriz de clasificación arrojada por el análisis discriminante para las observaciones morfológicas de las esporas del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus* incluidas en este estudio.

	%	<i>P.</i> <i>laevis</i>	<i>P.</i> <i>carolinianus</i>	<i>P.</i> <i>brevicapsulus</i>	<i>P.</i> <i>gualaquizanus</i>	<i>P.</i> <i>oreganus</i>	<i>P.</i> <i>pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>	100	60	0	0	0	0	0
<i>P. carolinianus</i>	89.8	0	132	5	3	5	2
<i>P. brevicapsulus</i>	86.67	0	4	26	0	0	0
<i>P. gualaquizanus</i>	80	0	5	0	24	1	0
<i>P. oreganus</i>	77.21	5	9	0	3	61	1
<i>P. pichinchensis</i>	90	0	5	0	0	1	54
TOTAL	87.93	65	155	31	30	68	57

Las distancias de Mahalanobis (Tabla 19) arrojadas por el análisis discriminante permiten visualizar que *P. laevis* y *P. pichinchensis* son las especies más distantes, considerando la morfología y dimensiones de los caracteres de sus esporas, mientras que *P. gualaquizanus* y *P. oreganus* se encuentran más cercanas a *P. laevis*.

Tabla 19. Distancias cuadradas de Mahalanobis arrojadas por el análisis discriminante para las observaciones morfológicas de las esporas del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus* incluidas en este estudio.

	<i>P.</i> <i>laevis</i>	<i>P.</i> <i>carolinianus</i>	<i>P.</i> <i>brevicapsulus</i>	<i>P.</i> <i>gualaquizanus</i>	<i>P.</i> <i>oreganus</i>	<i>P.</i> <i>pichinchensis</i>
<i>P. laevis</i>	0	23.522	24.224	16.772	17.475	49.769
<i>P. carolinianus</i>	23.522	0	7.603	9.243	7.284	13.883
<i>P. brevicapsulus</i>	24.224	7.603	0	21.143	21.311	32.680
<i>P. gualaquizanus</i>	16.772	9.243	21.143	0	7.025	28.024
<i>P. oreganus</i>	17.475	7.284	21.311	7.025	0	19.859
<i>P. pichinchensis</i>	49.769	13.883	32.680	28.024	19.859	0

En cuanto a las variables canónicas que se crearon en el análisis discriminante, aunque semejantes a las del análisis de componentes principales no se calculan de la misma forma, por lo que la correlación de cada variable con las funciones canónicas es diferente (Tabla 20). En este caso, el número total de verrugas proximales está correlacionado positivamente con la primera función canónica. La segunda función canónica esta correlacionada positivamente con el diámetro máximo de las esporas. La tercera función canónica está correlacionada con la densidad de espinas distales y el diámetro de verrugas proximales. La cuarta función canónica está correlacionada de forma negativa con el diámetro máximo. La quinta función canónica está correlacionada positivamente con el ancho del cíngulo ecuatorial.

Tabla 20. Matriz de estructura de los factores. Correlaciones variables morfológicas de las esporas medidas-funciones canónicas.

	Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3	Raíz 4	Raíz 5
Diámetro máximo	-0.038587	0.564457	-0.140075	-0.764203	0.158750
Diámetro mínimo	-0.000016	0.467997	-0.244271	-0.557315	0.136117
Diam máx/ Diam mín	-0.050773	0.098753	0.147740	-0.236579	0.075511
Longitud espinas distales	0.142456	-0.315077	-0.201880	-0.278539	0.194025
Densidad espinas distales	-0.106691	0.122990	0.662466	0.435811	0.396671
Número total de verrugas proximales	0.844838	0.435202	-0.129788	0.000351	-0.028738
Ancho de marca trilete	-0.031483	-0.118484	-0.381631	-0.043715	0.306310
Ancho de cíngulo ecuatorial	0.198600	-0.203384	-0.213399	-0.217417	0.669799
Diámetro verrugas proximales	0.462421	-0.286145	0.618785	-0.441491	0.054559

En cuanto a la variación explicada por cada función canónica creada por el análisis, la primera función o raíz canónica (R1) explica un 58.21% de la variación total, la segunda raíz canónica explica un 22.84%, la tercera raíz canónica un 12.58%, la cuarta raíz canónica un 5.05% y la quinta raíz canónica explica un 1.32% de la variación total (Tabla 21).

Tabla 21. Estructura de las funciones canónicas resultantes del análisis discriminante.

Raíz o función canónica (R)	Eigenvalor	% Total de variación	% de variación acumulado
1	3.993299	58.2062	58.2062
2	1.567110	22.8421	81.0483
3	0.863412	12.5851	93.6334
4	0.34649	5.0506	98.684
5	0.09030	1.316	100

En la gráfica de dispersión entre la función canónica 1 y la función canónica 2 (Fig. 6) se puede observar una tendencia de ciertos grupos a separarse. Las observaciones de *P. pichinchensis* (círculo naranja) tienden al cuadrante izquierdo superior, que está determinado por un bajo número de verrugas proximales (en el eje de las x) y por un diámetro máximo de las esporas elevado (eje y). En el cuadrante inferior se aprecia una tendencia de *P. brevicapsulus* (círculo verde) por separarse del grupo, determinada por la dimensión pequeña del diámetro de sus esporas (eje y). Además, las observaciones de *P. laevis* (círculo azul) tienden al cuadrante derecho superior, que está determinado por un elevado número de verrugas proximales (en el eje de las x) y por un elevado diámetro máximo de las esporas (en el eje de las y).

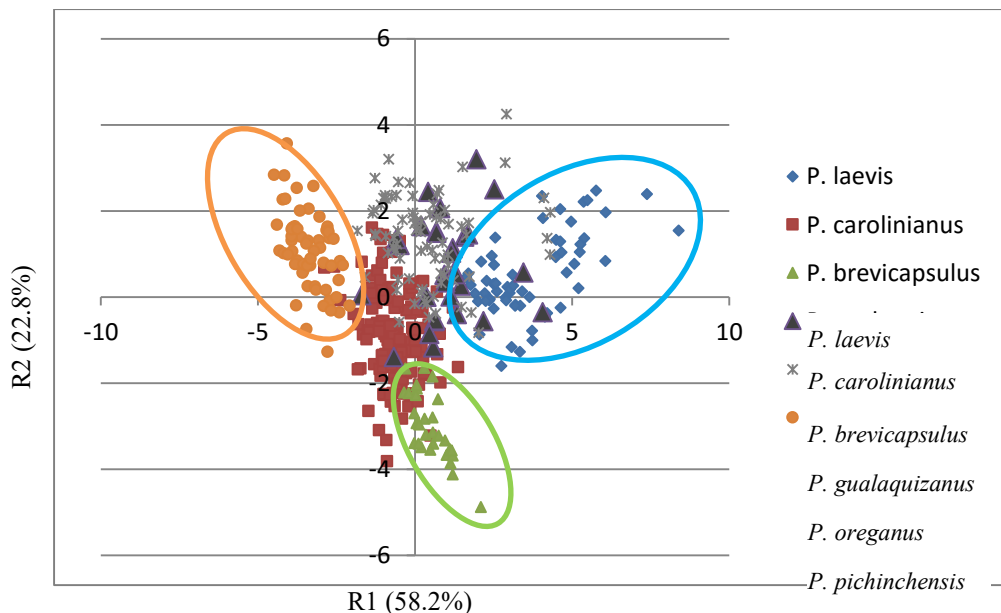


Fig. 6. Gráfica de dispersión de las funciones canónicas R1 y R2 resultante del análisis discriminante para las seis morfoespecies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

En la gráfica de dispersión entre la función canónica 1 y la función canónica 3 (Fig. 7) también se puede observar una tendencia de ciertos grupos a separarse. Las observaciones de *P. laevis* (círculo azul) tienden al cuadrante derecho inferior, determinado tanto por la

numerosa cantidad de verrugas proximales en las áreas triangulares (en el eje de las x), como por la baja densidad de espinas distales y el diámetro pequeño de sus verrugas proximales (en el eje de las y). Las observaciones de *P. pichinchensis* (círculo naranja) se encuentran en el cuadrante izquierdo con una tendencia al cuadrante inferior, lo que está determinado por el bajo número de verrugas proximales (en el eje de las x) y por la baja densidad de espinas distales (en el eje de las y).

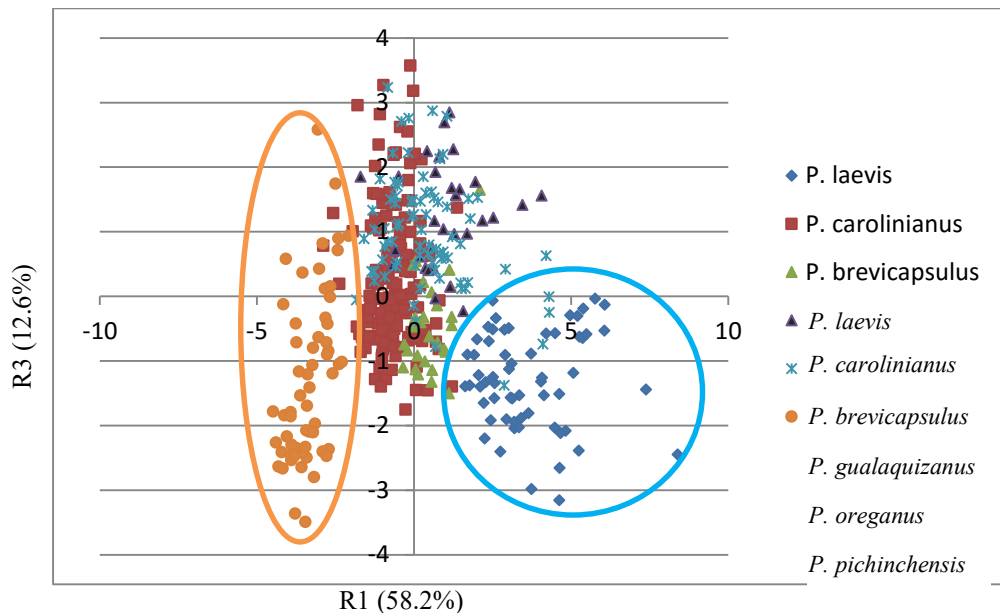


Fig 7. Gráfica de dispersión de las funciones canónicas R1 y R3 resultante del análisis discriminante para las seis morfoespecies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

f) Análisis de agrupación

En el análisis de agrupación en árboles se representan las diversas distancias que resultaron del método de agrupamiento seleccionado para las observaciones. Como en el análisis de componentes principales todas las variables de los caracteres de las esporas analizados resultaron de importancia, se consideraron todas para el análisis de agrupación.

