

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

«TAXONOMÍA, ECOLOGÍA Y FILOGENIA DEL GÉNERO *Disciseda* CZERN. (AGARICALES, AGARICACEAE) EN SONORA»

Por:

OSCAR EDUARDO HERNÁNDEZ NAVARRO

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO DE 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de **Oscar** Eduardo Hernández Navarro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias

100

Dr. Maftin Candelario Esqueda Valle Director de Tesis

Dra. Maria Auxiliadora Islas Osuna Asesor

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara Asesor

M.C. Aldo Hiram Gutierrez Saldaña Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González Director General

A Paulina Quintana

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las facilidades otorgadas durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. definitiva y A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Orígen Vegetal (CTAOV), orgullosamente mi segunda *Alma-mater.*

Al Dr. Martín Esqueda Valle, director, asesor, jefe, amigo, colega, **maestro**. Muchas gracias por todo lo que me ha enseñado, por introducirme al apasionante mundo de los hongos. Mi eterno respeto, admiración y agradecimiento.

A los miembros de mi comité de tesis, que los considero maestros y amigos, gracias por sus observaciones, apoyos, jaladas de orejas, etc:

- A la Dra. Mary Islas, por sus enseñanzas en las clases y seminarios (que si hacemos cuentas, nos vimos en micología, bioquímica, biología molecular y dos seminarios), sus consejos y hasta artículos enviados a las 3 de la mañana. Gracias Doctora.
- A la Dra. Carmen Contreras, por toda su paciencia (y vaya que se necesita mucha) hacia mi persona. Gracias por resolver mis dudas, por enseñarme tanto en teoría como en práctica.
- Al M.C. Aldo Hiram Gutiérrez, por ser mi primer maestro de micología, las idas a campo, soporte técnico, en fin, todo. Gracias Aldo MacGyver.

A mis profesores de posgrado, que con sus buenos y no tan buenos ejemplos, me mostraron por dónde sí y por dónde no, y en mayor o menor medida me ayudaron a formarme como persona y como estudiante.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos y asociados: Dr, Esqueda, Aldo, Geo, Beto, Damián, Toño, y Gaby. Gracias por hacer los días más amenos, sus observaciones, comentarios, discusiones de temas, en fin, gracias por formar parte de este gran equipo que somos. ¡Gracias chicos! Los quiero.

Gracias a Georgina Vargas por su apoyo técnico. ¡Gracias tía Geo! Gracias a Juan Villa Ibarra por su apoyo téncino en la redacción del Resumen en Inglés.

A los miembros del laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas: Dra, Mary, Dra. Carmen, Magda, Mitzuko, Lucía, Ignacio y Fox. Gracias por tenerme paciencia y compartirme un poco de sus experiencias, conocimientos y amistad.

A todos los miembros de los laboratorios de Genética de Plantas y Fisiología Vegetal, especialmente a Emmanuel Arispuro y Javier Ojeda, gracias por prestarme sus equipos y hacer amenas esas breves visitas.

A los miembros del laboratorio de marcadores moleculares de CICY: Dr. Felipe Sánchez-Teyer, M.C. Adriana Quiroz, Toño, Pika, Mary, Laura, Zamaria y Huijara, por su compañía y sus consejos.

Al Dr. Jorge Humberto Ramírez por su ayuda en el análisis bioinformático, a pesar de todo. Y a los miembros de su Laboratorio de Bioinformática aplicada de CICY: Ramón Pacheco, Lilly Oyösa y Felipe Barredo-Pool, a éste último y a Silvanna Andrade, gracias por su apoyo técnico y trasmitirme sus conocimientos de microscopía electrónica de barrido.

A los chicos que me recibieron con tanta amabilidad en CICY y se volvieron mis amigos en tan corto tiempo: Zamaria, Laura Espinosa, Laura Seele, Irving, Eduardo, Lupita, Zaira y sobre todo y de manera muy especial a Alfredo Miranda Plaza. Nos volveremos a encontrar.

A Lily Camargo Vázquez, una gran amiga desde hace muchos años, que la vida me hizo coincidir con ella en mi estancia en Mérida, profundamente agradecido por todas tus atenciones, momentos y compañía. Mérida no hubiera sido lo que fue sin ti. Nos volveremos a encontrar ¡Te adoro! A casi todos mis compañeros de Maestría, pero en especial a Mafer (¡Mi Armaaaa!), Beto, David y Valentín, por esas tardes estudiando, los ratos de risas y todo en general.

Al personal de docencia: Laura García, Argelia Marín, Verónica Araiza, Alejandra Córdova y Héctor Galindo. Gracias por su apoyo técnico y Gracias por todo.

A mis amigos, en especial a las perras del Mal: Edna, Vanessa, Diana y Alejandra. También a Carlos y a Miguel. Su cariño y apoyo me ayudan a ser mejor persona. Gente como ustedes son especies en peligro de extinción.

A mi toda familia, tanto materna como paterna, a mi tío Arturo en especial por su apoyo durante la estancia en Mérida. Mi eterno agradecimiento y amor a mi madre: la Mujer Maravilla alias Dra. Rita Navarro, a mis padre Dr. Jacinto Hernández, a mis "nanos" Carlos y Ulises, y a mi Abuelita (Doña Lupita de Navarro), que sin su amor no sería yo quién soy

A todos los que por mi "despistadéz" no nombre y forman parte de mi vida, a la que le agradezco por permitirme conocer a toda esta gente maravillosa.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABLASxi
RESUMENxii
ABSTRACTxiii
INTRODUCCIÓN 1
ANTECEDENTES
Características del Género Disciseda 3
Taxonomía5
Ecología6
Filogenia7
Caracterización Genotípica de los Hongos7
Situación Filogenética Actual de Hongos Gasteroides
Situación Filogenética Actual del Género Disciseda 10
JUSTIFICACIÓN 12
HIPÓTESIS
OBJETIVOS
Objetivo General
Objetivos Particulares 13
MATERIALES Y MÉTODOS 14
Origen del Material Micológico 14
Identificación Taxonómica de las Especies14
Análisis Macroscópico y Microscopía Óptica14

Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido	15
Análisis Ecológico1	15
Caracterización Genotípica de las Especies1	16
Extracción de ADN total 1	16
Amplificación de Fragmentos de ADNr por PCR	17
Análisis de Productos de PCR 1	18
Clonación y Secuenciación 1	18
Análisis Bioinformático 1	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 2	20
Caracterización Taxonómica y Ecológica 2	20
Caracterización Molecular y Filogenética 3	36
CONCLUSIÓN	51
RECOMENDACIONES5	52
Anexo 15	53
LITERATURA CITADA5	57

LISTA DE FIGURAS

1. Desarrollo semihipógeo del basidioma del género Disciseda	4
2. Capilicio del tipo Lycoperdon, desarticulándose en los septos en Disciseda	я
stuckertii	4
3. Representación esquemática de las unidades de repetición del ADN	
ribosomal	8
4. Representación esquemática del procesamiento del ADN ribosomal, así	
como la constitución de las unidades ribosomales.	9
5. Combinación de iniciadores que se utilizaron para amplificar la sección ITS	S1-
5.8S-ITS2.	17
6. Disciseda bovista	21
7. Disciseda candida	23
8. Disciseda hyalothrix	25
9. Disciseda stuckertii	26
10. Disciseda verrucosa	28
11. Disciseda pillosa	30
12. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando bandas íntegras de	
ADNg	37
13. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando Amplificaciones de IT	S1-
5.8S-ITS2 mediante PCR	37
14. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando Digestiones de Clone	S
Recombinantes digeridos con la enzima EcoRI	38
15. Árbol filogenético de las especies estudiadas	43

LISTA DE TABLAS

1. Localidades muestreadas en Sonora, México	31
2. Tabla comparativa de la distribución de las especies según el tipo de	
vegetación	34
3. Análisis de identidad con las secuencias de las bases de datos del GenBa	nk
	39

RESUMEN

Los hongos gasteroides son los principales descomponedores de materia orgánica en las zonas áridas y semiáridas. El género Disciseda posee numerosos conflictos taxonómicos debido a que las especies se discriminan básicamente por la ornamentación esporal. En el herbario "Dr. Martín Esqueda Valle", de la UES, existen varios especímenes de éste género sin identificar, pudiendo tratarse de nuevas especies. Las secuencias de ADN ribosomal, específicamente de los Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) son consideradas como el código de barras para la identificación molecular de especies de hongos. Con el objetivo de contribuir al conocimiento taxonómico, ecológico, corológico y genético de los hongos gasteroides, se revisó todo el material correspondiente a Disciseda depositado en el herbario de la UES. Los organismos se identificaron mediante características morfológicas macro- y microscópicas. Se realizaron además Tablas de localidades y mapas de distribución de cada especie. La caracterización genética se realizó mediante la extracción del ADN genómico, amplificando la sección ITS1-5.8S-ITS2 de cada aislado por PCR, y se clonó utilizando el sistema de clonación T-A y células de Escherichia coli. El ADN plasmídico de los clones recombinantes se obtuvo y fue secuenciado. Sus secuencias nucleotídicas se analizaron mediante el algoritmo BLAST y el Software MEGA 5.05 para obtener árboles de homología. Como resultados se identificaron seis morfoespecies, de las cuales cinco están bien definidas y una se propone como nueva especie para la ciencia con base en evidencia morfológica y molecular. El análisis filogenético discrimina las especies por su ornamentación esporal general: espinas, retículos y verrugas. Es posible que se traten de complejos de especies, por lo que se recomienda analizar otras regiones del genoma y más investigación microecológica.

Palabras clave: Hongos gasteroides, Lycoperdaceae, Taxonomía integrativa, Corología, ITS1-5.8S-ITS2.

