



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

RELACIONES FILOGENETICAS DEL COMPLEJO
SARCODON IMBRICATUS - *S. SQUAMOSUS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

(SISTEMATICA)

PRESENTA

VIOLETA PATIÑO CONDE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO

MEXICO, D. F.

MARZO 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



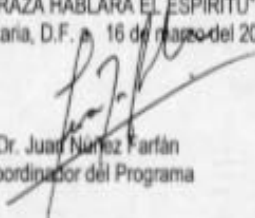
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de enero del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) de la alumna Patiño Conde Violeta con número de cuenta 92278323 con la tesis titulada: "Relaciones filogenéticas del complejo *Sarcodon imbricatus* - *S. squamosus*", bajo la dirección del Dr. Joaquín Cifuentes Blanco.

Presidente:	Dr. Tedfilo Herrera Suárez
Vocal:	Dra. Virginia León Regagnon
Secretario:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Suplente:	Dra. María Dolores González Hernández
Suplente:	Dra. Susana Aurora Magallón Puebla

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. 16 de marzo del 2006


Dr. Juan Nunez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico proporcionado por:

Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado del
CONACyT

Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado de la DGEP
de la UNAM

Programa de Apoyos Económicos a Estudiantes de Posgrado de la
DGEP de la UNAM

Proyectos CONACyT
34313-V

Proyectos DGAPA
IN-206901
IN-217198
IN-209605-3

Así mismo deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los
miembros de mi comité tutorial:

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Dra. Susana Magallón Puebla
Dra. Virginia León Règagnon

Y al resto de los miembros del jurado:

Dr. Teófilo Herrera Suárez

Dra. Dolores González Hernández

A mis papás, Lourdes y Alfredo, como una muestra por su amor y apoyo, porque esto es el resultado de sus aciertos. Gracias Chinito por haber inyectado en mi tu amor e interés por el conocimiento. Gracias Ma por enseñarme a ser valiente e independiente (aunque a veces me cueste un poco de trabajo y me de miedo), porque sin esto nunca lo hubiera logrado.

A mis hermanos, Laure y Pablo, por su amor y paciencia, pero sobretodo lo maravilloso que fue crecer juntos.

A Layih y Ceci por su amor y amistad, por los innumerables momentos en que hemos compartido los hombros, las risas y las imprecindibles miradas de complicidad.

A mi abuelita Elenita y mis tías Guille y Laura por su amor y apoyo, porque sin ustedes no podría disfrutar de muchas de las cosas que ahora tengo.

A los pequeños de la familia por sus sonrisas y los grandes momentos, gracias por hacerme sentir la felicidad de volver a ser niña.

A toda mi familia por su amor y confianza, como una pequeña muestra por lo mucho que todos ustedes me han dado.

A Ric por su amor e invaluable apoyo, por lo grandioso que ha sido disfrutar de su compañía e intelegente humor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por ser un gran maestro y tutor, por haberme acompañado en este largo pero enriquecedor trayecto de mi vida, por enseñarme a luchar con paciencia y entereza, pero sobretodo porque sin su confianza y apoyo esta maravillosa aventura científica nunca hubiese sido posible.

A la Dra. Susana Magallón Puebla por su gran apoyo e interés, por formativas clases y porque sin sus valiosas críticas este trabajo jamás hubiera sido lo que es.

A la Dra. Virginia León Règagnon por su enorme apoyo e interés y por todos sus comentarios que mejoraron y enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Dolores González Hernández por todo su apoyo durante mis estancias en el laboratorio de Sistemática Molecular del INECOL, A. C., Xalapa, Veracruz, y por sus innumerables enseñanzas.

Al Dr. Teófilo Herrera Suárez por sus valiosos comentarios y sobretodo porque sin su entusiasmo la micología en México no habría tenido tan buen inicio.

A mis amigos feténes por su confianza, apoyo y por todos los maravillosos momentos que hemos pasado juntos: Nuri, Clau (Puya), Layih, Auroriux, Yulian, Pau, Rama, Hugo, Clau, Jossi, Lilus, Mundo, Ale, Gelipe, Calin y Ana Burelo, Alvaro, Agus, Silvia, Dani (Caspel), Kara, Paola y Javier (Govenio).

A mis amigos y compañeros de la sección de Micología: Magda, Alfonso, Chayo y Sigfrido.

A Cristi por su ayuda y paciencia durante mis estancias en el laboratorio de Sistemática Molecular del INECOL, A. C., Xalapa, Veracruz.

A todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible este trabajo, aunque no pueda nombrarlas a todas (porque como muchos sabrán no me distingo por mi memoria) les agradezco profundamente todo lo que han hecho por mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	I
2. ANTECEDENTES	3
2.1 HISTORIA Y PROBLEMÁTICA TAXONÓMICA DE <i>SARCODON</i> <i>IMBRICATUS</i>	3
2.2 <i>SARCODON IMBRICATUS</i> EN MÉXICO	10
2.3 EL CONCEPTO DE ESPECIE EN HONGOS	12
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 MATERIALES HERBORIZADOS	19
4.2 REVISIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EJEMPLARES DE HERBARIO	19
4.3 TÉCNICAS MOLECULARES	20
4.3.1 Obtención del ADN genómico	20
4.3.2 Amplificación de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS1, 5.8S e ITS2	22
4.3.3 Secuenciación de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS1, 5.8S e ITS2	23
4.3.4 Edición de las secuencias	24
4.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	25
4.4.1 Muestreo taxonómico	25
4.4.2 Alineamiento de las secuencias	28
4.4.3 Búsqueda de los arboles más parsimoniosos	29
4.4.4 Evaluación de las hipótesis	30
5. RESULTADOS	31
5.1 REVISIÓN MORFOLÓGICA	31
5.2 DATOS MOLECULARES	31
5.2.1 Obtención de las secuencias de los espaciadores internos: ITS1, 5.8S e ITS2	31
5.2.2 Secuencias de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS1, 5.8S e ITS2	34

5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	36
5.3.1 Muestro taxonómico, alineamiento y matrices de datos	36
5.3.2 Búsqueda de los arboles más parsimoniosos y evaluación de las hipótesis	38
6. DISCUSIÓN	41
6.1 ESTRATEGIA DE ALINEAMIENTO	41
6.2 SISTEMÁTICA DEL COMPLEJO <i>SARCODON IMBRICATUS S. L.</i>	44
6.2.1 Los taxones europeos: <i>Sarcodon imbricatus s. s.</i> y <i>S. squamosus</i>	45
6.2.2 Los grupos de <i>Sarcodon imbricatus s. l.</i> con distribución en México	49
6.2.3 <i>Sarcodon aspratus</i>	54
7. CONCLUSIONES	57
8. LITERATURA CITADA	61
9. APÉNDICES	

I. INTRODUCCIÓN

La sistemática es la ciencia de la biodiversidad por excelencia (Wheeler, 1995), ya que ésta se encarga tanto de nombrar y describir a las especies, como de desentrañar su historia evolutiva (Anónimo, 1994; Schuh, 2000, 2003). Además, tiene el papel exclusivo de producir una clasificación que resuma, de manera eficiente, todo nuestro conocimiento al respecto y sea a la vez una fuerte herramienta predictiva que nos permita dar una explicación a tal diversidad biológica (Anónimo, 1994; Vane-Wright, 1996; Cracraft, 2002). Así mismo, la sistemática también nos provee de importantes herramientas para el uso y la conservación de la biodiversidad (Wheeler, 1995; Savage, 1995; Anónimo, 1994; Cracraft, 2002). En conjunto todas y cada una de estas tareas hacen de la sistemática una ciencia de vanguardia, cuyos retos y alcances reafirman su importancia en el desarrollo y el progreso de cualquier nación y del mundo en su conjunto dada la magnitud de la biodiversidad y los potenciales beneficios que ésta representa para toda la humanidad (Wheeler, 1995).

En la actualidad una de las líneas de investigación de mayor interés dentro de la sistemática es la sistemática filogenética, cuyo objetivo principal es producir un marco de referencia histórico para el entendimiento de la biodiversidad (Anónimo, 1994; González & De Luna, 1996; Cracraft, 2002). En las últimas décadas, esta área ha experimentado un vertiginoso progreso como consecuencia del desarrollo de los métodos filogenéticos y de los avances tecnológicos que han puesto al alcance de los investigadores nuevas fuentes de información histórica. En conjunto dichos avances han permitido clarificar y ahondar en la historia filogenética de una amplia diversidad de grupos taxonómicos, y en consecuencia avanzar hacia la construcción de una clasificación robusta (Schuh, 2000; Cracraft, 2002). Además, nos proporcionan un marco teórico para posteriores estudios ecológicos, biogeográficos, coevolutivos y en general de la biología comparada (Wanntorp *et al.*, 1990; Anónimo, 1994; de Pinna, 1996; Feder, 1996).

Por otra parte, el desarrollo de la sistemática filogenética ha permeado fuertemente en uno de los más antiguos e intrincados debates de la biología, el concepto de especie (Cracraft, 2000). Debido a que las especies ocupan una posición transcendental en todos los aspectos de la biología en general y la sistemática en particular, los sistemáticos han considerado que el desarrollo de un concepto de especie compatible con la teoría filogenética es crítico (Wheeler & Meier, 2000). Aunque en la actualidad existen varias versiones del concepto filogenético de especie (ver Cracraft, 1983, 1987; Nixon & Wheeler, 1990; Mishler & Theriot, 2000; Wheeler & Platnick, 2000), una perspectiva filogenética del problema de la especie proporciona numerosas ventajas para el estudio de la biodiversidad en comparación con otros conceptos. En primer lugar, los diferentes conceptos filogenéticos de especies son congruentes con la teoría evolutiva y cumplen

con los criterios de universalidad y operatividad, los cuales han sido señalados como deseables para cualquier concepto de especie por Hull (1997). Así mismo, se han desarrollado varios métodos o herramientas para delimitación de las especies congruentes con estas ideas o en general con la teoría filogenética (Frost & Kluge, 1994; Avise & Wollenberg, 1997; Wiens & Servedio, 2000). Por otro lado, se ha visto que estos conceptos, a diferencia de otros, brindan una mejor evaluación de la riqueza específica de un grupo (Groombridge, 1992), ya que nos permiten establecer y reconocer límites más naturales entre los taxones bajo estudio evitando una subestimación de la diversidad. Lo cual en consecuencia permite la planeación de estrategias más adecuadas para el uso y la conservación de la biodiversidad (Brooks *et al.*, 1992; Wheeler & Meier, 2000).

Una de las disciplinas biológicas donde el uso y la aplicación de estas ideas ha tenido un fuerte eco es la micología (Taylor *et al.*, 2000). En las últimas dos décadas, muchos especialistas de esta área han visto en el análisis filogenético basado en secuencias de ADN una importante herramienta para el estudio de los complejos de especies en hongos y una alternativa para el delimitación y reconocimiento de las especies que los conforman. En este caso en particular, dos factores han sido los detonadores para la amplia aplicación de estos conceptos y métodos, en primer lugar, las fallas y/o dificultades que se presentan al tratar de delimitar a las especies de hongos bajo los conceptos morfológico (Brasier, 1997, Petersen & Hugues, 1999) o biológico (Taylor *et al.*, 2000); y en segundo lugar, las numerosas ventajas que representa el uso de secuencias de ADN, en contraste con otras fuentes de caracteres, para la inferencia filogenética en este grupo de organismos (Bruns *et al.*, 1991; Berbee & Taylor, 1999; Taylor *et al.*, 2000). La amplia aceptación de estos conceptos y métodos entre los micólogos es claramente ejemplificada por los numerosos artículos publicados en años recientes en diversas revistas del ámbito micológico (ver Vilgalys, 1991; Anderson & Stasovski, 1992; Hibbett *et al.*, 1995; Kretzer *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 1998; Thon & Royse, 1999; Hughes *et al.*, 1999; Sims *et al.*, 1999; Kerrigan *et al.*, 1999; Witthuhn *et al.*, 2000; Harrington *et al.*, 2001; Hugues *et al.*, 2001; Tuthill *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2001; Myllys *et al.*, 2001; Kroken & Taylor, 2001; Henricot & Culham, 2002; Couch & Kohn, 2002; Shen *et al.*, 2002; Schurko *et al.*, 2003, Coetzee *et al.*, 2001, 2003).

Indudablemente, la correcta delimitación de las especies del reino *Fungi*, al igual que de cualquier otro grupo taxonómico, tiene profundos efectos sobre nuestro conocimiento, uso y conservación de la biodiversidad. En primer lugar, nos proporciona una visión más exacta sobre la diversidad de este grupo de organismos. En segundo, nos proporcionaría un marco teórico más robusto para el uso de estos recursos en áreas tan diferentes como la medicina, la biotecnología, el control de plagas, la industria alimenticia o farmacéutica, la conservación y el desarrollo sustentable.

RESUMEN

En el presente trabajo se investigaron las relaciones filogenéticas de *Sarcodon imbricatus sensu lato*, con base en el análisis filogenético de la región de los ITS, con la finalidad de establecer los límites y las relaciones filogenéticas del taxón mexicano reportado previamente como parte de este complejo de especies. Se compararon y analizaron 45 secuencias correspondientes a los grupos mexicano, europeo y asiático de *S. imbricatus s. l.*, y a otras especies de los géneros *Sarcodon*, *Hydnellum* y *Phellodon*.

Los resultados obtenidos indican que *Sarcodon imbricatus s. l.* incluye por lo menos 5 especies, las cuales se distinguen unas de otras por sus asociaciones vegetales y su distribución geográfica, así como por algunas características macroscópicas. Entre los taxones reconocidos se encuentran *S. imbricatus s. s.* y *S. squamosus* —cuya distribución se restringe a los bosques de *Picea* y *Pinus* en Europa, respectivamente—, *S. aspratus* —especie descrita de bosques de coníferas del este de Asia— y dos especies con distribución en México. La primera asociada a especies de *Quercus* y cuya distribución abarca bosques templados del centro, este y sureste del país, y la segunda hasta ahora sólo conocida de una localidad en la Sierra Madre Occidental.

Por otro lado, estos resultados sugieren que las asociaciones vegetales están fuertemente involucradas en los procesos de especiación dentro de este grupo de hongos ectomicorrizógenos, y podrían proporcionarnos una explicación para la distribución actual de estos taxones.

2. ANTECEDENTES

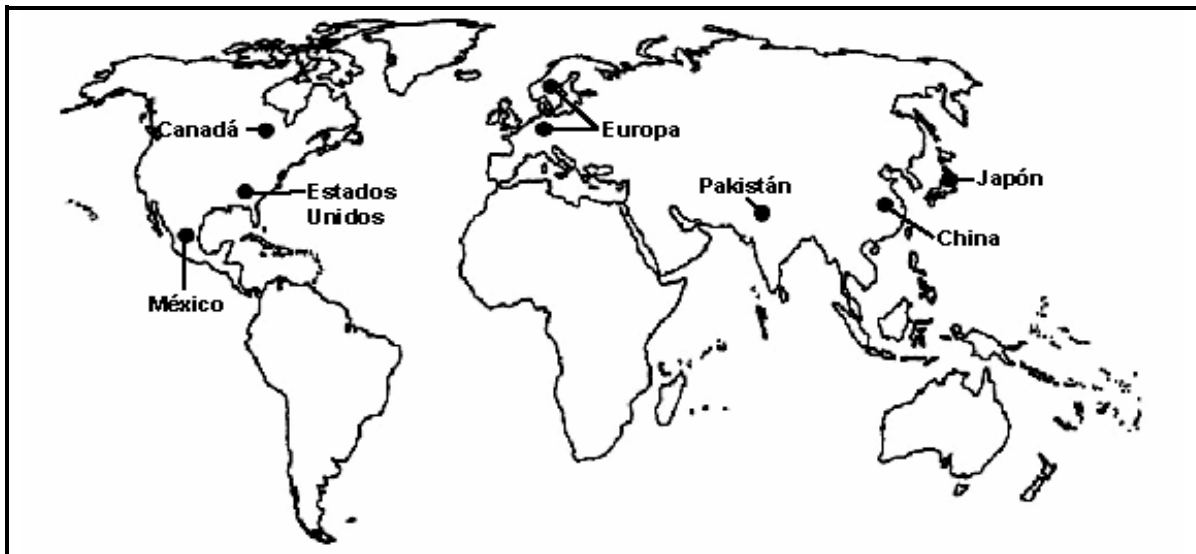
Sarcodon imbricatus (L.:Fr.) P. Karst. ha sido el centro de una de las más antiguas polémicas taxonómicas, a nivel de especie, que se han dado en el ámbito de la sistemática micológica. De manera particular, la amplia variación morfológica que presenta esta especie y la consecuente ambigüedad en sus límites taxonómicos han sido el principal objeto de debate entre los especialistas. Una breve revisión de su historia taxonómica, y particularmente de las distintas posturas sobre sus límites nos permitirá comprender mejor dicha problemática y sus implicaciones en el conocimiento de la diversidad fúngica de nuestro país.

2.1 HISTORIA Y PROBLEMÁTICA TAXONÓMICA DE *SARCODON IMBRICATUS*

Sarcodon imbricatus fue nombrada, por primera vez, en forma válida bajo el nombre de *Hydnum imbricatum* L. por K. Linnaeus (1753), aunque es posible que micólogos prelineanos como Celcius y Rupp conocieran este taxón (Maas Geesteranus & Nannfeldt, 1969; Johannesson *et al.*, 1999). Linnaeus (1753) describió esta especie de basidiomiceto como un hidnoide estipitado con tonos cafés, ornamentado en el píleo por escamas imbricadas y conspicuas, y que típicamente crecía bajo bosques de coníferas en Europa. Posteriormente, Fries (1821) sancionó y aceptó este nombre como válido. Más tarde, Karsten (1881) transfirió y designó a *H. imbricatum* como la especie tipo del género *Sarcodon* Quélet ex P. Karst. —el cual había sido descrito previamente de forma inválida por Quélet en Cooke & Quélet (1878)— designando así su nombre y posición taxonómica actual.

A partir de estos primeros trabajos, *Sarcodon imbricatus* ha sido registrada de numerosas regiones templadas del hemisferio norte. En Europa esta especie ha sido descrita de bosques de coníferas, donde se asocia a especies de *Picea* y de *Pinus*, por numerosos autores como Maas Geesteranus (1956, 1960, 1971 y 1975), Otto (1992), Stalpers (1993), Hanse & Knudsen (1997) y Pegler *et al.* (1997). Aunque también suele encontrarse en bosques deciduos como lo registraron Gulden & Hanssen (1992) en Noruega. En Asia esta especie ha sido registrada para bosques de coníferas tanto en el este de China como en Japón y Pakistán (Maas Geesteranus, 1960, 1971; Nikolaeva, 1977). En Norteamérica, Banker (1906, 1913), Harrison (1961, 1964) y Smith & Smith (1973) la registraron para bosques de coníferas, aunque estos últimos autores también lo hicieron para bosques deciduos como Coker & Beers (1951) y Baird (1986a y b). Por su parte, Cifuentes (1996) también la registró para otros tipos de bosques templados en México, incluyendo aquellos de *Quercus* y mesófilos de montaña.

De esta forma, *Sarcodon imbricatus* ha sido reconocida no sólo como una especie de amplia distribución geográfica y ecológica (ver Mapa A-1), sino también como un taxón que exhibe una gran variación macroscópica como puede observarse en la coloración y forma de basidioma, en el tamaño y forma de las escamas y en la disposición del himenio, entre otros caracteres (ver Fig. A-1a). Sin embargo, este taxón ha sido reconocido como una sola especie, la cual se caracteriza y diferencia de otras del género *Sarcodon* por presentar un sistema hifal monomítico con fibulas y esporas de contorno irregular, tuberculadas, no mayores a 9.0 μm y 6.5 μm de ancho (ver Fig. A-1b), de acuerdo con Maas Geesteranus (1956, 1960, 1971, 1975), Baird (1986a y b) y Cifuentes (1996).



Mapa A-1. Mapa de la distribución mundial de *Sarcodon imbricatus s. l.*

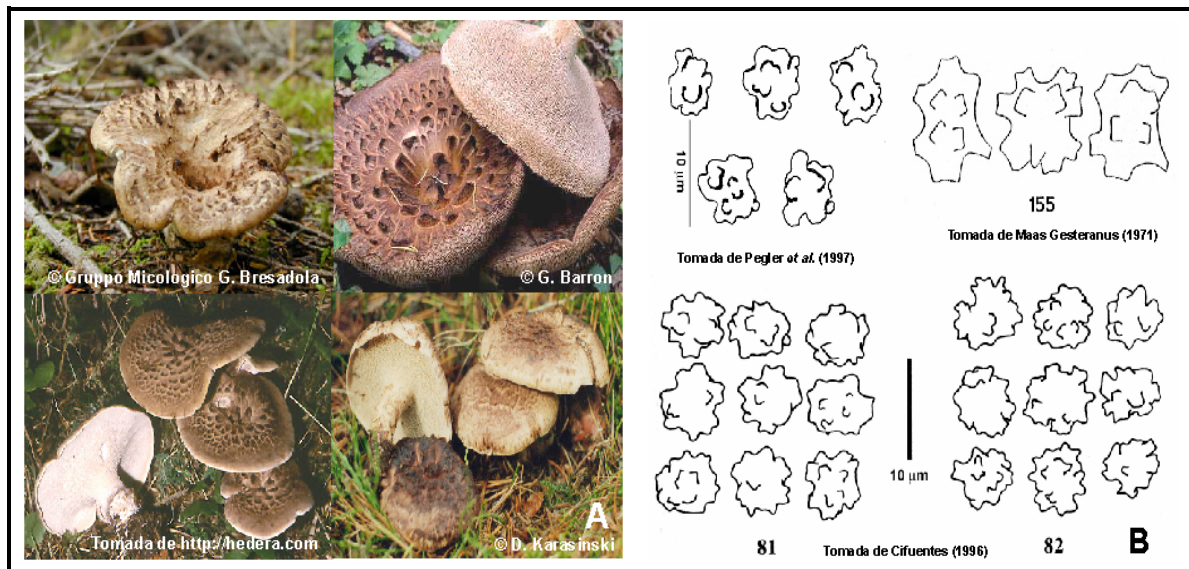


Fig. A-1 (a y b). Variación morfológica de *Sarcodon imbricatus s. l.*

No obstante, la inclusión de toda esta variación ecológica y macroscópica bajo un mismo nombre ha sido controversial y ha generado un importante debate sobre los límites taxonómicos de esta especie. Al respecto, los distintos especialistas se han dividido en dos posturas, cuya principal discrepancia se origina en el valor taxonómico que se le han asignado a los diferentes tipos de caracteres –microscópicos *versus* macroscópicos y ecológicos– en el proceso de delimitación de este taxón.

La primera de estas posturas, basada en los trabajos de Linnaeus (1753) y Fries (1821) y encabezada por autores como Maas Geesteranus (1956) y Baird (1986b), propone que *Sarcodon imbricatus* es una especie con una amplia variación macroscópica y ecológica, cuyos límites deben ser reconocidos con base en sus características microscópicas como la presencia de fibulas y la forma, talla y ornamentación de las esporas. Esta posición refleja claramente la enorme importancia que muchos micólogos han dado a este tipo de caracteres, al considerar que la variación en éstos no es afectada por condiciones ambientales como se ha supuesto para muchos caracteres macroscópicos. En este caso, la delimitación de *S. imbricatus* con base en los caracteres microscópicos ha dado lugar al empleo de un concepto amplio de especie, el cual ha sido algunas veces mejor referido como *S. imbricatus sensu lato*. Un claro ejemplo de la aplicación de este concepto puede verse en el trabajo de Maas Geesteranus (1960), quien consideró a *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. como un sinónimo taxonómico de *S. imbricatus* al señalar que ejemplares japoneses revisados por él y etiquetados como *Hydnum aspratium* Berk. no presentaban diferencias microscópicas significativas de aquellos encontrados en Europa. De igual forma, Baird (1986a y b) y Cifuentes (1996) reconocieron bajo el nombre de *S. imbricatus* a los taxones americanos estudiados por ellos, aún cuando éstos se presentaban en bosques deciduos a diferencia de aquellos registrados para Europa.

No obstante, todos estos autores dejaron abierta la posibilidad de que los taxones estudiados por ellos se trataran de especies distintas, dadas las diferencias geográficas, como lo sugirió Maas Geesteranus (1971) para el caso del taxón asiático, y ecológicas como lo hicieron Baird (1986b) y Cifuentes (1996) en relación a los taxones americanos. Incluso Baird (1986b) precisó que en tanto no se realizaran estudios de compatibilidad entre estos últimos y el europeo, la coespecificidad entre todos ellos no podría corroborarse ni refutarse del todo. Así mismo, Cifuentes (1996) consideró que era necesario abordar esta problemática desde una perspectiva filogenética para alejar cualquier duda sobre los límites taxonómicos y filogenéticos de esta especie, y particularmente sobre la identidad del taxón presente en México. No obstante, estos mismos y otros autores consideraron que era más apropiado el concepto amplio dada la evidencia actual –refiriéndose específicamente a la variación microscópica– y la falta de datos que corroboraran alguna divergencia entre los grupos que conforman a *Sarcodon imbricatus s. l.*

Por el contrario, J. Schaeffer (1767-1774), Persoon (1825), Johannesson *et al.* (1999) y Schafer (2000) han considerado a *Sarcodon imbricatus* como una especie exclusiva de bosques de *Picea* en Europa, y por lo tanto independiente del resto de los grupos ecológicamente distintos que han sido descritos dentro de *S. imbricatus s. l.* Esto evidentemente refleja el uso de un concepto de especie más estrecho que puede ser mejor referido con la connotación *sensu stricto*.

Históricamente, la primera propuesta para reconocer más de una especie dentro de lo que hoy conocemos como *Sarcodon imbricatus s. l.* fue hecha por J. Schaeffer (1767-1774), quien reconoció dos especies dentro de este grupo: una asociada típicamente a bosques de *Picea* y otro aquellos de *Pinus*. En el primer caso empleó el nombre de *Hydnum imbricatum*, en tanto que para la segunda propuso el nombre de *Hydnum squamosum* Schaeff. [non *H. squamosum* Bull. (1789) Herb. Fr. ilustración 409, *nomen dubium* e ilegítimo]. Además de las evidentes diferencias ecológicas, las láminas y descripciones hechas por Schaeffer (1767-1774) sugieren que existen importantes diferencias macroscópicas entre estos taxones (ver Fig. A-2 y Tabla A-1). Al respecto, Petersen (1976), Johannesson *et al.* (1999) y Schafer (2000) han precisado que los nombres empleados por Schaeffer (1767-1774) hacen referencia a dos taxones macroscópicamente distintos, los cuales se diferencian en que *H. imbricatum* presenta tonos cafés en el basidioma y un píleo deprimido al centro –e incluso infundibuliforme– ornamentado por escamas levantadas; en tanto que *H. squamosum* presenta un basidioma de menor tamaño con tonos rojizos y un píleo ornamentado con escamas de ápices adheridos o ligeramente levantados sólo en aquellas del centro.

Al igual que Schaeffer (1767-1774), otros autores como Persoon (1796, 1825) y Bresàdola (1932) han reconocido al menos dos especies dentro de *Sarcodon imbricatus s. l.* En primer lugar, Persoon en dos publicaciones distintas (1796 y 1825) reconoció los morfos típicos de bosques de *Picea* y de *Pinus* como especies distintas, aunque bajo los nombres de *Hydnum cervinum* Pers., e *Hydnum badium* Pers., respectivamente. Posteriormente, Bresàdola (1932) reconoció a la forma de *Picea* como *Hydnum imbricatum* –quizás considerando a *H. cervinum* como sinónimo de éste– y se refirió a la forma de *Pinus* como *H. badium*. Al respecto, Johannesson *et al.* (1999) señalaron que Bresàdola prefirió aplicar el nombre *H. badium* a esta última especie debido a que aplicó erróneamente el epíteto *squamosus* a una tercera especie del género *Sarcodon*, la cual de acuerdo con las propias ilustraciones de Bresàdola (1932) presenta tonos azules en la base del estípite y podría tratarse de *Sarcodon scabrosus* (Fr.)P. Karst., especie que comúnmente se confunde *S. imbricatus s. l.*

Otros autores que han reconocido los taxones descritos por Schaeffer (1767-1774) como especies distintas son Quélet (1886) y Karsten (1889). El primero transfirió a *Hydnum squamosum* al género *Sarcodon*

—donde previamente Karsten (1881) había transferido a *Sarcodon imbricatus*— bajo la combinación de *Sarcodon squamosus* (Schaeff.) Quél. Esta propuesta fue apoyada posteriormente por Karsten (1889).