En el árbol resultante del método para agrupar UPGMA utilizando distancias euclidianas cuadradas (Fig. 8), se forman varias agrupaciones que corresponden con las morfoespecies identificadas, como son *P. laevis* (cuadro azul), *P. brevicapsulus* (cuadro verde), *P. pichinchensis* (cuadro amarillo), *P. gualaquizanus* (cuadro morado). *P. oreganus* (cuadro rojo) se encuentra formando un grupo exclusivo también pero dentro del grupo conformado por *P. carolinianus* (cuadros grises). Todas las observaciones de *P. carolinianus*, salvo las pertenecientes a la población de Puerto Soledad, Oaxaca (cuadro gris con borde negro), se encuentran agrupadas.

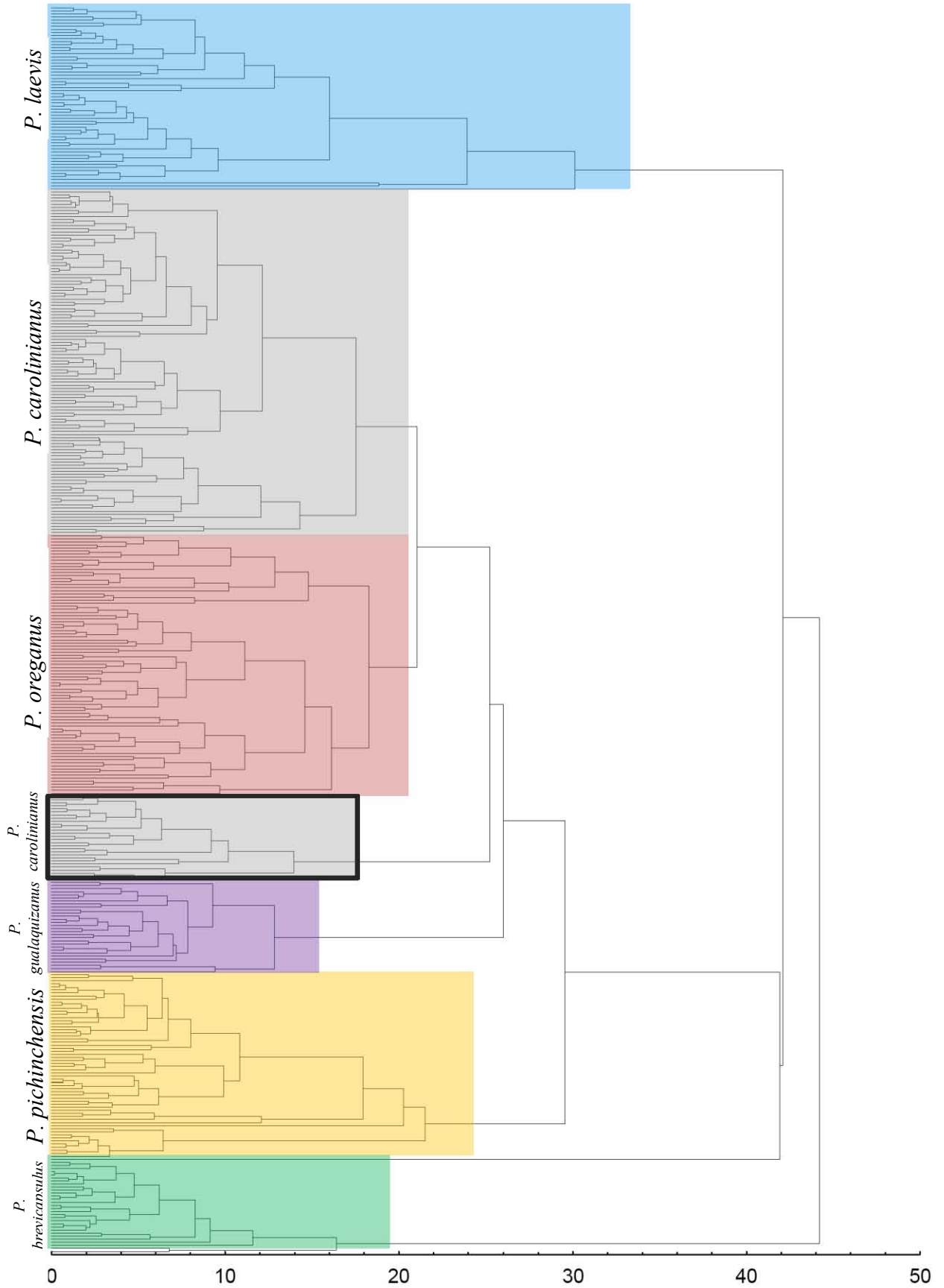


Fig. 8. Árbol de agrupación de las morfoespecies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* incluidas en este estudio con el método UPGMA con distancias euclidianas cuadradas utilizando medidas de los caracteres morfológicos de las esporas.

g) Clave para la identificación de especies

1a. Superficie distal de las esporas con verrugas o prominencias bajas redondeadas... *P. tenuis*

1b. Superficie distal de las esporas con espinas o báculos...2

2a. Esporas con más de 60 verrugas en la cara proximal...3

2b. Esporas con menos de 60 verrugas en la cara proximal...5

3a. Condición sexual monoica, esporas con 80-140 verrugas en la cara proximal, marca trilete de menos de 2.8 μm de ancho...4

3b. Condición sexual dioica, esporas con más de 140 verrugas en la cara proximal, marca trilete de más de 3 μm de ancho... *P. laevis*

4a. Esporas de menos de 36 μm de diámetro, cara proximal con verrugas distribuidas centralmente en las áreas triangulares.....*P. gualaquizanus*

4b. Esporas de más de 36 μm de diámetro, cara proximal con verrugas distribuidas uniformemente en las áreas triangulares...*P. oreganus*

5a. Diámetro de esporas por lo general mayor a 36 μm , esporas sin verrugas en la cara proximal...*P. pichinchensis*

5b. Diámetro de esporas por lo general menor a 36 μm , esporas con más de 5 verrugas en la cara proximal....6

6a. Esporas con densidad de espinas distales menor a 15 en un área de 10 μm^2 , base de las espinas de más de 2 μm de ancho... *P. brevicapsulus*

6b. Esporas con densidad de espinas distales mayor a 15 en un área de 10 μm^2 , base de las espinas de menos de 2 μm de ancho...*P. carolinianus*

Caracteres genéticos: rbcL y nad5

a) nad5

- **Máxima parsimonia**

La matriz del gen nad 5 consistió de 1054 pares de bases y 43 secuencias. 932 (88%) caracteres fueron constantes, 122 (12%) fueron variables, de los cuales 65 (6%) fueron informativos para parsimonia. El análisis recuperó 76546 árboles más parsimoniosos con una longitud de 165 pasos, índice de consistencia (IC) de 0.7636 e índice de retención (IR) de 0.887. Uno de los 76546 árboles más parsimoniosos se muestra en la figura 9.

El género *Phaeoceros* (recuadro amarillo) se recuperó como monofilético (porcentaje de bootstrap(PB)=81), aunque las relaciones filogenéticas de las especies no se resolvieron completamente. Todos los ejemplares de las especies consideradas como parte del complejo

P. laevis-*P. carolinianus* se recuperaron en un clado (recuadro morado) (PB=94), el cual también incluye a *P. tenuis*, *P. evanidus* y *P. dendroceroides*, especies de cara distal verrugosa, la primera proveniente de una población mexicana, la segunda de Australia y la tercera de Venezuela.

Dentro del clado del complejo se forma un clado (PB=74) con las tres poblaciones mexicanas identificadas como *P. laevis* y *P. microsporus* (Panamá). Se forma también un clado (PB=87) que incluye *P. brevicapsulus* (Cuba), *P. evanidus* (Australia) y *P. tenuis* (México). Además se forma un clado (PB=51) que incluye todos los ejemplares mexicanos del complejo (excepto los que corresponden a *P. laevis* y al individuo 6f (*P. oreganus*) de San Miguel Regla) más *P. flexivalvis* (República Dominicana) y *P. carolinianus* (Panamá) que también pertenecen al complejo *P. laevis*-*P. carolinianus*. También incluye a *P. dendroceroides* (Venezuela). Al interior de este clado, se forma otro clado (PB=63) integrado por 4c *P. brevicapsulus* de Jalapa, 12c *P. pichinchensis* del Distrito Federal y 23b *P. oreganus* del Estado de México.