ABSTRACT

The Gasteroid Fungi are the organic matter primary decomposers in both arid and semi-arid areas. The genus Disciseda has numerous taxonomic conflicts because the species are discriminated by their spore ornamentation. Several unidentified specimens of this genus are in the fungal collection located at "Dr. Martin Esqueda Valle" herbarium from the Universidad Estatal de Sonora (UES), and there may even be new species to identify. Ribosomal DNA sequences, specifically the Internal Transcribed Spacers (ITS), are considered as the bar code for fungal species molecular identification. All of the material for the genus *Disciseda* was reviewed, looking forward to provide a contribution for the gasteroid fungi taxonomic, ecological, genetic and chorological knowledge. Organisms were identified by morphological characteristics, both macroscopic and microscopic. Tables of localities, as well as distribution maps for each species, were also carried out. Genetic characterization was performed by extracting the genomic DNA, having section ITS1-ITS2-5.8S amplified; the fragment was cloned by using the TA cloning® kit and trough Escherichia coli transformation. The DNAs recombinant plasmid were sequenced and analyzed using the BLAST algorithm, being both aligned and analyzed throughout MEGA 5.5 Software for homology trees. Six morpho-species were identified, out of which five were well defined and one was proposed as new to science, based on morphological and molecular evidence. The species are discriminated by Philogenetic analysis according to their general sporal ornamentation: spines, warts and reticules, probably due to a species complexity. Thus, it is recommended to analyze other regions of the genome, and to have more microecological research performed.

Keywords: Gasteroid fungi, Lycoperdaceae, Integrative Taxonomy, Chorology, ITS1-5.8S-ITS2.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariontes, aclorófilos, heterotróficos y con nutrición osmotrófica (Whittaker, 1959); es decir, secretan enzimas para descomponer materia orgánica, la cual una vez convertida en sustancias más simples, pasa por difusión a través de una membrana semipermeable (Herrera y Ulloa, 2004). Su talo puede variar de unicelular a pluricelular o dimórfico, lo que significa que pueden alternar entre levaduriforme o filamentoso (Bonifaz, 2000). Dichos organismos se encuentran clasificados dentro del reino Fungi, establecido por Whitaker (1959).

Dentro del reino de los hongos, tradicionalmente se incluía la clase Gasteromycetes, propuesta a principios del siglo XIX (Persoon, 1801). Más adelante Fries (1829) publicó el segundo volumen de su obra *«Systema micologycum»*, agrupando organismos cuya única característica en común era el poseer cuerpo fructífero globoso por lo menos durante la fase joven. Sin embargo, muchos autores han sugerido que ésta clase no representa un conjunto monofilético de hongos (Heim, 1971). De hecho, se han producido taxonomías alternativas, colocando a miembros de los Gasteromicetos en el grupo de los Agaricales, Boletales y Russulales (Heim, 1971; Thiers, 1984; Singer, 1986). Así, el término correcto de los Gasteromycetes es «Hongos Gasteroides» (Pegler *et al.*, 1995).

Con respecto al conocimiento sobre los hongos gasteroides en Sonora, se han registrado 122 especies hasta el 2010 (Esqueda *et al.*, 2010; Piña *et al.*, 2010), de las cuáles cinco corresponden al género *Disciseda*. Dicho género es considerado conflictivo debido a sus ambigüedades taxonómicas y a su restringida distribución (Moreno *et al.*, 2007). Dichos estudios se basaron en taxonomía clásica, es decir, utilizando sólo características macro y

microscópicas para su identificación. La taxonomía permite una rápida identificación a nivel de especie, pero se basa más en la literatura publicada y en la experiencia del identificador, lo que puede llevar a confusiones y/o determinaciones incorrectas (Brock *et al.*, 2008). Actualmente se cuenta con herramientas moleculares, como la secuenciación de ADN ribosomal (Rodríguez *et al.*, 2004), que pueden complementar la información fenotípica con datos genotípicos y de esta manera establecer si se trata de una o varias especies.

El uso de las técnicas de taxonomía polifásica, permitirá actualizar la sistemática a través de la filogenia, para comprender la situación evolutiva de los organismos del Género *Disciseda*. Esto ayudará enriquecer el conocimiento sobre la biodiversidad de hongos gasteroides en Sonora, específicamente del género *Disciseda*, sobre el cual los estudios son limitados. Por lo que el objetivo de esta investigación fue caracterizar especímenes del género Disciseda taxonómica, ecológica y molecularmente para contribuir al conocimiento de la micobiota sonorense.

ANTECEDENTES

Características del Género Disciseda

Dentro de la clasificación tradicional de los Gasteromycetes, se incluía el orden de los Lycoperdales, con dos familias, Geastraceae y Lycoperdaceae (Pegler *et al.*, 1995). Dicha familia comprendía géneros como *Lycoperdon*, *Vascellum, Bovista, Calvatia y Disciseda* (Herrera y Ulloa, 2004). El género *Disciseda* fue propuesto por Czernaiev (1845), describiendo a *D. collabescens* como especie tipo e incluyendo a otros dos taxones: *D. compacta* y *D. mollis.* Inicialmente en el género se manejaba como *Diplocystis* bajo la descripción en latín: «Exoperidio suave, hábitat subterráneo, en el marco de la arena» (Saccardo, 1888).

Las especies incluidas en el género *Disciseda* presentan un basidioma globoso, comprimido y lenticular, de 1 a 5 cm de diámetro (Ahmad, 1959). En fase inmadura son semihipógeos, después pierden los cordones miceliares basales y se origina un orificio al exterior, por la cicatriz dejada por dichos cordones (Czernaiev, 1829). Al madurar giran y el orificio se convierte en la boca u ostiolo (Figura 1) (Calonge, 1998). No poseen subgleba, su capilicio es sinuoso con paredes gruesas, de tipo *Lycoperdon*, desarticulándose en los septos (Figura 2) (Mitchel *et al.*, 1975).



Figura 1. Desarrollo semihipógeo del basidioma del género *Disciseda*. Tomado y modificado de Kers (1975).



Figura 2. Capilicio del tipo Lycoperdon, desarticulándose en los septos en Disciseda stuckertii Basado en Kers (1975)

Taxonomía

Para la identificación de las especies de *Disciseda* es necesario seguir claves taxonómicas; a nivel mundial se aceptan unos 15 taxones (Kirk, 2008). A pesar de los esfuerzos de los micólogos, en el género sólo se observa variación consistente en el tamaño y ornamentación esporal (Guzmán y Herrera, 1969). Otros caracteres como el tamaño, color, boca o capilicio, de manera individual resultan pobres para separar a las distintas especies del género (Lizárraga *et al.*, 2010).

Existen reportes de especies para regiones en las que los datos son de dudosa veracidad. Calonge (1998) cita a *D. anomala* para la Península Ibérica basado sólo en un basidioma inmaduro, que se discute ser distinta con respecto a los ejemplares reportados para África y Australia. El mismo autor cita la misma especie para Veracruz, basado en medio basidioma (Calonge *et al.*, 2004). Se han descrito especies nuevas, tales como *D. nigra,* propuesta por Dörfelt y Nowak (2002); sin embargo, el artículo donde se describen carece de imágenes de microscopio electrónico o análisis genómico.

Otros ejemplos de especies poco conocidas, son las propuestas por Grgurinovic (1997) en su libro «*Larger Fungi of South Australia*», proponiendo como nuevas especies a *D. errurraga*, *D. kaloola*, *D. kiata* y *D. muntacola*. Tales especies son citadas únicamente en dicho país y libro, sin imágenes a Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y sin existir publicaciones en revistas al respecto. Posteriormente, May y Shingles (2003), reportaron que dichas especies en realidad son sinónimas, correspondiendo entonces a *D. hyalothrix*, *D. anomala, D. hypogaea y D. cervina*, respectivamente. Sin embargo, *D. hypogeaea* es en realidad *D. verrucosa* y además, en la misma publicación hace mención a *D. pedicellata*, sinónimo de *D. hyalothrix* (Moreno *et al.*, 2003). A la fecha, no se tiene acceso a los ejemplares australianos y los nombres propuestos por Grgurinovic permanecen como válidos en Index Fungorum (2012).

Para Sonora, actualmente se aceptan cinco especies sólidas: *D. bovista*, *D. candida*, *D. hyalothrix*, *D. stuckertii* y *D. verrucosa* (Esqueda *et al.*, 2010).

Cada especie ha tenido sus propios conflictos taxonómicos. Por ejemplo se tenían registradas para Sonora, *D. calva* y *D. cervina* (Esqueda *et al.*, 1995), la primera se considera sinónimo de *D. candida* y la segunda, después de revisar el material tipo, se descartó para la micobiota sonorense (Esqueda *et al.*, 2010). Hernández-Navarro (2011) cita para el municipio «La Colorada» cuatro de las cinco especies sólidas para Sonora y varias colecciones que no pudieron ser determinadas. Todos los ejemplares confusos de los trabajos mencionados, están depositados en el Herbario Dr. Martin Esqueda Valle, de la Universidad Estatal de Sonora (UES). Dicho material no pudo ser clasificado a nivel de especie mediante técnicas taxonómicas.

Ecología

A nivel mundial no se tienen suficientes datos sobre la ecología de éstas especies; se conoce, en Europa, para Alemania (Dörfelt y Nowak, 2002), la Península Ibérica (Calonge, 1998) y Suiza (Kers, 1975). En Asia, existen registros para China (Eckblad y Ellingsen, 1984); en Oceanía para Australia (Grgurinovic, 1997; May y Shingles, 2003); y Dring (1964) lo ha citado para África. En América para Estados Unidos (Bates *et al.*, 2009), México (Lizárraga *et al.*, 2010), Brasil (Gularte Cortéz *et al.*, 2010) y Argentina (Dios, 2001).

En la micobiota mexicana se han registrado 10 de las 15 especies aceptadas mundialmente: *D. hollosiana* Henn., se describió para México por Hennings (1902); *D. brandegei* (Lloyd) Zeller fue redescrita para Culiacán, Sinaloa por Zeller (1947); *D. anomala* (Cooke & Massee) G. Cunn., se registró para Veracruz por Calonge *et al.* (2004); *D. bovista* (Klotzsch) Henn., se conoce en Baja California, Baja California Sur (Calonge *et al.*, 2004), Chihuahua (Lizárraga *et al.*, 2010), Estado de México, Hidalgo (Guzmán y Herrera, 1969), Jalisco (Calonge *et al.*, 2004), Nuevo León (Urista *et al.*, 1985) y Sonora (Pérez-Silva *et al.*, 1994); *D. candida* (Schwein) Lloyd en Baja California (Calonge *et al.*, 2004), Chihuahua (Moreno *et al.*, 2010) y Sonora (Pérez-Silva *et al.*, 1994); *D. cervina* (Berk.) Hollós para Sonora (Esqueda et al., 1995); *D. hyalothrix*

(Cooke & Massee) Hóllos en Baja California (Ochoa y Moreno, 2006), Chihuahua (Laferriére y Gilbertson, 1992) y Sonora (Esqueda *et al.*, 1995); *D. stuckertii* (Speg.) G. Moreno, Esqueda & Altés, del Distrito Federal, Estado de México (Guzmán y Herrera, 1969) y Sonora (Pérez-Silva *et al.*, 1994); *D. subterranea* (Peck) Coker & Couch para Nuevo León (Guzmán y Herrera, 1973) y *D. verrucosa* G. Cunn. en Chihuahua (Moreno *et al.*, 2010) y Sonora (Aparicio-Navarro *et al.*, 1994).