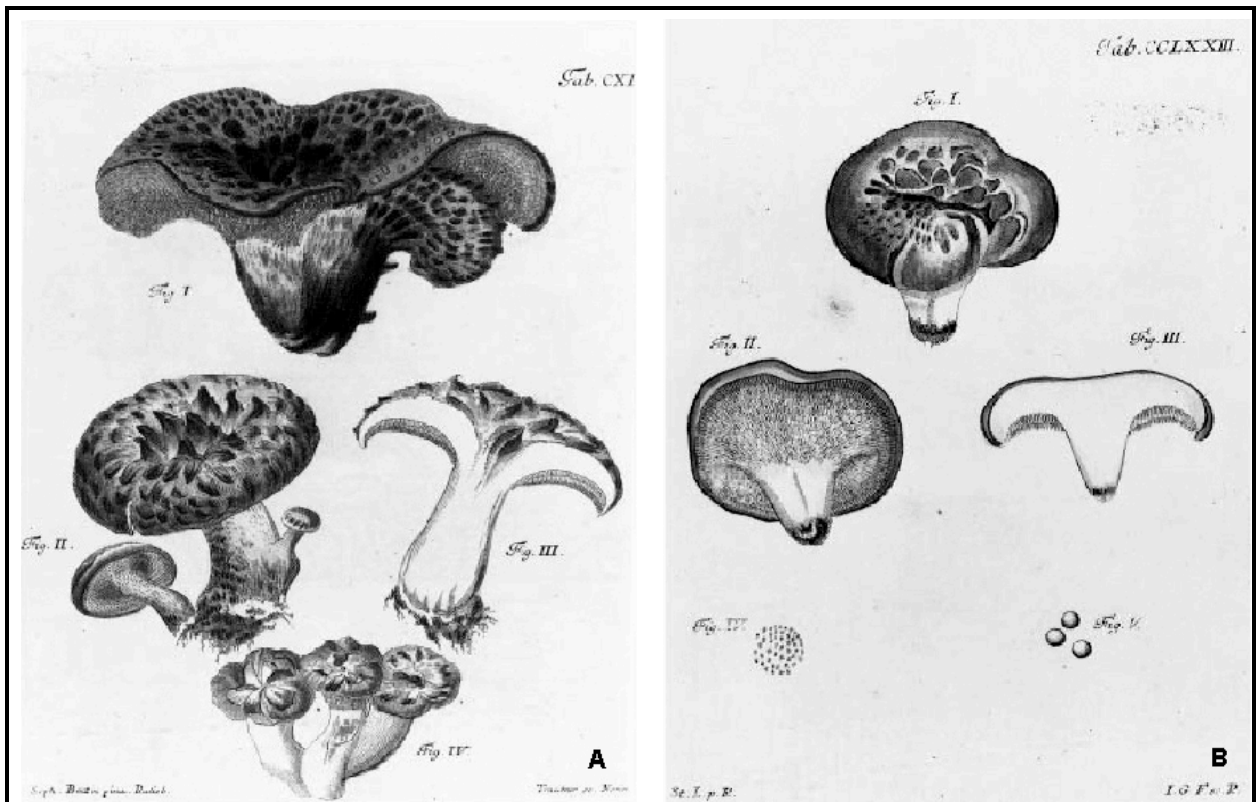


Figura A-2. Ilustraciones hechas por J. Schaeffer en “Fungorum Bavaria et Palatinatu, 1767-1774” correspondientes a *Hydnum imbricatum* (A) —Vol. II, lámina 140 (1767)— e *H. squamosum* (B) —Vol. III, lámina 273 (1770)—. Imágenes tomadas de Johannesson *et al.*, (1999).

Recientemente, Johannesson *et al.* (1999) realizaron un análisis comparativo de los fragmentos de restricción de la región de los interespaciadores ITS₁ e ITS₂ del ADN ribosomal del núcleo para los dos grupos europeos de *Sarcodon imbricatus s. l.*, y cuyos resultados apoyan la hipótesis de delimitación propuesta por Schaeffer (1767-1774). Al respecto, estos autores señalaron que además de las diferencias macroscópicas y ecológicas ya mencionadas por otros, los taxones propuestos por Schaeffer (1767-1774) —típicos de bosques de *Pinus* y de *Picea*— presentaban diferencias a nivel molecular como observaron en los patrones de bandedo y las secuencias de la región de los ITS obtenidas por ellos. Las cuales fueron idénticas entre los ejemplares de un mismo taxón, incluso entre aquellos recolectados hasta 400 km de distancia entre sí, pero distintas entre los taxones aún cuando sólo existiera una distancia de 0,3 km entre los sitios donde fueron recolectados los ejemplares de cada taxón (Johannesson *et al.*, 1999). Adicionalmente, Johannesson *et al.* (1999) y Schafer (2000) han señalado que además de todas las características antes mencionadas *Sarcodon squamosus* se caracteriza por la presencia de un pigmento azul

verdoso —aparentemente relacionado con la presencia de atromentina, ácido telefórico y dehidrogirocina— en cualquier estadio de su desarrollo y un olor agradable; en tanto que *S. imbricatus s. s.* nunca presenta dicho pigmento y además llega a despedir un olor desagradable (ver Tabla A-I para más detalles).

De esta forma, Johannesson *et al.* (1999) reconocieron a los taxones europeos como dos especies válidas e independientes bajo los nombres de *Sarcodon imbricatus* —en su sentido estricto— y *Sarcodon squamosus*, señalando a *Hydnum cervinum* e *H. subsquamosum* Basch.:Fr. como sinónimos del primero y a *H. badium* del segundo. Sin embargo, es importante mencionar que algunos de estos nombres han sido referidos como *nomen ambiguum* por Coker & Beers (1951), Maas Geesteranus (1956), Baird (1986a y b) y Cifuentes (1996), por lo que su utilización debe ser reconsiderada.

Tabla A-I Diferencias entre <i>Sarcodon imbricatus s. s.</i> y <i>S. squamosus</i>*			
Caracteres		<i>S. imbricatus s. s.</i>	<i>S. squamosus</i>
Píleo	Color	Café	Amarillo-café a vináceo
	Color de las escamas	Café	Café negruzco
	Tamaño de las escamas	Más grandes que en <i>S. squamosus</i>	Más pequeñas que en <i>S. imbricatus</i>
	Forma de las escamas	Generalmente levantadas	En el centro no levantadas o ligeramente
	Margen	Incurvado sólo cuando joven	Permanentemente incurvado
	Forma del centro del píleo	Deprimido, incluso infundibuliforme o con un hueco al centro	Ligeramente o no deprimido
Himenio	Posición	No decurrente	Ligeramente decurrente o subdecurrente
	Densidad	Espinas juntas	Espinas muy juntas
	Tamaño de las espinas	Más largas que en <i>S. squamosus</i>	Más cortas que en <i>S. imbricatus</i>
	Color de las espinas	Café	Azul grisáceo
Estipite	Tamaño	Generalmente más largo que el diámetro del píleo	Igual o más corto que el diámetro del píleo
	Forma	Cilíndrico o ligeramente bulboso en la base	Cilíndrico pero se estrecha hacia la base
	Color del contexto	Blanquecino-café	Blanquecino
	Color de la base del contexto	Concoloro con el resto del estipite	Algunas veces de color café negruzco
Otros	Olor	Algunas veces desagradable	Aromático
	Asociación vegetal	Especies de <i>Picea</i>	Especies de <i>Pinus</i>
	Longitud de los ITS	752 pb	761 pb
	Pigmento azul grisáceo	No presente en ningún estado de desarrollo	Presencia en cualquier estado de desarrollo

* Basadas en los trabajos de Johannesson *et al.* (1999) y Schafer (2000)

Si bien es cierto que el trabajo de Johannesson *et al.* (1999) ha comenzado a clarificar los límites taxonómicos entre los diferentes taxones que integran a *Sarcodon imbricatus s. l.*, dicha problemática está lejos de darse por concluida ya que aun quedan numerosas dudas por resolver como aquellas sobre los límites taxonómicos de los taxones presentes en los bosques deciduos en Europa y fuera de ésta como lo señalaron Maas Geesteranus (1971), Baird (1986b) y Cifuentes (1996) en el caso de Asia y Norteamérica.

Por otro lado, poco o nada conocemos sobre las relaciones filogenéticas entre *Sarcodon imbricatus* s. l. y el resto de las especies de este género. No obstante, Maas Geesteranus (1975) ubicó a *S. imbricatus* junto con *Sarcodon leucopus* (Pers.) Maas G. & Nannf. y *Sarcodon versipellis* (Fr.) Quéf. en la sección *Sarcodon* del género *Sarcodon* debido a la presencia de fibulas en todas ellas. Así mismo, ubicó al resto de las especies en cinco secciones más: *Scabrosi*, *Squamiceps*, *Velliceps*, *Violacei* y *Virescentes*, con base en la ausencia de fibulas y en algunos caracteres macroscópicos como el color de basidioma y la ornamentación del píleo. Desafortunadamente, ningún análisis filogenético ha abordado esta problemática y por tanto esta propuesta es hasta ahora tentativa.

En lo que respecta a la clasificación de *Sarcodon* dentro de los *Homobasidiomycetes*, las propuestas de Jülich (1981) y Stalpers (1993) son hoy en día ampliamente aceptadas. Éstas proponen incluir a éste género dentro de la familia *Bankeraceae* Donk del orden *Thelephorales* Corner ex. Obverw., junto con otros géneros de hidnoides estipitados como *Hydnellum* P. Karst., *Bankera* Coker et Beers ex Pouzar y *Phellodon* P. Karst. (Jülich, 1981; Stalpers, 1993), así como algunos otros de himenio poroide como *Boletopsis* Fayod (Stalpers, 1993). Recientemente, Larsson *et al.* (2004) exploraron las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de *Homobasidiomycetes*, con base en el análisis de las secuencias de dos regiones del ADN ribosomal, sus resultados corroboran la posición de *Sarcodon* dentro de *Bankeraceae* (ver Fig. A-3) y de ésta familia dentro del clado Teleforoide previamente definido por Hibbett *et al.* (1997). Así mismo, sugieren que *Hydnellum* es el grupo hermano de éste género, y que éstos junto con *Boletopsis*, *Bankera* y *Phellodon* forman un grupo monofilético.

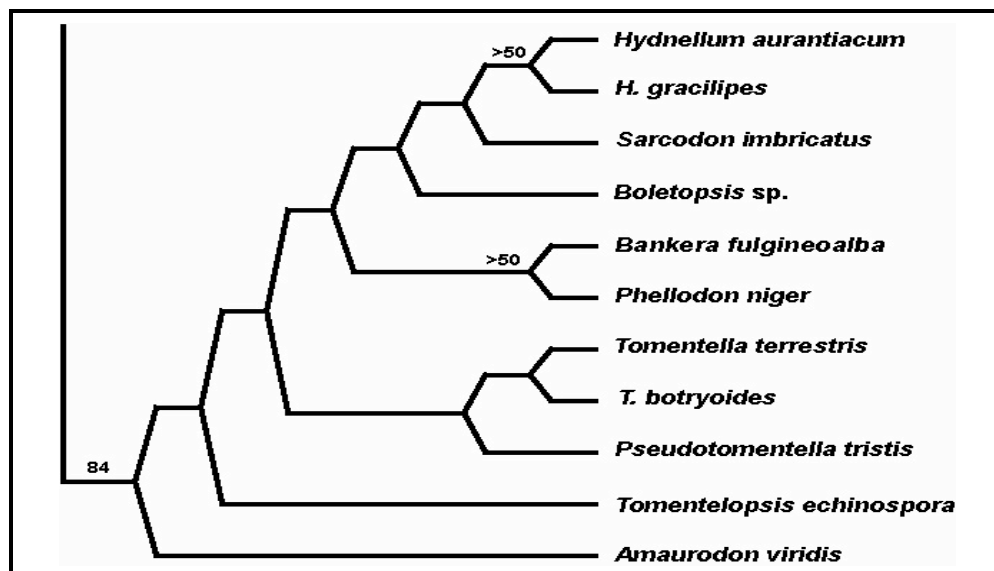


Figura A-3. Detalle del consenso estricto publicado por Larsson *et al.* (2004), donde se aprecia la posición del género *Sarcodon* en el clado Teleforoide. Nota: los valores indican los porcentajes de bootstrap.

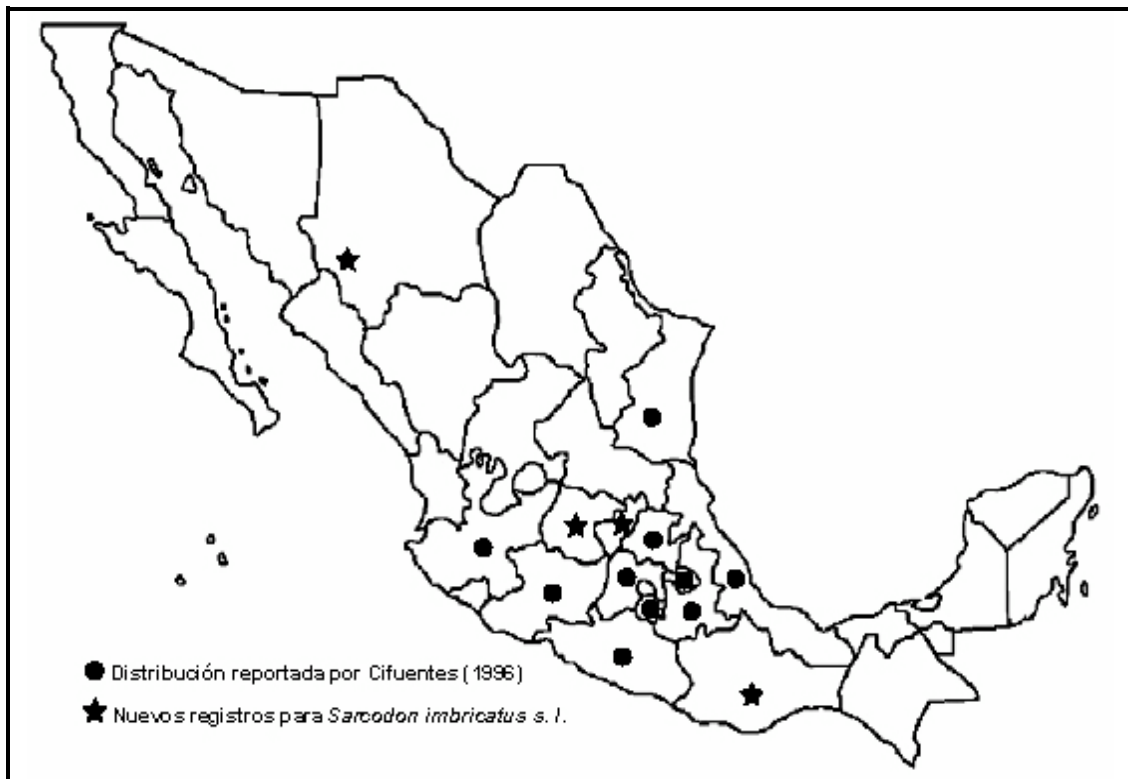
2.2 *SARCODON IMBRICATUS* EN MÉXICO

Sarcodon imbricatus —en sentido amplio— es una de las especies de hidnoides estipitados más conocidas en México, y ha sido citada desde principios de los años 60's para varias regiones templadas de nuestro país (Herrera & Guzmán, 1961; Guzmán, 1966; Guzmán, 1972; Valdés-Ramírez, 1972; Guzmán, 1977; Welden & Guzmán, 1978; Varela y Cifuentes, 1979; Mapes *et al.* 1981; Frutis & Guzmán, 1983; Martínez-Alfaro *et al.*, 1983; Guzmán & Villarreal, 1984; Garza *et al.*, 1985; Garza, 1986; Zarco, 1986; Díaz-Barriga *et al.*, 1988; Cifuentes *et al.*, 1990; Montiel *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1994). Sin embargo, el estudio taxonómico de esta especie en nuestro país no fue abordado de manera profunda sino hasta mediados de los años 90's por Cifuentes (1996), quien realizó una extensa y detallada revisión de los hidnoides estipitados presentes en México.

De acuerdo con Cifuentes (1996), la forma, ornamentación y color del píleo, la presencia de fibulas, el tamaño y ornamentación de las esporas definen bien a esta especie. En México ésta se presenta principalmente en bosques de *Pinus-Quercus*, de *Quercus* y mesófilos de montaña (Cifuentes, 1996), así como en bosques de coníferas, aunque muy raramente, como lo registró Guzmán (1977). Así mismo, Cifuentes (1996) señaló que *S. imbricatus* —en sentido amplio— es una de las especies de hidnoides estipitados de mayor distribución en México, donde se conoce de 10 estados del centro y este del país —a saber: Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz— (Cifuentes, 1996), y de 4 estados más del centro, noroeste y del suroeste —a saber: Guanajuato, Querétaro, Chihuahua y Oaxaca, respectivamente— de acuerdo con los resultados de la presente investigación (ver Mapa A-2).

Por otra parte, *Sarcodon imbricatus* — en su sentido amplio— se encuentra entre las 6 especies de hidnoides estipitados de mayor abundancia en México (Cifuentes, 1996). Lo anterior hace de ésta una especie clave para la conservación y el aprovechamiento de los bosques templados de nuestro país, ya que junto la formación de asociaciones ectomicorrizógenas juegan un papel transcendental en el establecimiento y mantenimiento de las comunidades vegetales (Cifuentes, 1996, Guzmán, 1998). Así mismo, ésta y otras especies de hidnoides estipitados ectomicorrizógenos son excelentes bioindicadores tempranos del deterioro de las comunidades vegetales ya que su declinación es un indicio de contaminación y disturbio en los suelos (Gulden & Hanssen, 1992; Gulden *et al.*, 1992, Arnolds & de Vries, 1993, Guzmán, 1994, Hawskworth, 1995). Por otra parte, esta especie es consumida en algunas partes de México (Estrada-Torres & Aroche, 1987) y en muchas otras regiones del mundo (Miller, 1980; Dähneke & Dähneke, 1982; Breitenbach & Kränzlin, 1986; Moreno *et al.*, 1986; MacKenny & Stuntz,

1987; Imazeki *et al.*, 1988), por lo que representa un importante recurso alimenticio y puede ser una buena alternativa en la dieta de las comunidades aledañas a los bosques donde crece.



Mapa A-2. Distribución actual de *Sarcodon imbricatus s. l.* en México

A pesar del avance en el conocimiento taxonómico de esta especie en nuestro país y del importante rol ecológico que juega en gran parte de los ecosistemas templados de México, aún existen dudas sobre los límites y relaciones filogenéticas del grupo mexicano de *Sarcodon imbricatus s. l.* dada la problemática taxonómica y la importancia que tienen las asociaciones vegetales en este grupo de especies. Al respecto Cifuentes (1996) señaló que si bien el taxón mexicano no presentaba diferencias morfológicas significativas en comparación con aquellos descritos por Schaeffer (1767-1774) y Johannesson *et al.* (1999) para Europa, existía la posibilidad de que se tratase de una especie distinta dadas las diferencias ecológicas, ya que en México *S. imbricatus s. l.* se presenta principalmente en bosques ricos en especies de latifoliadas —específicamente del género *Quercus*— a diferencia de sus contrapartes europeas. Incluso Cifuentes (1996) señaló que dada esta importante diferencia ecológica, era factible que existiera un cierto aislamiento, y por ende, una divergencia (molecular, genética o biológica) entre el taxón asociado a *Quercus* y aquellos asociados con grupos de coníferas. Sin embargo, este autor también apuntó que sólo un estudio de compatibilidad, como lo había sugerido Baird (1986b), o un análisis filogenético nos permitirían establecer con mayor precisión los límites taxonómicos de *S. imbricatus s. l.*, así como el papel

que juegan las asociaciones vegetales en la diversificación de las especies dentro de este grupo de hongos. Adicionalmente a la problemática anterior, el grupo mexicano de *Sarcodon imbricatus s. l.* llega a confundirse con otra especie del género *Sarcodon* que también presenta un pileo ornamentado con escamas imbricadas y fibulas. Ésta fue registrada como *Sarcodon* sp. por Cifuentes (1996), quien señaló que se trataba de otra especie distinta de *S. imbricatus* —en sentido amplio—, ya que ésta primera presentaba un pileo infundibuliforme con tonos rosados a vináceos y un himenio muy decurrente. Además, su distribución y asociación vegetal claramente la diferenciaba de *S. imbricatus* —en sentido amplio— y otras especies del género, ya que éste se presenta exclusivamente en bosques de *Abies* del centro de México. No obstante, Cifuentes (1996) señaló que estas especies podrían estar cercanamente relacionados, y por lo tanto, también incluyó a *Sarcodon* sp. en la sección *Sarcodon*. Sin embargo, las relaciones filogenéticas, e incluso los límites taxonómicos, entre estas especies aún desconocidos, lo cual podría implicar nuevas interrogantes no sólo sobre el grupo mexicano, con el cual comparte parcialmente su distribución geográfica, sino también con todos los grupos que integran a *S. imbricatus s. l.*

Hoy en día el trabajo realizado por Johannesson *et al.* (1999), y los datos aportados por estos autores, sitúan en una nueva perspectiva la problemática sobre los límites taxonómicos y las relaciones filogenéticas del taxón mexicano de *Sarcodon imbricatus s. l.*, no sólo por la importancia que tienen las características ecológicas dentro de este grupo, sino también por la distribución geográfica que presenta éste taxón. En este sentido, la presente investigación pretende contribuir a la resolución de la problemática de *S. imbricatus s. l.*, desde el punto de vista de la sistemática filogenética molecular, con la finalidad inmediata de establecer los límites taxonómicos y las relaciones filogenéticas del taxón mexicano; y por tanto, proveer de marco adecuado para el uso y conservación de este recurso en nuestro país.

2.3 EL CONCEPTO DE ESPECIE EN HONGOS

Es evidente que la problemática sobre los límites taxonómicos de *Sarcodon imbricatus* constituye un buen ejemplo de las disyuntivas que se presentan durante el proceso de delimitación de las especies en hongos, y en cualquier otro grupo de organismos. Para aproximarnos a esta problemática requerimos de un marco general de referencia, tanto teórico como metodológico, del concepto de especie en hongos y en lo general del problema del llamado concepto de especie.

En el caso de los hongos, el empleo de caracteres morfológicos —macroscópicos y/o microscópicos— u otros fenotípicos —como la presencia o ausencia de ciertos metabolitos secundarios— en el proceso de delimitación de las especies ha sido la práctica más común entre los micólogos. De hecho, las casi 100,000

especies descritas del reino *Fungi*, con muy pocas excepciones, han sido reconocidas bajo este criterio, mejor conocido como el concepto morfológico de especie (Taylor *et al.*, 2000).

Otro concepto que ha sido empleado por los micólogos es el concepto biológico de especie, que de acuerdo con Mayr (1942) y Dobzhansky (1951) considera que el aislamiento reproductivo es el elemento fundamental para la especiación, y el resto de los caracteres de una especie están subordinados a la habilidad de los individuos para entrecruzarse. Al respecto, Petersen y Hugues (1999) coinciden en que el aislamiento reproductivo y la divergencia genética son los procesos determinantes para la especiación, y que para el caso de los hongos es el que mejor se ajusta dada la complejidad de los ciclos de vida, la importancia de la reproducción clonal y la estructura de las poblaciones de estos organismos, en resumen dada su naturaleza biológica. En este sentido, el empleo de pruebas de compatibilidad o interfertilidad, realizadas a partir de cultivos monospóricos de esporas sexuales o meiosporas, son una herramienta perfecta para el reconocimiento de especies biológicas en hongos (Petersen y Hugues, 1999)

No obstante, la aplicación de uno u otro de estos conceptos en hongos ha resultado ser problemática e incluso inadecuada para el reconocimiento de grupos naturales a este nivel. En primer lugar, el concepto morfológico carece de criterios homogéneos como se deduce de las continuas polémicas derivadas de la relevancia de uno u otro tipo de característica —microscópicas *versus* macroscópicas— e inclusive de la cantidad de variación que resultaría significativa. Un claro ejemplo de esto es la problemática taxonómica de *Sarcodon imbricatus s. l.* Adicionalmente, Petersen y Hugues (1999) señalaron que el alto grado de convergencia morfológica y la plasticidad fenotípica que llega a presentarse en numerosos grupos de hongos podría propiciar un inadecuado establecimiento de los límites taxonómicos de las especies, especialmente cuando existen aquellas de tipo críptico. E incluso, muchas de las especies reconocidas bajo este concepto comprenden en muchas ocasiones más de una especie biológica o filogenética (Taylor *et al.*, 2000).

Por su parte, el empleo del concepto biológico de especie en hongos ha sido criticado con base en distintos argumentos teóricos y prácticos. En primer lugar, la aplicación de las pruebas de compatibilidad o interfertilidad sólo es posible en aquellos hongos teleomórficos heterotálicos susceptibles de ser cultivados, lo cual restringe enormemente la aplicación de este concepto entre estos organismos (Taylor *et al.*, 2000). Más allá de estas vicisitudes prácticas, Rosen (1978) señaló que la capacidad de entrecruzarse es un carácter de tipo plesiomórfico debido a que se comparte con el ancestro, y por consiguiente, de acuerdo con Taylor *et al.* (2000), existe la posibilidad de que especies hermanas puedan retener esta capacidad aun cuando sean genéticamente distintas e inclusive se encuentren aisladas geográficamente. Esta última situación no representa solamente una posibilidad teórica, ya que se han reportado varios ejemplos (ver

Anderson & Stasovski, 1992; Vilgalys & Sun, 1994; Hibbett *et al.*, 1995; Hibbett *et al.*, 1998; Isikhuemhen *et al.* 2001; Jin *et al.* 2001)

En las últimas décadas un gran número de micólogos se han pronunciado por la aplicación de un concepto filogenético de especie para el estudio de los hongos, ya que éste cumple con los criterios de universalidad, significado teórico y aplicabilidad propuestos por Hull (1997). Además, éste nos proporciona una visión más realista sobre la diversidad en este enorme grupo de organismos (Taylor *et al.*, 2000) y nos permite elaborar programas más eficientes para el uso y conservación de estos recursos, así como diseñar mejores estrategias para atacar y prevenir una gran variedad de enfermedades en plantas y animales causadas por hongos.

No obstante, la aplicación de este concepto en el ámbito micológico ha sido heterogénea ya que distintas variantes de éste han sido empleadas por los diferentes especialistas. Harrington & Rizzo (1999) reportaron que el concepto de Nixon & Wheeler (1990) era empleado por algunos micólogos y lo consideraron el más apropiado para el estudio de los hongos, ya que éste permite reconocer a las especies como el grupo más pequeño diagnosticable sin necesidad de apoyarse en el concepto de monofilia. Contrariamente, Taylor *et al.* (2000), Grube & Kroken (2000) y Kroken & Taylor (2001) se pronunciaron a favor del concepto de concordancia genealógica, el cual se basa en el concepto de coalescencia de genes desarrollado por autores como Avise *et al.* (1987) y Templeton (1989). Sin embargo, el empleo de este concepto no siempre resulta factible debido a la falta de obtención de diferentes marcadores moleculares. No obstante, la gran mayoría de los micólogos han estado empleando, implícita o explícitamente, el concepto filogenético propuesto por Mishler & Theriot (2000) y basado en los trabajos de Mishler & Brandon (1987) y Mishler & de Luna (1997), ya que este proporciona diversas ventajas teóricas y prácticas para el estudio de las especies de hongos y es por tanto preferido sobre los otros. En primer lugar, nos permite reconocer a las especies como grupos monofiléticos, los cuales son congruentes con la teoría evolutiva y deseables en la clasificación (Hennig, 1966; Farris, 1983; Mishler & de Luna 1997; Mishler & Theriot, 2000). Por otra parte, este concepto se fundamenta en el empleo de métodos filogenéticos para la delimitación de los grupos, y propone que la jerarquización de éstos a nivel de especies es un proceso independiente del primero (Mishler & Brandon, 1987), por lo que la decisión de jerarquización puede basarse en criterios prácticos como el apoyo de los clados y/o biológicos como las preferencias ecológicas (Mishler & de Luna, 1997; Mishler & Theriot, 2000). Particularmente, este último punto resulta ventajoso en el caso de los hongos, ya que se ha observado que características de importancia biológica como el grado de agresividad de los patógenos o la especialización de los hongos ectomicorrizógenos pueden ser empleadas para reconocer a grupos monofiléticos como especies.