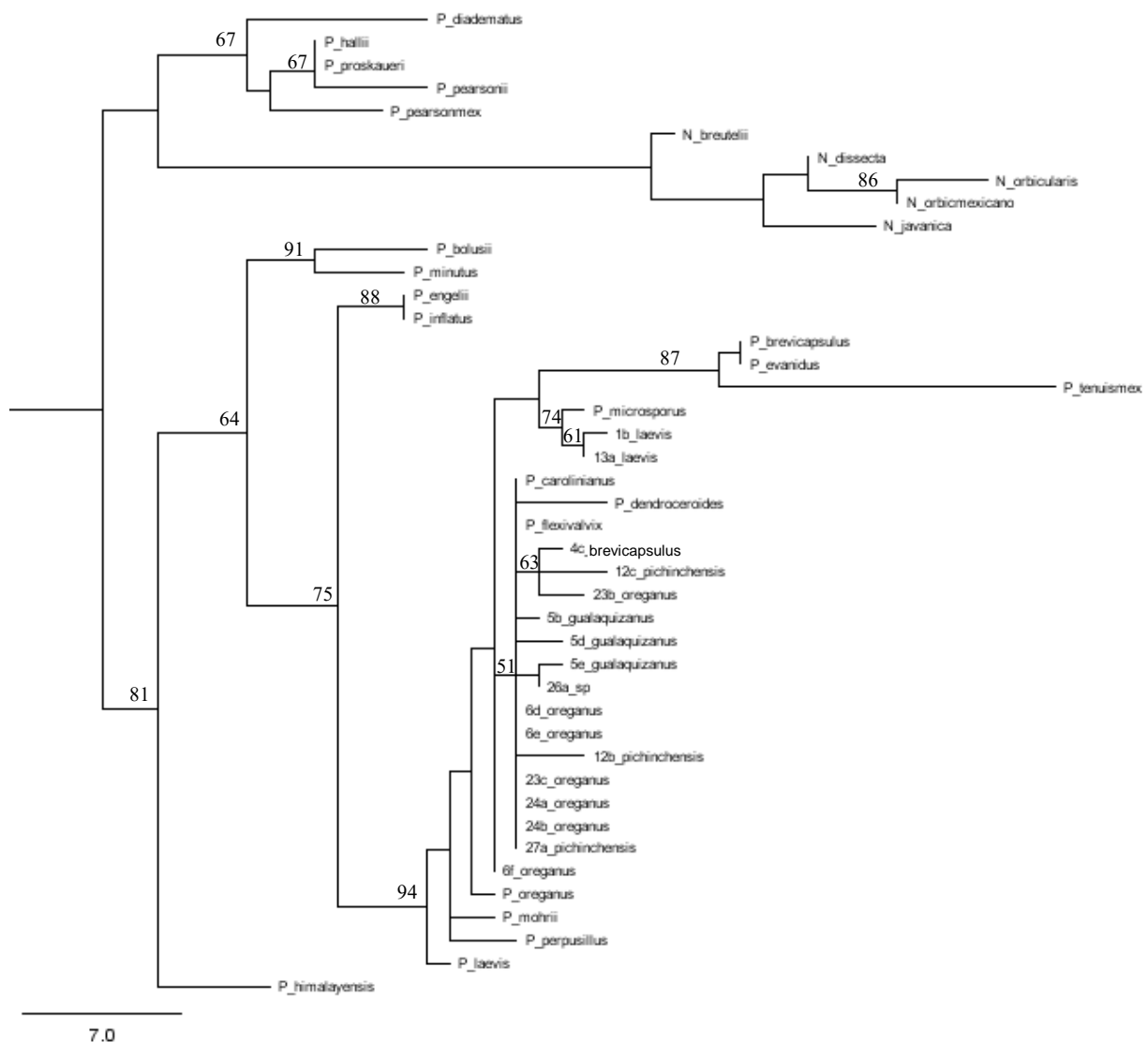


Fig. 9. Consenso estricto de los 76546 árboles más parsimoniosos para el gen nad5. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.

- **Inferencia bayesiana**

El análisis con inferencia bayesiana (Fig. 10) también recuperó el género *Phaeoceros* como monofilético (probabilidad posterior (PP)=0.99). Así como también se recuperó el clado (PP=1) que contiene a las especies del complejo *P. laevis* - *P. carolinianus* más *P. tenuis*, *P. evanidus* y *P. dendroceroides*.

Dentro de este clado se forma también un clado (PP=0.93) con las tres poblaciones mexicanas identificadas como *P. laevis* y *P. microsporus* (Panamá). Se forma también un clado (PP=1) que incluye *P. brevicapsulus* (Cuba), *P. evanidus* (Australia) y *P. tenuis* (México).

Al igual que en el análisis con parsimonia, se forma un clado con buen soporte (PP=1) que incluye todos los ejemplares mexicanos del complejo (excepto los que corresponden a *P. laevis*) más *P. flexivalvis* (República Dominicana) y *P. carolinianus* (Panamá) que también pertenecen al complejo *P. laevis*-*P. carolinianus*. También incluye a *P. dendroceroides* (Venezuela). Al interior de este clado se forma también un clado (PP=0.87) entre tres individuos de las poblaciones mexicanas: 4c *P. brevicapsulus* de Jalapa, 12c *P. pichinchensis* del Distrito Federal y 23b *P. oreganus* del Estado de México.



Fig. 10. Consenso estricto de los árboles obtenidos para el gen *nad5* con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.

b) *rbcL*

- **Máxima parsimonia**

La matriz del gen *rbcL* consistió de 50 secuencias de 1292 pares de bases. De estas pares de bases 1136 (88%) caracteres fueron constantes, 156 (12%) fueron variables, de los cuales 85 (7%) fueron informativos para parsimonia. El análisis recuperó 92700 árboles más parsimoniosos con una longitud de 203 pasos, índice de consistencia (IC) de 0.8374 e índice de retención (IR) de 0.9146. Uno de los 92700 árboles más parsimoniosos se muestra en la figura 11.

El género *Phaeoceros* (recuadro amarillo) se recuperó como monofilético en todos los árboles más parsimoniosos pero sin soporte de bootstrap. Las relaciones filogenéticas de

las especies tuvieron menos resolución que con el gen nad5. Al igual que con el gen nad5, se presenta el clado (PB=56) que agrupa a las *P. laevis* mexicanas (1a y 1b) con *P. microsporus* (Panamá), pero en este caso estos tres ejemplares se encuentran formando a su vez un clado con *P. inflatus* (Australia) (PB=63). En el cladograma obtenido para el gen nad5 *P. inflatus* se encontraba formando un grupo monofilético con *P. engelii*, ambas especies australianas.

A diferencia de los árboles filogenéticos obtenidos para nad5, en el análisis de parsimonia para rbcL se forma un clado (PB=62) que agrupa a los tres individuos de la población 24 identificada como *P. oreganus* de Los Azufres, Michoacán.

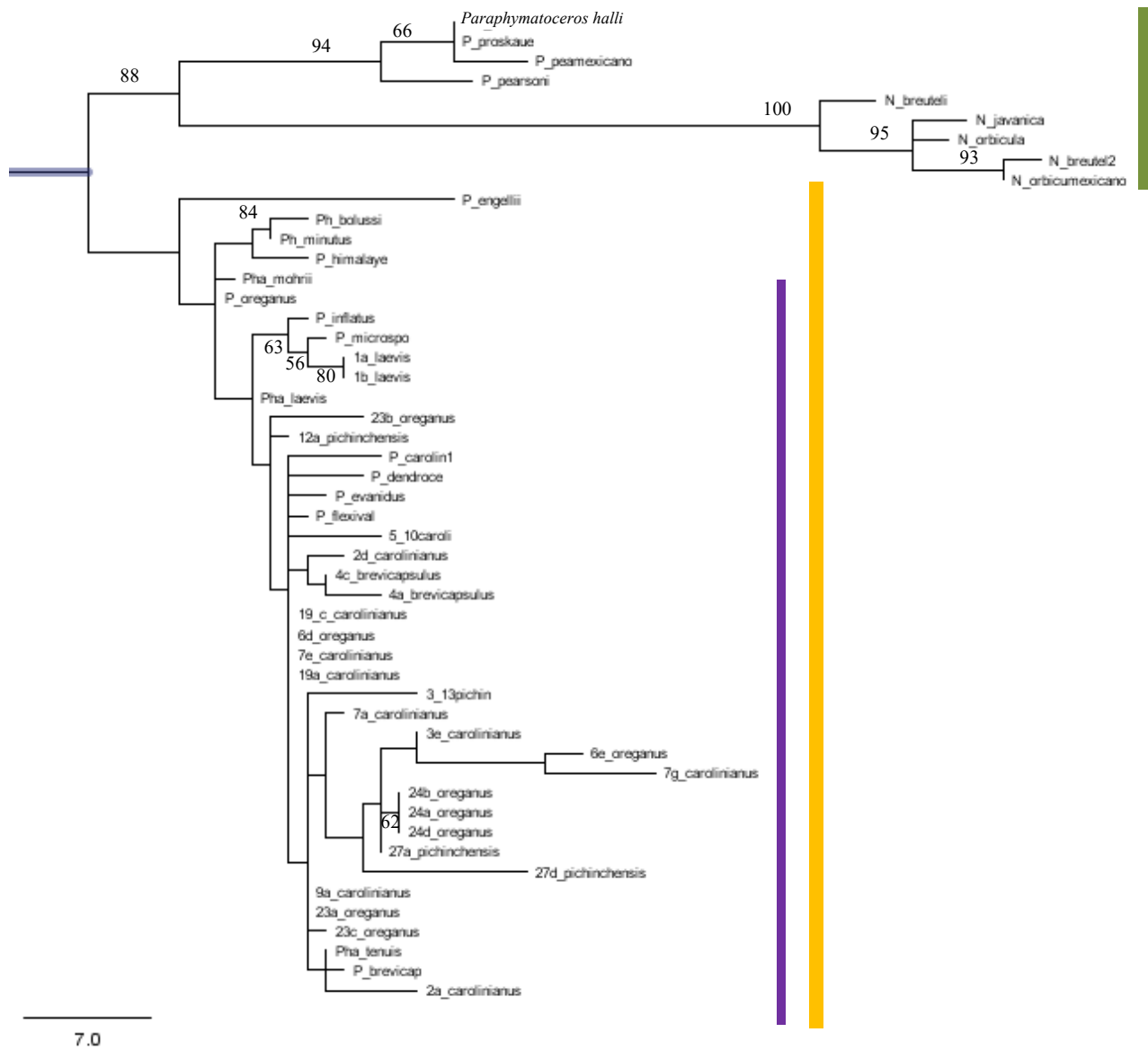


Fig. 11. Consenso estricto de los 93500 árboles más parsimonios para el gen rbcL. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.

- **Inferencia bayesiana**

El análisis con inferencia bayesiana (Fig. 12) también recuperó el género *Phaeoceros* como monofilético (PP=1), en concordancia con todos los resultados anteriores. Este filograma tiene un poco más de resolución que el cladograma obtenido con parsimonia.

Se forma un clado (PP=0.91) que incluye a todas las especies mexicanas del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* más ejemplares del complejo de otros países: *P. microsporus* (Panamá), *P. brevicapsulus* (Cuba), *P. flexivalvis* (República Dominicana), *P. laevis* (Portugal); además de otras especies del género *Phaeoceros*: *P. inflatus* (Australia), *P. tenuis* (México), *P. dendroceroides* (Venezuela), *P. evanidus* (Australia), *P. himalayensis* (Nepal).

Al igual que en el cladograma de parsimonia, se forma un clado (PP=0.96) entre los dos individuos de la población 1 (Ciudad Universitaria, D.F.) identificados como *P. laevis* y *P. microsporus* (Panamá), que a su vez forman un clado (PP=1) con *P. inflatus* (Australia).