Las 10 especies conocidas de *Disciseda* provienen principalmente del Norte y Noroeste de México y se han colectado en su mayoría en matorrales y pastizales. Sin embargo, Calonge *et al.* (2004) registraron a *D. anomala* para vegetación tropical, así como *D. bovista* y *D. candida* para vegetación de pino y encino. Sonora y Chihuahua son los estados donde mejor se conoce el género, con cinco especies. En el continente americano *D. verrucosa* sólo se conocía para Sonora y recientemente se ha registrado para Chihuahua (Lizárraga *et al.*, 2010).

Filogenia

Caracterización Genotípica de los Hongos

Desde hace más de veinticinco años, se propusieron las secuencias de genes ribosomales como herramienta para la identificación molecular de hongos (Blanz y Unseld, 1987). Sin embargo, recientemente, se ha propuesto a la región correspondiente a los genes ribosomales, que contiene a los espaciadores transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés), como el código de barras universal para la identificación molecular de hongos a nivel de especie (Schoch *et al.*, 2012). En la célula, los ribosomas están conformados por la subunidad: grande y la subunidad pequeña. Estas, que consisten en complejos de ARN ribosomal (ARNr), ribozimas y proteínas estabilizadoras (Lehninger, 2004). Estas son los sitios de traducción y anclaje del extremo 5' del ARN mensajero (ARNm), que es traducido a polipéptidos utilizando ARN de transferencia (ARNt) como acarreador (Solomon *et al.*, 2008). En eucariontes,

los ribosomas se encuentran realizando síntesis de proteínas principalmente en el núcleo y en el retículo endoplasmático rugoso (Lewin, 2008). Los ribosomas eucarióticos contienen cerca de 75 proteínas ribosomales y una copia de los genes 5S y 5.8S de las subunidades pequeña y grande ribosomal (SSU y LSU, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Warner, 2001). Los genes ribosomales pueden estar en un solo *locus*, como ocurre en plantas o pueden encontrarse en dos o más *loci (Belkhiri et al., 1992)*. En genomas eucariontes están organizados en cientos a miles de copias repetidas (en tándem), aunque el número puede variar de especie a especie o de individuo a individuo (Rogers y Bendich, 1987).

En una unidad transcripcional de ADN ribosomal (ADNr), se identifican dos espaciadores transcritos internos denominados ITS1 e ITS2, que separan el gen 5.8S de la SSU y de los genes de la LSU (Figura 3) (Gillespie *et al.*, 2006). Las regiones ITS2 varían en tamaño desde 262 a 1155 nucleótidos (Joseph *et al.*, 1999). Lo ITS son transcritos, sin embargo, después son eliminados durante el procesamiento del ARNm, por lo que no se incluyen durante la traducción (Figura 4) (Coleman, 2003).



Figura 3. Representación esquemática de las unidades de repetición del ADN ribosomal.

Modificado de Gillespie et al., 2006.



Figura 4. Representación esquemática del procesamiento del ADN ribosomal, así como la constitución de las unidades ribosomales.

Situación Filogenética Actual de Hongos Gasteroides

Como se mencionó, los hongos gasteroides se consideraban comúnmente como una clase (Gasteromycetes) (Herrera y Ulloa, 2004). Dentro de ésta se consideraba a los Himenogastrales como los géneros más primitivos debido a la presencia de láminas rudimentarias o seudohimenio (Cunningham, 1944). Los Licoperdales se consideran grupos más nuevos, debido a que la presencia de capilicio se toma como carácter autopomórfico; por otro lado los Sclerodermatales, al no poseerlo, son considerados un grupo más antiguo (Heim, 1971). Sin embargo, hay otros grupos con capilicio como en Podaxales, lo cual se considera un ejemplo de evolución paralela (Dring, 1973).

Por otro lado, existen ciertas transiciones entre Agaricales, Afiloforales y Gasteromicetos (Herrera y Ulloa, 2004). Los gasteromicetos comparten con los Agaricales los estípites, que en muchos están reducidos o ausentes, y las láminas, pero mantienen la columela (Calonge, 1998). Con los Afiloforales, comparten el hecho de que algunos gasteroides se consideran dimíticos, al poseer más de un tipo de capilicio (Pegler *et al.*, 1995). Aun así, la existencia de

eslabones filogenéticos verdaderos entre ambos, está lejos de ser demostrada (Calonge, 1998).

Malencon (1931) considera a los gasteroides un tránsito de Russulales a hipogeos como es el caso de *Martellia, Sclerogaster* e *Hydnangyum*, o de Agaricales a secotioides como *Elasmomyces* y *Arcangella*. Este tránsito es manejado como una «regresión» o «involución» debido a largos periodos de sequía y otras adaptaciones (Dring, 1964). Singer (1986), menciona que los Gasteromycetes son un grupo reducido, concentrado en áreas aisladas, lo que sugiere que sean un grupo viejo en proceso de extinción. Por el contrario, los Agaricales son más numerosos, con apariencia de ser un Filo joven en vías de expansión y conquista (Heim, 1971). Piña (2010) citó por primera vez a *Endoptychum arizonicum*, agarical típico de zonas áridas en vegetación de Encino, lo que permite discutir la adaptación de estas especies. De hecho, es difícil saber en qué dirección va la evolución (Calonge, 1998).

Mediante el uso de técnicas moleculares, la clasificación de los hongos gasteroides cambió enormemente (Hibbett *et al.*, 1997). Géneros como *Astraeus* fueron catalogados en la familia Diplocistydiaceae junto con Sclerodermataceae dentro de Boletales (Binder y Hibbett, 2006). Por otro lado, géneros como *Geastrum* y *Mycenastrum* se ubicaron en Phallomycetidae, donde se encuentran también los antiguos Phallales como *Phallus* y *Clathrus* (*Hosaka et al., 2006*). Sin embargo, la gran mayoría de géneros quedaron incluidos en el orden de los Agaricales en varias familias (Kirk, 2008).

Situación Filogenética Actual del Género Disciseda

El uso de técnicas moleculares ha provocado que la sistemática de hongos se esté modificando con gran rapidez (Hibbett *et al.*, 1997). El orden de los Lycoperdales no fue la excepción (Bates *et al.*, 2009). Los géneros incluidos en la familia Lycoperdaceae se encuentran ahora en el orden de los Agaricales, familia Agaricaceae, incluyendo Disciseda (Kirk, 2008).

No existe mucha información al respecto sobre el género en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (2012). En la actualidad se encuentran depositadas sólo cuatro secuencias de genes ribosomales en el NCBI (2012). Bates et al. (2009) depositaron una secuencia de 749 pb que incluye una secuencia parcial del gen 18S, secuencias completas de ITS1, 5.8S, ITS2 y secuencia parcial de 28S, correspondiente a D. candida (EU833654). Larsson y Jeppson (2008), depositaron dos secuencias de 1027 y 1524 pb, donde cada una incluye secuencia parcial de ITS1, secuencias completas de 5.8S e ITS2 y secuencia incompleta de 28S (2008), correspondientes a D. bovista (DQ112627.1) y D. candida (DQ112626). Por otra parte Hynson y Bruns (2009) depositaron una secuencia de 670 pb que incluye la secuencia completa de ITS1 y secuencia parcial de 28S (2009), con una longitud de 670 pb de una Disciseda no identificada. Como se observa, cada secuencia es de distinto tamaño, ya que corresponde a fragmentos incompletos de distintas regiones del genoma ribosomal.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el conocimiento taxonómico y genotípico sobre hongos gasteroides y específicamente el género *Disciseda* es limitado, a pesar de su importancia ecológica y sus conflictos taxonómicos. La caracterización polifásica de estos organismos, ampliará el conocimiento sobre los hongos gasteroides a nivel estatal, nacional y mundial, y permitirá proponer nuevas especies para la ciencia.

HIPÓTESIS

La caracterización taxonómica y molecular permitirá discriminar las morfo-especies del género *Disciseda*, según su ornamentación esporal.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar morfológica, ecológica y genéticamente a especímenes del género *Disciseda* provenientes de Sonora, mediante taxonomía clásica, macroecología y marcadores moleculares, para contribuir a la delimitación de las especies del género.

Objetivos Particulares

- 1. Caracterizar macro y microscópicamente las recolecciones de *Disciseda* provenientes de Sonora.
- Determinar la vegetación, fisiografía y edafología de las localidades de recolección.
- 3. Relacionar las especies determinadas y su hábitat.
- 4. Analizar filogenéticamente las colecciones de hongos mediante el ADN ribosomal, utilizando las regiones ITS1, 5.8S e ITS2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del Material Micológico

En el presente estudio se revisó todo el material depositado en la colección de hongos «Martín Esqueda Valle» de la Universidad Estatal de Sonora (UES), Unidad Académica Hermosillo, correspondiente al género *Disciseda.* Además se revisaron algunos duplicados en la colección de hongos del Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se elaboró una relación de las localidades en las que se han recolectado especímenes de dicho género en todo el estado.

Identificación Taxonómica de las Especies

Análisis Macroscópico y Microscopía Óptica

La caracterización macro y microscópica se llevó a cabo mediante técnicas convencionales de micología (Cifuentes *et al.*, 1986). Se observaron los especímenes en un microscopio estereoscópico OLYMPUS, a la vez que se realizaron preparaciones para microscopio utilizando azul con lactofenol, rojo congo, KOH, solución de Melzer y líquido de Hoyer. Se analizó el capilicio, así como el tamaño y ornamentación esporal utilizando un microscopio óptico (MO) de contraste de fases OLYMPUS y usando el programa INFINITY ANALYZER (Lumenera Corporation) como procesador de imágenes digitales.

Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido

Este análisis se realizó en el laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, bajo la tutoría del Biol. Felipe Barredo Pool. Una porción de la gleba se colocó en tubos Eppendorf y se fijó en una solución tampón de fosfato mono y dibásico, adicionándole glutaraldehído al 2.5% durante 48 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con la misma solución tampón, dejando reposar una hora en cada lavado y centrifugando a 10,000 x g por cinco minutos y decantando el sobrenadante. Después, se procedió a deshidratar el tejido utilizando alcohol etílico a distintas concentraciones (30, 50, 85, 96 y 100%), dejando reposar durante una hora cada lavado y realizando dos lavados por cada concentración. Las esporas se llevaron a un secador al punto crítico con CO₂ modelo SAMDRI-795. Posteriormente las esporas se llevaron al metalizador DESK II, donde se les dio una cubierta de oro al vacío a un voltaje de 120 mÅmp, presión de 36 mThor y 70 s, para obtener una capa de 150Å aproximadamente. Las muestras se llevaron al microscopio electrónico (JEOL-JSM 600LB) a vacío total, donde se tomaron fotografías de todas las morfoespecies.

Análisis Ecológico

Una vez identificadas las especies se relacionaron las colecciones con sus localidades, se determinó la referencia geográfica de cada espécimen con un GPS Garmin eTrex Vista HCx, utilizando el programa Datum WGS84 como procesador de imágenes digitales y el Software ArcGIS, se correlacionaron las especies con el tipo de vegetación, suelo y altitud de las localidades estudiadas. Se elaboraron mapas de distribución para cada una de las especies identificadas, así como Tablas con las localidades y la distribución de los taxones por tipo de vegetación.

Caracterización Genotípica de las Especies

Esta se realizó en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas con las Dras. Maria A. Islas Osuna y Carmen A. Contreras Vergara de la CTAOV siguiendo los siguientes pasos:

Extracción de ADN total

Un paso fundamental para la caracterización genotípica es la obtención de material genético, en este caso ADN genómico (ADNg) de buena calidad. Para la extracción de ADNg total se utilizó la técnica propuesta por Plaza *et al.* (2004), utilizándose hasta cinco individuos de cada especie. A partir de cuerpo fructífero se tomaron entre 200 y 500 mg de gleba (peso seco), resuspendido en 500 µL de solución tampón de lisis (0.1M NaCl, 0.5M Tris-HCL a pH 8.0, 1mM Na₂EDTA y 5% SDS). Se agregaron 0.2 g de perlas de vidrio de diferentes diámetros (1, 0.5 y 0.1 mm), siendo después homogenizado por 10 min en un vórtex a máxima velocidad. Se centrifugaron por 10 min a 11,000 x g, separando el sobrenadante en tubos nuevos y se repitió el procedimiento de extracción con el precipitado.

Después se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a cada muestra, mezclando por vórtex rápidamente y se centrifugó por 5 min. La capa acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo de nuevo con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclando vigorosamente en vórtex y centrifugando por 10 min a 10,000 x g.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol (para precipitar el ADNg). Se incubaron los tubos en el refrigerador por 1 h, para después centrifugar a 4°C por 10 min a 14,000 x g. Los precipitados resultantes se lavaron dos veces con etanol frío al 70%, se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 μ L de agua MQ estéril. Las muestras se trataron con RNasa (20 μ g/mL), incubando por 15 min

a 37°C. Se determinó la concentración de ADNg a 260 nm, el cual se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizó por tinción con GelRed[™] (BIOTIUM).

Amplificación de Fragmentos de ADNr por PCR

Para analizar las secuencias nucleotídicas de ITS1-5.8S-ITS2 de los hongos identificados como miembros del género *Disciseda*, se utilizaron iniciadores universales diseñados para amplificar por medio de PCR la región que comprende a las secuencias ITS1 e ITS2. Se usaron los iniciadores ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG -3'). Las combinaciones usadas fueron en general ITS1 e ITS4 y en algunos casos ITS5 e ITS4, con los cuales se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 700 pb, que incluye la región incompleta del 18S, ITS1 (187 a 298 pb), el gen corresponde al 5.8S (160 pb) y la región ITS2 (187 a 252 pb), así como región parcial del 28S (Figura 5).



Figura 5. Combinación de iniciadores que se utilizaron para amplificar la sección ITS1-5.8S-ITS2.

Las condiciones de amplificación utilizadas en las reacciones de PCR iniciaron con una desnaturalización a 94°C por 3 min. Después 30 ciclos comprendidos cada uno por un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, seguida de una alineación a 52°C por 30 s y una extensión a 72°C por 1 min y finalmente, un paso de extensión a 72°C por 10 min, para terminar la reacción enfriando a 4°C.

Análisis de Productos de PCR

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% usando una solución tampón TBE (Tris, borato y EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989). Después los geles fueron teñidos con GelRed[™] 1X, se visualizaron y fotografiaron con un fotodocumentador digital Kodak DS DC120 en luz ultravioleta, se analizaron utilizando el programa para fotodocumentación KODAK.

Clonación y Secuenciación

Una vez visualizados los fragmentos esperados se procedió a ligarlos al vector de clonación pCR 2.1 (INVITROGEN) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, utilizando T4 DNA ligasa e incubando toda la noche a 4°C. El vector conteniendo la secuencia de interés (plásmido), se introdujo mediante choque térmico a 42°C por 1 min, a células de *E. coli* TOP10. Estas células se crecieron a 37°C en placas con agar Luria-Bertani adicionado con 100 µg/mL de ampicilina. Las colonias que contienen el plásmido, se seleccionaron y posteriormente se inocularon en caldo LB adicionado con ampicilina para extraer el ADN plasmídico (ADNp) siguiendo la técnica de Lisis Alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para confirmar la presencia del inserto, se realizó una digestión del plásmido incubando a 37°C por 1h, utilizando la enzima de restricción *EcoR*I, debido a que el inserto se ubica entre dos sitios de corte para ésta enzima que reconoce la secuencia palindrómica 5'-GAATTC-3'. El

producto de la digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Finalmente, el ADNp se limpió utilizando el sistema comercial QIAGEXII (QIAGEN) y se envió a secuenciar por ambos extremos al "Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core" en la Universidad de Arizona en Tucson, Arizona, utilizando los iniciadores M13 Fw y M13 Rv.

Análisis Bioinformático

Para todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó la búsqueda de la identidad, utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul *et al.*, 1997). Posteriormente, fueron editadas y alineadas utilizando el software Sechencher versión 4.14. Se buscó el modelo de mejor ajuste para el algoritmo seleccionado de Máxima Verosimilitud (ML) para finalmente, elaborar un árbol de homología con Boootstrap de mil réplicas utilizando; el Software MEGA 5.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Taxonómica y Ecológica

Disciseda bovista (Klotzsch) Henn. Stud. Nat. Hist. Iowa Univ. 42: 128 (1903).

Basidioma subgloboso, 17-28 × 9-14 mm, color marrón amarillento. Estoma irregular, a veces ligeramente fimbriado. Exoperidio con hifas sin septos de \leq 3 µm de diámetro, poco entremezcladas con materia orgánica. Endoperidio ligeramente verrucoso, con tres capas que tienden a oscurecerse, arrugarse y desprenderse con la intemperización, la cual inicia generalmente en la base; la capa externa, intermedia e interna con hifas de 5-6, 10-16 y \leq 3.5 µm diámetro respectivamente; la capa interna con hifas no porosas y acintadas. Gleba marrón, marrón oscuro a ligeramente rojiza. Capilicio de paredes gruesas, marrón oscuro a rojizo, no porosas. Basidiosporas globosas, 6.4-8 µm diám., episporio \leq 1 µm de grosor, conformado por delicadas verrugas rectas y planas, visibles en MO bajo inmersión (Figura 6).

Taxón con el mayor número de colecciones registradas, en el 50% de las localidades muestreadas y en los seis tipos de vegetación. Podría formar parte de un complejo de especies, ya que el tamaño y ornamentación esporal son intermedios entre *D. candida* y *D. verrucosa*. Se diferencia de la primera por su ornamentación más evidente y de mayor tamaño esporal; de la segunda porque no forma procesos digitiformes como los que se muestran en la figura 6.

Material Estudiado: Localidad 2, UES 8642a, 8634, 8637, 8638, 8639, 8640, 8641a, 9602, 8643a, 8644; Localidad 5, UES 8351, 8362, 8681, 8682, 8683, 8685, 9600; Localidad 10, UES 1257, 2614, 2697, 3976, 2697, 3298, 2166, 4791, 3252, 10034, 10077, 10164, 10165, 10186, 10197; Localidad 13, UES 2503, 2694, 2772, 3645, 4283, 2767; Localidad 14, UES 2711a;



Figura 6. *Disciseda bovista*. a. Basidioma (UES 1257). b. Basidiomas (UES 1254). c. Mapa de distribución en Sonora. d-e. Esporas bajo MEB (UES 1257). f. Espora bajo MEB (UES 1254).

Localidad 15, UES 3751; Localidad 16, UES 2485, 2643, 3704; Localidad 17, UES 1254; Localidad 22, UES 2823; Localidad 23, UES 5208; Localidad 24, UES 2826, 2624; Localidad 25, UES 2223, 2817; Localidad 27, UES: 4548b; Localidad 29, UES 8575; Localidad 31, UES 8370; Localidad 34, UES 3253; Localidad 36, UES 3251; Localidad 38, UES 8230, 8232, 8237; Localidad 40, UES 9008a.

Disciseda candida (Schwein.) Lloyd, Mycol. Writ. 1: 100 (1902).

Basidioma globoso, aplanado, de (5-) 10-18 mm diámetro, liso a estriado al madurar, color marrón grisáceo a blanco isabelino con la intemperización. Estoma circular a indefinido, con la intemperización se torna más claro y se deforma hasta convertirse en un orificio irregular. Exoperidio con hifas de hasta 3µm diámetro. Endoperidio aterciopelado, marrón, con tres capas, la externa, intermedia e interna con hifas de pared delgada, hifas colapsadas e hifas de pared gruesa y acintada respectivamente. En todas las capas las hifas son de 4-8 µm diámetro. Gleba marrón oscura; capilicio de pared ligeramente engrosada y porosa, de 3-5 µm diámetro, comúnmente 4 µm diámetro. Basidiosporas de (3.5-) 4-4.8 (-5) µm diámetro, casi lisas al MO, bajo MEB se observan pequeñas verrugas menores a 1 µm (Figura 7).