Otro aspecto que ha enriquecido el estudio filogenético del reino *Fungi* en las últimas décadas es el análisis comparativo de secuencias de ADN (Bruns *et al.*, 1991, Mitchell *et al.*, 1995; Berbee & Taylor, 1999), y es considerado una de las herramientas más eficientes para el estudio y delimitación de las especies en hongos. Éste tipo de estudios resulta especialmente relevante en aquellos grupos donde cualquier otra fuente de caracteres es menos accesible. Al respecto, Bruns *et al.* (1991) señalaron que el empleo de este tipo de datos era indispensable en aquellos grupos de hongos que presentaban una morfología simple y un alto grado de convergencia morfológica. Además, las técnicas utilizadas para su obtención pueden ser aplicadas a cualquier gen o productos de éste y a la genética de todos los organismos (González, 1998). Particularmente, el estudio de la región de los interespaciadores del ADN ribosomal de núcleo —conocidos como ITS1 e ITS2— ha sido considerado apropiado para investigar las relaciones filogenéticas a nivel de especies, debido a las numerosas ventajas técnicas y teóricas que el empleo de esta región del genoma representa. Entre las primeras se encuentran la disponibilidad de primers universales y la obtención relativamente rápida de las secuencias a partir de minúsculas cantidades de ADN debido a que presenta abundantes copias dentro del genomas (Bruns *et al.*, 1991; Berbee y Taylor, 1999). En segundo lugar, está la alta variación observada en esta región, producto de su acelerada tasa de cambio evolutivo, la que resulta en una poderosa herramienta para la reconstrucción filogenética a este nivel de la jerarquía taxonómica (Berbee & Taylor, 1999). Sin embargo, esta región del genoma puede presentar de multiples copias parálogas, lo que puede representar algunos inconvenientes en el establecimiento de las hipótesis de homología. A pesar de esto, el potencial efecto negativo se ve atenuado por el proceso de la evolución concertada, el cual tiende a homogenizar las diferentes copias parálogas (Wendel & Doyle, 1998).

En la actualidad existen numerosos ejemplos donde el análisis comparativo de esta región y la aplicación del concepto filogenético *sensu* Mishler & Theriort han resultado exitosos como es el caso de muchos grupos de especies de agaricales (ver Vilgalys & Sun, 1994; Hibbett *et al.*, 1998; Thon & Royse, 1999; Wu *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2001; Otieno *et al.*, 2003; Vellinga, 2004;) y del orden *Thelephorales* (ver Taylor & Bruns, 1997; Johannesson *et al.*, 1999; Koljalg *et al.*, 2000; Koljalg & Dunstan, 2001; Koljalg *et al.*, 2001; Koljalg *et al.*, 2002), así como en otros grupos de hongos (Groenewald *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2001). Desde luego, esta nueva perspectiva en la investigación filogenética a nivel de especies en hongos, abre la posibilidad de abordar y clarificar la problemática taxonómica de *Sarcodon imbricatus s. l.*, y particularmente aquella relacionada con el establecimiento de los límites taxonómicos y de las relaciones filogenéticas del taxón mexicano.

Por otra parte, los avances que en este sentido puedan alcanzarse en la presente investigación tienen potencial aplicación en campos como la ecología o la conservación. En el caso del complejo de especies de *S. imbricatus* —en sentido amplio—, y particularmente en el establecimiento de los límites taxonómicos del grupo mexicano, resulta trascendental por la capacidad que este grupo de hongos tiene para formar asociaciones ectomicorrizógenas, las cuales en muchas ocasiones son indispensables para el establecimiento y mantenimiento de las especies vegetales con las que se asocian. Adicionalmente, Cracraft (2002) ha mencionado que la biología de la conservación puede verse ampliamente beneficiada con la incorporación de conceptos filogenéticos, ya que su aplicación suele proporcionar una visión más exacta sobre la diversidad de los taxones y nos permite reconocer a las especies como grupos naturales. De manera particular, el correcto establecimiento de los límites taxonómicos del grupo mexicano nos permitirá tener una visión más clara sobre la diversidad de la micobiota nacional. Ésto, en conjunto con a la información derivada de las relaciones filogenéticas, también nos brinda un marco adecuado para aplicar índices de diversidad que consideren no solamente el número de especies sino además las relaciones de parentesco entre ellas (ver Purvis *et al.*, 2005 para una discusión detallada de estas metodologías), lo puede resultar relevante para el desarrollo de proyectos de conservación de los bosques templados de México, donde este taxón se presenta.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo de tesis pretende abordar la problemática taxonómica del grupo mexicano de *Sarcodon imbricatus sensu lato* desde la perspectiva de la sistemática molecular, con la finalidad de establecer claramente los límites filogenéticos y taxonómicos de este taxón respecto a otros grupos incluidos en dicho complejo de especies, así como las relaciones filogenéticas entre todos éstos.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Obtener una hipótesis de las relaciones filogenéticas entre algunos de los grupos que tradicionalmente integran *Sarcodon imbricatus s. l.* con base en el análisis filogenético de las secuencias de las regiones interesparadores del ADN ribosomal del núcleo (ITS1, 5.8S e ITS2).
- II. Realizar un análisis crítico, con base en los resultados obtenidos del análisis filogenético, de las propuestas taxonómicas para la delimitación de *Sarcodon imbricatus s. l.* y con base en ello establecer los límites y las relaciones filogenéticas del taxón mexicano.
- III. Establecer las relaciones y límites filogenéticos, con base en los resultados obtenidos del análisis filogenético, entre los grupos europeos -*Sarcodon imbricatus sensu stricto* y *S. squamosus*- y el mexicano de *S. imbricatus s. l.*
- IV. Evaluar, en el contexto de la hipótesis filogenética obtenida, la importancia taxonómica de algunos caracteres ecológicos y geográficos que han tenido relevancia en las diferentes propuestas de delimitación de *Sarcodon imbricatus s. l.*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen los materiales, técnicas y métodos empleados para la realización del presente trabajo de tesis. Se inicia con una breve descripción de los materiales herborizados estudiados y de la revisión morfológica de los mismos. En una segunda parte, se describen las técnicas utilizadas para la obtención de los datos moleculares, así como el diseño de análisis filogenético realizado.

4.1 MATERIALES HERBORIZADOS

Para la realización del presente trabajo de tesis se revisaron 40 ejemplares herborizados, de los cuales 24 son ejemplares mexicanos de *Sarcodon imbricatus*, 12 de otras 10 especies de *Sarcodon* y 4 de los siguientes géneros de hidnoides estipitados: *Hydnellum*, *Boletopsis*, *Phellodon* y *Bankera* (ver Apéndice I). Estos ejemplares se encuentran depositados en las siguientes colecciones científicas mexicanas: Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME); Herbario del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas, UAT (TLMX); Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas, UAEM; Herbario del Instituto de Ecología A.C. (XAL), Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN (ENCB) y Herbario Micológico del Instituto de Biología, U. de G. (IBUG).

4.2 REVISIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EJEMPLARES DE HERBARIO

Durante el presente trabajo se revisaron 25 ejemplares herborizados, de los 40 arriba mencionados, empleando las técnicas convencionales en micología (Largent *et al.*, 1980; Cifuentes *et al.*, 1986; Stalpers, 1993). Estos 25 ejemplares incluyen 24 materiales mexicanos de *Sarcodon imbricatus* s. l. –18 previamente estudiados y determinados por Cifuentes (1996) y 6 más que se estudiaron y determinaron durante el presente trabajo– y un ejemplar del género *Hydnellum* (ver Apéndice I). Aunque la mayoría de estos ejemplares habían sido previamente estudiados, todos fueron sometidos a una nueva revisión morfológica con la finalidad de familiarizarse con el grupo de estudio, así como para corroborar su determinación o en aquellos casos donde era necesario identificarlos a nivel de especie. En estos últimos casos emplearon las claves taxonómicas contenidas en los trabajos de Stalpers (1993) y Cifuentes (1996).

4.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Durante el presente trabajo de tesis se procesaron los 40 ejemplares herborizados utilizando técnicas moleculares convencionales con la finalidad de obtener las secuencias de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS₁, 5.8S e ITS₂) del ADN ribosomal del núcleo de cada uno de éstos. A continuación se describen cada una de las fases –obtención del ADN genómico, amplificación de la región de los ITS y secuenciación de la misma– de este proceso, así como las técnicas empleadas durante cada una de ellas.

Es importante mencionar que antes de comenzar cualquiera de los procedimientos a continuación descritos, cada uno de los ejemplares herborizados y sus muestras correspondientes fueron etiquetados, empleando una clave que combina tanto el nombre de la especie como el nombre del colector y su número, con la finalidad de agilizar su manejo en el laboratorio (ver Apéndice II).

4.3.1 Obtención del ADN genómico

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo, en primer lugar, un protocolo de extracción de ADN modificado de aquel descrito por González & Vovides (2002); y en segundo, el protocolo recomendado para GeneClean Kit III (Bio 101[®] Systems, Q-BIOgene). En esta sección también se describen aquellas técnicas empleadas para la cuantificación y preservación de las soluciones de ADN.

a) **Extracción del ADN genómico.** Por cada ejemplar herborizado se tomó una muestra de tejido de aproximadamente 1 cm de ancho por 2 cm de largo, la cual se etiquetó con la misma clave del ejemplar correspondiente. Posteriormente, cada muestra se sumergió en una solución de hipoclorito al 5% por 10 minutos y se lavó con agua destilada estéril con la finalidad eliminar cualquier tejido u organismo contaminante como otros hongos o bacterias que se encontrasen en su superficie y evitar así cualquier contaminación en las soluciones de ADN.

Concluido el tratamiento de desinfección, cada muestra se seccionó en pequeños fragmentos que fueron puestos en un frasco estéril correctamente etiquetado con 5 ml de buffer de extracción (CTAB 2x, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20mM, NaCl 1.4 M); en seguida las muestras fueron incubadas en un baño María (PRECISION mi80) a 65°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo, la mitad de cada muestra se maceró en un mortero y el resto se conservó a -70°C para su uso posterior. A cada macerado se le agregaron 2 ml del buffer de extracción correspondiente y previamente incubado, la mezcla se repartió en varios tubos eppendorf de 1.5 ml estériles y etiquetados. En seguida, todas las muestras se incubaron nuevamente en un

baño María a 65°C pero sólo por 30 minutos para completar el proceso de lisis. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 7 500 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga (Micro Max, IEC) para separar los restos celulares de la fase acuosa, la cual se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, evitando rebasar un volumen máximo de 700 μ l, para proceder a la extracción del ADN desde esta solución.

A continuación, a cada muestra se le agregó un volumen igual de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y la mezcla se agitó suavemente por 1 minuto. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron a 12 300 rpm por 10 minutos, recuperándose nuevamente la fase acuosa en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles y evitando rebasar el volumen máximo arriba mencionado. Una segunda y tercera extracción se llevaron a cabo de la misma forma para cada una de las muestras pero esta vez empleando una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Finalizado el proceso de extracción, la fase acuosa de cada muestra, libre de otros compuestos orgánicos, se repartió nuevamente en varios tubos estériles y etiquetados, evitando rebasar un volumen máximo de 500 μ l, para iniciar el proceso de precipitación alcohólica del ADN genómico.

A cada muestra se le agregaron dos volúmenes iguales de etanol absoluto, previamente enfriado a -20°C, y un volumen, correspondiente a la décima parte del volumen original de la muestra, de una solución de acetato de sodio (NaCH₃CO₂) 6M. Posteriormente, las muestras se agitaron suavemente por algunos segundos y se dejaron precipitando a -20°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13 200 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante de cada una. El precipitado depositado en el fondo de cada tubo se lavó con 300 μ l de etanol al 80% (v/v), previamente enfriado a -20°C y las muestras nuevamente se centrifugaron a 13 200 rpm por otros 15 minutos desechándose una vez más el sobrenadante. Finalmente, los precipitados de cada muestra se secaron en un microconcentrador (Hetotrap CT 60e y Hectovac VR1, HETO-HOLTEN) a 50°C por 7 minutos, y posteriormente, se resuspendieron en 50 μ l de agua destilada estéril. Las muestras de ADN genómico de un mismo ejemplar se concentraron en un solo tubo para su posterior purificación.

b) Purificación del ADN genómico. El ADN genómico de cada ejemplar se purificó siguiendo el protocolo recomendado para GeneClean III Kit, con dos ligeras modificaciones: 1) el tiempo de contacto entre el EZ-Glassmilk® y el ADN, se extendió hasta 20 minutos en lugar de 5 minutos, y 2) durante este tiempo, las muestras se agitaron manualmente cada 5 minutos para incrementar la recuperación del ADN genómico. En todos los casos, el ADN purificado se resuspendió en agua destilada estéril.

c) Cuantificación del ADN genómico. La concentración de cada una de las soluciones de ADN genómico se calculó, en la medida de lo posible considerando los estados de degradación que presentaban las mismas, mediante la comparación visual de bandas de estas soluciones con otras muestras de ADN μ l de

concentración conocida. Para ello se emplearon 5 μ l de cada solución y se corrieron en un gel de agarosa estándar al 0.8%, utilizando bromuro de etidio como marcador.

d) **Preservación de las soluciones del ADN genómico.** Con la finalidad de evitar una mayor degradación del ADN genómico extraído y purificado, las muestras se preservaron a una temperatura de -20°C , descongelándose únicamente para ser empleadas en la amplificación de los fragmentos genómicos de interés.

4.3.2 Amplificación de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS₁, 5.8s e ITS₂

Las reacciones de amplificación se realizaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR). Éstas se llevaron a cabo bajo el protocolo recomendado para la enzima de amplificación Platinum *Pfx* (InvitrogenTM, Life Technologies), empleando los siguientes pares de “primers”: ITS₅ - ITS₂ e ITS₃ - ITS₄, diseñados por White *et al.* (1990). Por cada 25 μ l de reacción, se utilizaron entre 1 y 6 μ l de ADN genómico, según el estado de degradación y la concentración de cada muestra, 2.5 μ l de buffer 10x, 4 μ l de una solución equimolar de dNTP's 1.25 mM, 0.5 μ l de MgSO₄ 50 mM, 0.2 μ l de Platinum *Pfx* y 3 μ l de cada primer 10 μ M. Todas las reacciones se aforaron hasta 25 μ l con agua destilada estéril. En el caso de algunas reacciones se adicionaron 0.25 μ l de Enhancer PCR 10x para mejorar la calidad y eficiencia de las mismas.

Tres diferentes ciclos de amplificación se emplearon para obtener los fragmentos de todas las muestras (ver Tabla M-1). En la mayoría de las muestras, la región flanqueada por los primers ITS₂ e ITS₅ se amplificó utilizando el ciclo C-A. En tanto que la amplificación del fragmento flanqueado por los “primers” ITS₃-ITS₄, se llevó a cabo por alguno de los ciclos C-B o C-C.

Tabla M-1. Ciclos empleados para la amplificación de la región de los ITS.			
Ciclo	C-A	C-B	C-C
Desnaturalización inicial	94°C / 3 min.	94°C / 3 min.	96°C / 5 min.
Número de Ciclos	30-35 ciclos	30-35 ciclos	30 ciclos
Desnaturalización °C/T	94°C / 15 seg.	94°C / 30 seg.	96°C / 1 min.
Alineamiento °C/T	50°C / 30 seg.	50°C / 30 seg.	55°C / 1 min.
Extensión °C/T	68°C / 1 min.	68°C / 1 min.	72°C / 2 min.
Extensión final /Tiempo	68°C / 7 min.	68°C / 7 min.	72°C / 7 min.
Termociclador	Techne (Genius)	Perkim-Elmer 480	Perkim-Elmer 480

Al término de cada ciclo de amplificación, los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, empleando bromuro de etidio como marcador, y su tamaño se calculó por la comparación visual de éstos

con una muestra de ADN digerido por EcoRI/Hind III (Aldrich-Sigma). La purificación de los productos y la concentración de sus soluciones se realizaron con los protocolos arriba descritos para cada uno de los procesos.

4.3.3 Secuenciación de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS₁, 5.8S e ITS₂

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo siguiendo los protocolos recomendados para los kits de secuenciación cíclica Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) o ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). A continuación se describe cada uno de ellos.

a) **Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit.** Dos diferentes volúmenes de reacción, 20 y 10 μ l, se emplearon para llevar a cabo las reacciones de secuenciación con este kit. En el primer caso, y siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante, las reacciones se llevaron a cabo en 20 μ l empleando entre 100 y 180 ng de producto, 1 μ l de primer 10 μ M, 7 μ l de Thermo Sequenase Premix y agua destilada estéril para aforar. En el segundo caso, las reacciones se llevaron a cabo en 10 μ l empleando la mitad de los volúmenes recomendados para la Thermo Sequenase Premix –es decir, 3,5 μ l– y el agua destilada estéril, manteniendo sin modificación los volúmenes de las soluciones del primer y del producto de amplificación. Dado la economía y los excelentes resultados obtenidos en el segundo protocolo, la mayoría de las muestras se procesaron bajo éste. Independientemente del volumen, todas las reacciones fueron puestas en una termocicladora Perkin-Elmer 480 bajo las siguientes condiciones de secuenciación cíclica: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 3 minutos seguido por 25 ciclos, cada uno de los cuales consistió en un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, un alineamiento a 45°C por 15 segundos y una extensión a 60°C por 1 minuto.

Una vez concluido el programa de secuenciación, las reacciones se transfirieron a un tubo eppendorf estéril para ser purificadas. A cada muestra se adicionaron 7 μ l de acetato de amonio (7.5 M) y 68 μ l de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C, colocándose en hielo por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos, y al término se desechó el sobrenadante de cada una. Posteriormente, las muestras se lavaron con 300 μ l de etanol al 70% (v/v), y nuevamente se centrifugaron a 12 000 rpm por otros 15 minutos. Por último, se desechó el sobrenadante y el precipitado de cada muestra se secó a 50°C por 5 minutos.

Las muestras ya purificadas se resuspendieron con 3,8 μ l de buffer “formamide loading dye” y se desnaturalizaron a 70°C por 2 minutos. En seguida, se corrieron en un gel de acrilamida al 5% en un

secuenciador automatizado modelo ABI 373A (Perkin-Elmer). Los resultados se analizaron con el programa Sequencing Analysis 3.0 (Applied Biosystems).

b) Protocolo de secuenciación para Big Dye Premix Kit. Las reacciones de secuenciación empleando este kit se llevaron a cabo bajo un protocolo modificado de aquel recomendado por el fabricante, y el cual a continuación se describe. Por cada 20 μ l de reacción se utilizaron entre 15 y 25 ng de producto, 1 μ l de primer 10 μ M, 2 μ l de Big dye Premix y se aforó con agua destilada estéril. En algunos casos, se adicionaron 4 μ l de betaína por reacción, con el fin de disminuir el ruido observado en la señal de algunas muestras causado por la estructura secundaria o la composición de bases que las secuencias de éstas presentaban.

Todas las reacciones fueron puestas en una termocicladora modelo Tpersonal (Whatman Biometra) bajo las siguientes condiciones de secuenciación cíclica: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 3 minutos seguido de 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en un ciclo de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, un alineamiento a 50°C por 20 segundos y uno de extensión a 60°C por 3 minutos.

Una vez concluido el programa de secuenciación, las reacciones se transfirieron a tubos eppendorf estériles para ser purificadas. A cada una de las muestras se le adicionaron 80 μ l de isopropanol al 75% (v/v), y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13 200 rpm por 15 minutos, y se desechó el sobrenadante de cada una. Posteriormente, las muestras se lavaron con 200 μ l de etanol al 70% (v/v), y se centrifugaron nuevamente a 13 200 rpm por otros 15 minutos. Por último, se desechó el sobrenadante y el precipitado de cada muestra se secó a 50°C por 5 minutos.

Las muestras ya purificadas se resuspendieron en 20 μ l de buffer "formamida high dye" y se desnaturalizaron a 96°C por 5 minutos. En seguida, éstas se corrieron en un secuenciador automatizado de capilar modelo ABI 310 (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron con el programa ABI PRISM 310 Collection 3.0.0 versión 1.3.0.0 (Applied Biosystems).

4.3.4 Edición de las secuencias

Las secuencias obtenidas para cada ejemplar se editaron y ensamblaron empleando los programas EditView 1.0 (ABI PRISM, Perkin-Elmer 1990-1996) y SeqPup 0.6 ©1990 - 1996 Gilbert D. G. y posteriormente, cada una de las secuencias editadas completamente se incorporaron sin alinear a matriz de datos.

4.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las relaciones filogenéticas dentro de *Sarcodon imbricatus sensu lato* fueron investigadas con base un análisis filogenético basado en las secuencias de la región de los espaciadores internos (ITS₁, 5.8S e ITS₂) del ADN ribosomal del núcleo, con la finalidad de descubrir los límites filogenéticos y taxonómicos entre los diferentes grupos europeos y mexicanos que forman parte de este complejo de especies. En términos generales, el presente análisis se llevó a cabo en los cuatro fases: 1) muestreo taxonómico, 2) alineamiento de las secuencias de la región de los ITS, 3) búsqueda de árboles por el método de máxima parsimonia y 4) pruebas de robustez, las cuales serán descritas a detalle en los siguientes párrafos.

4.4.1 Muestreo Taxonómico

El muestreo taxonómico incluyó 31 ejemplares como grupo interno y 14 como posibles grupos externos, los cuales suman un total de 45 OTU's. La selección de éstos se realizó considerando tanto el marco teórico precedente como la pregunta de interés, y en el caso del grupo externo se tomó en cuenta la propuesta de Nixon y Carpenter (1993) que sugiere la inclusión de varios grupos externos con la finalidad de evitar conclusiones erróneas sobre la monofilia del grupo de interés. Adicionalmente, en todos los casos se consideraron aquellos aspectos relacionados con la disponibilidad de ejemplares herborizados y su condición física y/o curatorial.

En el caso del muestreo del grupo interno, éste se realizó considerando tanto los representantes del taxón mexicano de *Sarcodon imbricatus sensu lato* como representantes de Europa y Asia, con la finalidad de abarcar la mayor variación morfológica, ecológica y geográfica exhibida por este taxón.

En primer lugar, el muestreo taxonómico incluyó 18 ejemplares mexicanos de *Sarcodon imbricatus s. l.*, los cuales se seleccionaron con base en los siguientes criterios: a) distribución geográfica, b) tipo de vegetación de procedencia y c) variación macromorfológica, con la finalidad de representar la variación que exhibe dicho taxón en México (ver Tabla M-2 , Mapa M-1 y Apéndice III). Las secuencias de estos ejemplares fueron obtenidas durante el presente trabajo de tesis.

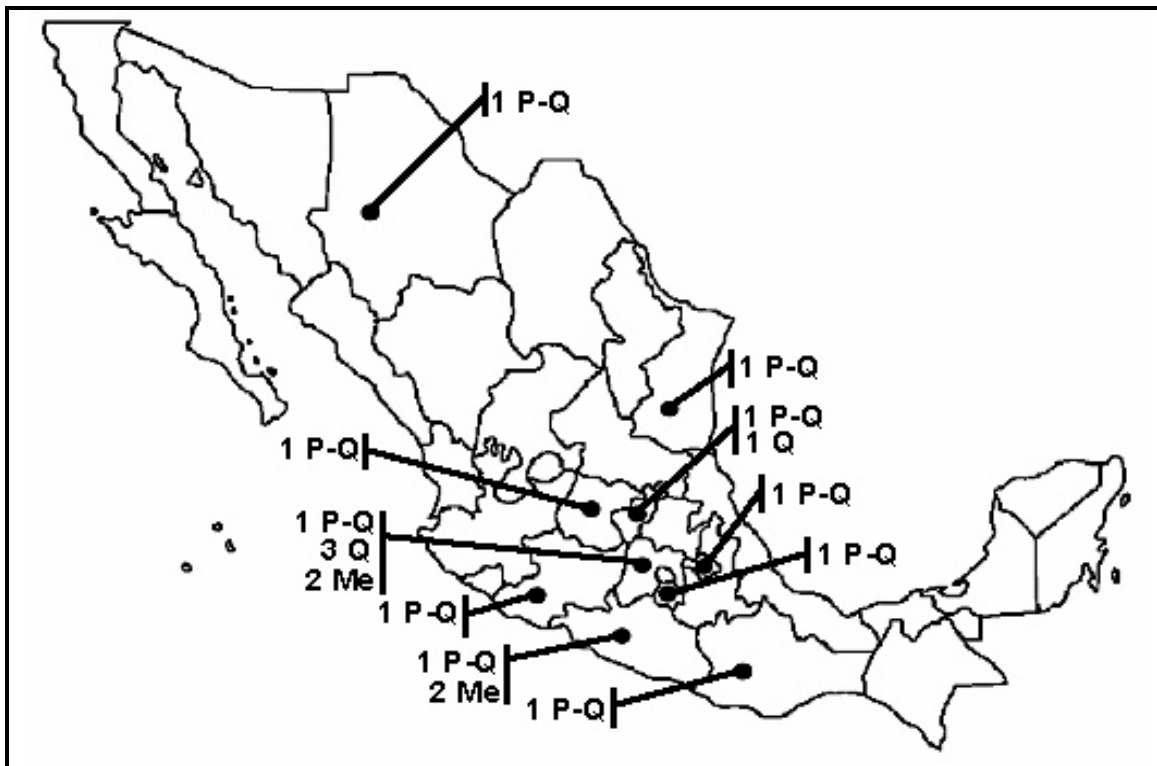
En este punto es importante mencionar que el muestreo del grupo mexicano de *Sarcodon imbricatus s. l.* no incluyó ningún ejemplar de bosques de *Pinus*, específicamente de *P. patula*, a pesar de que se contaba con ejemplares de este tipo de vegetación –identificados con las siguientes claves: Si-Vre2789 y Si-Vre1575–, debido a que no se logró obtener las secuencias de la región de interés en ninguno de estos casos

(ver Apéndice I y II, y Resultados págs. 31-34). Sin embargo, los ejemplares incluidos representan en gran medida la variación ecológica y morfológica descrita por Cifuentes (1996) para este taxón en México.

Por otra parte, el muestro del grupo interno incluyó otros 13 OTU's que corresponden a 5 ejemplares de *Sarcodon imbricatus sensu stricto*, 7 de *Sarcodon squamosus* y 1 de *Sarcodon aspratus*, los cuales han sido considerados como coespecíficos del grupo mexicano por Cifuentes (1996) y forman parte de *Sarcodon imbricatus s. l.* (ver Tabla M-2), y cuyas secuencias de la región de los ITS fueron obtenidas del GenBank.