Además se forma un clado (PP=0.91) que agrupa a todas las poblaciones mexicanas del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus* (excepto las que corresponden a *P. laevis*) y a otros ejemplares del complejo: *P. brevicapsulus* (Cuba) y *P. flexivalvis* (República Dominicana), así como otras especies del género *Phaeoceros*: *P. tenuis* (México), *P. evanidus* (Australia) y *P. himalayensis* (Nepal). También se forma un clado (PP=0.94) que agrupa a los tres individuos de la población 24 identificada como *P. oreganus* de Los Azufres, Michoacán.

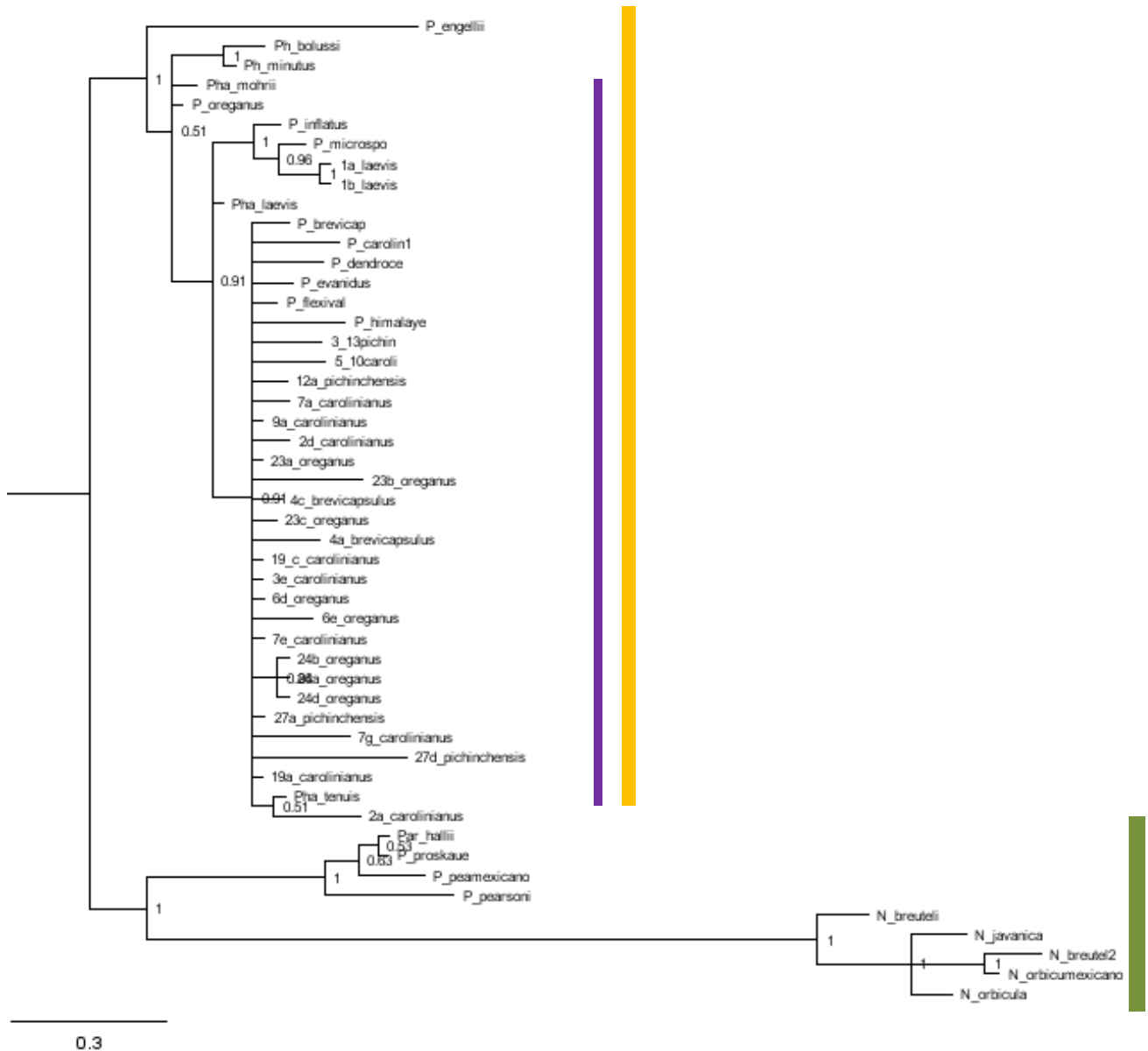


Fig. 12. Consenso estricto de los árboles obtenidos para el gen *rbcL* con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.

c) Matriz concatenada: *rbcL* y *nad5*

- **Máxima parsimonia**

La matriz concatenada de los genes *nad 5* y *rbcL* consistió de 60 secuencias de 2345 pares de bases. 2067 (88%) caracteres fueron constantes, 278 (12%) fueron variables, de los cuales 150 (6%) fueron informativos para parsimonia. El análisis recuperó 44000 árboles más parsimoniosos con una longitud de 378 pasos, índice de consistencia (IC) de 0.7831 e índice de retención (IR) de 0.8877. Uno de los 44000 árboles más parsimoniosos se muestra en la fig. 13.

El género *Phaeoceros* (recuadro amarillo) se recuperó como monofilético (PB=91), aunque las relaciones filogenéticas de las especies no se resolvieron. Todos los ejemplares

de las especies consideradas como parte del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus* se recuperaron en un clado (recuadro morado) (PB=63), el cual también incluye a *P. tenuis*, *P. evanidus* y *P. dendroceroides*, especies con esporas de cara distal verrugosa, la primera proveniente de una población mexicana, la segunda de Australia y la tercera de Venezuela. Se recuperó un clado (PB=85) formado por los individuos mexicanos identificados como *P. laevis* (1a, 1b y 13a) y *P. microsporus* (Panamá); así como un clado (PB=57) que agrupa a los tres individuos de la población 24 correspondientes a *P. oreganus* y otro clado (PB=57) que agrupa a los individuos 5e (*P. gualaquizanus*) y 26a (*P. sp.*).



Fig. 13. Uno de los 44000 árboles más parsimoniosos para la matriz concatenada de los genes *rbcl* y *nad5*. Los números asociados a las ramas corresponden a los valores de bootstrap.

- **Inferencia bayesiana**

El análisis con inferencia bayesiana (fig. 14) también recuperó el género *Phaeoceros* como monofilético (PP=1). Este filograma tiene un poco más de resolución que el cladograma obtenido con parsimonia. Al igual que en el cladograma de parsimonia, todos los ejemplares

de las especies consideradas como parte del complejo *P. laevis*-*P. carolinianus* se recuperaron en un clado (recuadro morado) (PP=1), el cual también incluye a *P. tenuis*, *P. evanidus* y *P. dendroce*. Se recuperó un clado (PP=1) integrado por *P. microsporus* (Panamá) y por los individuos mexicanos identificados como *P. laevis* (1a, 1b y 13a), Además, se recuperó un clado (PP=0.67) integrado por *P. tenuis* (México) y 2a *P. carolinianus* (Chiapas).

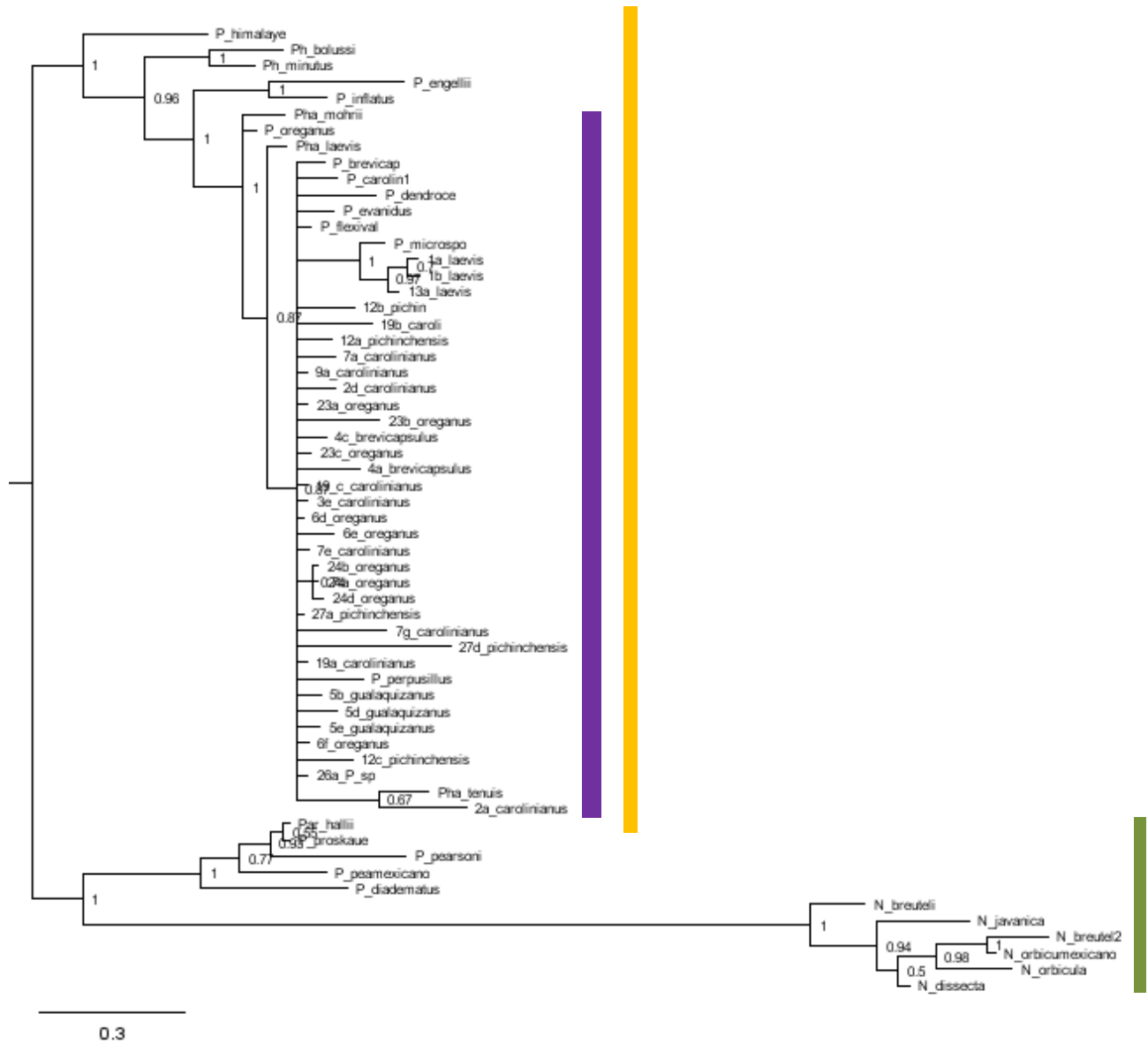


Fig. 14. Consenso de mayoría de los árboles obtenidos para matriz concatenada de los genes *rbcL* y *nad5* con Inferencia Bayesiana. Los números asociados a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores.