Especie característica de la micobiota sonorense, recolectada en 14 localidades, en todos los tipos de vegetación registrados, excepto en zonas urbanas. Este taxón es fácil de identificar, por el tamaño de las esporas y la delicada ornamentación que presentan, la cual es casi lisa al MO y con verrugas muy finas al MEB; así como, por el capilicio fuertemente poroso.

Material Estudiado: Localidad 1, UES 1216; Localidad 6, UES 8528; Localidad 7, UES 5621; Localidad 8, UES 8304; Localidad 10, UES 3962, 2368, 2187, 4349, 10005, 10082, 10177, 10180, 10195; Localidad 13, UES 2752a; Localidad 14, UES 2638; Localidad 16, UES 3705, 2519, 2642, 2750, 2916, 4323; Localidad 18, UES 1256; Localidad 19, UES 3733; Localidad 20, UES 5629; Localidad 27, UES 3895; Localidad 30, UES 8510; Localidad 31, UES 8650a, 8651; Localidad 37, UES 4129; Localidad 38, UES 8235; Localidad 39, UES 10249; Localidad 40, UES 9002, 9007.



Figura 7. *Disciseda candida*. a. Basidiomas (UES 10249). b: Basidioma (UES 10082). c. Mapa de distribución en Sonora. d. Capilicio bajo MEB (UES 10082). e. Espora bajo MEB (UES 1216). f. Espora bajo MEB (UES 1256).

Disciseda hyalothrix (Cooke & Massee) Hollós, Növ. Közl. 1: 107 (1902).

Basidioma globoso o subgloboso, de 12-20 × 17-28 mm, color marrón grisáceo a marrón oscuro al madurar. Estoma irregular. Exoperidio con hifas de $\leq 4 \ \mu m$ diámetro, mezcladas con arena y materia orgánica; en el mesoperidio se observan hifas pseudoparenquimatosas que se colapsan en la madurez.
Endoperidio formado por dos capas, la externa con hifas de 3-4 μ m diámetro, entremezcladas, mientras que la interna con hifas rectas, de hasta 4 μ m diámetro, con pared más gruesa. Gleba marrón oscura a rojiza. Basidiosporas de (6-) 8-11 (-12) μ m, con pedicelo de hasta 10 μ m de largo; episporio con verrugas irregulares, planas y cónicas vistas al MO; bajo el MEB se observan espinas coalescentes en el ápice, formando semiretículos y verrugas (Figura 8).

Este taxón está registrado en ocho localidades, dominadas por matorral árido, selva baja caducifolia y pastizal. El amplio rango en el tamaño de las esporas que se observa entre las colecciones, e incluso en un mismo basidioma, y la variación en la forma de la ornamentación esporal de esta especie, a menudo generan conflictos en su determinación. No obstante, es justo esta ornamentación irregular la que permite diferenciarla.

Material Estudiado: Localidad 5, UES 8350, 8686; Localidad 8, UES 8303; Localidad 10, UES 2842, 10011, 10114, 10123, 10157, 10176; Localidad 11, UES 439; Localidad 13, UES 2768; Localidad 14, UES 3705, 2519, 2642, 2750, 2916, 4323; Localidad 18, UES 1256; Localidad 19, UES 3733; Localidad 20, UES 5629; Localidad 27, UES 3895; Localidad 30, UES 8510; Localidad 31, UES 8650a, 8651; Localidad 38, UES 8231; Localidad 40, UES 9002, 9007.

Disciseda stuckertii (Speg.) G. Moreno, Esqueda & Altés, Persoonia 19: 273 (2007).

Basidioma globoso, subgloboso, 8-13 mm diámetro, color marrón claro a marrón oscuro o grisáceo al madurar. Exoperidio con hifas de 3-5 µm diámetro, entremezcladas con arena y materia orgánica; mesoperidio con hifas pseudoparenquimatosas que se colapsan en la madurez. Endoperidio conformado por hifas de 4-8 µm diámetro, de pared gruesa, formándose estrías, cicatrices y oscureciéndose con la intemperización. Gleba marrón oscura o marrón rojizo oscura. Capilicio con hifas de 3-4 µm diámetro, sin poros. Basidiosporas reticuladas de color marrón oscuro, unigutuladas, de 8.5-10 µm diámetro (Figura 9).



Figura 8. *Disciseda hyalothrix.* a. Basidioma (UES 10123). b: Basidioma (UES 10157). c. Mapa de distribución en Sonora. d. Capilicio bajo MEB (UES 10123). e-f. Esporas bajo MEB (UES 10157).

Esta es la especie actualmente menos recolectada en Sonora (10 localidades), aunque su presencia en sitios muy áridos como El Pinacate y Gran Desierto de Altar (Localidad 3, Tabla 1 y 2), la hacen interesante. También se ha colectado en matorrales, pastizales y selva baja caducifolia. Es la única especie con esporas reticuladas en el género. Sin embargo, su posición taxonómica es discutida aún por varios autores, ya que también se ha ubicado en el género *Abstoma* (Wright y Suárez, 1990; Moreno *et al.*, 2007).



Figura 9. *Disciseda stuckertii.* a. Basidioma (UES 10257). b. Basidioma (UES 10261). c. Mapa de distribución en Sonora. d. Capilicio bajo MEB (UES 10261). e-f. Esporas bajo MEB (UES 10261).

Material Estudiado: Localidad 3, UES 10257, 10261; Localidad 5, UES 8472, 8475; Localidad 8, UES 8303; Localidad 10, UES 4397; Localidad 12, UES 1231; Localidad 19, UES 3729; Localidad 22, UES 1244; Localidad 32, UES 5232; Localidad 36, UES 1587; Localidad 40, UES 8409, 8413.

Disciseda verrucosa G. Cunn., Trans. & Proc. New Zealand Inst. 57: 205 (1926).

Basidioma subgloboso, 10-15mm diámetro. Exoperidio compuesto de hifas hialinas, de pared delgada, escasamente ramificadas, con residuos vegetales y gránulos de arena, que persiste en el ápice. Endoperidio delgado, flácido, papiráceo, color marrón claro a grisáceo o blanquecino al madurar. Dehiscente a través de un estoma inconspicuamente dentado y lacinado mamoso, de aproximadamente 1 mm diámetro. Gleba color marrón oscura, pulverulenta. Basidiosporas de 7-8.5 µm diámetro, unigutuladas, episporio grueso, con verrugas solitarias de > 2 µm de largo, que pueden ser rectas, con ápice plano o curvo hasta formar procesos digitiformes como los observados en la figura 10 d-f (Figura 10).

Se ha colectado en todos los tipos de vegetación (Tabla 1 y 2) y junto con *D. bovista*, son las únicas especies con registros para zonas urbanas. Se distingue por una ornamentación conspicua en sus esporas, aunque no todas las muestras forman procesos digitiformes y la densidad de los mismos también es variable, lo cual se corrobora en los especímenes de Sonora (Figura 10 d-f). Inicialmente, los basidiomas con verrugas rectas y aisladas se clasificaron como *D. hypogaea*, cuyo holotipo estudiaron Moreno *et al.* (2003) en conjunto con el material tipo de *D. verrucosa*, encontrando esporas con ambas formas de ornamentación, por lo que actualmente *D. hypogaea* se considera sinónima de *D. verrucosa*.

Material Estudiado: Localidad 3, UES 10250; Localidad 4, UES 4414; Localidad 5, UES 8684, 8687, 8688; Localidad 8, UES 8608, 8609, 8610, 8611; Localidad 9, UES 7323; Localidad 10, UES 2615, 2777, 10014, 10023, 10026, 10028, 10083, 10145, 10187; Localidad 13, UES 3295; Localidad 14, UES 2711; Localidad 15, UES 4484; Localidad 16, UES 3266; Localidad 28, UES 6436, 7194; Localidad 29, UES 8552; Localidad 32, UES 5113, 5226; Localidad 33, UES 6835; Localidad 35, UES 1778; Localidad 36, UES 1581; Localidad 38, UES 8234; Localidad 39, UES 6502; Localidad 40, UES 8257, 9003, 9005.



Figura 10. *Disciseda verrucosa.* Basidioma (UES 10250). b. Basidioma (UES 8257). c. Mapa de distribución en Sonora. d-e. Esporas bajo MEB (UES 10250). f. Espora bajo MEB (UES 8257).

Disciseda pillosa (Hernández-Navarro & Esqueda) sp. nov.

Basidioma globoso de 10-15 mm. Endoperidio grisáceo a blanquecino, cubierto por finas vellosidades que dan apariencia pruinosa, las cuales tienden a desaparecer por la intemperización, permaneciendo en la base del cuerpo fructífero. Una vez roto el cordón miceliar, la boca queda formada por pliegues irregulares que tienden a formar finas fimbrias conforme el ejemplar envejece.

Esporas globosas de 3-5 µm, con pequeñas verrugas evidentes al MO y con un pequeño pedicelo de hasta 2 µm. Al microscopio electrónico, la ornamentación está formada por verrugas con ápice plano, a diferencia de *D. cervina,* cuya ornamentación se basa en finas espinas. Gleba pulverulenta, oscura (Figura 11).

Se ha recolectado en siete localidades, con cuatro diferentes tipos de vegetación, a saber, mezquital, matorral espinoso, matorral sarcocaule y selva baja caducifolia, teniendo más registros en este último. Por su menor tamaño esporal comparado con *D. bovista* y diferente a *D. candida*, cuya ornamentación esporal es sublisa, mientras que *D. pillosa* es fina pero claramente verrucosa y la presencia consistente del pedicelo. Las vellosidades en el endoperidio son constantes en todas las colecciones, en mayor o menor medida. Ninguna colección con dichas vellosidades mostró ausencia de pedicelo u ornamentación sublisa. La mayoría del material depositado en el Herbario de la UES, determinado como *D. cervina* se considera como representativo de esta especie, otros eran identificaciones incorrectas como *D. candida*.