Nombre Científico	Procedencia Geográfica	Tipo de vegetación	No de GenBank	No. de ejemplares
<i>S. imbricatus s. l.</i>	México	Bosque de coníferas ^{1*}	-----	1
<i>S. imbricatus s. l.</i>	México	Bosque de <i>Pinus-Quercus</i>	-----	8
<i>S. imbricatus s. l.</i>	México	Bosque de <i>Quercus</i>	-----	5
<i>S. imbricatus s. l.</i>	México	Bosque mesófilo	-----	4
<i>S. imbricatus s. s.</i>	Suecia	Bosque de <i>Pinus</i>	AF103885-89	5
<i>S. squamosus</i>	Suecia	Bosque de <i>Picea</i>	AF103890-96	7
<i>S. aspratus</i>	Corea del sur	Bosque de coníferas ^{2*}	AF335110	1
Total				31

^{1*} Datos de vegetación no confirmados.



Mapa M-1. Localización geográfica y tipos de vegetación de los grupo internos mexicanos.
 Nota: para cada estado se señalan los números de ejemplares por vegetación, la cual está dada en clave: C= coníferas, P-Q= *Pinus-Quercus*, Q= *Quercus*, y Me= mesófilo de montaña.

Por su parte, el grupo externo incluyó un total de 14 OTU's que se distribuyen de la siguiente manera: 8 ejemplares de posibles grupos externos cercanos y 6 de posibles lejanos (Tablas M-3 y M-4). Las secuencias de la mayoría de estos grupos se obtuvieron durante el presente trabajo de tesis, y unas pocas del GenBank. En el caso del grupo externo cercano, la selección de los OTU's se realizó considerando la división infragenérica propuesta por Maas Geesteranus (1975) para *Sarcodon*, la cual divide en 6 secciones al género. De esta forma, el muestreo de este grupo incluyó 8 ejemplares de otras 8 especies del género *Sarcodon* – a saber: *S. leucopus*, *S. versipellis*, *Sarcodon sp.* descrita por Cifuentes (1996), *S. piperatus* Coker in Maas G., *S. fulgineoviolaceus* (Kalchbr. in Fr.) Pat., *S. atrovirides* (Morgan) Banker, *S. scabripes* (Peck) Banker y *S. scabrosus*— distribuidas en 5 de las 6 secciones de éste (ver Tabla M-3). En este punto es importante mencionar que aún cuando se había considerado incluir a *Sarcodon modestus* (Snell & Dick) Baird y *Sarcodon lepidus* Maas G., especies de las secciones *Squamiceps* y *Scabrosi* respectivamente, en el muestro del grupo externo, ésto no fue posible debido a que no se logró obtener las secuencias de interés para estas especies (ver Resultados págs. 31-34).

Sección	Especies representantes	Clave del ejemplar	No. de ejemplares
<i>Sarcodon</i>	<i>S. leucopus</i>	Sleu-C3440	1
	<i>S. versipellis</i>	Sver-C2947	1
	<i>Sarcodon sp.</i>	Snov-C3031	1
<i>Velliceps</i>	<i>S. piperatus</i>	Spi-C3751	1
<i>Violacei</i>	<i>S. fulgineoviolaceus</i>	Sfv-C3272	1
<i>Virescentes</i>	<i>S. atrovirides</i>	Satro-CT95-150	1
	<i>S. scabripes</i>	Ssci-C3458	1
<i>Scabrosi</i>	<i>S. scabrosus</i>	Ssca-S205	1
Total			8

Género	Especies representantes	Clave del ejemplar	No. de ejemplares
<i>Hydnellum</i>	<i>H. conrescens</i>	Hydne-Co2-185	1
	<i>H. aurantiacum</i>	AF351866	1
	<i>H. diabolus</i>	AF351863	1
	<i>H. geogenium</i>	AF351868	1
<i>Phellodon</i>	<i>P. excentrimexicana</i>	Phexmex-Co1-286	1
	<i>P. melaleucus</i>	AY228355	1
Total			6

En el caso del grupo externo lejano, la selección de los OTU's se realizó considerando los resultados obtenidos por Larsson *et al.* (2004), quienes sugieren que el género *Hydnellum* es grupo hermano de

Sarcodon y que ambos están dentro de la familia *Bankeraceae* (ver Fig. A-3 en la sección de Antecedentes). De esta forma, el grupo externo lejano incluyó 6 OTU's que comprenden 4 especies del género *Hydnellum* —a saber: *H. concrescens* (Pers.) Banker, *H. aurantiacum* (Batsch: Fr.) P. Karst., *H. diabolus* Banker e *H. geogenium* (Fr.) Banker— y 2 de *Phellodon* —a saber: *P. excentrimexicana* Baird y *P. melaleucus* (Fr.:Fr.) P. Karst.— (ver Tabla M-4). Aunque también se habían considerado en el muestreo taxonómico del grupo externo otras dos especies de los géneros *Bankera* y *Boletopsis* —a saber: *Bankera* sp. 1 nov. registrada por Cifuentes (1996) y *Boletopsis leucomelaena* (Pers.) Fayod— su inclusión no fue posible debido no se logró obtener las secuencias de éstas por causas similares a las mencionadas en los casos anteriores (ver Resultados pág. 31 - 34).

4.4.2 Alineamiento de las secuencias

Se realizaron varias estrategias de alineamiento múltiple dado que las 45 secuencias disponibles –28 obtenidas durante el presente trabajo y 17 del GenBank (ver Resultados pág. 33)– presentaron importantes diferencias en longitud, particularmente entre el grupo interno y el externo. Inicialmente las secuencias se alinearon tanto en Clustal X v. 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) como en el programa Partial Order Alignment o POA (Lee *et al.*, 2002), el cual había mostrado dar buenos resultados para otras matrices con un grado semejante de variación (Vellinga, 2004). Adicionalmente, las secuencias también se intentaron alinear en Malign[©]1996-2000 W. Wheeler & Gladstein. No obstante, ninguna de estas estrategias resultó satisfactoria ya que los alineamientos presentaban numerosos sitios alineados ambiguamente, incluso después de realizar un fuerte ajuste manual.

Considerando los resultados anteriores se implementaron otras dos estrategias de alineamiento. La primera, denominada InG-1-OutG, consistió en el alineamiento progresivo y sólo de menor ambigüedad de los grupos externos con el objetivo de minimizar los conflictos de alineamiento que se presentaron entre éstos y el grupo interno. El primer paso de esta estrategia consistió en alinear sólo los OTU's del grupo interno –conformado por 32 secuencias–, y en un segundo paso, se alinearon uno a uno los grupos externos, descartando aquellos que produjeran una menor correspondencia entre los sitios alineados y un mayor número de posiciones alineadas ambiguamente. Cada uno de estos alineamientos se llevó a cabo en Megalign 3.02 (Lasergene, DNASTAR Inc.) empleando los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: inserción de gaps igual a 30 y longitud de gaps igual a 10; y de alineamiento pareado: ktuple igual a 30 y inserción de gaps igual a 10. Estos valores se seleccionaron después de realizar varios ensayos de alineamiento y de considerar aquella combinación de valores o costos que produjo mejores resultados.

En una segunda estrategia, llamada POA-RCx, todas las secuencias disponibles se alinearon en POA (Lee *et al.* 2002), empleando una matriz de parámetros Blosum 80; y posteriormente se realinearon en Clustal X v. 1.8 (Thompson *et al.* 1997) bajo los siguientes parámetros: “opening gaps” igual a 50 y “extension penalties” igual a 25. Esta segunda estrategia se realizó con la finalidad de incluir a todos los OTU’s y no sesgar nuestros resultados.

Finalmente, cada una de las matrices resultantes de las estrategias InG-i-OutG y POA-RCx –M₃₈ y M₄₅, respectivamente– se ajustaron manualmente en MacClade 4.05 (Maddison & Maddison, 2002) y se editaron excluyendo tanto las regiones alineadas ambiguamente y los extremos del gen como los caracteres no informativos y constantes, con la finalidad de que cada una de las matrices sólo incluyeran los caracteres informativos y pudiesen ser empleadas en las diferentes estrategias de búsqueda.

4.4.3 Búsqueda de los árboles más parsimoniosos

La búsqueda de árboles se realizó empleando el criterio de parsimonia. Inicialmente se llevaron a cabo dos tipos de búsqueda no exactas, una heurística y otra multiratchet para la matriz M₄₅ (ver Tabla R-3 y R-4, y págs. 36-38 en Resultados), con la finalidad de seleccionar la estrategia más eficiente para evaluar el universo de árboles. En ambas estrategias se realizaron 10 000 réplicas heurísticas, tratando a los caracteres informativos como igualmente pesados y no ordenados, y a los indels como datos faltantes (?). Los resultados de estas primeras búsquedas permitieron seleccionar a la estrategia multiratchet como la más adecuada, ya que permite explorar un mayor número de islas del universo de árboles y de evitar óptimos locales, como lo sugirieron Nixon (1999) y Sikes & Lewis (2001).

Considerando lo anterior, se llevaron a cabo búsquedas “multiratchet” para ambas matrices, M₃₈ y M₄₅ (ver Tabla R-3 y R-4, y págs. 36 -38 en Resultados), empleando PaupMacRatchet (Sikes & Lewis, 2001) y PAUP* 4.ob10/Altivec (Swofford, 2002). Cada búsqueda multiratchet comprendió 20 búsquedas ratchet sucesivas, cada una con 500 iteraciones. En cada iteración se pesó aleatoriamente el 15% de los caracteres incluidos y se realizaron 1,000 réplicas heurísticas bajo los siguientes parámetros: random sequence addition, TBR como algoritmo de rearreglo de ramas y ACCTRAN como algoritmo de optimización. El valor de MaxTrees se limitó a 1,000 árboles por réplica con la finalidad de reducir el tiempo computacional empleado y aumentar el poder de búsqueda (DeBry & Olmstead, 2000). Los caracteres informativos parsimoniosos, únicos que se incluyeron, se trataron como no ordenados e igualmente pesados y los indels o gaps se codificaron como datos faltantes (?). Aunque también se consideró codificar a los gaps o indels como quinto estado (5° edo), esta opción se descartó al observar que el número de sitios informativos se

incrementó de manera dramática, lo cual podría ser mas el resultado de un incremento artificial que la verdadera adición de información (González, 1996).

Al finalizar la búsqueda multiratchet se requirió purgar los archivos “.tree”, generados por cada búsqueda ratchet, para eliminar los árboles menos parsimoniosos y sólo mantener aquellos más parsimoniosos encontrados en cada uno de estos archivos. Posteriormente, los árboles más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda multiratchet de cada una de las matrices M₃₈ y M₄₅ fueron orientados utilizando a *Hydnellum aurantiacum* e *Hydnellum concrescens* y a *Phellodon excentrimexicana* y *Phellodon melaleucus* como grupos externos operacionales, respectivamente. Por último, se construyó un consenso estricto para cada uno de los grupos de árboles más parsimoniosos resultantes del análisis de las distintas matrices.

4.4.4 Evaluación de las hipótesis

Los resultados obtenidos en cada búsqueda se evaluaron mediante dos pruebas de soporte de clados: un análisis de bootstrap y otro de jackknife. En primer lugar se realizó un análisis de Bootstrap (Felsenstein, 1985) con 10,000 réplicas, en cada una de las cuales se remuestreó 100% de los caracteres y se llevaron a cabo 10 réplicas heurísticas bajo las siguientes condiciones: random sequence addition, TBR como algoritmo de rearreglo de ramas, ACCTRAN como algoritmo de optimización y el valor de MAXTREE se limitó a 1000 con la finalidad de reducir el tiempo de computo empleado y permitir un mayor número de réplicas para evitar una subestimación del soporte de los clados (DeBry & Olmstead, 2000). En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis de Jackknife (Mueller & Ayala, 1982) bajo las mismas condiciones de búsqueda que el análisis de Bootstrap pero removiendo en el 50% de los caracteres. Ambos análisis se llevaron a cabo en PAUP* 4.obio/Altivec (Swofford, 2002).

5. RESULTADOS

En la presente sección se describen los resultados obtenidos tanto en el trabajo de laboratorio como en los análisis filogenéticos realizados; además se detallan brevemente los resultados de la revisión morfológica de los ejemplares.

5.1 REVISIÓN MORFOLÓGICA

En lo que respecta a los resultados obtenidos de la revisión morfológica, el ejemplar del género *Hydnellum*, con clave Hydne-C02-185, se determinó como *Hydnellum concrescens*, en tanto que para los restantes 24 ejemplares se confirmó o se determinó su identidad como *Sarcodon imbricatus s. l.* En conjunto, estos últimos materiales coinciden con la descripción hecha por Cifuentes (1996) para esta especie en México y no distan sustancialmente de aquellas realizadas por Maas Geesteranus (1971) y Baird (1986a) para este mismo grupo. No obstante, los ejemplares revisados de *S. imbricatus* presentaron una amplia variación en la forma y ornamentación del píleo, así como diferencias en la forma del estípite. Por ejemplo, la forma del píleo va desde convexa a plana con el centro deprimido o umbilicado hasta infundibuliforme, mientras que las escamas pueden presentar o no el ápice levantado, además de que pueden variar ampliamente en su coloración y distribución sobre el píleo. Por su parte, la forma del estípite va desde cilíndrico hasta bulboso en la base y llega a presentar una amplia gama de coloraciones.

5.2 DATOS MOLECULARES

Los resultados obtenidos en este rubro son descritos a continuación, comenzando con aquellos relacionados con la obtención de las secuencias de la región del ADN ribosomal de interés (ITS1 e ITS2). Así mismo se describen algunos datos obtenidos a partir de un análisis de la variación y composición de las secuencias.

5.2.1 Obtención de las secuencias de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS1, 5.8S e ITS2

En lo que se refiere a la extracción del ADN, éste se logró extraer y purificar de cada uno de los 40 ejemplares herborizados empleados en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, todas las muestras presentaron signos de degradación, como lo revelaron los barridos observados en los geles de

electroforesis. Al parecer, ésto es una consecuencia de la herborización, ya que durante este proceso las cadenas de ADN pueden fragmentarse tanto por la acción de factores físicos como biológicos. Adicionalmente, el uso de diversas sustancias para el control de plagas puede degradar aun más el ADN.

En términos generales, las muestras de ADN obtenidas durante el presente trabajo de tesis pueden ser divididas en tres categorías cualitativas de acuerdo con el grado de degradación que exhibían: 1) *Poco degradado*, cuando las muestras –a saber: 9 muestras– presentaban una banda de fragmentos de alto peso molecular claramente definida acompañada de ligero barrido de fragmentos de bajo peso molecular; 2) *Medianamente degradado*, cuando las muestras –a saber: 22 muestras– presentaban un barrido que incluía tanto fragmentos de ADN de alto como bajo peso molecular en concentraciones similares; y c) *Altamente degradado*, cuando las muestras –a saber: otras 9 muestras– presentaban un barrido que sólo incluía fragmentos de bajo peso molecular.

A pesar de las pésimas condiciones en que se encontraba el ADN genómico de la mayoría de las muestras, la región de los ITS (ITS₁, 5.8 e ITS₂) del ADN ribosomal del núcleo se logró amplificar y secuenciar con éxito para 28 ejemplares –19 del grupo interno y 9 del externo– de los 40 propuestos en el muestreo taxonómico (ver Tabla R-1). La mayoría de estas secuencias comprende en su totalidad la región de los ITS, y sólo aquellas pertenecientes a los ejemplares Si-VO242, Spi-C3751 e Hynde-C2002-185 presentaron un déficit en la secuenciación del ITS₂ de aproximadamente 50, 30 y 100 pb, respectivamente (ver Tabla R-1). Los restantes 12 ejemplares –6 del grupo interno y 6 del externo– presentaron diversas dificultades que impidieron la secuenciación completa de la región de los ITS o bien la obtención de sus secuencias (ver Tabla R-1).

Un primer caso es el que se presentó en los ejemplares mexicanos de *Sarcodon imbricatus s. l.* con clave Si-G26063, Si-GoPo50878 y Si-Vre1575, de los cuales sólo se logró obtener la región flanqueada por el par de “primers” ITS₅-ITS₂ –es decir, el ITS₁–, ya que en ambos casos se observó la presencia de dos productos alternativos para la región flanqueada por el par de “primers” ITS₃-ITS₄. Este hecho fue sugerido, en primera instancia, por la señal obtenida en los electroferogramas correspondientes –donde se observan numerosas ambigüedades después de las 210 pb para Si-G26063 y de las 120 pb para Si-GoPo50878 y Si-Vre1575– y posteriormente confirmado por la observación de dos bandas de tamaño similar en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en cada caso. La naturaleza precisa de estos productos es desconocida ya que no fue posible emplear técnicas de clonación en el presente trabajo, pero existe la posibilidad de que se traten de copias alternativas de esta región del genoma como se ha observado en otras especies de hongos (Bruns, 2001; Ko & Jung., 2002).

Tabla R-1. Relación de las secuencias obtenidas

	Nombre Científico	Clave del ejemplar			Secuencias			
					C	L	P/N	L
Grupo interno	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-VO242	Edo. Mex	B. de <i>Quercus</i>	✓	706*		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-VO502	Chihuahua	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	718		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-M202	Oaxaca	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	743		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-C2957	Edo. Mex	B. mesófilo	✓	749		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-PL160782	Guerrero	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	749		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-S509	Guanajuato	B. de <i>Quercus</i>	✓	749		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-C3048	Edo. Mex	B. mesófilo	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-PR2716	Querétaro	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-PR643	Guerrero	B. mesófilo	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-M42	Michuacán	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-C3586	Edo. Mex	B. de <i>Quercus</i>	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-S197	Edo. Mex	B. de <i>Quercus</i>	✓	751		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-ET3414	Tlaxcala	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	752		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-H484	Tamaulipas	B. coníferas	✓	752		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-Cao2	Edo. Mex	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	752		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-C2612	Guerrero	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	752		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-Mor1304	Morelos	B. <i>Pinus-Quercus</i>	✓	753		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-PC57	Querétaro	B. de <i>Quercus</i>	✓	753		
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-G26063	Michoacán	B. <i>Pinus-Quercus</i>			*p	450
	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-GoP050878	Edo. Mex	B. <i>Pinus-Quercus</i>			*p	326
<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-Vre1575	Veracruz	B. de <i>Pinus patula</i>			*p	327	
<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-Vre2789	Veracruz	B. de <i>Pinus patula</i>			*n	---	
<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-GD3449	Jalisco	B. <i>Pinus-Quercus</i>			*n	---	
<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-Rdz350	Jalisco	B. de <i>Quercus</i>			*n	---	
<i>Total</i>					18		6	
Grupo externo	<i>Sarcodon</i> sp.	Ssp-C3031			✓	729		
	<i>S. leucopus</i>	Sleu-S204					*n	---
	<i>S. leucopus</i>	Sleu-C3440			✓	707		
	<i>S. scabrosus</i>	Ssca-S205			✓	676		
	<i>S. scabrosus</i>	Ssca-C3275					*n	---
	<i>S. fulgineoviolaceus</i>	Sfv-C3272			✓	684		
	<i>S. piperatus</i>	Spi-C3751			✓	647*		
	<i>S. atroviridis</i>	Satro-CT95-150			✓	638		
	<i>S. modestus</i>	Smod-N80					*n	---
	<i>S. versipellis</i>	Sver-C2947			✓	749		
	<i>S. lepidus</i>	Slep-V1115					*n	---
	<i>S. scabripes</i>	Ssci-C3458			✓	740		
	<i>Hydnellum conrescens</i>	Hydne-C02-185			✓	643*		
	<i>Boletopsis leucomelaena</i>	Bolepleu-VO2884					*n	---
<i>Phellodon excentrimexicana</i>	Phexmex-C01-286			✓	680			
<i>Bankera sp. 1 nov</i>	Bnov-C3245					*n	---	
<i>TOTAL</i>					10		6	

Notas: Las columnas identificadas como C y P/N indican las secuencias que, según sea el caso, fueron obtenidas completamente o parcialmente/no obtenidas, respectivamente. En las columnas identificadas con la letra L se muestran las longitudes o pares de bases secuenciadas en cada caso. El asterisco (*) indica un pequeño déficit en la secuenciación, en tanto que *p indica que las secuencias se obtuvieron parcialmente y *n que no han podido ser obtenidas.

Un segundo caso, con una situación similar a la descrita en el párrafo anterior, se presentó con los ejemplares de los grupos externos *Sarcodon modestus* y *Sarcodon lepidus* —con clave Smo-N80 Slep-V1115, respectivamente—, cuyos electroferogramas de ambas regiones —ITS1 y del ITS2— exhibieron una señal ambigua que sugiere la existencia de más de un producto de amplificación. Sin embargo, en ninguno de estos dos últimos casos no se observó la presencia de más de un producto de amplificación en el gel de

agarosa de bajo punto de fusión al 2%. No obstante, existe la posibilidad de que estas especies presenten copias alternativas de esta región del genoma, pero a diferencia de otros casos éstas presenten un tamaño prácticamente idéntico y por tanto no puedan observarse en un gel de agarosa.

Una tercera y última dificultad fue la que se presentó con los ejemplares mexicanos Si-Vre2789, Si-G3449 y Si-Rdz350 de *Sarcodon imbricatus s. l.*, así como con Sleu-S204 de *Sarcodon leucopus*, Ssca-C3275 de *Sarcodon scabrosus*, Bolepleu-VO2884 de *Boletopsis leucomelaena* y Bnov-C3245 de *Bankera sp. nov.*, especie descrita por Cifuentes (1996). En estos casos, y a diferencia de los antes descritos, las secuencias no se obtuvieron debido a que las reacciones de amplificación fueron ineficientes y no se logró obtener las concentraciones mínimas requeridas para su posterior secuenciación.

En todos los casos antes mencionados se están buscando otras estrategias de amplificación y de secuenciación de ser necesario para obtener la región de interés de manera exitosa, ya que la incorporación de las secuencias de estos ejemplares podrían ampliar nuestro conocimiento sobre la problemática del complejo de *Sarcodon imbricatus s. l.*, así como arrojar algunas luces sobre la sistemática del género *Sarcodon*.

5.2.2 Secuencias de los espaciadores internos del ADN ribosomal: ITS1, 5.8S e ITS2

Una revisión preliminar de las secuencias obtenidas y su comparación por pares –empleando la opción “pairwise base differences” del menú de “Data” de PAUP* 4.obio/Altivec (Swofford, 2002)– revelaron que existen diferencias en longitud y composición entre éstas, tanto al interior del grupo interno y del externo como entre ambos grupos.

En primer lugar, se observó que la mayoría de las secuencias de los ejemplares mexicanos de *Sarcodon imbricatus s. l.* presentan una longitud total entre 743 y 753 pb. Estas pequeñas diferencias en longitud deben principalmente a la diferente eficiencia de las reacciones de secuenciación y no a cambios en la composición de pares de bases entre las mismas, como lo sugiere una proporción de diferencias desde 0.00 hasta 0.03 (ver Tabla R-2). Una excepción a este comportamiento fue el caso del ejemplar mexicano Si-VO502, cuya secuencia tuvo una longitud total de 718 pb y presentó un rango de proporción de diferencias entre 0.05 y 0.06 con respecto al resto de los ejemplares mexicanos (ver Tabla R-1 y R-2). Así mismo, se observó que el grupo mexicano de *S. imbricatus s. l.* en su conjunto presentó un menor número de diferencias en longitud y composición con los grupos europeos –*S. imbricatus s. s.* y *Sarcodon squamosus*– comparado con *Sarcodon aspratus* y *Sarcodon sp.* (ver Tabla R-2).

Por otra parte, las secuencias de *Sarcodon imbricatus s. s.*, *S. squamosus*, *Sarcodon aspratus* y *Sarcodon* sp., también presentaron diferencias en longitud y composición. Éstas fueron mínimas en el caso de los dos primeros grupos, pero mucho mayores entre *S. aspratus* y *Sarcodon* sp. y entre éstos y los dos primeros (ver Tabla R-2).

Por último, se observó una enorme variación en longitud y en composición tanto entre los grupos externos como en el grupo interno y el externo. En ambos casos las diferencias en longitud fueron desde unas cuantas pares de bases hasta poco más de 100 pb; en tanto que aquellas relacionadas con la composición alcanzaron valores entre 0.10 y 0.23 – siendo las de *Sarcodon leucopus* y *Sarcodon scabripes* las de menor valor y las de *Sarcodon atrovirides* las de mayor valor (ver Tabla R-1 y R-2).

	<i>S. imbricatus</i> G-I	AF103885 - 9	AF103890 - 6	Si-VO502	Snov-C3031	AF335110	Sleu-C3440	Ssci-C3458	Sfv-C3272	Ssca-S205	Spi-C3751	Sver-C2947	Satro-CT95-150	AF351863	AF351866	Phexmex-C01-286	AF351868	Hydne-C02-185	AY228355	
<i>S. imbricatus</i> G-I*	0.0 - 0.03																			
<i>S. IMBRICATUS</i> s. s	0.04 - 0.06	-																		
<i>S. squamosus</i>	0.04 - 0.06	0.02	-																	
<i>S. imbricatus</i> G-II	0.05 - 0.07	0.04	0.4	-																
<i>Sarcodon</i> sp	0.07 - 0.09	0.06	0.07	0.08	-															
<i>S. aspratus</i>	0.10 - 0.12	0.08	0.09	0.09	0.07	-														
<i>S. leucopus</i>	0.07 - 0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.12	-													
<i>S. scabripes</i>	0.10 - 0.12	0.11	0.11	0.11	0.12	0.14	0.10	-												
<i>S. fulgineoviolaceus</i>	0.16 - 0.18	0.15	0.15	0.17	0.15	0.17	0.17	0.17	-											
<i>S. scabrosus</i>	0.16 - 0.19	0.17	0.17	0.19	0.18	0.20	0.18	0.18	0.16	-										
<i>S. pipentus</i>	0.17 - 0.19	0.16	0.16	0.16	0.17	0.19	0.19	0.19	0.14	0.19	-									
<i>S. versipellis</i>	0.17 - 0.18	0.21	0.19	0.18	0.17	0.21	0.16	0.18	0.18	0.22	0.21	-								
<i>S. atroviridis</i>	0.21 - 0.23	0.22	0.21	0.24	0.22	0.25	0.23	0.22	0.25	0.27	0.27	0.26	-							
<i>H. diabolus</i>	0.10 - 0.12	0.10	0.09	0.10	0.10	0.12	0.10	0.12	0.09	0.18	0.13	0.11	0.21	-						
<i>H. aurantiacum</i>	0.15 - 0.17	0.15	0.15	0.16	0.15	0.18	0.16	0.16	0.14	0.17	0.17	0.19	0.25	0.11	-					
<i>P. excentrinexi</i>	0.16 - 0.17	0.16	0.15	0.17	0.16	0.20	0.18	0.19	0.17	0.20	0.19	0.20	0.24	0.14	0.18	-				
<i>H. geogenium</i>	0.16 - 0.18	0.15	0.14	0.16	0.15	0.18	0.16	0.16	0.16	0.19	0.16	0.20	0.24	0.11	0.13	0.20	-			
<i>H. concrescens</i>	0.17 - 0.18	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.20	0.18	0.17	0.21	0.20	0.20	0.26	0.14	0.18	0.19	0.19	-		
<i>P. melaleucus</i>	0.17 - 0.18	0.17	0.15	0.17	0.17	0.19	0.17	0.16	0.17	0.21	0.21	0.22	0.24	0.14	0.17	0.11	0.21	0.21	-	

Notas: La primera columna indica el nombre de las especies comparadas y la primera fila las claves de las mismas. * Debido a que las secuencias de *Sarcodon imbricatus* pertenecientes a los ejemplares del Grupo I presentaron diferencias mínimas entre ellos en la presente tabla se muestran los valores obtenidos para este conjunto en un rango y de la misma forma en relación con el resto de los grupos internos y externos. ** Debido a que el ejemplar mexicano de *S. imbricatus* -Si-V-O502- del Grupo II presentó diferencias sustanciales con el resto del grupo mexicano, los

5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

A continuación se describen los resultados, comenzando con aquellos relacionados con la construcción de las matrices de datos y finalizando con las hipótesis obtenidas y las evaluaciones de las mismas.