VIII. DISCUSIÓN

• Identificación de los ejemplares recolectados

Las únicas claves disponibles para América del género *Phaeoceros* (Hässel 1987, 1989) utilizan la ornamentación de las esporas como base para distinguir entre especies. Por esto, los caracteres de las esporas fueron la base para la identificación de las morfoespecies en el presente estudio. La identificación de las morfoespecies evaluadas en este estudio se complicó por la gran cantidad de variación intraespecífica que se registró en los nueve caracteres medidos.

La identificación de *P. pichinchensis* no presentó complicaciones ya que la clave (Hässel, 1989) recurría a la ausencia de verrugas en las áreas triangulares de la cara proximal, que la diferenciaba del resto de las especies del género. Sin embargo, en la descripción de la especie, Hässel (1989) define el intervalo del diámetro de las esporas en el tipo entre 33 y 37 μm ; mientras en las poblaciones mexicanas recolectadas, las dos poblaciones presentaron intervalos mucho más amplios: 33.5-46.5 μm en la población 12 (Distrito Federal) y 34.5-44 μm en la población 27 (Oaxaca), lo cual extiende en casi 10 μm el intervalo descrito (Tabla 22). Sin embargo, la ausencia de verrugas en las áreas triangulares y la corta longitud de las espinas distales (en promedio) separaron a las dos poblaciones mexicanas identificadas como *P. pichinchensis* del resto de las poblaciones recolectadas.

Tabla 22. Comparación de los caracteres morfológicos de las esporas reportados por Hässel (1989) y los medidos en este estudio en *P. pichinchensis*.

	Hässel (1989)	Este estudio	
		Población 12	Población 27
Diámetro de las esporas	33-37 μm	36.48-43.55 μm	34.52-44.05 μm
Ancho del cíngulo ecuatorial	1.6-2.23 μm	0.95-2.07 μm	0.81-3.39 μm
Longitud de espinas distales	0.5 μm	0.6-1.5 μm	0.76-2.75 μm

En la identificación de las poblaciones mexicanas de *P. carolinianus*, los intervalos del diámetro de las esporas en las plantas recolectadas formaron un continuo que comprende de 27-44 μm . El diámetro de las esporas es crítico en la diferenciación entre *P. flexivalvis* y *P. carolinianus* según la clave de Hässel (1989). Sin embargo, más adelante Hässel (1989) establece que: “*P. flexivalvis* difiere de *P. carolinianus* por las espinas agudas distales que dan la apariencia de líneas radiales”, las poblaciones recolectadas fueron identificadas como *P. carolinianus* al no presentar espinas agudas distales.

Las diferencias sugeridas por Hässel (1989) entre *P. oreganus* y *P. mohrii* eran muy sutiles. El número de espinas en diámetro distal se traslapaba, de 14 a 17 en *P. mohrii* y de (15) 18-19 en *P. oreganus*, al igual que la longitud de las espinas distales. Las plantas recolectadas para este estudio mostraron intervalos que podían identificarlas como cualquiera de las dos especies. Sin embargo, fue el ancho del cíngulo ecuatorial y la base bulbosa de las espinas distales lo que llevó a la identificación de las plantas recolectadas como *P. oreganus*. Aun así, parece necesario evaluar las diferencias morfológicas en las esporas de estas dos especies con un mayor número de poblaciones para determinar si en realidad se pueden diferenciar con base en las esporas.

En cuanto a las poblaciones identificadas como *P. gualaquizanus* y *P. brevicapsulus*, ambas comparten una cara distal espinosa y verrugas presentes en las áreas triangulares proximales agrupadas en el centro. Algunas de las diferencias señaladas por Hässel (1989) entre estas dos especies, como el diámetro de las esporas y el ancho del cingulo ecuatorial, se traslapan en las poblaciones recolectadas. Sin embargo, la base de las espinas ancha (espinas de forma cónica) en *P. brevicapsulus* llevó a identificar a la población 4 como perteneciente a esta especie, y a la población 5, cuyas espinas son angostas en la base (espinas en forma de aguja), como perteneciente a *P. gualaquizanus*, la cual además posee una elevada densidad de espinas distales (su media es 46.8, en comparación con *P. brevicapsulus* cuya media es 13.6, Tabla 9) y un alto número de verrugas proximales (media = 105.6, Tabla 9) en comparación con *P. brevicapsulus* (media = 33.7, Tabla 9).

En cuanto a las poblaciones identificadas como *P. laevis*, al seguir exclusivamente la clave de Hässel (1989) no hay otra opción para estos individuos que identificarlos como *P. microsporus*, principalmente por el diámetro de las mismas, que las separa de *P. oreganus* y *P. mohrii*. Aunque Hässel (1989) no trata la condición sexual, en las notas de la especie señala que “Las esporas de esta especie (*P. microsporus*) también son bastante similares a las de *P. laevis*, pero son de mayor diámetro” (Hässel, 1989). Al revisar la publicación de Hässel (1987) donde describe las esporas de *P. laevis*, los intervalos del diámetro de las esporas reportados para *P. laevis* y para *P. microsporus* son muy limitados, y por lo menos la población 1 se traslapa con ambos intervalos; la población 13, en cambio, no tiene conflicto y, con base en el diámetro de las esporas, puede fácilmente identificarse como *P. laevis* (Tabla 23).

Tabla 23. Intervalos de diámetro de las esporas y altura de las espinas en *P. laevis*, *P. microsporus* y las poblaciones 1 y 13 de este estudio. Las medidas se encuentran en μm .

	Hässel (1987)	Hässel (1989)	Este estudio	
	<i>P. laevis</i>	<i>P. microsporus</i>	1	13
Diámetro de las esporas	33-38	42-44	33.1-43.1	32.1-39.5
Altura espinas	1-1.5	hasta 1	0.7-2.8	0.9-2.7

El problema de los intervalos tan estrechos en las medidas no se limita al diámetro de las esporas, sino también a la altura de las espinas distales, en este caso, ambas poblaciones recolectadas en México presentan tanta variación en este carácter que podrían ser identificadas como cualquiera de las dos especies. Entonces, debido a que los intervalos de las esporas no son concluyentes respecto a la identidad de la población 1 siguiendo las descripciones de Hässel (1989), se descartó la posibilidad de identificarla como *P. microsporus* debido a que ésta es una especie monoica y *P. laevis* es dioica (Villarreal & Renner, 2013), lo que coincide con las poblaciones 1 y 13 recolectadas para este estudio.

Estos conflictos al identificar algunas especies se deben, principalmente, a los intervalos en los valores de los caracteres de las esporas reportados por Hässel (1987, 1989). Esos intervalos tan limitados podrían deberse al escaso material que revisó para elaborar la clave y las descripciones, al basarse exclusivamente en esporas del material tipo, y es posible que varias de las especies incluidas en la clave sean en realidad sinónimos, o sus diferencias se encuentren en características distintas a las incluidas en la clave de Hässel (1989).

Evidentemente, la revisión de las esporas del material tipo bajo microscopía electrónica de barrido es un paso importante en la delimitación de las especies; sin embargo, el estudio de la variación intra e interespecífica es esencial para redefinir los límites de las mismas.

- **Evaluación de caracteres morfológicos de las esporas**

Se analizaron los datos de la matriz en conjunto, considerando que las agrupaciones de las morfoespecies se encuentran delimitadas por más de un carácter de la ornamentación de las esporas (Hässel, 1987, 1989), con el propósito de poner a prueba los caracteres con los que, principalmente Hässel (1987, 1989), delimita las distintas especies dentro del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*, ya que Schuster (1992) y Proskauer (1958) consideran que no hay diferencias significativas entre los caracteres de las esporas dentro del complejo.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de componentes principales. Las gráficas de dispersión entre los componentes principales muestran una separación entre *P. pichinchensis* (Figs. 3 y 5), *P. oreganus* (Fig. 4) y *P. laevis* (Fig. 4) del resto de las especies del complejo; aunque *P. oreganus* y *P. laevis* se traslapan en su distribución en la gráfica dada por lo caracteres de las esporas, se pueden distinguir por la condición sexual, monoica en el primero y dioica en el segundo.

Las pruebas *post-hoc* indican que las diferencias encontradas en el MANOVA son significativas entre todas las especies entre los caracteres medidos en este análisis. En el análisis canónico discriminante, *P. pichinchensis*, *P. laevis* y *P. brevicapsulus* se presentan espacialmente separados del resto de las especies, con base, principalmente, en cuatro de los caracteres evaluados: diámetro máximo de las esporas, número total de verrugas proximales, densidad de espinas distales y diámetro de las verrugas proximales. Y la mayoría de las esporas (88%) fueron clasificadas satisfactoriamente *a priori*, como lo indica el análisis de clasificación de los grupos.

En cuanto al UPGMA, las morfoespecies incluidas en el estudio forman grupos bien definidos, con excepción de *P. oreganus* y *P. carolinianus*. En el caso de estas dos especies, *P. carolinianus* se divide en dos grupos, uno de estos grupos está conformado por la población de Puerto Soledad (Oaxaca) (grupo B) y el otro grupo se encuentra conformado por el resto de las poblaciones identificadas como *P. carolinianus* (grupo A). Las poblaciones de *P. oreganus* se encuentran formando un solo grupo, pero están más relacionadas al grupo A de *P. carolinianus*. Los resultados obtenidos podrían deberse a que los caracteres evaluados son insuficientes para diferenciar entre estas dos morfoespecies, a que la población de Puerto Soledad es una morfoespecie distinta del grupo A de *P. carolinianus* y de *P. oreganus* o que la prueba no presenta tanta sensibilidad como en el caso de las pruebas *post-hoc* del análisis de componentes principales, donde estas dos especies se separan con claridad.