Material estudiado: Localidad 7, UES 5494; Localidad 9, UES 6483, UES 6482, UES 7155; Localidad 10, UES 2775, UES 2620, UES 2698; Localidad 16, UES 3705, UES 2752; Localidad 19, UES 3734; Localidad 27, UES 7193, UES 6445; Localidad 30, UES 8370.

A pesar del trabajo aquí presentado y de los desarrollados por otros autores (Calonge, 1998; Dörfelt y Nowak, 2002; May y Shingles, 2003; Bates *et al.*, 2009), el género *Disciseda* está todavía poco estudiado a nivel mundial y existen registros de especies de dudosa veracidad en la determinación. Calonge (1998) citó a *D. anomala* para la Península Ibérica basado en un sólo basidioma inmaduro y comparando sus caracteres macro- y microscópicos con ejemplares de África y Australia. Calonge et al. (2004) citaron la misma especie para el estado de Veracruz con base en medio basidioma y sin estudio de las esporas bajo microscopía electrónica, por lo que la presencia de esta especie en México es dudosa. Se duda también de las características en *D. nigra* Dörfelt



Figura 11. *Disciseda pillosa*. a. Basidioma (UES 8370). b. Basidioma (UES 6483). c. Mapa de distribución en Sonora. d-e. Esporas bajo MEB (UES 8370). f. Espora bajo MEB (UES 6483).

y Nowak, (2002), en donde el tamaño y la ornamentación esporal parecen distintos a *D. arida, D. bovista* y *D. candida*, pero no se define puntualmente la ornamentación esporal bajo microscopio electrónico, lo cual es fundamental en este género.

	Nombre	Municipio	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud	Vegetación
1.	A orillas de Mazocahui	Baviácora	29° 32´ 30.0"	110° 07´ 00.0"	620	MS
2.	Cañón de Nacapule	Guaymas	27° 59´ 08.5"	111° 02´ 06.4"	81	MSA
3.	Cráter El Elegante	Puerto Peñasco	31° 51´ 33.8"	113° 22´ 54.0"	252	MSA
4.	Ejido 15 de Mayo	Álamos	26° 57´ 42.0"	108° 55´ 30.0"	1100	SBC
5.	Ejido Francisco Villa	Guaymas	28° 06´ 31.1"	111° 01´ 21.1"	139	MSA
6.	El Apache	Guaymas	28° 19´ 25.3"	111° 14´ 27.7"	43	М
7.	El Mezquital	Cumpas	29° 57´ 26.3"	109° 38´ 23.2"	882	Μ
8.	El Papalote	Hermosillo	29° 12´ 56.1"	111° 02´ 39.4"	348	М
9.	El Sabinito	Álamos	27° 00´ 05.5"	108° 48´ 14.2"	377	SBC
10.	Km 100 carr. Hillo- Yécora	La Colorada	28° 37´ 00.0"	110° 07´ 09.0"	600	ME
11.	Km 115 carr. 36N a Pto. Libertad	Pitiquito	29° 42´ 54.0"	112° 26´ 06.0"	250	MDM
12.	Km 122 carr. Mazocahui a Cananea	Bacoachi	31° 21´ 00.0"	110° 08´ 51.0"	829	Р
13.	Km 137 carr. Hillo- Yécora	San Javier	28° 34´ 34.0"	109° 46´ 42.0"	800	SBC
14.	Km 151 carr. Hillo- Yécora	San Javier	28° 34´ 33.0"	109° 40′ 55.0"	850	SBC
15.	Km 158 carr. 36N a Pto. Libertad	Pitiquito	29° 52´ 45.0"	112° 38´ 14.0"	250	MDM
16.	Km 162 carr. Hillo- Yécora	Soyopa	28° 33´ 45.0"	109° 35´ 58.0"	850	SBC

Tabla 1. Localidades muestreadas en Sonora, México

Nombre	Municipio	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud	Vegetación
17. Km 170 carr. Mazocahui a Cananea	Cananea	30° 51´ 28.0"	110° 04´ 12.0"	1338	Р
18. Km 193 carr. Mazocahui a Cananea	Cananea	30° 58´ 00.0"	110° 12´ 00.0"	1620	Р
19. Km 3.5 carr. A San Javier	San Javier	28° 34´ 58.0"	109° 44´ 48.0"	1300	SBC
20. Km 8 carr. Moctezuma- Antena	Cumpas	29° 58´ 53.8"	109° 39´ 52.7"	818	Р
21. Km. 146 carr. Mazocahui-Cananea	Bacoachi	30° 39´ 08.0"	109° 58´ 09.0"	1046	Р
22. Km. 23 carr. Sonoyta- Pto. Peñasco	Plutarco Elías Calles	31° 46´ 06.3"	113° 00´ 48.3"	364	MDM
23. Km. 31 carr Hillo-Yécora	La Colorada	28° 49´ 00.0"	110° 42´ 34.0"	150	Μ
24. Km. 40 carr. Hillo-Yécora	La Colorada	28° 49´ 00.0"	110° 37´ 37.0"	150	М
25. Km. 42 carr. Navojoa- Álamos	Álamos	27° 04´ 05.0"	109° 01´ 28.0"	700	SBC
26. Km. 7.5 camino Álamos- Guicoba	Álamos	26° 57´ 14.0"	108° 56´ 11.0"	800	SBC
27. La Mesa del Trigo	Álamos	26° 58´ 12.0"	108° 41´ 21.0"	592	SBC
28. La Pintada	Hermosillo	28° 33´ 46.9"	111° 0´ 24.49"	233	MSA
29. Las Ánimas	Benjamín Hill	30° 12´ 38.0"	111° 18´ 55.0"	770	М
30. Maytorena	Guaymas	28° 13´ 32.5"	110° 48´ 50.3"	40	MSA
31. Ojo de Agua	Plutarco Elías Calles	31° 55´ 38.2"	113° 01´ 40.5"	307	MDM

Tabla 1. Localidades muestreadas en Sonora, México (continuación).

Nombre	Municipio	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud	Vegetación
32. Palo Injerto	Álamos	27° 02´ 50.9"	108° 43´ 57.9"	425	SBC
33. Rancho Las Palomas	Mazatán	28° 59´ 30.0"	110° 27´ 20.0"	216	М
34. Rancho Las Uvalamas	Álamos	26° 57´ 42.0"	108° 55´ 30.0"	1100	SBC
35. Reserva CEDESon.	Hermosillo	29° 02´ 10.0"	110° 57´ 30.0"	216	U
36. Río Cuchujaqui	Álamos	26° 56´ 34.0"	108° 52´ 59.0"	750	SBC
37. San Luis	Carbó	29° 33´ 42.4"	111° 04´ 52.8"	458	MDM
38. San Pedro	Álamos	27° 03´ 52.8"	108° 43´ 14.2"	444	SBC
39. Sierra de Mazatán	Mazatán	29° 01' 12.0"	110° 16' 36.0"	581	М
40. Tuape	Opodepe	30° 02´ 52.9"	111° 00´ 22.1"	670	MDM

Tabla 1. Localidades muestreadas en Sonora, México (continuación).

Tipo de vegetación: MS: Matorral Subtropical, MSA: Matorral Sarcocaule, SBC: Selva Baja Caducifolia, M: Mezquital, ME: Matorral Espinoso, MDM: Matorral Desértico Micrófilo, P: Pastizal, U: Área Urbana

HÁBI	ГАТ			ESPI	ECIE		
Veg	Loc	Disciseda bovista	Disciseda candida	Disciseda hyalothrix	Disciseda stuckertii	Disciseda verrucosa	Disciseda pillosa
М	6		•				
М	7		•				•
М	8		•	•	•	•	
М	23	•					
М	24	•					
М	29	•				•	
М	33					•	
М	39		•			•	
MDM	11			•			
MDM	15	•				•	
MDM	22	•			•		
MDM	31	•	•	•			
MDM	37		•				
MDM	40	•	•	•	•	•	
ME	10	•	•	•	•	•	•
MS	1		•				
MSA	2	•					
MSA	3				•	•	
MSA	5	•		•	•	•	
MSA	28					•	
MSA	30		•	•			•
Р	12				•		
Р	17	•				•	
Р	18		•	•			
Р	20		•	•			
Р	21						
SBC	4					•	

Tabla 2. Tabla comparativa de la distribución de las especies según el tipo de vegetación.

HÁBI	ТАТ			ESP	ECIE		
Veg	Loc	Disciseda bovista	Disciseda candida	Disciseda hyalothrix	Disciseda stuckertii	Disciseda verrucosa	Disciseda pillosa
SBC	13	•	•	•		•	
SBC	14	•		•		•	
SBC	16	•	•			•	•
SBC	19		•	•	•		•
SBC	25	•					
SBC	26						
SBC	27	•	•	•			•
SBC	32				•	•	
SBC	34	•					
SBC	36	•			•	•	
SBC	38	•	•	•		•	
SBC	9					•	•
U	35	•				•	

Tabla 2. Tabla comparativa de la distribución de las especies según el tipo de vegetación (continuación).

Loc: Localidad; Veg: Tipo de vegetación: MS: Matorral Subtropical, MSA: Matorral Sarcocaule, SBC: Selva Baja Caducifolia, M: Mezquital, ME: Matorral Espinoso, MDM: Matorral Desértico Micrófilo, P: Pastizal, U: Área Urbana

Caracterización Molecular y Filogenética

El ADN genómico total extraído fue de buena calidad y la concentración osciló entre los 50 y 400 ng/µL. En todos los casos en el análisis electroforético, se observó una banda ANDg íntegra mayor a 12 Kb (Figura 12). Las bandas amplificadas mediante PCR fueron de tamaño mayor a 700 pb (Figura 13) y después de visualizarse se clonaron. Los clones recombinantes se identificaron mediante digestión con EcoRI, observándose dos productos de aproximadamente de 300 pb y 400 pb, respectivamente, por tener un sitio interno de corte de *EcoRI* (Figura 14). El análisis por BLAST de las secuencias arrojó similitud con otros miembros de la familia Lycoperdaceae como Disciseda, Handkea, Calvatia y Lycoperdon (Tabla 3).