5.3.1 Muestreo taxonómico, alineamiento y matrices de datos

Considerando los resultados del número de secuencias obtenidas durante el presente trabajo de tesis y aquellas del GenBank –28 y 17, respectivamente– se obtuvieron un total 45 secuencias –32 del grupo interno y 13 del externo– (ver Tabla R-3). Éstas se emplearon en las estrategias de alineamiento InG-I-OutG y POA-RCx dando como resultado las matrices M38 y M45, respectivamente (ver Tabla R-3 y R-4

Tabla R-3. Lista de las secuencias disponibles y los OTU's incluidos en las distintas matrices					
	Nombre Científico	Clave del ejemplar o No. De GeneBank	Secuencias		
			D	Matrices	
				M38	M45
Grupo interno	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i> (grupo mexicano)	Si-C3048, Si-H484, Si-C2957, Si-PR643, Si-M42, Si-C3586, Si-ET3414, Si-M202, Si-PC57, Si-PR2716, Si-Cao2, Si-C2612, Si-VO242, Si-PL160782, Si-Mor1304, Si-S197, Si-S509 y Si-VO502	18 ☞	✓	✓
	<i>S. aspratus</i>	AF335110	1 ☞	✓	✓
	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103885-9	5 ☞	✓	✓
	<i>S. squamosus</i>	AF103890-6	7 ☞	✓	✓
Total			31	31	31
Grupo externo cercano	<i>Sarcodon sp.</i>	Ssp-C3031	1 ☞	✓	✓
	<i>S. leucopus</i>	Sleu-C3440	1 ☞	✓	✓
	<i>S. scabrosus</i>	Ssca-S205	1 ☞		✓
	<i>S. fulgineoviolaceus</i>	Sfv-C3272	1 ☞	✓	✓
	<i>S. piperatus</i>	Spi-C3751	1 ☞		✓
	<i>S. atroviridis</i>	Satro-CT95-150	1 ☞	✓	✓
	<i>S. versipellis</i>	Sver-C2947	1 ☞		✓
	<i>S. scabripes</i>	Ssci-C3458	1 ☞	✓	✓
Total			8	5	8
Grupo externo lejano	<i>Hydnellum conrescens</i>	Hydne-C02-185	1 ☞	✓	✓
	<i>H. aurantiacum</i>	AF351866	1 ☞	✓	✓
	<i>H. diabolus</i>	AF351863	1 ☞		✓
	<i>H. geogenium</i>	AF351868	1 ☞		✓
	<i>Phellodon excentrimexicana</i>	Phexmex-C01-286	1 ☞		✓
	<i>P. melaleucus</i>	AY228355	1 ☞		✓
Total			6	2	6
TOTAL			45	38	45

Nota: en la tercera columna se indica con una ☞ las secuencias que fueron obtenidas durante el presente trabajo y con un ☞ aquellas que fueron obtenidas del GenBank; en la cuarta y quinta columna se indican con ✓ los OTU's incluidos en las distintas matrices.

En lo que respecta al número de OTU's incluidos tenemos que ambas matrices –M38 y M45– incluyeron 31 grupos internos pero difirieron en el número de grupos externos (ver Tabla R-3). En el caso de M45, el grupo externo incluyó 14 OTU's –es decir, el 100% de la secuencias disponibles en este caso–, en tanto que en M38 fueron incluidos 7, debido a que las 7 secuencias restantes no cumplieron los requerimientos de la estrategia de alineamiento correspondiente (ver pág. 28 en Materiales y Métodos). Si bien ambas matrices tuvieron un menor número de OTU's del propuesto originalmente, es importante mencionar que el muestreo taxonómico no se vió afectado drásticamente. En primer lugar, el muestreo original del grupo interno está representado en 84% en ambas matrices quedando incluidos todos los grupos del complejo *Sarcodon imbricatus s. l.* considerados previamente. En segundo lugar, el grupo externo en cada matriz, aunque diferente en número de OTU's, proporciona un marco si bien no óptimo, adecuado para someter a prueba las hipótesis sobre los límites y las relaciones filogenéticas del grupo mexicano de *S. imbricatus s. l.*, considerando que el muestreo taxonómico representa en gran medida la diversidad del grupo interno e incluso del externo.

En cuanto a las estrategias de alineamiento, se puede señalar que tanto en el caso de InG-i-OutG como en el de POA-RCx los resultados fueron satisfactorios dado que se observó una mejor correspondencia entre los sitios alineados, particularmente en las regiones variables, en cada una las matrices resultantes –M38 y M45–. Adicionalmente, éstas requirieron de ajustes manuales menores y presentaron un bajo porcentaje de regiones alineadas ambiguamente y un número considerable de caracteres informativos, aunque los porcentajes de sitios constantes y variables no informativos fueron un tanto distintos (ver Tabla R-4). [Para la examinación de la matriz alineada solicítela a la autora en la siguiente dirección electrónica: viol_patino@ciencias.unam.mx]

Tabla R-4. Comparación de los tipos de caracteres entre las matrices.						
Matriz de datos		M83		M45		
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
Caracteres	Totales	878	100%	958	100%	
	Extremos y regiones ambiguas del gen	102	11.6%	83	8.7	
	Constantes	430	49%	433	45.1%	
	Variables Totales	346	39.4	442	46.2	
	Variables no informativos	170	19.4%	172	18%	
	Variables Informativos	Totales	176	20%	270	28.2
		ITS5-ITS2	79	45%*	124	46%*
		ITS3-ITS4	97	55%*	146	54%*
	Excluidos	702	80%	688	71.8%	
	Incluidos	176	20%	270	28.2%	

* Estos porcentajes se calcularon tomando como el 100% sólo total de caracteres informativos especificados en esta tabla.

Una vez que las matrices se editaron, éstas presentaron las siguientes dimensiones finales: 38 OTU's y 176 caracteres parsimoniosamente informativos en el caso de M₃₈, y 45 OTU's y 270 en M₄₅. En cada caso el número de caracteres que se describe corresponde exclusivamente a caracteres o sitios parsimoniosamente informativos.

5.3.2 Búsqueda de los árboles más parsimoniosos y evaluación de las hipótesis

En lo que respecta a la búsqueda multiratchet llevada a cabo con M₃₈, ésta resultó en 83 árboles igualmente parsimoniosos de 423 pasos de longitud (CI=0.6525, HI= 0.3475, RI= 0.8158. RC= 0.5323), cuyo consenso estricto presentó una buena resolución y altos valores de bootstrap y jackknife en casi todas sus ramas principales (ver Fig. R-1).

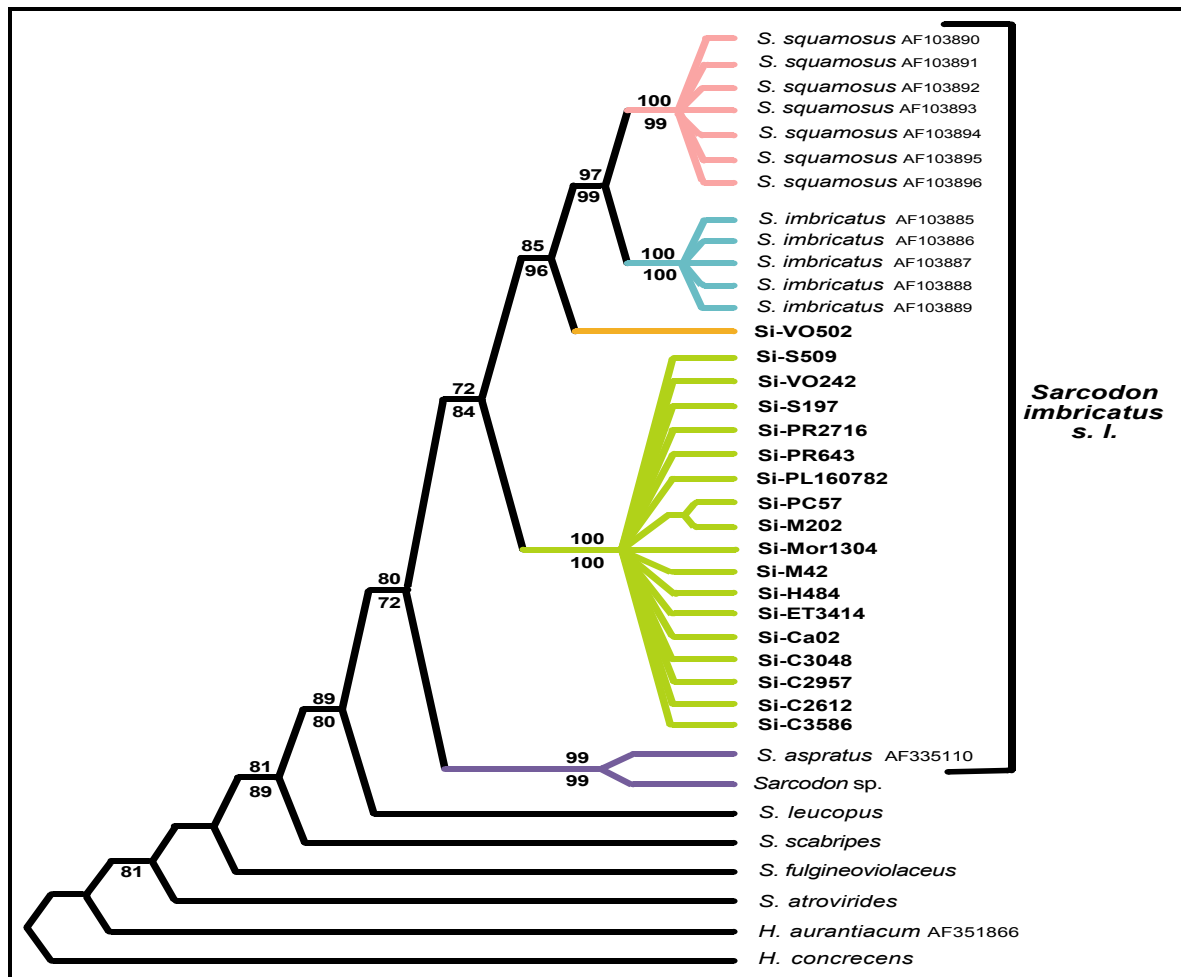


Figura R-1. Consenso estricto de 83 árboles igualmente parsimoniosos (L=423) obtenidos de la búsqueda multiratchet de M₃₈. **Nota:** los valores en las ramas indican los porcentajes de bootstrap (arriba) y de jackknife (abajo) obtenidos en cada rama.

En primer lugar los resultados obtenidos a partir de la matriz M₃₈ sugieren la existencia de 5 grupos dentro de *Sarcodon imbricatus s. l.*: *Sarcodon squamosus* (en rosa), *S. imbricatus s. s.* (en azul), dos aun no descritos que involucran ejemplares mexicanos (en verde y anaranjado) y *Sarcodon aspratus* junto con *Sarcodon sp.* (en morado), cuyos valores de bootstrap y jackknife oscilan entre el 96 y 100%. En segundo lugar, también sugieren que los ejemplares mexicanos no forman un solo grupo y que en el caso del ejemplar Si-VO₅₀₂ (procedente del estado Chihuahua, éste podría estar más cercanamente relacionado con los grupos europeos. Por último, estos resultados muestran que *Sarcodon leucopus* es el grupo hermano de *S. imbricatus s. l.*

Por su parte, la búsqueda multiratchet llevada a cabo con M₄₅ se obtuvieron un total de 2212 árboles igualmente parsimoniosos de 895 pasos de longitud (CI= 0.4916, HI= 0.5084, RI= 0.6354, RC= 0.3124), cuyo consenso estricto está pobremente resuelto y en general poco apoyado, con excepción de los clados internos de *Sarcodon imbricatus s. l.* (ver Figura R-2).

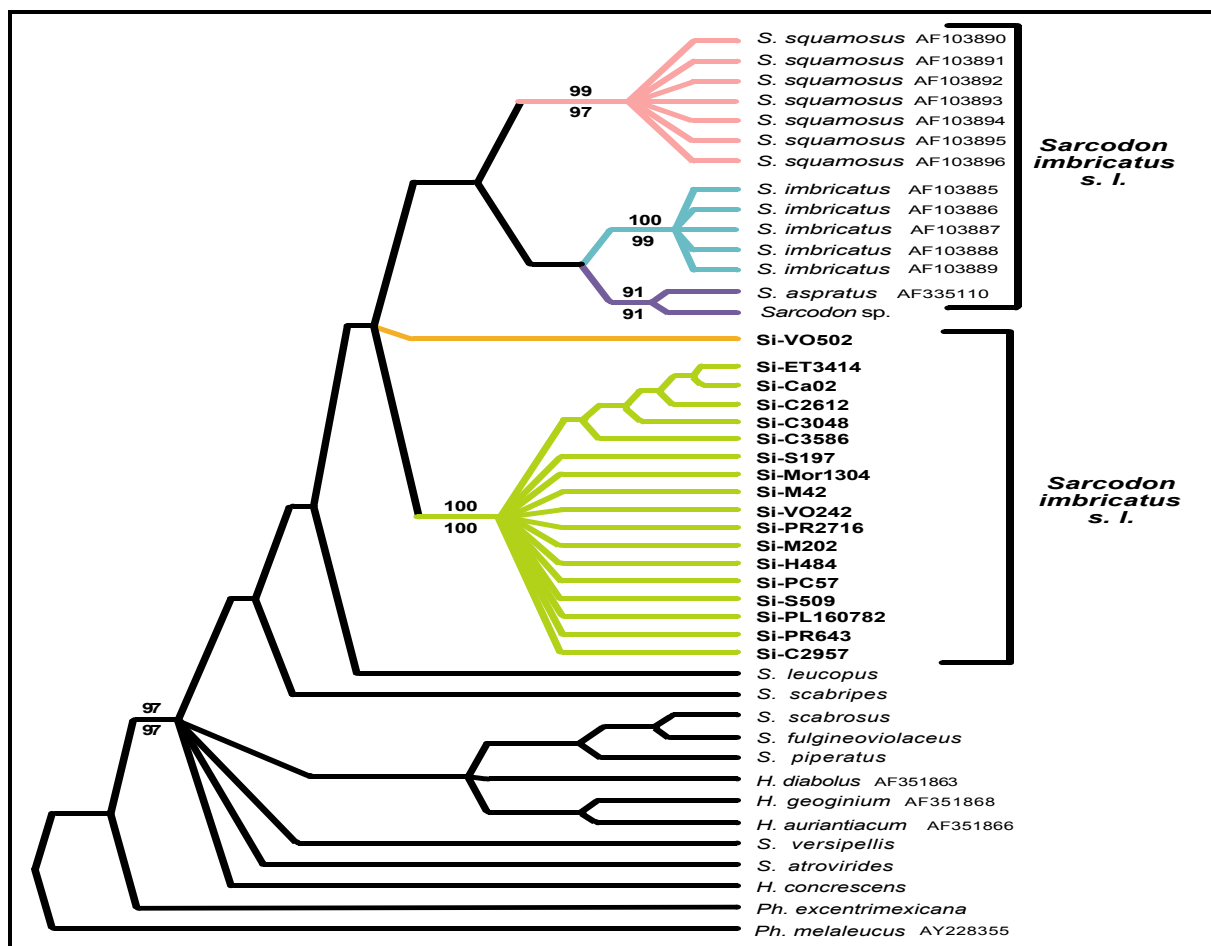


Figura R-2. Consenso estricto de 2212 árboles igualmente parsimoniosos (L=895) obtenidos de la búsqueda multiratchet de M₄₅. Nota: los valores en las ramas indican los porcentajes de bootstrap (arriba) y de jackknife (abajo) obtenidos en cada rama.

Como puede verse en la Figura R-2, estos resultados también sugieren la existencia de los mismos 5 grupos dentro de *Sarcodon imbricatus s. l.* e igualmente muestran a *Sarcodon leucopus* como el taxón más cercanamente relacionado con el conjunto de éstos. Sin embargo, existen algunas diferencias entre los resultados obtenidos a partir de M45 y aquellos de M38; en primer lugar, el consenso estricto de M45 propone una relación más cercana entre el clado de los grupos europeos –*Sarcodon squamosus* y *S. imbricatus s. s.*– y el aquel formado por *S. aspratus* y *Sarcodon* sp.; y en segundo lugar, presenta una politomia en la base del grupo de *S. imbricatus s. l.* que impide establecer las relaciones entre todos los grupos que conforman a éste. Por otra parte, los resultados sugieren de manera preliminar que no existe una división clara entre los géneros *Sarcodon* e *Hydnellum*.

6. DISCUSIÓN

En la presente sección se discuten, en primer lugar, los resultados obtenidos a partir de las diferentes estrategias de alineamiento y, en segundo lugar, la sistemática del complejo de especies de *Sarcodon imbricatus*.

6.1 ESTRATEGIAS DE ALINEAMIENTO

En los análisis filogenéticos basados en el estudio comparativo de secuencias de nucleótidos o aminoácidos, un paso trascendental es el proceso de alineamiento (Morrison & Ellis, 1997). Éste corresponde al establecimiento de las hipótesis de homología posicional en secuencias (Hawkins *et al.*, 1997), por lo que las decisiones que tomemos durante esta fase tienen importantes repercusiones en nuestros resultados y en las interpretaciones que hagamos de éstos. Desde luego el presente caso no es la excepción al respecto, ya que aunque en términos generales las estrategias de alineamiento implementadas aquí —InG-1-Out y POA-Rcx— produjeron resultados satisfactorios, como puede observarse en una mejor correspondencia entre los sitios alineados de las regiones hipervariables, los alineamiento o matrices resultantes de ellos —M₃₈ y M₄₅, respectivamente— presentan algunas diferencias importantes que parecen repercutir en la topología y la robustez de las hipótesis obtenidas en cada caso (ver Figs. D-1 en esta sección y R-2 en la sección de Resultados).

Un primer efecto de las distintas estrategias de alineamiento puede ser observado en el número de caracteres informativos que cada matriz contiene (ver Tabla R-4 en la sección de Resultados). En el caso de M₄₅ este número alcanza 270 caracteres, los cuales representan el 28.2% de la totalidad de los caracteres; mientras que M₃₈ contiene solamente 176 correspondientes al 20%. El alto porcentaje que presenta M₄₅ no sólo parece excesivo en relación a M₃₈ sino a muchos otros reportados en análisis filogenéticos sobre otros grupos de hongos, también basados en el estudio comparativo de la región de los ITS y enfocados a este mismo nivel taxonómico. Por ejemplo Henricot & Culman (2002), Hughes *et al.* (1999) y Kretzer *et al.* (1996) han reportado porcentajes entre el 13 y 20% de caracteres informativos para esta región del ADN ribosomal del núcleo, por lo que un número de sitios informativos de M₄₅ resulta más desconcertante que alentador, y pone en duda la calidad de este alineamiento.

Como se mencionó previamente, el alineamiento en secuencias corresponde a la elaboración de las hipótesis de homología primaria, cuyo establecimiento se basa exclusivamente en el criterio de similitud topológica o posicional (Morrison & Ellis, 1997). De esta forma, los sitios o posiciones de una secuencia

son reconocidos como caracteres y los cambios observados en ellos como estados de carácter. Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los métodos de alineamiento buscan maximizar la correspondencia entre los sitios a los menores costos (González, 1996; 1998), como un intento de reflejar la homología en secuencias. Sin embargo, esta presunción no siempre garantiza que el alineamiento óptimo represente el alineamiento verdadero ya que la máxima similitud no necesariamente equivale a homología (Thorne & Kishino, 1992; Morrison & Ellis, 1997). Esto es particularmente cierto cuando se alinean secuencias con diferente longitud, donde la inserción de gaps requerida para optimizar el criterio de correspondencia implementado en cuestión puede volverse sumamente problemática y agudizarse cuando se comparan taxones muy divergentes (Morrison & Ellis, 1997).

Esta última situación refleja claramente la problemática observada en la matriz M₄₅, si consideramos dos factores que distinguen a ésta de M₃₈ y que resultaron contraproducentes: 1) un mayor número de grupos externos y 2) una mayor correspondencia en las regiones hipervariables.

En relación al primer punto podemos señalar que aún cuando M₄₅ incluyó un mayor número de grupos externos con la finalidad de evitar algún sesgo en los resultados, el consenso estricto obtenido de su análisis no difirió significativamente de aquella resultante de la matriz M₃₈ (ver Figs. R-1 y R-2 en Resultados), y en cambio sí agudizó el problema del alineamiento dadas las enormes diferencias que se observaron entre el grupo interno y todos los externos, así como entre estos últimos. Ésta amplia divergencia es una de las causas del alto porcentaje de caracteres informativos, más que la propia adición de OTU's.

Esta situación replantea la importancia que tiene el diseño del muestreo taxonómico del grupo externo, no sólo en cuanto al número de OTU's a incluir, sino en relación a la selección de éstos sobre todo al usar marcadores moleculares con tasas de sustitución acelerada. En el caso de M₄₅ este procedimiento se realizó considerando toda la información disponible hasta el momento (ver pág. 36 en Resultados), pero la falta de una hipótesis filogenética más amplia sobre este grupo de hongos y la posibilidad de que la delimitación entre *Sarcodon* e *Hydnellum* no refleje grupos naturales –como lo sugieren preliminarmente los resultados (ver Fig. R-2)– condujeron a la comparación de taxones muy divergentes. Éste último punto debe ser considerado de suma importancia cuando se trabaja con regiones no codificantes, como es el caso de la región de los ITS, cuya variación llega a ser tal, que el proceso de alineamiento puede convertirse en un reto casi imposible de vencer (Bruns, 2001) y derivar en alineamientos subóptimos (Morrison & Ellis, 1997).

En lo que respecta al segundo punto, es importante mencionar que las estrategias de alineamiento llevadas aquí presentan algunas diferencias, la principal de éstas radica en el método de alineamiento inicial o base

de cada una de ellas —Clustal W para la primera y POA para la segunda. Si bien es cierto que los algoritmos de ambos programas emplean un árbol guía y están basados en el método general de alineamiento múltiple, éstos se diferencian en el criterio que emplean durante el alineamiento sucesivo de las secuencias. En el caso de Clustal W, las secuencias a alinear son forzadas a ajustarse al alineamiento precedente —e. g. la tercera secuencia a alinear se ajusta al alineamiento del primer par, y así sucesivamente— (Higgins *et al.*, 1996; Lee, 2004). Por lo contrario, el algoritmo de POA, aunque actúa de forma similar, éste va evaluando más de uno posible alineamiento cada vez que incorpora una secuencia (Lee *et al.*, 2002; Grasso & Lee, 2004). En el caso de M₄₅, este proceso tan dinámico, junto con el realineamiento en Clustal X v. 1.8 (Thompson *et al.* 1997), pudieron haber forzado la correspondencia entre las bases a alinear, particularmente en las regiones hipervariables tanto del ITS₁ como del ITS₂, modificando las hipótesis de homología primaria e incrementando sustancialmente el número de caracteres informativos. Sin embargo, este incremento podría tratarse más un artificio del alineamiento como resultado de la maximización de la correspondencia entre los sitios de estas regiones, que como una verdadera adición de datos históricos.

Adicionalmente, la calidad de las hipótesis de homología primaria contenidas en M₄₅ puede ser puesta en duda si consideramos, contrariamente a lo que se esperaría, que los resultados obtenidos del análisis de esta matriz presentan un pobre apoyo estadístico en comparación con aquellos obtenidos para M₃₈ (ver Figs. D-1 y R-2 en Resultados). Goloboff *et al.* (2003) y Ramírez (2005) han señalado que en ocasiones bajos valores de bootstrap podrían estar reflejando más una serie de conflictos entre diferentes grupos de caracteres que la falta de ellos, lo cual parece factible en el presente caso dado el amplio número de caracteres supuestamente informativos.

Por otra parte, las diferencias entre M₃₈ y M₄₅ tienen importantes repercusiones en los resultados obtenidos a partir de cada matriz. Por ejemplo, la hipótesis resultante de M₄₅ presenta una menor resolución en comparación con aquella obtenida de M₃₈ (ver Fig. D-1 en esta sección y Figs. R-1 y R-2 en Resultados). Lo anterior parecería contradecir la idea de que matrices más grandes —con más OTU's y más caracteres— dan lugar a hipótesis con mayor resolución y/o apoyo estadístico, como lo han señalado Bremer *et al.* (1999) y Yoder & Irwin (1999). Es preciso señalar que por sí sólo el aumento en el número de OTU's y/o caracteres no produce necesariamente hipótesis más robustas, sino que se requiere de una adecuada selección de OTU's y de la elaboración de hipótesis de homología primaria convincentes.

Considerando todo lo anterior, podemos afirmar que la estrategia de alineamiento POA-Rex no fue la más adecuada como lo demuestran los inconvenientes referidos y por tanto los resultados obtenidos de ésta deben ser tomados con cautela. Por lo contrario, la estrategia InG-I-OutG no sólo produjo un

alineamiento satisfactorio en términos metodológicos sino también una matriz —M₃₈— que puede ser juzgada como un buen conjunto de hipótesis de homología posicional, si consideramos que el porcentaje de caracteres informativos es semejante al reportado en otros estudios donde se ha empleado el mismo marcador molecular y sobre otros grupos de especies de homobasidiomicetos. Adicionalmente, los altos valores de apoyo estadístico y una buena resolución en la hipótesis resultante (ver Fig. D-1) son indicativos de la buena calidad del alineamiento producido por esta segunda estrategia. Por ello, la subsecuente serie de discusiones sobre la sistemática del complejo de especies de *Sarcodon imbricatus* se basarán principalmente en dichos resultados.

6. 2 SISTEMÁTICA DEL COMPLEJO *SARCODON IMBRICATUS S. L.*

En términos generales, los resultados obtenidos con base en el análisis filogenético de la región de interespaciadores del ADN ribosomal del núcleo (ITS₁, 5.8S e ITS₂), cuyo alineamiento está representado en la matriz M₃₈, revelan la existencia de 5 clados o grupos dentro *Sarcodon imbricatus s. l.*, los cuales están fuertemente soportados por valores entre 96 y 100% de jackknife y entre 85 y 100% de bootstrap (ver Fig. D-1). Entre estos cinco clados, dos de ellos corresponden a dos especies previamente descritas para bosques de *Pinus* y *Picea* en Europa —*Sarcodon squamosus* y *S. imbricatus s. s.*— y un tercer clado corresponde con una tercer especie aún no descrita —denominada aquí como Grupo I— que se distribuye en gran parte de las zonas templadas del centro, sur y este de México (ver Fig. D-1). Así mismo, sugieren la existencia de un segundo taxón en México no descrito a la fecha —Grupo II— y además apoyan el reconocimiento de *Sarcodon aspratus* como una especie distinta (ver Fig. D-1).

Estos resultados sugieren ciertas afinidades filogenéticas entre los diferentes grupos de *Sarcodon imbricatus s. l.* e incluso entre éstos y otras especies. En primer lugar, *Sarcodon squamosus* y *S. imbricatus s. s.* se encuentra cercanamente relacionadas y éstas podrían haber especiado recientemente. Así mismo, sugieren que el Grupo II está más relacionado con los taxones europeos que con el Grupo I, el cual aparece con el grupo hermano de todos éstos. Por otro lado, *Sarcodon aspratus* parece ser el grupo más basal de *S. imbricatus s. l.* junto con *Sarcodon* sp., especie registrada para bosques de *Abies* del centro de México por Cifuentes (1996) y no considerada previamente como parte de este grupo. Por último, la posición de *Sarcodon* sp. dentro de *S. imbricatus s. l.*, sugiere que la delimitación taxonómica actual de éste representa un grupo parafilético. Sin embargo, estos resultados deben ser considerados preliminares ya que el muestreo del grupo interno propuesto aquí no incluye a toda la diversidad descrita bajo el

nombre de *S. imbricatus s. l.* Además, aunque los resultados obtenidos de M₄₅ apoyan la existencia de estos mismos 5 grupos dentro de *S. imbricatus s. l.*, sugieren relaciones distintas entre éstos.