Los caracteres morfológicos de las esporas evaluados en este estudio presentaron diferencias significativas entre las morfoespecies recolectadas en el centro y sur de México. Todos los caracteres medidos parecen importantes en la diferenciación de las especies estudiadas. Sin embargo, un muestreo más amplio podría resultar en un continuo en los valores de algunos o todos los caracteres de las esporas, o reafirmar o redefinir las morfoespecies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*.

Para proveer de un elemento práctico en la identificación de las morfoespecies del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* y, debido a que, como ya se discutió en el apartado anterior, las claves disponibles (Hássel 1987, 1989) utilizan intervalos muy cortos de la variación en la morfología de las esporas para delimitarlas, se construyó una clave de identificación de las morfoespecies recolectadas en el área de estudio.

Para elaborar la clave se utilizó una combinación de los caracteres morfológicos que ayudaron inicialmente a la identificación de las poblaciones como una u otra morfoespecie, como es el caso de la distribución de las verrugas en las caras proximales de las esporas y la condición sexual. Además, se utilizó una combinación de los datos morfológicos registrados de las esporas para los análisis estadísticos. El reto principal fue utilizar medidas e intervalos de los caracteres que se traslaparan lo menos posible y que fueran prácticos en la identificación de las morfoespecies. Tres de los caracteres que habían resultado importantes en el análisis canónico discriminante fueron fundamentales en la construcción de la clave: el diámetro máximo de las esporas, el número total de verrugas proximales y la densidad de espinas distales. Dentro de la clave se incluyó también a *P. tenuis*, que aunque no pertenece al complejo *P. laevis* – *P. carolinianus* debido a que posee una cara distal verrugosa, en lugar de la característica cara distal espinosa del complejo, es la única otra especie recolectada en la región perteneciente al género *Phaeoceros*.

Aunque la clave fue construida con caracteres de valor taxonómico que sirven para diferenciar entre las especies del género, podría resultar impráctica en la identificación al utilizar caracteres que sólo pueden observarse utilizando MEB o microscopios ópticos muy potentes. Sin embargo, la dificultad para la correcta identificación de las especies del género *Phaeoceros* podría ser consecuencia de dos factores muy importantes que afectan la taxonomía actual de los antocerotes:

1. Los escasos estudios disponibles de antocerotes que señalen caracteres de valor taxonómico más allá de la morfología de esporas (Bharadwaj 1981, Proskauer 1951, 1958; Schuster, 1992), y
2. La gran cantidad de variación fenotípica que los estudios disponibles han registrado dentro de una sola especie (Proskauer, 1958), que impide delimitar con precisión caracteres exclusivos de una u otra especie.

Es por esto que es importante registrar y analizar la variación en los caracteres morfológicos de los antocerotes, para determinar qué caracteres son adecuados en la diferenciación entre especies, tanto dentro de *Phaeoceros* como en otros géneros de la división. Aunque Proskauer (1958) realizó amplios estudios acerca de la variación fenotípica en diversas especies del género *Phaeoceros*, aún queda mucho trabajo por hacer.

- **Evaluación de los caracteres moleculares: nad5 y rbcL**

En cuanto al análisis molecular, la relación entre las especies no se resuelve completamente, quizá porque los marcadores utilizados no son los adecuados, como se discutirá más adelante. En la elección de los marcadores, sin embargo, se procuró incluir individuos de las mismas morfoespecies identificadas, así como otras, que provinieran de distintas regiones del mundo, al ser un complejo con especies de distribución cosmopolita. Al existir pocos estudios de

antocerotes a nivel molecular que tuvieran una representación considerable del género *Phaeoceros*, se seleccionaron los genes *nad5* y *rbcL*.

Los resultados de ambos genes parecen indicar que las relaciones entre los grupos se encuentran dadas por la biogeografía y la condición sexual, mientras que la ornamentación y las dimensiones de las esporas son caracteres limitados en el reconocimiento de los grupos taxonómicos tan cercanos, como es el caso de las especies del complejo *P. carolinianus* – *P. laevis*.

En cuanto a la biogeografía, en los árboles filogenéticos de *nad5* (Figs 9-10) se forma un clado que incluye a todos los individuos mexicanos de este estudio (menos los identificados como *P. laevis*), así como a la mayoría de los que corresponden a las regiones de Centro y Sudamérica, como son *P. flexivalvis* (República Dominicana), *P. dendroceroides* (Venezuela) y *P. carolinianus* (Panamá). Este grupo está conformado por especies de cara distal espinosa, con excepción de *P. dendroceroides*, cuyas esporas tienen una gran verruga o grupo de verrugas centrales en la cara distal. Las plantas con cara distal espinosa que corresponden a las regiones de Estados Unidos y Europa no forman parte de este clado.

En los árboles filogenéticos de *rbcL* y la matriz concatenada (Figs. 11-14) aparece también el clado anterior, donde además se suman *P. evanidus* (Australia) y *P. tenuis* (México). En este clado parece no haber un patrón en la ornamentación de las esporas, ya que está integrado por elementos de cara distal espinosa y de cara distal verrugosa, y aunque los primeros constituyen una proporción considerablemente mayor que los segundos dentro del clado, existen pocas especies de *Phaeoceros* con cara distal verrugosa con respecto a las especies con cara distal espinosa.

Otro clado en común en todos los análisis, tanto de parsimonia como de inferencia bayesiana, de los genes *nad5*, *rbcL* y la matriz concatenada, es el que está compuesto por los individuos pertenecientes a las poblaciones mexicanas identificadas como *P. laevis* (Fig. 15 D-F) y a un individuo identificado como *P. microsporus* (Villarreal y Renner, 2013) de Panamá (Fig. 15 A-C), pero la relación de este grupo monofilético con el individuo identificado como *P. laevis* (Villarreal y Renner, 2013) de Portugal, no se resuelve.

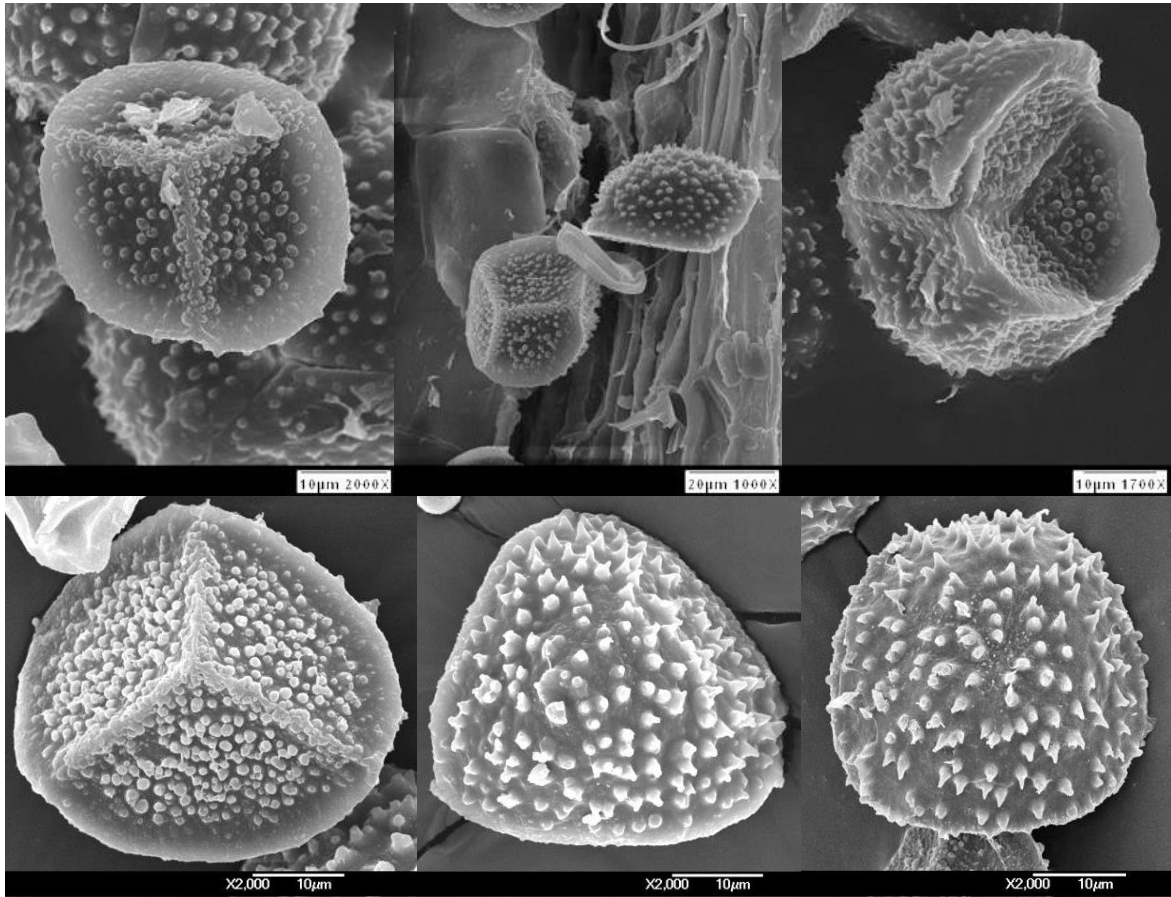


Fig. 15. A-C. Esporas de *P. microsporus* de Panamá. A. Cara distal verrugosa. B. Esporas y pseudoeláteres en la cápsula. C. Tétrada con espora desprendida. D-F. Esporas de *P. laevis* de México. D-E. Esporas de la población I. D. Cara proximal verrugosa. E. Cara distal espinosa. F. Espora de la población 13, cara distal espinosa.

Phaeoceros microsporus fue descrita por Stephani (1916) a partir de plantas recolectadas en Guatemala; la describe como monoica y de esporas pequeñas (27 μm). Hässel (1989) revisó el material tipo de la especie y observó esporas con un intervalo de diámetro de 42-44 μm , aunque no hace mención de la condición sexual. Villarreal y Renner (2013) incluyeron en su análisis de correlación de monoicismo y dioicismo en Anthocerotophyta secuencias de un individuo identificado como *P. microsporus* recolectado en Panamá (Fig. 15 A-C), el que además es tratado como monoico y de esporas “grandes” (> 35 μm), por lo que es de suponer que los autores utilizaron la descripción de las esporas de Hässel (1989) para su identificación.