En el análisis Filogenético, el mejor modelo de sustitución para Máxima Verosimilitud (ML) correspondió al modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) con sitios Invariables (K2+I). Se considera que este modelo describe el patrón de sustitución de una mejor manera y se basan en los valores más bajos de Criterios de Información Bayesiana (BIC). El análisis se realizó con 22 secuencias nucleotídicas, cuatro de ellas obtenidas de la base de datos NCBI: *Lycoperdon subcretaceum* (JN572908.1) como grupo externo, *Abstoma purpureum* (GQ981488.1) como grupo hermano y dos secuencias de *Disciseda* reportadas, *D. bovista* (DQ112627) y *D. candida* (EU833654.1). Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura fueron eliminadas. En la matriz final hubo un total de 662 posiciones.



Figura 12. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando bandas íntegras de ADNg. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus) Carriles 1 y 2*: D. bovista*; 3-5: *D. candida*; 6: *D. pillosa*.



Figura 13. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando Amplificaciones de ITS1-5.8S-ITS2 mediante PCR. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus) Carriles 1-2 *D. bovista*; 3 y 4: *D. verrucosa*.



Figura 14. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% Mostrando Digestiones de Clones Recombinantes digeridos con la enzima *EcoRI*. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus), Carriles 1-6: Clones recombinantes de *D. bovista* digeridos, 7: Clon recombinante de *D. bovista* sin digerir.

Especie/Fenotipo	Especie/secuenciación	% Identidad
D. bovista 1902	Lycoperdon subcretaceum	91%
	Handkea utriformis	91%
	Bovista graveolens	91%
D. bovista 21601	Handkea utriformis	91%
	Lycoperdon subcretaceum	91%
	Lycoperdon lambinonii	91%
D. candida 10605	Disciseda candida	98%
(D. calva)	Lycoperdon pusillum	93%
	Disciseda bovista	92%
D. candida 1809	Disciseda candida	98%
	Lycoperdon pusillum	93%
	Disciseda bovista	93%
D bovista	Disciseda bovista	98%
(D. cervina)	Disciseda candida	93%
	Lycoperdon pusillum	92%
D. hyalothrix 20605	Handkea utriformis	92%
	Lycoperdon subcretaceum	92%
	Lycoperdon lambinonii	92%
D. hyalothrix H41611	Handkea utriformis	92%
	Lycoperdon subcretaceum	92%
	Handkea subcretacea	92%

Tabla 3. Análisis de identidad con las secuencias de las bases de datos delGenBank del NCBI

Especie/Fenotipo	Especie/secuenciación	% Identidad
D. pillosa	Disciseda candida	96%
	Bovista tomentosa	94%
	Disciseda bovista	93%
D. stuckertii 14	Abstoma purpureum	94%
	Handkea utriformis	90%
	Bovista graveolens	90%
D. stuckertii 30605	Abstoma purpureum	94%
	Handkea utriformis	90%
	Calvatia cretacea	90%
D. stuckertii 54	Abstoma purpureum	94%
	Handkea utriformis	90%
	Bovista graveolens	90%
D. verrucosa 10605	Disciseda candida	98%
	Bovista dermoxhantha	93%
	Lycoperdon pusillum	93%
D. verrucosa 1902	Disciseda candida	98%
	Bovista dermoxantha	93%
	Lycoperdon pusillum	93%
D. verrucosa 22205	Disciseda bovista	99%
	Disciseda candida	94%
	Bovista tomentosa	93%

Tabla 3. Análisis de identidad con las secuencias de las bases de datos del GenBank del NCBI (continuación).

Especie/Fenotipo	Especie/secuenciación	% Identidad
D. verrucosa 32205	Disciseda bovista	99%
	Disciseda candida	94%
	Bovista tomentosa	93%
D. bovista	Disciseda bovista	98%
	Disciseda candida	94%
	Bovista tomentosa	93%
D. bovista 4	Lycoperdon subcretaceum	91%
	Handkea utriformis	91%
	Bovista graveolens	91%

Tabla 3. Análisis de identidad con las secuencias de las bases de datos del GenBank del NCBI (continuación).

De un total de 736 caracteres analizados, 571 están conservados, esto quiere decir que en todos los casos existe el mismo nucleótido para estas posiciones. Por otro lado existen 163 sitios variables, de los cuales 27 corresponden a sitios de variabilidad única, es decir, sólo una de las veintidós secuencias tenía una variación puntual en un sitio específico. Por lo tanto 136 sitios fueron parsimoniosamente informativos, esto quiere decir que existen dos o más variaciones en el mismo sitio de la secuencia.

La figura 15 muestra el árbol de homología resultante. Se observa a *Lycoperdon subcretaceum*, resaltado en verde como grupo externo. Dentro del árbol se observan dos clados principales, el primero (A), formado exclusivamente por secuencias de organismos pertenecientes a especies caracterizadas por la presencia de verrugas. En el primer subclado, se observa una politomía compuesta por miembros de *D. verrucosa* y *D. candida* en el 100 por ciento de las réplicas. Esto nos indica que las secuencias son sumamente parecidas entre sí. Cercano a este grupo, se acerca la secuencia de *D. candida* depositada por Bates *et al.* (EU833654.1) en el 93% de las réplicas. Finalmente

la secuencia correspondiente a *D. pillosa*, que se separa en el 65% de las réplicas de las otras secuencias de *D. candida*.

En el siguiente subclado, encontramos otra politomía conformada por secuencias de *D. bovista* y *D. verrucosa*, incluida la secuencia de *D. bovista* depositada en la base de datos (DQ112627.1), y una secuencia de *D. bovista* identificada como *D. cervina.* En el clado (B), el primer subclado está formado exclusivamente por secuencias de *D. bovista* de Sonora; sin embargo, el segundo subclado separa a los miembros de *D. hyalothrix*, cuya ornamentación está formada básicamente por espinas fusionadas en el ápice de manera irregular.

Finalmente, en el segundo subclado se observa un grupo conformado exclusivamente por *D. stuckertii*, que correspondería a la única especie del género con retículos como ornamentación esporal. Cabe destacar la presencia en éste clado de *Abstoma purpureum*, una especie de esporas reticuladas; sin embargo, las diferencias entre las secuencias no permiten separar las especies a nivel de género, lo que podría sugerir que esta especie pertenece a *Disciseda*; además, la secuencia depositada de *A. purpureum* es parcial.

Las diferencias entre *Abstoma* y *Disciseda* no son del todo claras, se agrupan en *Disciseda* aquellos hongos que forman un estoma o boca en la parte inferior y quedan restos de exoperidio en la parte apical y su peso permite que se volteen (Domínguez, 1989). El género *Abstoma*, como su nombre lo indica, carece de boca verdadera, y según Wright y Suárez (1990), no forma poros en el capilicio. Salvo estas dos características, en este clado se agrupan organismos con características sumamente similares a *Disciseda*. Sin embargo, en las colecciones Sonorenses se ha observado gran cantidad de organismos de *Disciseda* que tienden a no formar boca, lo cual podría deberse a muchos factores, ya que la dehiscencia se da al romperse el cordón micelial, y su forma al fragmentarse podría ser azarosa.



Figura 15. Árbol filogenético de las especies estudiadas.

En el caso de *D. stuckertii*, al revisar varios ejemplares bajo MEB, se ha observado en un mismo basidioma esporas con retículos profundos y otras con retículos someros, característica que separa a algunas especies *Abstoma* de esporas reticuladas, tales como *A. purpureum*, *A. reticulatum* y *A. townei* (Wright y Suárez, 1990). Algo similar podría suceder con *A. pampeanum*, cuya ornamentación esporal según Ochoa y Moreno (2006) es: "Esporas de 7.5-9 µm de diámetro, de color ocre pardo, globosas y fuertemente ornamentadas al MO. Al MEB, la ornamentación parece estar formada por espínulas y pequeñas verrugas que se anastomosan y forman pequeñas crestas". La descripción y fotografías presentadas, recuerdan a *D. hyalothrix* con pedicelo corto, que como

se ha mencionado, el tamaño de las esporas y del pedicelo en las colecciones Sonorenses, así como la forma de las espinas y su patrón de agrupamiento, varía entre organismos e incluso dentro de un mismo basidioma, lo que inicialmente provocó la descripción de dos especies sinónimas: *D. pedicellata* y *D. hyalothrix*. Por lo tanto, existe posibilidad de que suceda lo mismo en esta especie de *Abstoma*.

Abstoma también tiene conflictos con *Calvatia*, tal es el caso de *A. friabilis* descrita en 1992 (Moreno *et al.*), aunque los autores revisaron el material tipo de *Abstoma* y *Calvatia*, no fue hasta catorce años después que fue renombrada como *Calvatia friabilis*. De hecho existen muchos conflictos taxonómicos dentro de la familia Lycoperdaceae.

Larsson y Jeppson (2008) estudiaron varios miembros de la familia Lycoperdaceae del Norte de Europa utilizando secuencias ribosomales. Varios grupos están conformados por especies válidas con representantes de géneros como *Bovista*, *Calvatia*, *Lycoperdon* y *Disciseda*, aunque en éste último sólo se estudiaron dos organismos de dos especies. En el resto del análisis se puede observar cómo hay especies conflictivas dentro de cada género que se salen de los clados, especialmente de *Lycoperdon* y *Calvatia*. Géneros como *Handkea* son manejados como inválidos dentro del estudio, por sus características taxonómicas pobres.

Los géneros de Lycoperdaceae están emparentados con géneros del orden Agaricales como Agaricus, Coprinus, Lepiota y otros hongos con himenio laminar, como lo reportaron Krüger *et al.* (2001) al analizar genes ribosomales y RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, por sus siglas en inglés) de Lycoperdaceae. Este estudio permitió separar los Geastrales del resto de la familia, observando las relaciones dentro de Lycoperdaceae con base en el carácter taxonómico de la estructura del capilicio. En un clado se agrupan aquellos con capilicio tipo *Lycoperdon,* separándose de otras especies con capilicio tipo *Bovista* o de transición. El principal problema al comparar éstos géneros, es que se sabe que algunos son monofiléticos y otros polifiléticos, lo que explica la gran variabilidad de caracteres morfológicos y

diversidad en secuencias de ADN. A la fecha no se sabe si *Disciseda* es monofilético o polifilético, y mucho menos se ha comparado molecularmente con taxones cercanos como las especies de *Abstoma*, género no bien aceptado a nivel mundial.