No obstante, los resultados obtenidos tanto de M₃₈ como M₄₅ nos permiten establecer claramente los límites entre los distintos grupos de *Sarcodon imbricatus s. l.* aquí estudiados, y sugieren que los eventos de especiación dentro de este grupo han estado en gran medida determinados por las asociaciones vegetales que éstos forman con algunos géneros de coníferas y angiospermas. A continuación se discuten cada uno de los grupos encontrados en la presente hipótesis filogenética y algunos de sus aspectos taxonómicos. Así mismo se abordan algunas particularidades ecológicas y biogeográficas implicadas con las relaciones filogenéticas entre éstos.

6.2.1. Los taxones europeos: *Sarcodon imbricatus s. s.* y *S. squamosus*

En primer lugar los resultados obtenidos apoyan la hipótesis propuesta por Schaeffer (1767-1774) y corroboran los resultados obtenidos por Johannesson *et al.* (1999) para los grupos europeos de *Sarcodon imbricatus s. l.*, los cuales hoy día son reconocidos como especies válidas e independientes bajo los nombres de *S. imbricatus* (L.:Fr.) P. Karst. —en sentido estricto— y *Sarcodon squamosus* (Schaeff.) Quél. Adicionalmente, Johannesson *et al.* (1999) han señalado que tanto las diferencias morfológicas y ecológicas, como el grado de disimilitud observado en la región de los ITS entre estos dos taxones —equivalente al 3,2% según sus propios resultados— podrían estar indicando una interrupción en el flujo genético entre éstos, como resultado de un proceso de especiación y por tanto consideraron que el concepto actual de *S. imbricatus* —en sentido amplio— incluye a por lo menos dos especies biológicas en Europa: *S. squamosus* y *S. imbricatus sensu stricto*.

Macroscópicamente, estas dos especies se distinguen fácilmente por la forma y coloración del basidioma y por la coloración y distribución de las escamas que ornamentan el píleo, entre otros caracteres (para más detalles ver págs. 6-8 y Tabla A-1 en Antecedentes). Sin embargo, Johannesson *et al.* (1999) señalaron que estos taxones son microscópicamente indiferenciables, ya que ambos presentan fibulas y esporas de contorno irregular tuberculadas y de talla similar. Esta afirmación debe ser considerada como tentativa, ya que hasta el momento no se han empleado técnicas microscópicas más finas —como la microscopía electrónica de barrido o de transmisión— que pudiesen revelar alguna variación discreta en éstos y otros caracteres microscópicos.

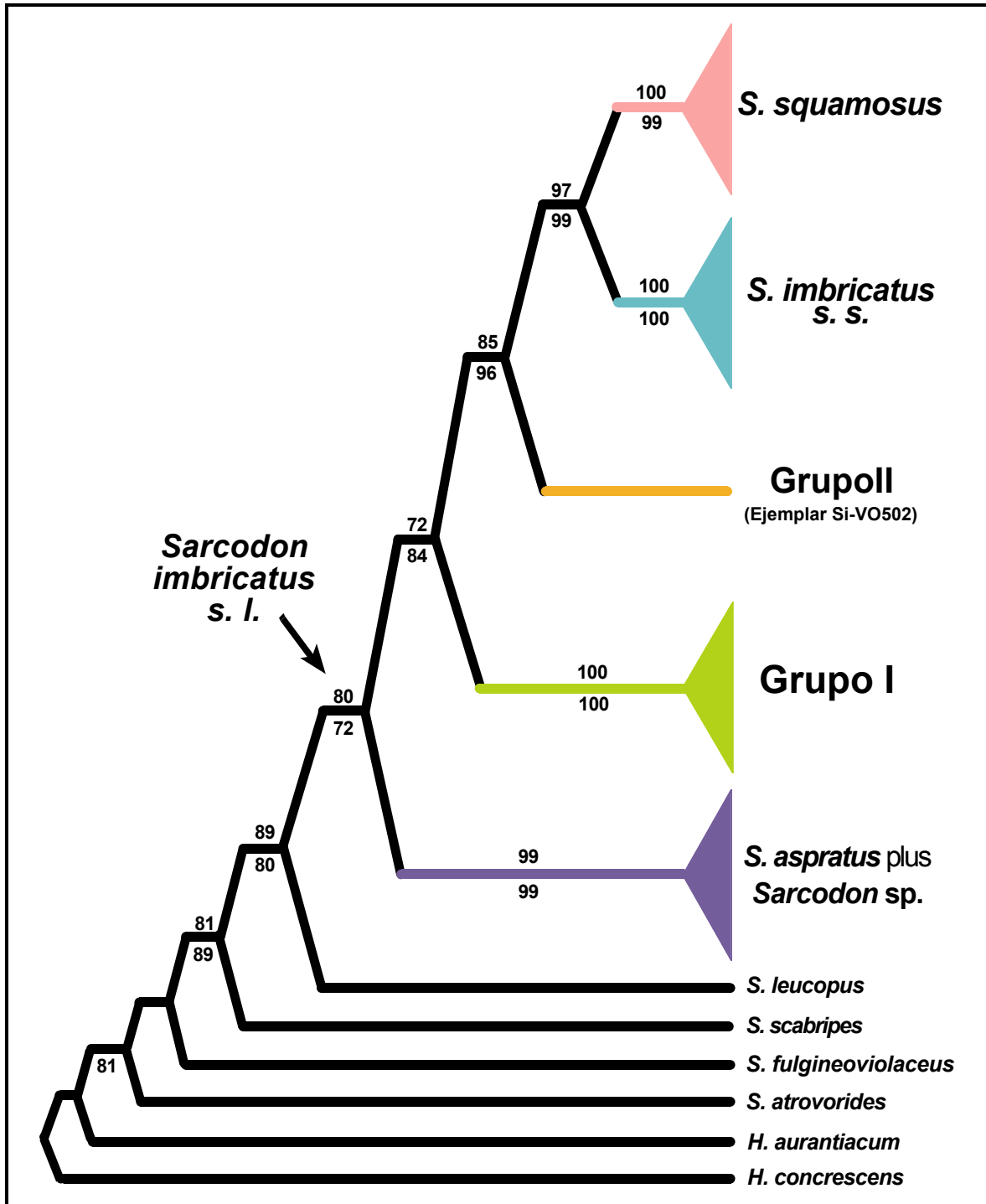


Figura D-I. Consenso estricto de 83 árboles igualmente parsimoniosos ($L=423$) obtenidos de la búsqueda multiratchet de M_{38} . **Nota:** los valores en las ramas indican los porcentajes de bootstrap (arriba) y de jackknife (abajo) obtenidos en cada rama.

Una de las diferencias más importantes entre estas especies, como ya lo han mencionado varios autores, es el tipo de asociación vegetal que presentan cada una de ellas: *Sarcodon imbricatus* s. s. se asocia con bosques de *Picea* y *Sarcodon squamosus* con aquellos de *Pinus*. Esta característica resulta relevante ya que

éstas especies de hongos con cada uno de estos grupos de coníferas forman asociaciones ectomicorrizógenas, las cuales son necesarias para el exitoso establecimiento de algunas especies de fotobiontes como en el caso del género *Pinus* (Carlile y Watkinson, 1994). Otros ejemplos de pares de especies morfológicamente similares pero ecológicamente distintas han sido reportadas previamente para el orden Thelephorales. Dos casos de éstos son el par formado por *Bankera fulgineoalba* y *B. violascens* (Maas Geesteranus, 1975) y aquel integrado por *Boletopsis grisea* y *B. leucomelaena* (Niemelä & Saarenkosa, 1989), las cuales en cada caso se distinguen por estar asociadas a especies de pinos o de píceas, respectivamente.

Aunque la especificidad en este tipo de asociaciones mutualistas ha sido rechazada por varios autores, ya que se ha observado que una misma especie de fotobionte puede formar ectomicorrizas con varias decenas de micobiontes de diferentes géneros (Trappe, 1962), en los casos de *S. imbricatus s. s.* y *S. squamosus* esta afirmación no es cierta del todo si consideramos que la especificidad no sólo debe ser entendida como la asociación ecológica especie-especie sino también taxón-taxón, independientemente del rango de cada uno de ellos. Adicionalmente, la especificidad puede ser una característica de uno solo de los participantes de la asociación y no necesariamente de ambos, como se ha observado en muchas de las asociaciones ectomicorrizógenas. Éstos casos, los micobiontes suelen exhibir un intervalo de hospederos muy restringido en comparación aquel presentan los fotobiontes respecto a sus huéspedes, lo cual podría estar indicando que es el micobionte el que determina con quien asociarse; y quizás por ello esta característica ecológica resulta tan relevante en ciertos grupos de hongos ectomicorrizógenos.

Lo anterior replantea la uso e importancia de las características ecológicas en este grupo de especies, a pesar de que éstas han sido vistas con poco entusiasmo por varios micólogos, ya que en este caso las diferencias relacionadas con la asociación vegetal brindan una importante evidencia sobre los límites filogenéticos y taxonómicos de este par de especies previamente confundidas.

En cuanto a la distribución geográfica de ambas especies es posible, dada la evidencia, que ésta se encuentre restringida a los bosques de coníferas de Europa. Sin embargo, la especialización en la asociación vegetal que muestran cada una de estas especies —*Sarcodon imbricatus s. s.* con bosques de *Picea* y *S. squamosus* con *Pinus*— podrían limitar su distribución a ciertas regiones de dicho continente. Incluso Johannesson *et al.* (1999) señaló que *S. imbricatus s. s.* no se encuentre en aquellos países donde no existen naturalmente bosques de *Picea* como Escocia y Holanda (Johannesson *et al.*, 1999). Más aún, esta misma situación hace sospechar que aquellos ejemplares de *S. imbricatus* —en sentido amplio— reportados de bosques deciduos en Noruega por Gulden & Hanssen (1992) podrían representar una tercera especie y cuya también podría estar limitada a Europa.

Otro aspecto importante a destacar sobre estos dos taxones europeos es aquel relacionado con algunos de los sinónimos propuestos por Johannesson *et al.* (1999), quienes aceptaron a *Hydnum cervinum* Pers. e *Hydnum subsquamosum* Basch.:Fr como sinónimos taxonómicos de *Sarcodon imbricatus* —en sentido estricto— y a *Hydnum badium* Pers. como sinónimo de *Sarcodon squamosus*. Sin embargo, existen algunas dudas sobre el concepto y empleo de estos nombres, por lo que su uso debe ser reconsiderado. En el caso de *Hydnum cervinum*, Baird (1986b) señaló que la descripción hecha por Persoon (1796) para este taxón es confusa y no lo define claramente por lo que lo consideró como un *nomen ambiguum*. Además este nombre fue enlistado como un sinónimo de *Sarcodon imbricatus s. l.* por Banker (1906, 1913) y Maas Geesteranus (1956). Debido a lo anterior es preferible no considerar este nombre como sinónimo de *S. imbricatus s. s.*, en tanto no se realice un estudio más detallado sobre el trabajo de Persoon.

Por su parte, el uso del nombre de *Hydnum subsquamosum* Basch.:Fr. es sumamente controversial ya que éste se ha empleado para nombrar distintas especies de hidnoides estipitados. Aunque Batsch (1783) lo propuso para referirse a lo que consideró una sola especie, él seleccionó dos láminas que corresponden a dos taxones distintos. El primero es de identidad desconocida —el cual fue ilustrado en la lámina 10, Fig. 43 de dicho trabajo— y el segundo corresponde al taxón de bosques de *Picea* de *Sarcodon imbricatus s. l.*, cuya lámina fue seleccionada del trabajo de Schaeffer (1767-1774) por el propio Batsch (Johannesson *et al.*, 1999). Esta situación llevo a Johannesson *et al.* (1999) a considerar a *H. subsquamosum* como sinónimo de *S. imbricatus* en sentido estricto. No obstante, Fries (1821) también relacionó dicho nombre con una especie de contexto zonado que refirió bajo el nombre ilegítimo y de estatus dudoso de *Hydnum squamosum* Bull. [Bulliar, 1789. Herb. Fr. ilustración 409], la cual parece pertenecer al género *Hydnellum* y ha sido incorrectamente confundida con *H. squamosum* Schaeff. Mas adelante, Persoon (1825) y Fries (1828) también relacionaron el nombre de *H. subsquamosum* con el taxón de *S. imbricatus s. l.* asociado a bosques de *Pinus* y que hoy en día es conocido como *S. squamosus*. Esto podría poner en duda la decisión tomada por Johannesson *et al.* (1999) acerca de las sinonimias de los taxones estudiados por ellos.

Autores como Coker & Beers (1951), Maas Geesteranus (1956) y Baird (1986a) determinaron que el concepto de especie de *Hydnum subsquamosum* no es claro y por tanto el epíteto debe ser considerado como un *nomen ambiguum*. Yo coincido con esta conclusión y considero que es preferible no enlistar ni este nombre ni el de *Hydnum cervinum* como sinónimos de *Sarcodon imbricatus s. s.* para evitar nuevas confusiones sobre los límites taxonómicos de esta especie. De esta forma, en el presente trabajo de tesis sólo se aceptan a *Hydnum imbricatum* L.: Fr. y *Phaeodon imbricatus* (L.:Fr.) Schroet. como sinónimos de *S. imbricatus*, cuyo concepto indudablemente es el mismo para los tres.

En el caso de *Hydnum badium*, considerado como sinónimo de *Sarcodon squamosus* por Johannesson *et al.* (1999), su concepto es más claro y parece referirse al taxón en cuestión. Incluso Donk (1933) consideró a dicho taxón como una especie más del género *Sarcodon*, pero lo refirió bajo la nueva de *Sarcodon badius* (Pers.) Donk. De esta forma, en el presente trabajo ambos nombres, así como *Hydnum squamosum* Schaeff., son aceptados como sinónimos válidos de *S. squamosus*. Sin embargo, la relación que propuso Persoon (1825) entre *H. badium* e *Hydnum subsquamosum* debe ser considerada con detalle en un estudio futuro con la finalidad de alejar cualquier duda sobre el concepto del primero de estos nombres.

6.2.2. Los grupos de *Sarcodon imbricatus sensu lato* con distribución en México

Por otro lado, la presente hipótesis filogenética revela la existencia de otros dos taxones dentro de *Sarcodon imbricatus s. l.*, cuya distribución abarca gran parte del territorio mexicano. Éstos podrían representar nuevas especie dada la distribución y asociación vegetal que cada uno de ellos exhibe.

El primero de estos taxones, denominado aquí como Grupo I (ver Fig. D-1), comprende un grupo de ejemplares caracterizados principalmente por estar asociados con especies del género *Quercus* y cuya distribución conocida hasta ahora abarca una gran variedad de bosques templados, donde se presentan especies de este género de angiospermas, del centro, sur y este de México. Macroscópicamente, el Grupo I semeja en mucho a *Sarcodon imbricatus s. s.* ya que la forma y coloración del basidioma son muy similares entre ellos. Sin embargo, la ornamentación del píleo es más parecida a la observada en *Sarcodon squamosus*, con el cual también comparte la presencia de un olor agradable y un himenio subdecurrente. No obstante, el Grupo I presenta algunas características ecológicas y morfológicas, además de su distribución, que lo definen y lo distinguen del resto de los grupos de *S. imbricatus s. l.*

En cuanto a las diferencias morfológicas que distinguen al Grupo I, éstas parecen ser, al igual en el caso de las especies europeas, sólo a nivel macroscópico. La principal característica macroscópica que diferencia a este taxon del resto de los grupos de *Sarcodon imbricatus s. l.* es la longitud de las espinas, la cual es un mucho mayor que en el resto de los grupos. Por ejemplo, las espinas en *S. imbricatus s. s.* llegan a medir solo hasta 12 mm de longitud (Maas Geesteranus, 1971; Pegler *et al.*, 1997) y en *Sarcodon squamosus* incluso éstas son menores (Schafer, 2000), pero la longitud de estas estructura en el Grupo I van desde los 15 hasta los 35 mm. Adicionalmente, el Grupo I se caracteriza macroscópicamente por presentar tonos naranjas hasta cafés en el basidioma, un píleo deprimido al centro o infundibuliforme y ornamentado por escamas con el ápice generalmente adherido, e himenio subdecurrente. Si bien muchas de estas últimas características no distinguen del todo al Grupo I del resto de los grupos de *S. imbricatus s. l.*, la

combinación de todos los caracteres macroscópicos y ecológicos sí constituyen un conjunto único que permite reconocer al Grupo I como una especie independiente.

Al igual que en el caso de las especies europeas, el Grupo I no presenta ninguna diferencia microscópica respecto con el resto de los grupos de *Sarcodon imbricatus* s. l., ya que éste también presenta un sistema hifal monomítico con fibulas, así como esporas de contorno irregular ornamentadas con tubérculos planos y de talla muy semejante. Sin embargo, es necesario realizar estudios más detallados, empleando técnicas más finas de microscopía, sobre la variación microscópica dentro de este grupo de especies para alejar cualquier duda en este sentido.

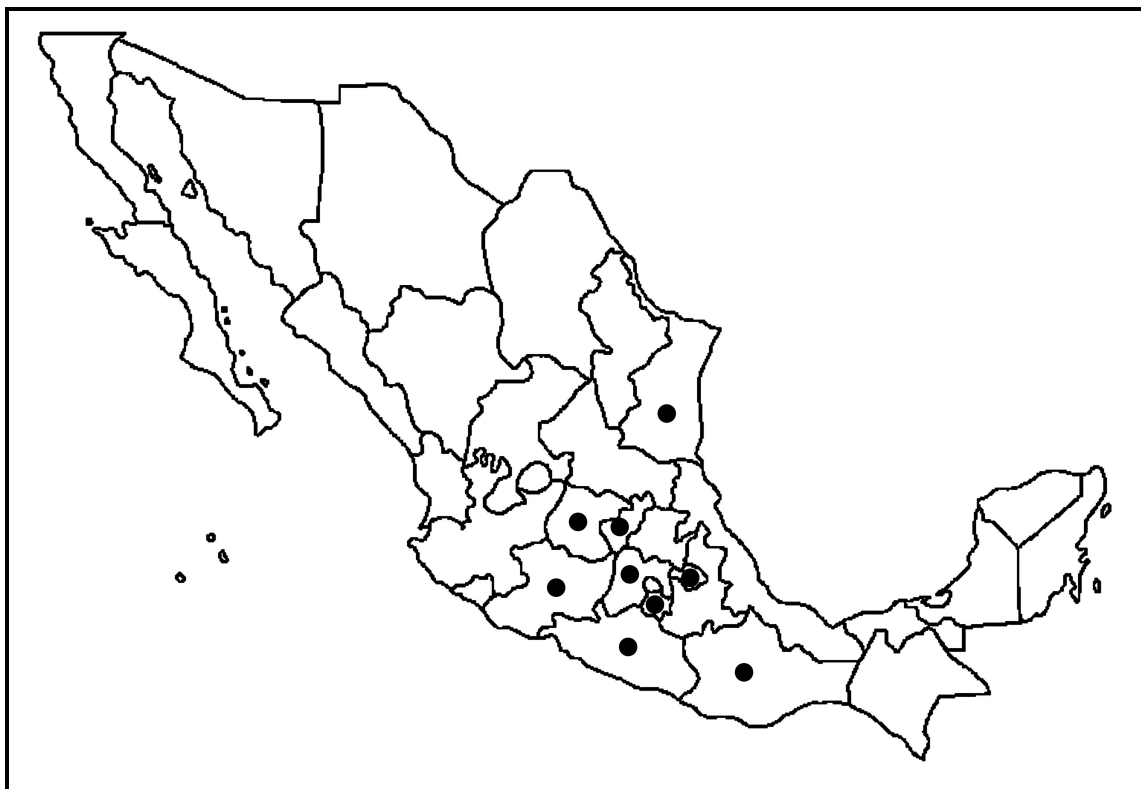
Desde el punto de vista ecológico, el Grupo I se caracteriza y se distingue del resto de los grupos de *Sarcodon imbricatus* s. l. por asociado con especies del género *Quercus*, aunque puede encontrarse en gran variedad de bosques templados en México. Ésto contrasta fuertemente con el tipo de asociación vegetal observado en los taxones europeos y claramente define al Grupo I como otra especie. En términos generales, el Grupo I está conformado por ejemplares procedentes tanto de bosques de *Pinus-Quercus* y de *Quercus*, como mesófilos de montaña (ver Fig. R-2 y Apéndice III). No obstante, la asociación con especies de *Quercus* es factible ya que esta especie no se presenta en zonas donde no se presentan especies de este género de angiospermas ni en donde sólo se presentan especies de *Pinus* o *Liquidambar*, especies también comunes en bosques mixtos y mesófilos de montaña, respectivamente..

Una excepción a esto es el caso del ejemplar con clave Si-H484 (ver Fig., R-1 y Apéndice III), el cual fue recolectado en la reserva de El Cielo en el estado de Tamaulipas y cuyas notas de campo refieren bosques de coníferas en la localidad. Sin embargo, en esta zona también encontramos bosques de *Quercus* o mixtos de *Pinus-Quercus*, como es común en muchas regiones templadas de México (Rzedowski 1994), por lo que es posible que este ejemplar haya sido recolectado en una zona de transición en el interior de un bosque de coníferas. Además, es pertinente señalar que en muchas ocasiones los colectores anotan sólo el tipo de vegetación dominante en el sitio de recolección y excluyen cualquier información sobre otros tipos de vegetación adyacente a éste (Cifuentes com. pers.).

La asociación del Grupo I con especies de *Quercus* resulta interesante si consideramos la capacidad de este grupo de hongos para formar asociaciones ectomicorrizógenas y la posibilidad de que ésta podría estar relacionada con el proceso de especiación como lo sugirieron Johannesson *et al.* (1999) en el caso de *Sarcodon imbricatus* s. s. y *Sarcodon squamosus*. Más aún, en el caso del Grupo I el cambio en la asociación vegetal resulta más drástico —de coníferas a angiospermas— que el observado en los taxones europeos, aunque éste parece ser común entre varias especies de hidnoides estipitados macroscópicamente similares que forman ectomicorrizas de las familias *Bankeraceae* o *Thelephoraceae* Chev. Por ejemplo,

Cifuentes (1996) describió una probable nueva especie de *Bankera* que se distingue principalmente de *Bankera fulgineoalba* porque la primera se presenta en bosques de *Pinus-Quercus*, mientras que la segunda sólo se ha registrado de aquellos de *Picea*. Así mismo, Baird (1986b), Jülich (1989) y Maas Geesteranus (1975) han considerado a *Hydnellum ferrigipes* Coker como una especie distinta de *Hydnellum caeruleum* (Hornem.:Pers.) P. Karst. debido a que la primera se presenta en bosques de *Quercus* mientras que la segunda en coníferas.

La distribución geográfica del Grupo I abarca gran parte de las regiones templadas de varios estados del centro, sur y este del país como son el Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Querétaro, Tamaulipas y Tlaxcala (ver Mapa D-1). Estas regiones encuentran distribuidas, de acuerdo con Rzedowski (1994), en las siguientes provincias fisiográficas de México: la sierra Madre Oriental, el eje Neovolcánico Transversal, la sierra Madre del Sur y el sistema montañoso del norte de Oaxaca. Es posible que la distribución potencial del Grupo I abarque gran parte de los bosques templados encontrados en estas provincias, siempre y cuando estén presentes especies del género *Quercus* en dichos ecosistemas (ver Mapa D- 2).



Mapa D-1. Distribución conocida para México del Grupo I

Dada la evidencia filogenética, geográfica, ecológica y morfológica considero que el Grupo I constituye una especie distinta de aquellas presentes en Europa. No obstante, lo anterior también plantea nuevas

dudas sobre otros taxones de *Sarcodon imbricatus s. l.* que han sido descritos para México u otras regiones de Norteamérica, con los cuales el Grupo I comparte su distribución y/o asociación vegetal.

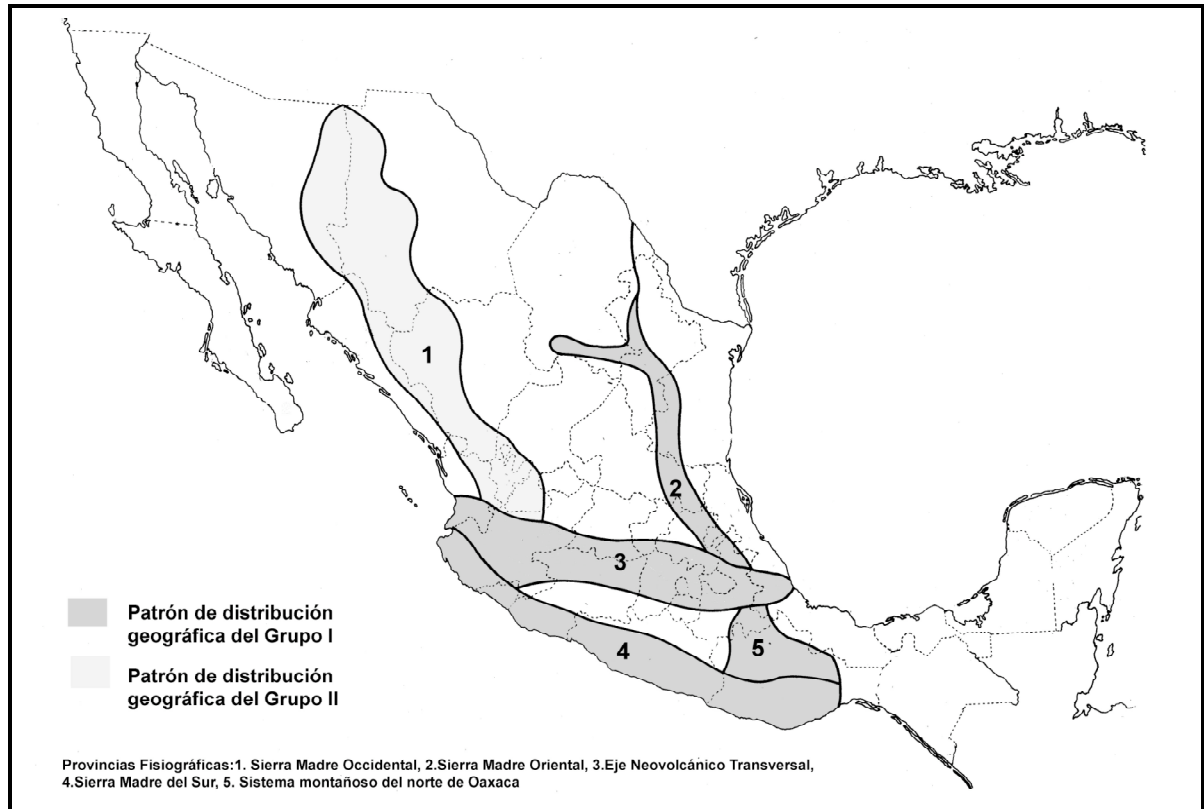
El primero de estos grupos es aquel descrito por Baird (1986a) para bosques deciduos del sureste de los Estados Unidos, el cual fue considerado coespecífico de los taxones europeos por Baird (1986a) y del taxón mexicano por Cifuentes (1996). Sin embargo, la presente hipótesis filogenética de *Sarcodon imbricatus s. l.* sugiere que dadas las afinidades geográficas y ecológicas de este grupo con el Grupo I podría tratarse de la misma especie. Es necesario incluir en un estudio más amplio ejemplares de otras regiones de Norteamérica para corroborar o refutar dicha propuesta.

Otra duda que aún queda por resolver se desprende de los trabajos realizados por Guzmán (1977) y Cifuentes (1996), quienes también citaron a *Sarcodon imbricatus s. l.* para bosques de coníferas del centro de México. Más allá de poner en duda la presente hipótesis filogenética sobre el Grupo I plantean la posibilidad de que en estas regiones de México se encuentre presente otra especie más de complejo de *S. imbricatus s. l.*, dadas las diferencias ecológicas entre éste y el Grupo I. No obstante, esta conclusión aun debe ser considerada como tentativa ya que hasta el momento no ha sido posible incluir secuencias de la región de los ITS de ejemplares de estas regiones.