Proskauer (1958) reportó que *P. laevis* (al que él se refiere como *P. laevis* subsp. *laevis*) presenta amplios intervalos de variación en sus esporas, de <30-50 μm , y que presenta condición sexual dioica. Hässel (1987) evaluó el tipo de *P. laevis* y describe el diámetro de las esporas de *P. laevis* en un intervalo de 33-38 μm .

Con base en la aproximación de Hässel (1987, 1989) al estudiar los tipos, *P. microsporus* y *P. laevis* se diferencian por el tamaño de las esporas, que son más grandes en *P. microsporus*. Las mediciones realizadas en este estudio revelan que las esporas dentro de

una población pueden variar suficiente como para abarcar el intervalo de ambas especies reportado por Hässel (1989). Por ello, este carácter requiere exploraciones poblacionales más amplias para determinar si es de valor taxonómico en la diferenciación de ambas especies. El carácter más importante, por tanto, en la diferenciación de *P. laevis* y *P. microsporus*, sería la condición sexual.

Una posible explicación a la relación entre los individuos dioicos mexicanos y *P. microsporus* podría encontrarse en la hipótesis propuesta por Proskauer (1958) de que era posible que poblaciones dioicas, que se clasificarían como *P. laevis*, surgieran alrededor del mundo de manera independiente a partir de poblaciones o individuos monoicos. Esta hipótesis podría concordar con los resultados obtenidos en la filogenias moleculares, en las que *P. laevis* de Portugal no se encuentra formando parte de este grupo monofilético. Proskauer (1958) ya había señalado la dudosa relación genética que podría existir entre plantas dioicas con esporas semejantes alrededor del mundo, ya que, al ser una especie dioica, requeriría que una espora femenina y una masculina viajaran largas distancias permaneciendo viables y cayeran juntas en un lugar con las condiciones propicias para germinar y reproducirse. Aunque *P. laevis* es conocido por su potencial para desarrollar estructuras de reproducción asexual, como son los tubérculos, las poblaciones encontradas pertenecerían a un solo sexo (femenino o masculino), y en las poblaciones mexicanas se conocen ambos sexos.

Los mecanismos de determinación sexual en antocerotes han sido poco estudiados. Proskauer (1958) postuló, al analizar los cromosomas de varias poblaciones del complejo *P. laevis* – *P. carolinianus*, la existencia de cromosomas sexuales en las células de las plantas dioicas, identificadas como *P. laevis* (*P. laevis* subsp. *laevis* según el texto original). *P. laevis* tiene cuatro autosomas y un cromosoma sexual heterocromático en la fase haploide; este cromosoma sexual parece presentar ligeras diferencias en tamaño entre plantas femeninas y masculinas (Proskauer, 1958). En contraste, las poblaciones monoicas que Proskauer (1958) identificó como *P. carolinianus*, tenían 5 cromosomas en los anteridios; el quinto cromosoma, aunque uno de los más pequeños, era de mucho mayor volumen que los cromosomas sexuales juntos de las plantas dioicas y no parecía marcadamente heterocromático.

El estudio de los cromosomas de individuos de estas tres poblaciones (las dos de *P. laevis* mexicanos y *P. microsporus* de Panamá) podría ayudar a explicar varios fenómenos poco conocidos en los antocerotes. En primer lugar, si el origen del dioicismo o monoicismo está determinado exclusivamente por los cromosomas, o si pueden presentar sistemas de sexo lábil dependiendo de condiciones ambientales o poblacionales. En segundo lugar, de presentarse diferencias en los cromosomas entre las poblaciones dioicas y monoicas, se ratificaría el papel de los cromosomas en la determinación sexual en los antocerotes y se podrían hacer inferencias más exactas de la evolución de los cromosomas sexuales, así como los cambios de sexo y las reversiones en el género.

Villarreal y Renner (2013) infirieron que las tasas de cambio de dioicismo (considerado como posible estado ancestral en Anthocerotophyta) a monoicismo eran dos veces más frecuentes que en la dirección opuesta, e identificaron reversiones independientes en varios géneros como *Megaceros*, *Nothoceros* y *Phaeoceros*. Esos autores encontraron una

relación entre el tamaño de las esporas y la condición sexual, donde las especies dioicas tenían esporas más pequeñas que las especies monoicas. Esta relación no se presenta en las plantas mexicanas incluidas en este estudio, donde el intervalo de variación de las esporas de las plantas monoicas es muy amplio, de <28-50 μm , mientras que las plantas dioicas presentan un intervalo de diámetro de las esporas menor, de 32->42 μm , pero que, sin embargo, se ubica en la media aproximada del intervalo de las monoicas.

Otro clado de interés es el que forman *P. tenuis* (México), *P. brevicapsulus* (Cuba) y *P. evanidus* (Australia) en las filogenias resultantes del gen nad5. En este caso parece que una característica morfológica de las esporas que no fue evaluada en este estudio podría estar unificando el grupo, esto es, la presencia de verrugas en la cara distal. Sin embargo, la población mexicana, que presenta espinas sobre verrugas en la cara distal, identificada como *P. brevicapsulus*, no forma parte de este grupo. A pesar de que la relación monofilética de estas tres especies no se reafirma en el análisis con rbcL ni con la matriz concatenada, donde estas relaciones no se resuelven, la presencia de verrugas en las caras proximales de las esporas podría estar unificando este grupo.

Distribuciones disyuntas similares a las que presenta este grupo se han reportado en otras especies de la división, como es el caso de la distribución disyunta de *Phaeoceros himalayensis* y *Notothylas dissecta*, que se distribuyen en América e India (Ashtana y Srivastava, 1991). Además, Proskauer (1958) ya había considerado la posibilidad de que especies monoicas, como es el caso de estas tres, tuvieran una mayor capacidad de dispersión, con esporas cuya viabilidad puede extenderse hasta más de 10 años, y que solo necesitan una espora que germine para establecer poblaciones a través de autofecundación y formación de tubérculos. Algunos estudios en hepáticas han propuesto que la mayoría de las especies con intervalos intercontinentales son resultado de eventos de dispersión a gran distancia, y que las especies con este tipo de distribución suelen presentar esporas bisexuales (plantas monoicas) y mecanismos de reproducción asexual (Gradstein, 2013). Estos caracteres coinciden con el grupo monofilético conformado por *P. tenuis* (México), *P. brevicapsulus* (Cuba) y *P. evanidus* (Australia), en la condición sexual (monoica) en las tres especies y la capacidad de formar tubérculos (mecanismos de reproducción asexual) en *P. tenuis* y *P. evanidus*, por lo que la relación monofilética de estas tres especies con distribución disyunta no es improbable.

En general, los análisis moleculares parecen no presentar correspondencia con los datos morfológicos analizados, con excepción del caso de *P. laevis* (mexicano). Esto podría tener varias explicaciones, que ya se habían considerado previamente:

- Algunos o todos los caracteres morfológicos considerados en este estudio podrían ser plásticos, y podrían estar influidos por condiciones ambientales, poblacionales, entre otras.
- Otra razón podría ser que los caracteres morfológicos de las esporas sean genéticos, pero que puedan ser convergencias. Proskauer (1957) sugirió que era probable que ocurrieran cambios en la ornamentación o dimensiones de las esporas de distintas áreas geográficas que resultaran en medidas u ornamentaciones similares.

- La hibridación también fue sugerida por Proskauer (1957): “...creo también, aunque no se han realizado cruces en el laboratorio, que el entrecruzamiento entre plantas de diferentes áreas ocurre”. Aunque luego señala que sería algo muy raro debido a que la espora de otra área debe arribar, establecerse cerca de las plantas locales y reproducirse, y el mecanismo reproductivo de la subsp. *carolinianus* tiene una fuerte tendencia hacia la autofecundación de los talos o clones.
- Por último, debería considerarse si los marcadores moleculares presentan suficiente variación o tasas de sustitución altas. Ya que los marcadores utilizados en este estudio codificaban para los genes *rbcL* de cloroplasto y *nad5* de mitocondria, acumulan una menor cantidad de variación que aquellas regiones que no codifican.

IX. CONCLUSIONES

Los caracteres morfológicos evaluados en el presente trabajo son de utilidad en la identificación de las morfoespecies recolectadas en el centro de México. Sin embargo, es necesario evaluar las variaciones interpoblaciones e interespecíficas de otras morfoespecies del complejo *Phaeoceros laevis* – *P. carolinianus* incluidas en las claves de Hässel (1987, 1989) para determinar si estos caracteres son suficientes para distinguir todas las especies del complejo, ya que los intervalos utilizados en dichas claves parecen ser muy estrechos.

En cuanto a los caracteres moleculares evaluados, los genes *nad5* y *rbcL*, tienen una utilidad limitada a nivel de especie al ser genes codificantes y es necesario impulsar la secuenciación de regiones más variables en una mayor cantidad de especies alrededor del mundo para tener un panorama más preciso de las relaciones en el complejo. A pesar de esto, se detectaron algunas relaciones de interés como las que forman el grupo monofilético integrado por las poblaciones de *P. laevis* mexicanas y *P. microsporus*. Además parecen evidenciar algunos patrones biogeográficos.

En este estudio se consideraron cuatro fuentes de evidencia: 1) la morfología de las esporas, 2) el gen *nad5* de mitocondria, 3) el gen *rbcL* de cloroplasto y 4) la condición sexual.

La morfoespecie que corresponde a las dos poblaciones identificadas como *P. laevis* presenta varias líneas de evidencia que indican que podría representar una especie distinta del resto de las morfoespecies que se evaluaron en este estudio:

1. Los caracteres medidos de las esporas presentan diferencias significativas,
2. forma un grupo monofilético separado del resto de las morfoespecies en la filogenia del gen *rbcL* de cloroplasto,
3. también forma un grupo monofilético separado del resto de las morfoespecies en la filogenia del gen *nad5* de mitocondria, y
4. presenta condición sexual dioica, a diferencia del resto de las morfoespecies, que son monoicas.

En cuanto al nombre que debería asignarse a estas dos poblaciones, identificadas en el presente trabajo como *P. laevis*, existe la posibilidad de que:

- 1) se consideren como parte de *P. microsporus*, con base en la evidencia molecular y la similitud en la ornamentación de las esporas, ampliando la condición sexual de esta especie, es decir, que podría ser monoica o dioica. Sin embargo, existiría conflicto para diferenciar *P. laevis* y *P. microsporus* dioico con base en los caracteres taxonómicos utilizados actualmente,
- 2) se consideren como parte de *P. laevis*, con base en la evidencia morfológica de las esporas y a la condición sexual, o
- 3) se consideren como una especie nueva, con base en la combinación de evidencia morfológica, molecular y a la condición sexual.