Por otra parte, la presente hipótesis filogenética sugiere la existencia de otro taxón —denominado aquí como Grupo II— del grupo *Sarcodon. imbricatus s. l.* en México, el cual a diferencia del Grupo I, se distribuye en el noroeste del país. Aunque hasta el momento este grupo sólo está representado por el ejemplar Si-VO502 procedente del estado de Chihuahua, es posible que este taxón se trate de una especie distinta tanto de aquellas presentes en Europa como del Grupo I dadas las enormes diferencias moleculares entre éste y el resto de los ejemplares mexicanos (ver págs. 34 y 35 y Tabla R-2 en Resultados), así como con aquellos de los taxones europeos. Además, la distribución geográfica de este grupo sugiere un origen distinto de aquel del Grupo I, y sugiere que ésta puede llegar a extenderse a gran parte de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Occidental (ver Mapa D-2). En cuanto al tipo de asociación vegetal del Grupo II aún no se puede afirmar algo al respecto, ya que los datos de campo del ejemplar Si-VO502 señalan que éste fue recolectado en un bosque de *Pinus-Quercus* (ver Apéndice III), lo cual deja una incertidumbre en este sentido. No obstante, la evidencia molecular, filogenética y geográfica claramente apunta a que este grupo se trata de otra especie mas del complejo, aunque es importante señalar que se requiere incluir un mayor número de ejemplares de ésta región del país para corroborar los presentes resultados.

Otro aspecto importante a destacar sobre los resultados obtenidos para las especies de *Sarcodon imbricatus s. l.* presentes en México es aquel relacionado con los patrones distribución que exhiben los

Grupos I y II, los cuales potencialmente abarcan las provincias fisiográficas de la Sierra Madre Oriental, el Eje Neovolcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur y el Sistema Montañoso del norte de Oaxaca en el caso del Grupo I, y la Sierra Madre Occidental en el caso del Grupo II (ver Mapa D-2).



Mapa D-2. Patrones de distribución geográfica de los Grupos I y II en México

Este patrón de distribución resulta interesante desde el punto de vista biogeográfico, ya que junto con la evidencia filogenética, sugiere que cada una de estas especies llegaron a territorio mexicano por distintas vías, una del lado este y otra del oeste. Este tipo de patrones biogeográficos en hongos, especialmente en macromicetos ha sido descrito en gran parte de Norteamérica, por ejemplo, en México Guzmán (1973), Estrada-Torres (1994) y Cifuentes (1996) han señalado que muchas especies exhiben una distribución este-oeste; mientras que en los Estados Unidos se ha descrito que *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer incluye a dos grupos genéticamente distintos que coinciden con este tipo de patrones (Hugues *et al.*, 1999; Methven *et al.*, 2000). Otro ejemplo es el caso *Armillaria mellea sensu stricto*, el cual de acuerdo con un análisis de la región de los ITS e IGS también puede ser segregado en varios grupos geográficos, de los cuales uno se encuentra en el este y el otro en el oeste de Norteamérica (Coetzee *et al.*, 2000). Lo anterior sugiere que la distribución en hongos puede estar fuertemente influenciada por la historia biogeográfica del región donde éstos se distribuyen, así como por su historia filogenética.

Por otra parte, se ha visto que este tipo de patrones biogeográficos en el caso de aquellas especies que presentan algún tipo de asociación ecológica, como aquellas de tipo mutualista o de parasitismo, pueden estar influenciadas por la especificidad en la asociación (Wu *et al.*, 2000). Ésto refleja en mucho lo observado en la distribución de los diferentes grupos de *Sarcodon imbricatus s. l.* y de manera particular en el Grupo I, cuya distribución parece estar fuertemente determinada por su asociación vegetal. Otro ejemplo de ello, es el caso del patógeno *Armillaria nabsnona* Volk & Burdsall, cuya distribución está restringida a la costa oeste de los Estados Unidos y específicamente a bosques de maderas duras donde se encuentran especies del género *Alnus* (Volk *et al.*, 1996).

Recientemente, Halling (2001) señaló que diversas especies de hongos ectomicorizógenas exhiben patrones de distribución muy semejantes a aquellos de sus hospederos, sugiriendo una co-migración entre los componentes de esta simbiosis. Un claro ejemplo de ello es la asociación que se da entre un grupo monofilético de especies del género *Suillus* Gray y varias especies de *Pinus* subgénero *Strobus* (Kretzer *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000). Más aún, muchos de estos patrones de co-migración parecen estar fuertemente determinados por la historia geológica y biogeográfica de las regiones en cuestión (Wu *et al.*, 2000; Halling, 2001). Para el caso de México, Contreras-Medina & Eloisa-León (2001) han identificado tres componentes biogeográficos que explican el origen de la biota mexicana, uno sudamericano, otro norteamericano oriental y otro más occidental, lo cual sugiere que la distribución de los Grupos I y II podría ser el resultado de una co-migración con sus respectivos hospederos. Sin embargo, la corroboración o refutación de estas hipótesis requiere del empleo de metodologías biogeográficas apropiadas, así como de ampliar el muestreo del grupo interno además de contar con hipótesis filogenéticas de sus hospederos.

6.2.3. *Sarcodon aspratus*

Por último, la presente hipótesis filogenética sugiere que *Sarcodon aspratus* es una especie distinta de aquellas presentes en Europa y México, y por tanto no debe ser considerada un sinónimo de *Sarcodon imbricatus s. l.* Esto corrobora las sospechas de Maas Geesteranus (1971), quien señaló que este taxón podría tratarse de otra especie dadas algunas diferencias morfológicas sutiles. Lamentablemente durante el presente trabajo de tesis no fue posible revisar el material tipo de esta especie ni tampoco ninguna descripción de ésta. No obstante, la comparación de algunas fotografías de esta especie con aquellas de otros del grupo de *S. imbricatus s. l.* estudiados aquí, revelan algunas diferencias macroscópicas como la forma infundibuliforme del basidioma y un himenio muy decurrente, las cuales junto con las escamas más delgadas reportadas por Maas Geesteranus (1971), definen claramente a esta especie. Sobre

su asociación vegetal no existen datos precisos ya que hasta el momento no se ha registrado en bosques de coníferas, sin embargo, su distribución se restringe al este de Asia.

Por otra parte, *Sarcodon aspratus* y *Sarcodon* sp. macroscópicamente son muy similares, sin embargo, es poco probable que estos taxones se traten de la misma especie dadas las diferencias ecológicas y moleculares que se han observado entre éstas. En primer lugar, *Sarcodon* sp. sólo ha sido registrada de bosques de *Abies* del centro de México y presenta tonos rosados cuando fresco y vináceos cuando seco (Cifuentes, 1996), a diferencia de *S. aspratus* que parece presentar más bien tonos cafés. Además, la proporción de diferencias entre las secuencias de estos taxones es de 0.07, siendo mucho mayor que aquella observada entre otros grupos de *Sarcodon imbricatus* s. l. (ver Tabla R-2 en Resultados). Sin embargo, estas conclusiones debe ser tomadas con precaución hasta que no se realice un nuevo análisis filogenético que incluya una mayor cantidad de representantes de estos dos taxones.

7. CONCLUSIONES

La delimitación de las especies en hongos ha ocupado un lugar importante en las innumerables discusiones taxonómicas que se han dado a lo largo de la historia de la micología. Tradicionalmente, los especialistas han reconocido las especies de hongos bajo el concepto morfológico y han hecho uso para ello tanto de caracteres macroscópicos como microscópicos, siendo estos últimos a los cuales les han asignado un mayor valor taxonómico. Sin embargo, en la actualidad nuevos enfoques sobre esta problemática han comenzado a revelar que muchas especies morfológicas pueden estar agrupando varias especies desde el punto de vista biológico y filogenético. De manera particular, el uso de un concepto filogenético y de la disposición de métodos *ad hoc* han resultado beneficiosos para el estudio de la diversidad del reino Fungi, ya que nos permiten tener una mejor evaluación de la riqueza específica de los diferentes grupos de hongos y proveen de un marco robusto para la elaboración de programas sobre el uso y conservación de estos invaluable recursos.

Un claro ejemplo de lo anterior es el caso *Sarcodon imbricatus s. l.*, cuyos límites taxonómicos han sido el centro de uno de más intrincados y antiguos debates de la sistemática del orden *Thelephorales* y en general de la micología. La aplicación de métodos filogenéticos y de un concepto de especie congruente con la teoría filogenética, así como el empleo de datos moleculares, han abierto una nueva perspectiva para abordar ésta y otras problemáticas de naturaleza semejante en el campo de la micología. Así mismo, proporcionan un marco teórico para el estudio de los procesos de especiación o de algunos factores que pudiesen haber estado involucrados en éste.

Al respecto, los resultados obtenidos durante la presente investigación de tesis revelan la existencia de una fuerte estructura filogenética dentro de *Sarcodon imbricatus s. l.*, la cual apoya la idea de segregar a este taxón en varias especies no sólo con base en las diferencias moleculares sino también en aquellas de índole ecológico e incluso morfológico. Entre estas encontramos a: *S. imbricatus s. s.*, *S. squamosus*, *S. aspratus* y dos nuevas especies, cuya distribución hasta ahora conocida abarca varias regiones templadas de México. Ésto corrobora las propuestas de Schaeffer (1767 - 1774) y Johannesson *et al.* (1999) para aquellos taxones descritos de Europa y confirma las sospechas de Maas Geesteranus (1971) y Cifuentes (1996) para el caso de los taxones estudiados por ellos en el este de Asia y en México, respectivamente. Por otra parte, los resultados sugieren que las asociaciones ectomicorrízogenas que forman este grupo de especies de hongos con varios grupos de gimnospermas y angiospermas podrían estar fuertemente involucrados en los procesos de especiación, y así brindarnos una explicación para la distribución actual de estos taxones.

En términos generales, la presente hipótesis filogenética sobre *Sarcodon imbricatus s. l.* sugiere que además de las diferencias macroscópicas y químicas observadas entre las especies que conforman a este complejo, aquellas relacionadas con el tipo de asociación vegetal son contundentes y por tanto podrían brindarnos una mejor evidencia de los límites filogenéticos y taxonómicos de todas estas especies previamente confundidas. En primer lugar, *Sarcodon imbricatus s. s.* y *S. squamosus* se encuentran asociadas a bosques de *Picea* y *Pinus* en Europa, respectivamente. Incluso hay evidencia de que no existe flujo génico entre estas especies como lo plantearon Johannesson *et al.* (1999), lo cual podría ser el resultado de un proceso de especiación mediado en gran parte por la asociación vegetal como lo sugieren los presentes resultados.

Un caso similar al anterior es aquel de las especies con distribución en México, una de los cuales parece estar asociado a bosques de *Pinus* y la otra a aquellos donde se presentan especies del género *Quercus*. Particularmente, el tipo de asociación vegetal que presenta este último taxón contrasta con aquellas observadas en el resto de los taxones estudiados aquí y claramente define a éste como una especie distinta dada la importancia de esta característica dentro de este grupo de hongos. No obstante, aún queda por resolver la relación de este taxón con aquel descrito de bosques deciduos del este de los Estados Unidos por Baird (1986a y b). En cuanto al otro taxón, llamado aquí como Grupo II, por ahora podemos decir poco ya que el presente análisis incluyó un sólo ejemplar de éste, sin embargo, existe evidencia relacionada con el tipo de asociación y la distribución geográfica de éste que apoyan la idea de que se trata de una cuarta especie del complejo y la segunda con distribución en México. Por otra parte, los resultados sugieren que las especies presentes en México tienen orígenes biogeográficos distintos como consecuencia de algún proceso de comigración con hospederos vegetales.

En cuanto al caso de *Sarcodon aspratus*, aunque no existen datos precisos sobre su asociación vegetal, ésta puede distinguirse claramente de las otras especies tanto por su distribución geográfica, la cual se restringe al este de Asia, como por algunas características macroscópicas.

A partir de estos resultados es evidente que existe una relación entre una especie de hongos con un grupo particular de plantas, lo cual hace referencia a un cierto grado de especificidad en este tipo de relaciones ecológicas. Aunque muchos especialistas han rechazado este concepto en el caso de las asociaciones ectomicorrizógenas, así como en muchas otras de tipo micorrízico, la evidencia actual replantea estas cuestiones y brinda una nueva perspectiva donde el concepto de especificidad no solo puede ser entendido como una relación especie-especie sino una relación entre grupos monofiléticos, independientemente de su jerarquía.

Por otra parte, considerando los resultados y dada la importancia que tienen en estos grupos de hongos las asociaciones ectomicorrizógenas, aún quedan pendientes varias dudas por resolver como aquellas relacionadas sobre los límites y las relaciones filogenéticas del taxón descrito de bosques deciduos en Europa por Gulden & Hanssen (1992) o de aquel descrito por Baird (1986a y b) para el mismo tipo de vegetación pero del sureste de los Estados Unidos. De manera particular, el establecimiento de la identidad de este último taxón es prioritario para el conocimiento de este grupo de hongos en nuestro país, ya que este taxón comparte una afinidad geográfica y ecológica con el Grupo I, y por tanto existe la posibilidad de que se traten de la misma especie o al menos de especies cercanamente relacionadas.

En cuanto a las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies que conforman a *Sarcodon imbricatus* s. l., los resultados indican que los grupos europeos están más cercadamente relacionados entre ellos que con cualquier otro de los grupos aquí estudiados, así mismo sugieren que las especies presentes en México -incluyendo los Grupos I, II y *Sarcodon* sp.- tienen un origen filogenético distinto y que éstas migraron junto con sus hospederos por diferentes vías geográficas. Sin embargo, las vías precisas de migración de estos grupos aún son desconocidas y las conclusiones en este sentido deben ser tomadas como preliminares en tanto no se lleve a cabo un análisis filogenético que incluya a todos, o en su defecto, a un mayor número de grupos geográficos y ecológicos de *S. imbricatus* s. l. Lo cual además nos puede proporcionar un marco teórico más robusto para una mejor comprensión sobre los orígenes y las relaciones filogenéticas de las especies de este complejo presentes en México y en el mundo.

8. LITERATURA CITADA

- Anderson J. B. & E. Stasovski. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia** 84: 505 - 516.
- Anónimo. 1994. **Systematic Agenda 2000**. American Society of Plant Taxonomists, Society of Systematic Biologists and Willi Hennig Society.
- Arnolds E. & B. de Vries. 1993. Conservation of Fungi in Europe. In Pegler D. N. (Ed.) **Fungi in Europe. Investigation, recording an mapping**. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E. & T. Lamb. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489 - 522.
- . & K. Wollenberg. 1997. Phylogenetics and the origin of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 94: 7748 - 7755.
- Baird R. E. 1986a. Study of the stipitate hydnums from the Southern Appalachian Mountains, Genera: *Bankera*, *Hydnellum*, *Phellodon*, *Sarcodon*. **Bibliotheca Mycologica** 104. Cramer, Lehre.
- . 1986b. Type studies of North American and other related taxa of stipitated hydnums: genera *Bankera*, *Hydnellum*, *Phellodon*, *Sarcodon*. **Bibliotheca Mycologica** 103. Cramer, Lehre.
- Banker H. J. 1906. A contribution to a revision of the North American Hydnceae. **Memories of the Torrey Botanical Club** 12: 99 -194.
- . 1913. Type studies in the Hydnceae III. The genus *Sarcodon*. **Mycologia** 5: 12 - 17.
- Batsch J. G. C. 1783. **Elenchus Fungorum**. Magdeburg
- Berbee M. L. & J. W. Taylor. 1999. Fungal Phylogeny. In Olivier, R. I. y M. Schweizer. **Molecular fungal biology**. Combridge University Press, Cambridge. 21-77.
- Brasier C. M. 1997. Fungal species in practice: identifying species units in fungi. In Claridge. M. F., Dawah H. A. & M. R. Wilson (Eds.). **Species: the units of biodiversity**. Chapman & Hall, London. 135-169.
- Breitenbach J. & F. Kränzlin. 1986. **Fungi of Switzerland. Vol 2 Heterobasidiomycetes, Aphylophorales and Gasteromycetes**. Verlag Mykologia, Lucerna.
- Bremer B., Jansen R. K., Oxelman B., Backlund M., Lantz H. & K-J Kim. 1999. More characters or more taxa a robust phylogeny —Case study from the coffe family (Rubiaceae). **Systematic Biology** 48: 413 - 435.
- Bresàdola, J. 1932. **Iconographia Mycologica Vol XXI**. Milano.

- Brooks D. R., Mayden R. L. & D. A. McLennan. 1992. Phylogeny and biodiversity: conserving our evolutionary legacy. **Trends in Ecology and Evolution** 7: 55 -59.
- Bruns T. D., White T. J. & J. W. Taylor. 1991. Fungal Molecular Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 22: 525 - 564.
- . 2001. ITS Reality. **Inoculum** 56: 2 - 3.
- Carlile M. J. & S. C. Watkinson. 1994. **The Fungi**. Academic Press Ltd, London.
- Cifuentes B. J., Villegas M. y L. Pérez-Ramírez. 1986. Hongos. *In*: Lot A. y F. Chiang. **Manual de herbario**. Consejo Nacional de la Flora, México, D.F.
- ., Villegas M., Pérez-Ramírez L., Bulnes M., Corona M., González M. del R., Jiménez I., Pompa A. & G. Vargas. 1990. Observaciones sobre la distribución, hábitat e importancia de los hongos de los Azufres, Michoacán. **Revista Mexicana de Micología** 6: 133 - 149.
- . 1996. **Estudio taxonómico de los géneros hidniodes estipitados (Fungi: Aphyllophorales) en México**. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Fac. de Ciencias, UNAM, Mexico D.F.
- Coetzee M. P. A., Wingfield B. D., Harrington T. C., Dalevi D., Coutinho T. A. & M. J. Wingfield 2000. Geographical diversity of *Armillaria mellea s.s.* based on pylogenetic analysis. **Mycologia** 92: 105 - 113.
- ., Wingfield B. D., Bloomer P., Ridley G. S., Kile G. A. & M. J. Wingfield. 2001. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand *Armillaria* species. **Mycologia** 93: 887 - 896.
- ., Wingfield B. D., Bloomer P., Ridley G. & M. J. Wingfield. 2003. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia. **Mycologia** 95: 285 - 293.
- Coker W. C & A. H. Beers. 1951. **The stipitate hydnums of the Eastern United States**. University of North Carolina Press, Chapell Hill.
- Contreras-Medina R. & H. Eloisa-León. 2001. Una visión panbiogeográfica preliminar de México. *In*: Llorente-Bousquets J. & J. J. Morrone. **Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones**. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Cooke M. C. & L. Quélet. 1878. **Clavis Synoptica Hymenomycetum Europaeorum**. Bailliere & Fils, Paris.
- Couch B. C. & L. M. Kohn. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segragation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia** 94: 683 - 693.
- Cracraft J. 1983. Species concepts and speciation analysis. **Current Ornithology** 1: 159 - 187.

- . 1987. Species concepts and the ontology of evolution. **Biology and Philosophy** 2: 329 – 346.
- . 2000. Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. In Wheeler Q. D. & R. Meier (Eds.) **Species concepts and phylogenetic theory**. Columbia University Press, New York. 3 – 14.
- . 2002. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 89: 127-144.
- Dähnecke R. M. & S. M. Dähnecke. 1982. **700 Pilze in Farbfotos**. At Verlag Aarau, Stuttgart.
- DeBry R. W. & R. G. Olmstead. 2000. A simulation study of reduced tree-search effort in bootstrap resampling analysis. **Systematic Biology** 49: 171 – 179.
- de Jong S. N., Lévesque C. A., Verkley G. J. M., Abeln E. C. A. Rahe J. E. & P. G. Braun. 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. **Mycological Research** 105: 658 – 669.
- de Pinna M. C. C. 1996. Comparative biology and systematics: controversies in retrospective. **Journal of Comparative Biology** 1: 3 – 16.
- Díaz-Barriga H., Guevara-Fefer F. y R. Valenzuela. 1988. Contribución a los macromicetos del Estado de Michoacán. **Acta Botánica Mexicana** 2: 21 – 44.
- Dobzhansky T. 1951. **Genetics and the Origin of Species**. Columbia University Press, New York.
- Donk M. A. 1933. Revision der Niederländischen *Homobasidiomycetae-Aphylllophoraceae* II. **Mededeelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijks Universiteit te Utrecht** 9: 278 pp.
- Estrada-Torres A. & R. M. Aroche. 1987. Acervo etnomicológico en tres localidades del municipio de Acambay, Estado de México. **Revista Mexicana de Micología** 3: 109 – 131.
- . 1994. **La familia Gomphaceae (Aphylllophorales: Fungi) en el Estado de Tlaxcala**. Tesis de Doctorado en Ciencias, ENCB, INP, México D. F.
- Farris J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. In Platnick N. I. (Ed.). **Advances in cladistics**. Columbia University Press, New York.
- Feder M. A. 1996. The analysis of physiological diversity: the prospects for pattern documentation and general questions in ecological physiology. In Feder M. A., Bennet A., Bunguen W. & R. Huey (Eds.). **New directions in ecological physiology**. Cambridge University Press. Cambridge.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 738 – 791.

- Fries E. 1821. **Systema Mycologicum Vol 1**. Lund, Sweden. 520 pp.
- . 1828. **Elenchus Fungorum**. Lund, Sweden
- Frost D. R. & A. G. Kluge. 1994. A consideration of epistemology in the systematic biology, with special reference to species. **Cladistics** 10: 259 – 294.
- Frutis I. & G. Guzmán. 1983. Contribución al conocimiento de los hongos del Estado de Hidalgo. **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología** 18: 219 –265.
- Garza F., García J. & J. Castillo. 1985. Macromicetos asociados a bosques de *Quercus rysophylla* en algunas localidades del centro del Estado de Nuevo León. **Revista Mexicana de Micología** 1: 423 – 437.
- . 1986. Hongos ectomicorrízicos en el Estado de Nuevo León. **Revista Mexicana de Micología** 2: 197 – 205.
- Goloboff P. A., Farris J. S., Källersjö M., Oxelman B., Ramírez M. J. & C. A. Szumik. 2003. Improvements to resampling measures of group support. **Cladistic** 19: 324 –332.
- González D. 1996. Codificación de las inserciones – deleciones en el análisis filogenético de las secuencias génicas. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 59: 115 – 129.
- , & E. de Luna. 1996. Sistemática filogenética: teoría, análisis y datos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 59: 97-98.
- . 1998. Marcadores moleculares para estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. **Revista Mexicana de Micología** 14: 1 – 21.
- , y A. Vovides. 2002. Low intralinear divergence in *Ceratozamia* (*Zamiaceae*) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL-F non coding region. **Systematic Botany** 27: 654 – 661.
- Grasso C. & C. Lee. 2004. Combining partial order alignment and progressive multiple sequence alignment increases alignment speed and scalability to very large alignment problems. **Bioinformatics (febrero)**: 1 – 25.
- Groenewald M., Kang J-Ch., Crous P. W. & W. Gams. 2001. ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. **Mycological Research** 105: 651 – 657.
- Groombridge B. 1992. **Global biodiversity: status the earth's living resources, a report**. Champall & Hall, New York. 585 pp.
- Grube M. & S. Kroken. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycological Research** 104: 1284-1294.

- Gulden G. & E. W. Hanssen. 1992. Distribution and ecology of stipitate hydneous fungi in Norway. **Sommerfeltia** **13**: 1 - 59.
- ., Hoiland K., Bendiksen K., Brabdrud T. E., Foss B. S., Jensen H. B., & D. Laber. 1992. Macromycetes and air pollution. **Bibliotheca Mycologica** **144**, Cramer, Vaduz
- Guzmán G. 1966. Macromicetos comunes en la ruta Amecameca - Tlamanca (Volcán Popocatepetl), México. *In* **Guía de Excursiones, III Congreso Mexicano de Botánica**. pp. 13 -16.
- .. 1972. Algunos macromicetos, líquenes y mixomicetos en la zona del Volcán Popocatepetl (Amecameca - Tlamanca, México) *In* **Guías Botánicas de Excursiones en México. I Congreso Latinoamericano de Botánica y V Congreso Mexicano de Botánica**, pp. 17 -42.
- .. 1973. Some distributional relationships between Mexican and United States mycofloras. **Mycologia** **65**: 1319 - 1330.
- .. 1977 **Identificación de los hongos**. Limusa, México, D. F.
- .. & L. Villareal. 1984. Estudio sobre los hongos, líquenes y mixomicetos del Cofre de Perote, Veracruz I: Introducción a la micoflora de la región. **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología** **19**: 107 - 124.
- .. 1994. Algunos aspectos importantes en la ecología de los hongos (especialmente de los macromicetos). **Ecológica** **3**: 1 - 9.
- .. 1998. Inventorying the fungi of México. **Biodiversity and Conservation** **7**: 369 - 384.
- Halling R. E. 2001. Ectomycorrhizae: coevolution, significance, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **88**: 5 -13.
- Hanse L. & H. Knudsen. 1997. **Nordic Macromycetes Vol. 3**, Nordsvamp, Copenhagen.
- Harrington T. C., D. McNew, J. Steimel, Hofstra D. & R. Farrell. 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophistoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. **Mycologia** **93**: 111 - 136.
- .. & D. M. Rizzo. 1999. Defining species in the fungi. *In* Worrall J. J. (Ed.). **Structure and Dynamics of Fungal Populations**. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Harrison K. A. 1961. **The stipitate hydnums of Nova Scotia**. Canada Department of Agriculture Publication 1099, Ottawa.
- .. 1964. New or little known North American stipitate hydnums. **Canadian Journal of Botany** **42**: 1205 - 1233.
- Hawkins J. A., Hughes C. E. & R. W. Scotland. 1997. Primary homology assessment, characters and character states. **Cladistic** **13**: 275 - 283.

- Hawksworth D. L. 1995. The resources base for biodiversity assessments. In Heywood V. T. & R. T. Watson (Eds.). **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hennig W. 1966. **Phylogenetic Systematics**. University of Illinois Press, Urbana.
- Henricot B. & A. Culham. 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affeting *Buxus* spp. and its phylogenetic status. **Mycologia** **94**: 980 - 997.
- Herrera T. & G. Guzmán. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. **Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México** **32**: 33 - 135.
- Hibbett D. S., Fukumasa-Nakai Y., Tsuneda A. & M. J. Donaghue. 1995. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. **Mycologia** **87**: 618- 638.
- , Pine E. M., Langer E., Langer G. & M. J. Donaghue. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. **Proceedings National of Academy Science USA** **94**: 12002 - 12006.
- , Hansen K. & M. J. Donoghue. 1998. Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from an expanded rDNA dataset. **Mycological Research** **102**: 1041 - 1049.
- Hughes K. W., McGhee L. L., Methven A. S., Johnson J. E. & R. H. Petersen. 1999. Patterns of geographic speciation in the genus *Flammulina* based on sequences of the ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 area. **Mycologia** **91**: 978-986.
- Higgins D. G., Thompson J. D. & J. Gibson. 1996. Using Clustal for multiple sequence alignments. In Doolittle R. F (ed.). Computer methods for macromolecular sequence analysis. **Methods in Ezymology** **266**: 382 - 402.
- , Petersen R. H., Johnson J. E., Moncalvo J-M., Vilgalys R., Redhead S. A., Thomas T. & L. L. McGhee. 2001. Infragenic phylogeny of *Collybia s. s.* based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions. **Mycological Research** **105**: 164 - 172.
- Hull D. L. 1997. The ideal species concept and why we can't get it. In Claridge. M. F., Dawah, H. A. & M. R. Wilson (Eds.). **Species: the units of biodiversity**. Chapman & Hall, London. 357 -380.
- Imazeki R., Otani Y. & T. Hongo. 1988. **Fungi of Japan**. Yama-kei Publishers Co., Tokio. 623 pp.
- Isikhuemhen S. O., Monclavo J-M., Nerud F. & R. Vilgalys. 2001. Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium*. **Mycological Research** **104**: 732 - 737.
- Jin J., Hughes K. W. & R. H. Petersen. 2001. Biogeographical patterns in *Panellus stypticus*. **Mycologia** **93**: 309 - 316.