Antes de hacer una modificación al concepto de *P. microsporus* o describir una especie nueva es importante llevar a cabo estudios de cultivo en el laboratorio de estas poblaciones que permitan identificar si la determinación sexual no está relacionada a factores ambientales o poblacionales, y estudios cromosómicos que podrían dar claridad a los mecanismos de determinación del sexo en antocerotes.

En cuanto al resto de las morfoespecies evaluadas, los datos morfológicos indican que presentan diferencias significativas en los caracteres de las esporas, lo que sería una primera evidencia de que representan especies distintas. Sin embargo, esto no se encuentra respaldado por la evidencia molecular. La falta de evidencia molecular no significa, por las razones previamente analizadas, que no sean especies distintas. Aun así, la evidencia morfológica podría ser resultado de presiones ambientales o poblacionales, podrían existir convergencias entre plantas de distintas regiones, o el muestreo podría ser muy limitado, como ya se había planteado anteriormente, por lo que una sola línea de evidencia positiva no es concluyente respecto a la identidad de las especies.

Los resultados muestran una tendencia en la que las especies del complejo pertenecientes al centro y sur de México, así como a Centro y Sudamérica se encuentran más cercanamente relacionadas que las que provienen de Estados Unidos y Europa. Esto reforzaría la hipótesis de Proskauer (1957) de la tendencia en las plantas de este complejo a formar “razas locales” que podrían variar en el patrón de las esporas con respecto a otras razas locales, pero que estarían más emparentadas entre ellas que con poblaciones con la misma ornamentación de regiones más lejanas.

Si estas “razas locales” representan especies distintas podría aclararse evaluando un mayor número de caracteres morfológicos, como son grosor del talo gametofítico, distribución de estomas en la cápsula, dimensiones y grosor de las paredes de las células epidérmicas en la cápsula, número de capas de epidermis y tejido asimilativo en la cápsula, entre otras, y caracteres genéticos más variables, ya que con los caracteres evaluados en el presente estudio, sólo la morfología de las esporas permite distinguirlas. Por tanto, con la evidencia molecular evaluada en este estudio, y debido a que estas morfoespecies comparten la misma condición sexual (monoica), y solo se han evaluado caracteres morfológicos de las esporas que se consideran como una sola fuente de evidencia en su conjunto, hasta no encontrar más evidencia de que las poblaciones evaluadas en este estudio representan especies distintas, podrían considerarse como parte de la especie cosmopolita *P. carolinianus*.

Los escasos estudios disponibles a nivel de especie, y aún de género, en los antocerotes dificultan la identificación de los patrones en los caracteres que son fundamentales para reconocer a las especies. Los estudios de relaciones genéticas y de variación interespecífica e intraespecífica en los caracteres morfológicos, anatómicos, embriológicos, ecológicos, cromosómicos, moleculares, entre otros, podrían ayudar a esclarecer la delimitación de las especies en muchos de los géneros de Anthocerotophyta.

X. LITERATURA CITADA

- Akaike, H. 1974. A new look at statistical model identification. *IEEEET Automatic Control* 19.
- Andersson, L. 1990. The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon* 39.
- Barret, C. F. & J. V. Freudenstein. 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* 20.
- Bharadwaj, D. C. 1981. Taxonomy of Anthocerotales. *Recent Advances in Cryptogamic Botany*.
- Cain A. J. 1954. *Animal species and their evolution*. Hutchinson University Library, London.
- Campbell, D. H. 1924. A remarkable development of the sporophyte in *Anthoceros fusiformis* Aust. *Annals of Botany* 37.
- Carafa, A., J. G. Duckett, J. P. Knox & R. Ligrone. 2005. Distribution of cell wall xylans in bryophytes and tracheophytes: New insights into basal interrelationships of landplants. *New Phytologist* 168.
- Cargill, D. C., R. J. Duff, J. C. Villarreal & K. S. Renzaglia. 2005. Generic concepts in hornworts: historical review, contemporary insights and future directions. *Australian Systematic Botany* 18.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9.
- Dauphin, G., T. Pocs, J. C. Villarreal & N. Salazar. 2006. Nuevos registros de hepáticas y anthocerotófitas para Panamá. *Tropical Bryology* 27.
- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concepts of species, species criteria, and the process of speciation. En: Howard, D. J. & S. H. Berlocher. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press.
- De Queiroz, K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 56(18).
- De Queiroz, K. 2007 Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56(6).
- Dobzhansky, T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist* 84.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19.
- Duff, R. J., J. C. Villarreal, D. C. Cargill & K. S. Renzaglia. 2007. Progress and challenges toward developing a phylogeny and classification of the hornworts. *The Bryologist* 110(2).
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology* 20(4).
- Gradstein, S. R. 2013. Afro-American hepatics revisited. *Polish Botanical Journal* 58(1).
- Goffinet B. 2000. Origin and phylogenetic relationships of bryophytes. En J. Shaw & B. Goffinet (eds.). *The Biology of Bryophytes*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid S41*.

- Hasegawa, J. 1991. Taxonomy of *Phaeoceros laevis* subsp. *carolinianus* and its allied taxa in Japan and its adjacent region. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 69.
- Hässel, G. G. 1976. Taxonomic problems and progress in the study of the Hepaticae. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 41.
- Hässel, G. G. 1984. *Anthoceros punctatus* L., sus esporas. *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* 5(1-2).
- Hässel, G. G. 1987. *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. and *P. carolinianus* (Michx.) Prosk., their spores. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 62.
- Hässel, G. G. 1988. A proposal for a new classification of the genera within the Anthocerotophyta. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 64.
- Hässel, G. G. 1989. Las especies de *Phaeoceros* (Anthocerotophyta) de América del Norte, Sud y Central; la ornamentación de sus esporas y taxonomía. *Candollea* 44(2).
- Hässel de Menéndez, G. G. 1990. Las especies de *Anthoceros* y *Folioceros* (Anthocerotophyta) de América del Norte, Sud y Central; la ornamentación de sus esporas y taxonomía. *Candollea* 45(1).
- Hässel, G. G. 2006. *Paraphymatoceros* Hässel, gen. nov. (Anthocerotophyta). *Phytologia* 88(2).
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17.
- Kenrick, P. & P. R. Crane. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389.
- Lincoln, R. J., G. A. Boxhall & P. F. Clark. 1982. *A Dictionary of Ecology, Evolution and Systematics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. En: Claridge, M.F., H. A. Dawah & M. R. Wilson. *Species: The Units of Biodiversity*. London: Chapman and Hall.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. 1969. *Principles of systematic zoology*. McGraw-Hill, New York.
- Mishler, B. D. & S. P. Churchill. 1984. A cladistic approach to the phylogeny of the bryophytes. *Brittonia* 36.
- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva & M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7.
- Page, R. D. M. & E. C. Holmes. 1998. *Molecular evolution: A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Proskauer, J. 1951. Studies on Anthocerotales. III. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 78(4).
- Proskauer, J. 1958. Studies on Anthocerotales. V. *Phytomorphology* 7(2).
- Puillandre, N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovich, M. C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford & S. Samadi. 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21.
- Qiu, Y., L. Li, B. Wang, Z. Chen, V. Knoop, M. Groth-Malonek, O. Dombrowska, J. Lee, L. Kent, J. Rest, G. F. Estabrook, T. A. Hendry, D. W. Taylor, C. M. Testa, M. Ambros, B. Crandall-Stotler, R. J. Duff, M. Stech, W. Frey, D. Quandt & C. C. Davis. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(42).

- Renzaglia, K. S. 1978. A comparative morphology and developmental anatomy of the Anthocerotophyta. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 44.
- Renzaglia, K. S. & K. C. Vaughn. 2000. Anatomy, development and classification of hornworts. En: Shaw, J. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press.
- Renzaglia, K. S., J. C. Villarreal & R. J. Duff. 2009. New insights into morphology, anatomy and systematics of hornworts. En: B. Goffinet & J. Shaw (eds). *Bryophyte Biology II*. Cambridge University Press.
- Ridley, M. 1993. *Evolution*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19.
- Schofield, W. B. 1985. *Introduction to Bryology*. Macmillan.
- Schuser, R. M. 1992. *The Hepaticae and Anthocerotae of North America*, Vol. VI. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Simpson, J. J. 1961. *Principles of animal taxonomy*. Columbia University Press.
- Smith G. 1955. *Cryptogamic Botany*, volume II, 2nd edition. McGraw-Hill.
- Sneath P. H. A. & R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Steinauser, S., S. Beckert, I. Capesius, O. Malek & V. Knoop. 1999. Plant mitochondrial RNA editing. *Journal of Molecular Evolution* 48.
- Stotler R. E. & B. J. Crandall-Stotler. 2005. A revised classification of the Anthocerotophyta and a checklist of the hornworts of North America, North of Mexico. *The Bryologist* 108 (1).
- Swofford, D. L. 1998. *PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4 beta 10, Massachusetts, USA. Sinauer Associates.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: Otte, D. & J. A. Endler. *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Inc.
- Thomson, J. D. 1997. The significance of spore morphology in the *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. species complex. (Abstract) *American Journal of Botany* 83 (sup. 6).
- Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25.
- Vandepoorten & Shaw. 2010. The application of molecular data to the phylogenetic delimitation of species in bryophytes: a note of caution. *Phytotaxa* 9.
- Villareal, J. C., D. C. Cargill, A. Hargborg, L. Söderström & K.S. Renzaglia. 2010. Hornwort diversity: Patterns, causes and future work. *Phytotaxa* 9.
- Villareal, J. C. & S. S. Renner. 2012. Hornwort pyrenoids: Carbon-concentrating mechanisms evolved and were lost at least five times during the last 100 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109.
- Villareal, J. C. & S. S. Renner. 2013. Correlates of monoicy and dioicy in hornworts, the apparent sister group to vascular plants. *BMC Evolutionary Biology* 13.
- Wily, E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27.
- Wiley, E. O. & B. S. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley-Blackwell.
- Wright, S. 1940. The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. En: J. Huxley (ed.). *The new systematics*. Oxford University Press, London.