- Johannesson H., Ryman S., Lundmark H. & E. Danell. 1999. *Sarcodon imbricatus* and *S. squamosus* two confused species. **Mycological Research** 103: 1447 - 1452.
- Jülich W. 1981. **Higher taxa of Basidiomycetes**. Cramer, Vaduz.
- . 1989. **Guida a la determinazione dei funghi**. Saturnia, Vaduz.
- Karsten P. 1881. Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, Systemate novo dispositarum. **Revue Mycologique** 3 (9): 20
- Karsten P. 1889. Fungi aliquot novi in Brasilia a Dre. Edw. Wainio anno 1885 lecti. **Hedwigia** 28: 190 - 195.
- Kerrigan R. W., Callac P., Xu J. & R. Noble. 1999. Population and phylogenetic structure within the *Agaricus subfloccosus* complex. **Mycological Research** 103: 1515 - 1523.
- Ko K. S. & H. S. Jung 2002. Three nonorthologous ITS₁ types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 23: 112 - 122.
- Koljalg U., Dahlberg A., Taylor A. F., Larsson E., Hallenberg N., Stenlid J., Larsson K. H., Fransson P. M., Karen O. & L. Johnsson. 2000. Diversity and abundance of resupinate thelephoroid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. **Molecular Ecology** 9: 1985 - 1996.
- , & Dunstan W. A. 2001. *Pseudomentella larsenii* sp. nov. (*Thelephorales*), a common ectomycorrhiza former in dry eucalypt and woodland forests of Western Australia. **Harvard Papers in Botany** 6: 123 - 130.
- , Jakucs E., Boka K. & R. Agerer. 2001. Three ectomycorrhizae with cystidia formed by different *Tomentella* species as revealed by rDNA-ITS sequences and anatomical characteristics. **Folia Cryptogama Estonia** 38: 27 - 39
- Koljalg U., Tammi H., Timonen S., Agerer R. & R. Sen. 2002. ITS rDNA sequence-based phylogenetic analysis of *Tomentellopsis* species from boreal and temperate forests, and the identification of pink-type ectomycorrhizas. **Mycological Progress** 1: 81 - 92.
- Kretzer A., Li Y., Szaro T. & T. D. Bruns. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus sensu lato*: phylogenetic and taxonomic implications. **Mycologia** 88: 776 - 785.
- Kroken S. & J. W. Taylor. 2001. A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized *Letharia*. **Mycologia** 93: 38 - 53.
- Largent D., Johnson D. y R. Watling. 1980. **How to identify mushrooms to genus III: microscopic features**. Mad River Press, Eureka.

- Larsson K-H., Larsson E. & U. Koljalg. 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. **Mycological Research** 108: 983 – 1002.
- Lee C., Grasso C. & M. Sharlow 2002. Multiple sequence alignment using partial order graphs. **Bioinformatics** 18: 94-96.
- Linneus K. 1753. **Species Plantarum**. Estocolmo.
- Maas Geesteranus R. A. 1956. The stipitate Hydnums of The Netherlands — 1. *Sarcodon* P. Karst. **Fungus** 26: 44-60.
- Maas Geesteranus R. A. 1960. Notes on the hydnums – II. **Persoonia** 1: 341 – 384.
- . & J. A. Nannfeldt. 1969. The genus *Sarcodon* in Sweden in the light of recent investigations. **Svensk Botanisk Tidskrift** 63: 401 – 440.
- . 1971. **Hydnaceous fungi of the Eastern old world**. North Holland Publishing Co.
- . 1975. **Die Terrestrischen stachelpilze europas**. Verhandelingen der Koninklijke Neerlands Akad.emic van Wetenschappen Afd. Natuurkunde, Tweede Reeks 65, Amsterdam.
- MacKenny M. & D. Stuntz. 1987. **The New Savory Wild Mushrooms**. University of Washington Press, Seattle.
- Maddison D. R. & W. P. Maddison. 2002. **MacClade 4 version 4.05**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Mapes C., Guzmán G. & J. Caballero. 1981. **Etnomicología Púrepecha. El conocimiento y uso de los hongos en la cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán**. Dirección General de las Culturas Populares-Sociedad Mexicana de Micología, México, D. F.
- Martínez-Alfaro M. A., Pérez-Silva E. & E. Aguirre-Acosta. 1983. Etnomicología y exploraciones micológicas en la Sierra Norte de Puebla. **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología** 18: 51 – 63.
- Mayr E. 1942. **Systematics and the Origin of Species**. Columbia University Press, New York.
- Methven A., Hugues K. W. & R. H. Petersen. 2000. *Flammullina* RFLP patterns identify species and show biogeographical patterns within species. **Mycologia** 92: 1064 – 1070.
- Miller O. K. 1980. **Mushrooms of North America**. E. P. Dutton, New York.
- Mishler B. D. & R. N. Brandon. 1987. Individuality, pluralism, and the phylogenetic species concept. **Biology an Philosophy** 2: 397 – 414.
- . & E. de Luna. 1997. Sistemática filogenética y el concepto de especie. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 60: 45 – 57.

- , & E. C. Theriot. 2000. The phylogenetic species concept (*sensu* Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. *In* Wheeler Q. D. & R. Meier (Eds.) **Species concepts and phylogenetic theory**. Columbia University Press, New York. 44 - 54.
- Mitchell J. I., Roberts P. J. & S. T. Moss. 1995. Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. **Mycologist** **9**: 67 - 75.
- Montiel E., Portugal D., López L., Mora V. M & L. Acosta-Urdapilleta. 1992. Los hongos ectomicorrizógenos conocidos en el Estado de Morelos (México). **International Journal of Mycology and Lichenology** **5**: 261 -269.
- Moreno G., García Manjon J, L, & A. Zugaza. 1986. **La Guía INCAFO de los hongos de la Península Ibérica**. INCAFO S. A., Madrid.
- Morrison D. A. & J. Y. Ellis. 1997. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of Apicomplexa. **Molecular Biology and Evolution** **14**: 428 - 441.
- Mueller G. M., Wu Q.-X., Huang Y.-Q., Guo S.-Y., Aldana-Gomez R. & R. Vilgalys 2001. Assessing biogeographical relationships between North American and Chinese macrofungi. **Journal of Biogeography** **28**: 271 - 281.
- Mueller L. D. & F. J. Ayala. 1982. Estimation and interpretation of genetic distance in empirical studies. **Genetical Research** **40**: 127 - 137.
- Myllys L., Lohtander K. & A. Tehler. 2001. Beta-Tubulin, ITS and group I intron sequences challenge the species pair concept in *Physcia aipolia* and *P. caesia*. **Mycologia** **93**: 335 - 343.
- Niemelä T. & R. Saarenoksa. 1989. On Fennoscandian polypores 10. *Boletopsis leucomeleana* and *B. grisea* described and illustrated. **Karsenia** **29**: 12 - 28.
- Nikolaeva T. A. 1977. Hydnoaceous fungi. **Cryptogameous Plants of the URSS** **6**: 1 - 578.
- Nixon K. C. & Q. D. Wheeler. 1990. An amplification on the phylogenetic species concept. **Cladistics** **6**: 211-223.
- , & J. M. Carpenter. 1993. On uotgruops. **Cladistics** **9**: 413 - 426.
- , 1999. The Parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. **Cladistics** **15**: 407-414.
- O'Donnell K., Cigelnik E. & H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia** **90**: 465 - 493.
- Otieno W., Pérez S.A. & A. Termorshuizen 2003. Characterization of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. **Mycologia** **95**: 160-175.

- Otto P. 1992. Verbreitung und Rückgang der terrestrischen Stachelpilze Ostdeutschlands. **Gleditschia** 20: 153 – 202.
- Pegler D. N., Roberts P. J. & B. M. Spooner. 1997. **British chanterelles and tooth fungi**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Persoon C. H. 1796. **Observationes Mycologicae** 1: 1 – 116 pp. Leipzig.
- Persoon C. H. 1825. **Mycologia Europaea** 2. Erlangen.
- Petersen R. H. 1976. An annotated index for J. C. Schaeffer's 'Bavarian Fungi'. **Mycotaxon** 4: 145 – 154.
- , & K. W. Hughes. 1999. Species and speciation in mushrooms. **Bioscience** 49: 281 – 313.
- Purvis A., Gittleman J.L. & T. Brooks (eds.). 2005. **Phylogeny and conservation**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Quélet L. 1886. Echiridion Fungorum in Europa Media et praesertim in Gallia vigentium. 188 pp.
- Ramírez M. J. 2005. Resampling measures of groups support: a reply to Grant and Kluge. **Cladistics** 21: 83 – 89.
- Rodríguez O., Garza M. & L. Guzmán-Davalos. 1994. Inventario preliminar del hongos del Volcán de Tequila, Estado de Jalisco, México. **Revista Mexicana de Micología** 10: 103 – 112.
- Rosen D. E. 1978. Vicariant patterns and historical explication in biogeography. **Systematic Zoology** 27: 159 – 188.
- Rzedowski J. 1994. **Vegetación de México**. Limusa, México.
- Savage J. M. 1995. Systematics and the Biodiversity Crisis. **BioScience** 45: 673 – 679.
- Schaeffer J. 1767-1774. **Fungorum qui in Bavaria et Palatinatu circa Ratisbonam nascuntur** Vols. I, II, III y IV. Regensburg
- Schafer D. 2000. Dyeing to resurrect an old species? **Field Mycology** 1 (2): 42 – 43.
- Schuh R. 2000. **Biological Systematics**. Cornell University Press. Cornell. 236 pp.
- . 2003. The Linnean System and its 250-years persistence. **Botanical Review** 69: 59-78.
- Schurko A., Mendoza L., de Cook A. W. A. M. & G. R. Klanssen. 2003. Evidence for geographic clusters:molecular genetic differences among strains of *Phytium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia** 95: 200 – 208.
- Shen Q., Geiser D. M & D. J. Royle. 2002. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates. **Mycologia** 94: 472 – 482.

- Sikes D. S. & P. O. Lewis. 2001. beta software, version 1. **PAUPRat: PAUP* implementation of parsimony ratchet searches**. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, USA.
- Sims K. P., Sen R., Watling R. & P. Jeffries. 1999. Species and population structures of *Pisolithus* and *Scleroderma* identified by combined phenotypic and genomic marker analysis. **Mycological Research** 103: 449 - 458.
- Smith H. V. & A. H. Smith 1973. **How to know the non-gilled fleshy fungi**. W. C. Brown Co. Dubuque, Iowa.
- Stalpers J. A. 1993. **The Aphyllophorales fungi I: Keys to the species of the Thelephorales**. Studies in Mycology No. 35. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
- Swofford D. L. 2002. **PAUP* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods**, version 4.0b10/Altevec. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
- Taylor J. W. & T. D. Bruns. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 94: 4510-4515.
- , Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. & M. C. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology** 31: 21 - 32.
- Templeton A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In Otte D. & J. A. Endler (Eds.). **Speciation and Its Consequences**. Sinauer, Sunderland, MA.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 24: 4876-4882.
- Thon M. R. & D. J. Royse. 1999. Evidence for two independent lineages of Shiitake of de Americas (*Lentinula boryana*) based on rDNA and β -tubulin gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 13 (3): 520 - 524.
- Thorne J. L. & H. Kishino. 1992. Freeing phylogenies from artifacts of alignment. **Molecular Biology and Evolution** 9: 1148 - 1162.
- Trappe J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. **Botanical Reviews** 28: 538 - 560.
- Tuthill D. E., Frisvad J. C. & M. Christensen. 2001. Systematics of *Penicillium simplicissimum* based on rDNA sequences, morphology and secondary metabolites. **Mycologia** 93: 298 - 308.

- Valdés-Ramírez M. 1972. Microflora of the coniferous forest on the Mexican Basin. **Plant and Soil** 36: 31-38.
- Vane-Wright R. I. 1996. Systematics and the conservation of biological diversity. **Annals of Missouri Botanical Garden** 83: 47 - 57.
- Varela L. & J. B. Cifuentes, 1979. Distribución de algunos macromicetos del Norte del Estado de Hidalgo. **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología** 13: 75 - 88.
- Vellinga E. C. 2004. Phylogeny and Taxonomy of Lepiotaceous fungi. Thesis Ph. D University of Leiden.
- Vilgalys R. 1991. Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. **Mycologia** 83: 758 - 773.
- , & B. L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 91: 4599 - 4603.
- Volk T. J., Burdsall H. H. Jr. & M. T. Banik. 1996. *Armillaria nabsnona*, a new species from North America. **Mycologia** 88: 484 - 491.
- Wanntorp H. E., Nilsson D.R., Nylin S., Ronquist F., Stearns S.C. & N. Wedell. 1990. Phylogenetics approach in ecology. **Oikos** 57: 119 - 132.
- Wiens J. J. & M. R. Servedio. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B** 267: 631 - 636.
- Welden A. L. & G. Guzmán. 1978. Lista preliminar de los hongos, líquenes y mixomicetos de las regiones de Uxpanapa, Coatzacoalco, Los Tuxtlas, Papaloapan y Xalapa (parte de los Estado de Veracruz y Oaxaca). **Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología** 13: 151 -161.
- Welden J. F. & J. J. Doyle. 1998. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In: Soltis D. E., Soltis P. S. y J. J. Doyle (eds.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Kluwer Academic Publisher. Massachusetts. 265-296.
- Wheeler Q. D. 1995. Systematics and biodiversity. *Bioscience* 45 (supplement): s21-s28.
- , & R. Meier (Eds.). 2000. Preface. **Species concepts and phylogenetic theory**. Columbia University Press, New York. ix-xii.
- , & N. I. Platnick. 2000. The phylogenetic species concept (*sensu* Wheeler and Platnick). In Wheeler Q. D. & R. Meier (Eds.) **Species concepts and phylogenetic theory**. Columbia University Press, New York. 55-69.

- White J. T. Bruns S. L. y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M. A., Gelfand M.A., Sninsky D.H., J. J. y T. J. White (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego. 315- 322.
- Witthuhn R. C., T. C. Harrington, J. P. Steimel, B. D. Wingfield & M. J. Wingfield. 2000. Comparison of isozymes, rDNA spacer regions and MAT-2 DNA sequences as phylogenetic characters in the analysis of *Ceratocystis coerulescens* complex. **Micologia** **92**: 447 - 452.
- Wu Q-X., Mueller G. M., Luztoni F. M., Huang Y-Q. & S-Y. Guo. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationships of eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species (*Fungi*) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **17**: 37 - 47.
- Yoder A. D. & J. A. Irwin. 1999. Phylogeny of the Lemnaceae: effects of character and taxon sampling on resolution of species. **Cladistics** **15**: 351 - 361.
- Zarco J. 1986. Estudio de la distribución ecológica de los hongos (principalmente macromicetos) en el Valle de México, basado en los especímenes depositados en el herbario ENCB. **Revista Mexicana de Micología** **2**: 41 - 72.

APÉNDICES

APÉNDICE I: LISTA DE MATERIALES HERBORIZADOS

Bankera sp. 1 nov.

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Temascaltepec, desviación a El Polvorín, carr. Toluca-Temascaltepec, oct. 05, 1991, **Cifuentes 3245 (FCME 04491)**.

Boletopsis leucomelaena

MÉXICO: QUERÉTARO: Mpio. de Amealco, km 7.5 a la Laguna de Servin, oct. 01, 2001, **Villarruel-Ordaz 2884 (FCME 18526)**.

Hydnellum concrecens

MÉXICO: HIDALGO: Mpio. de Jacala, sept. 21, 2002, **Cifuentes 2002-185 (FCME)²**.

Phellodon excentrimexicana

MÉXICO: QUERÉTARO: Mpio. de Amealco, km 7.5 a la Laguna de Servin, oct. 01, 2001, **Cifuentes 2001-286 (FCME 18118)**.

Sarcodon atrovirides

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA: CAROLINA DEL NORTE: Jackson Cp., Bull Pen Road, 7.3 millas, jul. 24, 1995, **Cifuentes T95-150 (FCME 07926)**.

Sarcodon fulgineoviolaceus

MÉXICO: TLAXCALA: Mpio. de Tlaxco, Cerro El Peñon, km 4-5 de El Rosario al Parque Recreativo El Rodeo, jun, 12, 1992, **Cifuentes 3272 (FCME 08428)**.

Sarcodon imbricatus (sensu lato)

MÉXICO: CHIHUAHUA: Mpio. Guachochi, alrededores de Tonachi, jul. 28, 1997, **Sánchez-Espinosa y Villarruel-Ordaz 502 (FCME 09722)**. **ESTADO DE MÉXICO:** Mpio. de Amanalco, km 55.5 de la carr. Toluca-Amanalco-Valle de Bravo, ag. 22, 1990, **Castillejos 02 (FCME 03033)**; Mpio. de Chapa de Mota, km 1 de la desviación al Observatorio, sept. 10, 1993, **Cifuentes 3586 (FCME 05891)**; oct. 1, 1993, **Sierra Galván 197 (FCME 06081)**; km 75 de la carr. 77 Federal Libre a Jilotepec, oct. 2, 1993, **Villarruel-Ordaz 242 (FCME)**; Mpio. de Valle de Bravo, carr. San José-Valle de Bravo, km 10 desviación a Temascaltepec, jul. 30. 1990, **Cifuentes 3048 (FCME 03834)**; carr. Toluca-Temascaltepec, km 21 de la desviación a Valle

de Bravo, oct. 7, 1989, **Cifuentes 2957 (FCME 02470)**. GUANAJUATO: Mpio. de Guanajuato, Sierra de Santa Rosa, sept. 10, 1995, **Sierra Galván 509 (FCME 07757)**. GUERRERO: Mpio de Atlixac, km 76 de la carr. Chilpancingo-Tlapa, jul. 16, 1982, **Paz Larralde s.n. (FCME 01780)**; Mpio. de Taxco, km 10 de la desviación a Tetipac, jul. 4, 1986, **Luna Zendejas y Cifuentes 2612 (FCME 07823)**; km 8-10 a Tetipac, Taxco-Ixcateopan, jul. 26, 1986, **Macias y Pérez-Ramírez 643 (FCME 13746)**. HIDALGO: Mpio. de Zacualtipan, 4 kms antes de Zacualtipan, Piedra Blanca, ag. 05, 1978, **González Pérez s.n. (FCME 00086)**. JALISCO: Mpio. de Manzanilla de la Paz, 5 kms adelante de la Paz, hacia Mazamitla, ag. 14, 1986, **Guzmán-Dávalos 3449 (IBUG)**; Mpio. de Tequila, km 15-16 de la brecha a la Estación de Microondas Norte en el cerro de Tequila, sept. 21, 1986, **Rodríguez 350 (IBUG)**. MICHOACÁN: Mpio. de Zinapécuaro, zona de Los Azufres, ag. 1984, **Guzmán 26063 (XAL)**; km 5.5 de la carr. San Pedro Jácuaro-Los Azufres, desviación al Balneario Erendira, ag. 30, 1994, **Montañez 42 (FCME 07098)**. MORELOS: Mpio. de Cuernavaca, Col. Del Bosque, sept. 04, 1985, **Mora 1304 (Herbario Micológico, Escuela de Ciencias Biológicas, UAEM)**. OAXACA: Mpio. de Calpulalpan, Paraje Loma del Romero, sept. 15, 1997, **Montañez 202 (FCME 09414)**. QUERÉTARO: Mpio. de Amealco, Laguna de Servin 2, ag. 31, 2001, **Patiño-Conde 57 (FCME 18110)**; km 5.5 de la Laguna de Servin, sept. 30, 2001, **Pérez-Ramírez 2716 (FCME 18417)**. TAMAULIPAS: Mpio. de Gómez Farías, Reserva de la Biosfera El Cielo, La Perra, oct. 29, 1988, **Heredia 486 (FCME 14973)**. TLAXCALA: Mpio. de Totolac, Cerro Tepeticpac, sept. 02, 1992, **Estrada-Torres 3414 (TLXM)**. VERACRUZ: Mpio. de Xico, El Revolcadero, 1 km al sur de Templaderas, Ejido Ingenio El Rosario, Zona del Cofre de Perote, oct. 02, 1984, **L. Villarreal 1575 (XAL)**; jul. 17, 1987, **L. Villarreal 2789 (XAL)**.

Sarcodon lepidus

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Temascaltepec, km 71 de la carr. Toluca-Tejupilco, desviación a Presa Chica, sept. 23, 1988, **Castillejos y Villegas 1115 (FCME 14536)**.

Sarcodon leucopus

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Chapa de Mota, km 75 de la carr. 77 Federal Libre a Jilotepec, oct. 02, 1993, **Sierra Galván 204 (FCME 05920)**. TLAXCALA: Mpio. de Huamantla, Parque Nacional La Malinche, Volcán La Malintzi, sept. 22, 1992, **Cifuentes 3440 (FCME 07824)**.

Sarcodon modestus

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Tejupilco, km 11 del camino de terracería a Nanchititla, ag. 22, 1987, **Nava 80 (ENCB)**.

Sarcodon piperatus

MÉXICO: GUERRERO: Mpio. de Taxco, cerro de El Huizteco, La Capilla, sept. 22, 1994, **Cifuentes 3751** (FCME 07813).

Sarcodon scabripes

MÉXICO: TLAXCALA: Sept. 26, 1992, Cifuentes 3458 (FCME 08099).

Sarcodon scabrosus

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Chapa de Mota, km 75 de la carr. 77 Federal Libres a Jilotepec, oct. 02, 1993, **Sierra Galván 205** (FCME 05923). Tlaxcala: Mpio. de Tlaxco, Cerro El Peñón, km 4-5 de El Rosario al Parque Recreativo El Rodeo, jul. 04, 1992, **Cifuentes 3275** (FCME 04931).

Sarcodon sp.

MÉXICO: ESTADO DE MÉXICO: Mpio. de Jocotitlán, km 11 de la carr. Jocotitlan-Cerro de Microondas, jul. 26, 1990, **Cifuentes 3031** (FCME 03849).

Sarcodon versipellis

MÉXICO: HIDALGO: Mpio. de Zacualtipán, km 100 de la carr. Pachuca-Tampico, oct. 02, 1989, **Cifuentes 2947** (FCME 02679).

APÉNDICE II: LISTA DE MATERIALES PROCESADOS

A continuación se enlistan los materiales herborizados, con sus claves correspondientes, utilizados durante el presente trabajo de tesis para la obtención de las secuencias de la región de los ITS.

No.	Nombre Científico	Colector y No.	Clave
1	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Cifuentes 3048	Si-C3048
2	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Heredia 484	Si-H484
3	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Cifuentes 2957	Si-C2957
4	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Pérez-Ramírez 643	Si-PR643
5	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Montañez 42	Si-M42
6	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Cifuentes 3586	Si-C3586
7	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Estrada-Torres 3414	Si-ET3414
8	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Montañez 202	Si-M202
9	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Patino-Conde 57	Si-PC57
10	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Pérez-Ramírez 2716	Si-PR2716
11	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Castillejos 02	Si-Ca02
12	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Cifuentes 2612	Si-C2612
13	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Guzman 26063	Si-G26063
14	<i>S. imbricatus s. l.</i>	González P. 050878	Si-GoPo50878
15	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Villareal 1575	Si-Vre1575
16	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Villaruel-Ordáz 242	Si-VO242
17	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Paz-Larralde 160782	Si-PL160782
18	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Mora 1304	Si-Mor1304
19	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Sierra 197	Si-S197
20	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Villareal 2789	Si-Vre2789
21	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Villaruel-Ordáz 502	Si-VO502
22	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Sierra 509	Si-S509
23	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Guzmán-Dávalos 3449	Si-GD3449
24	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Rodríguez 350	Si-Rdz350
25	<i>S. leucopus</i>	Sierra 204	Sleu-S204
26	<i>S. leucopus</i>	Cifuentes 3440	Sleu-C3440
27	<i>S. scabrosus</i>	Sierra 205	Ssca-S205
28	<i>S. scabrosus</i>	Cifuentes 3275	Ssca-C3275
29	<i>Sarcodon sp</i>	Cifuentes 3031	Snov-C3031
30	<i>S. fulgineoviolaceus</i>	Cifuentes 3272	Sfv-C3272
31	<i>S. piperatus</i>	Cifuentes 3751	Spi-C3751
32	<i>S. atroviridis</i>	Cifuentes T95-150	Satro-CT95-150
33	<i>S. modestus</i>	Nava 80	Smod-N80
34	<i>S. versipellis</i>	Cifuentes 2947	Sver-C2947
35	<i>S. lepidus</i>	Villegas 1115	Slep-V1115
36	<i>S. scabripes</i>	Cifuentes 3458	Ssci-C3458
37	<i>Hydnellum conrescens</i>	Cifuentes 2002-185	Hydne-Co2-185
38	<i>Boletopsis leucomelaena</i>	Villaruel-Ordáz 2884	Bolepleu-VO2884
39	<i>Phellodon excentrimexicana</i>	Cifuentes 2001-286	Phexmex-Co1-286
40	<i>Bankera sp. 1 nov</i>	Cifuentes 3245	Bnov-C3245

**APÉNDICE III: LISTA DE EJEMPLARES CONSIDERADOS EN EL
MUESTREO TAXONÓMICO DEL GRUPO INTERNO**

No.	Nombre	Clave o No. de acceso a GenBank	Procedencia geográfica	Tipo de vegetación
1	<i>Sarcodon imbricatus s. l.</i>	Si-VO502	MX: Chihuahua	B. de <i>Pinus-Quercus</i> ⁴
2	<i>S. imbricatus s.l.</i>	Si-C3048	MX: Edo. Méx.	B. mesófilo
3	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-C2957	MX: Edo. Méx.	B. mesófilo
4	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-C3586	MX: Edo. Méx.	B. de <i>Quercus</i>
5	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-Cao2	MX: Edo. Méx.	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
6	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-VO242	MX: Edo. Méx.	B. de <i>Quercus</i>
7	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-S197	MX: Edo. Méx.	B. de <i>Quercus</i>
8	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-S509	MX: Guanajuato	B. de <i>Quercus</i>
9	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-PR643	MX: Guerrero	B. mesófilo
10	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-C2612	MX: Guerrero	B. mesófilo
11	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-PL160782	MX: Guerrero	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
12	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-M42	MX: Michoacán	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
13	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-Mor1304	MX: Morelos	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
14	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-M202	MX: Oaxaca	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
15	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-PC57	MX: Querétaro	B. de <i>Quercus</i>
16	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-PR2716	MX: Querétaro	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
17	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-H484	MX: Tamaulipas	B. de coníferas ¹
18	<i>S. imbricatus s. l.</i>	Si-ET3414	MX: Tlaxcala	B. de <i>Pinus-Quercus</i>
19	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103885	S: Grödinge, Sörmland	B. de <i>Picea</i>
20	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103886	S: Björklinge, Uppland	B. de <i>Picea</i>
21	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103887	S: Tuna, Medelpad	B. de <i>Picea</i>
22	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103888	S: Njurunda, Medelpad	B. de <i>Picea</i>
23	<i>S. imbricatus s. s.</i>	AF103889	S: Fiby, Uppland	B. de <i>Picea</i>
24	<i>S. squamosus</i>	AF103890	S: Nacka, Sörmland	B. de <i>Pinus</i>
25	<i>S. squamosus</i>	AF103891	S: Bårdige, Sörmland	B. de <i>Pinus</i>
26	<i>S. squamosus</i>	AF103892	S: Njurunda, Medelpad	B. de <i>Pinus</i>
27	<i>S. squamosus</i>	AF103893	S: Indal, Medelpad	B. de <i>Pinus</i>
28	<i>S. squamosus</i>	AF103894	S: Tallhed, Medelpad	B. de <i>Pinus</i>
29	<i>S. squamosus</i>	AF103895	S: Timrå, Medelpad	B. de <i>Pinus</i>
30	<i>S. squamosus</i>	AF103896	S: Lunsen, Uppland	B. de <i>Pinus</i>
31	<i>S. aspratrus</i>	AF335110	Corea del Sur	B. de coníferas ²

Notas: MX= Mexico, S= Suecia. 1.- Datos vegetación no confirmados. 3.- No existen datos precisos sobre el tipo de vegetación de este ejemplar.