Schoch *et al.* (2012) proponen los ITS como el código de barras para hongos por varias razones: Una de ellas es su fácil amplificación debido a que éstos genes se encuentran en tándem, al contrario de los genes que codifican proteínas; otra, que la probabilidad de una buena identificación usándolos es del 0.73, en contraste con un 0.70 usando dos marcadores en plantas. A pesar de que en ciertos grupos los ITS funcionan bien, existen otros casos donde los mismos autores señalan la necesidad de usar marcadores complementarios a los genes ribosomales, como en ascomicetos, tal es el caso de Pezizomycotina. Por ejemplo *Cladosporium, Penicillium, Fusariumn* o *Aspegillus* (O'Donnell y Cigelnik, 1997; Skouboe *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2007); o en grupos de Basidiomicetos como *Cantharellus, Tulasnella*, líquenes. Lo mismo se ha reportado en grupos muy antiguos, como levaduras u hongos cenocíticos como en Glomeromycota, donde las secuencias pueden ser hasta 20% divergentes en una misma espora (Stockinger y Walker, 2009; Buyck *et al.*, 2011). Esto habla de la gran variabilidad intraespecífica de las secuencias ribosomales.

Al respecto, Nilsson *et al.* (2008) estudiaron la variabilidad intraespecífica de las secuencias ribosomales entre distintos géneros y grupos de hongos. A pesar de que el canónico 3% de variabilidad intraespecífica es aceptado en hongos en general, éstos autores, con base en secuencias de la base de datos GenBank, determinaron que la variación del reino es de un 2.51% con una desviación estándar de 4.57. Lo anterior se debe a que clados de hongos más primitivos como Glomeromycota tienen una variabilidad intraespecífica de 7.46<u>+</u>4.14%, mientras que en los Ascomicetos y Basidiomicetos, las cifras se reducen a 1.96<u>+</u>3.73% y 3.33<u>+</u>5.62%, respectivamente. Sin embargo, en este mismo estudio se resaltan especies de Basidiomicetos como *Hypocrea citrina* y *Malassezia furfur*, con variabilidad mayor al 3%, mientras al otro extremo, especies como *Boletus edulis* y *Cordyceps bassiana* con menos del 1% de

diferencia o bien, *Agaricus bisporus* y *Alternaria brassicae*, sin diferencia alguna. Por otro lado, el gen 5.8S está muy conservado entre especies y la variación es menor a $0.21\% \pm 0.67$, lo cual se observó para *Disciseda* durante el alineamiento.

Es importante destacar también que en muchas ocasiones la base de datos no es cien por ciento taxonómicamente confiable. Nilsson et al. (2006), estudiaron 51,354 secuencias de diferentes especies de hongos, correspondientes a 9,684 especies en 1,711 géneros, destacando que el 82% de las secuencias no tienen ejemplar de referencia (voucher), y el 63% no especifican el país de origen del hongo. Sólo el 2% de las secuencias especifican datos sobre el colector o identificador, 12% de las secuencias tienen al menos un nucleótido ambiguo, 40% de las secuencias no han sido publicadas en ningún artículo y sólo 0.8% de las secuencias han tenido algún tipo de actualización.

Con respecto a su identidad taxonómica, el 74% de las secuencias coinciden con secuencias bien identificadas, por lo que los autores proponen que cerca del 20% de las secuencias depositadas pueden estar mal identificadas taxonómicamente al nivel de especie. Lo que traería consigo una serie de posibles confusiones en la identificación, basándonos únicamente en secuencias de nucleótidos depositadas, esto nos habla de la gran importancia de la identificación taxonómica basal para contribuir a la delimitación de especies a nivel mundial.

Adicionalmente, se sabe que el número de estudios filogenéticos basado en más de un gen se ha incrementado en los últimos años (Lutzoni *et al.*, 2004). Muchos genes se han descrito como candidatos para competir o bien complementar la información obtenida con los genes ribosomales, que han servido para la sistemática molecular durante más de veinte años (Blanz y Unseld, 1987). Algunos ejemplos son: *atp6,* un gen codificante para una proteína mitocondrial (Kretzer y Brunds, 1999; Robinson *et al.*, 2001); *gapdh,* el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Smith, 1989; Den Baker *et al.*, 2004); los genes de las proteínas *rpb1* y *rpb2*, que constituyen la primera y la segunda subunidades más grandes de la ARN polimerasa II (Liu *et al.*, 1999; Liu y Hall, 2004). También genes codificantes para β -tubulina y actina (Zeller y Smith, 1964; Ayliffe *et al.*, 2001), así como *tef1*, un gen que codifica para el factor 1- α de elongación de la traducción (Baldauf y Palmer, 1993; Rehner y Buckley, 2005), entre otros. Sin embargo, muchos de éstos genes tienen la gran desventaja de que la tasa de amplificación exitosa tiende a ser baja (Schoch *et al.*, 2012).

En este estudio nos basamos únicamente en secuencias de ADN ribosomal de las seis morfoespecies descritas, de las cuales sólo cuatro serán las primeras en ser depositadas en la base de datos. Sin embargo, el análisis resultó pobre para discriminar las especies cuya ornamentación esporal se basa en verrugas, ya que aun siendo especies tan diferentes entre sí como *D. verrucosa* y *D. candida*, sus secuencias resultaron prácticamente idénticas.

La clasificación de organismos, especialmente hongos, utilizando marcadores moleculares, sigue siendo un reto. Un ejemplo es *Rhizoctonia solani* (Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*), cuya variabilidad morfológica (basada en caracteres como forma de hifas, número de núcleos por célula, grupos de anastomosis) y genética es sumamente grande, tal como lo describe (Meza-Moller *et al.*, 2011), donde el polimorfismo de las secuencias amplificadas mediante AFLP, es del 100%. Esto nos habla también de la variabilidad genética que pueden tener distintas razas de una misma especie.

Además de las variaciones de los marcadores moleculares, quizás las morfoespecies correspondan a un complejo de especies. En la mayoría de los fitoparásitos los marcadores moleculares muchas veces resultan insuficientes y las clasificaciones llegan a variedades, razas o formas especiales. En claro ejemplo es el de *Fusarium oxysporum*, f.sp. *ciceris*, que ataca cultivos de garbanzo a nivel mundial, y sólo en Sonora, existen reportadas varias razas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6), sumamente variables morfológica y genéticamente (Arvayo-Ortiz *et al.*, 2011).

Algo similar pudiera ocurrir con las especies cuya ornamentación esporal se basa en verrugas o incluso en el género completo. En el Tabla 2, observamos la distribución de especies de acuerdo a las distintas localidades y tipos de vegetación de una manera comparativa entre todas las especies. Se observa que a excepción del área urbana, se han registrado las cinco especies ya reportadas en todos los tipos de vegetación. El caso de *D. pillosa* es una singularidad, debido al limitado conocimiento que tenemos de esta nueva especie.

En la gran mayoría de las localidades se ha reportado más de una especie, y existen sitios donde las seis especies coexisten, como la localidad 10, Kilómetro 100 de la carretera Hermosillo-Yécora, con matorral espinoso. Cabe destacar que en localidades como ésta, existen varios estudios al respecto. El primero realizado por Esqueda *et al.* (2000), donde se realizaron 18 muestreos en distintas épocas del año, encontrando cuatro de las especies actualmente conocidas para Sonora. Once años después, Hernández-Navarro (2011) basado en cuatro muestreos intensivos, cita las cinco especies reportadas para Sonora y un taxón sin identificar, que actualmente se identificaron y corresponden a *D. pillosa*. En este mismo estudio se observó que las diferentes especies de *Disciseda* fructifican durante todo el año y coexisten en un mismo tipo de vegetación.

El hecho de no encontrar un basidioma, no precisamente quiere decir que el hongo esté ausente en la localidad, ya que el cuerpo fructífero es sólo la estructura reproductiva del organismo, pudiendo encontrarse el micelio secundario en suelo de las distintas localidades. Esto nos habla de la importancia de estudios taxonómicos y ecológicos más intensos, para elucidar la riqueza taxonómica fúngica y de todos los tipos de organismos de los ecosistemas, así como de la posible existencia de un complejo de especies en el género *Disciseda*.

Se han citado una gran cantidad de complejos de especies para los diferentes grupos de hongos. En el caso de otros basidiomicetos, las especies del género *Ganoderma* son un claro ejemplo. A pesar de que las características morfológicas para separar las especies son varias, existen una gran cantidad de confusiones para muchas especies, especialmente *G. lucidum*, al que se le

48

atribuyen algunas propiedades medicinales. Para la identificación de especies dentro de éste género se han usado tanto secuencias ribosomales (ITS, LSU-D1, RAPD) como genes codificantes para proteínas (β-tubulina), e incluso se han diseñado marcadores específicos para esta especie, sin gran éxito. Algunos autores sugieren que el género *Ganoderma* es evolutivamente nuevo y que pueden existir convergencias de características morfológicas con orígenes polifiléticos (Moncalvo *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2012).

Adasvakeg y Gilbertson (1986) reportan que *G. lucidum* de Norteamérica es genéticamente compatible con *G. resinaceum* de Europa, por lo que pertenecerían a la misma especie biológica, pero poseen diferencias morfológicas tanto de los basidiomas como de sus cultivos. Se han logrado las cruzas de distintas cepas y especies cultivadas, aunque tampoco demuestran la formación de organismos biológicamente fértiles (esporas viables). Esto pudiera ocurrir con *Disciseda;* sin embargo, la falta de reportes taxonómicos, ecológicos, moleculares, e incluso del cultivo de éstas especies, no permiten asegurar o negar la existencia de un compejo de especies o del intercambio génico entre ellas. Dichos complejos deben de ser estudiados desde un punto de vista ecológico, taxonómico, genético y filogeográfico.

En el complejo *Amanita muscaria*, el hongo probablemente más popular e ilustrado del mundo debido a su amplia distribución, atractiva apariencia y sus propiedades psicoactivas (Michelot y Melendez-Howell, 2003), existen numerosas variedades donde el carácter taxonómico variable es el color de píleo, escamas y pié. Por ejemplo, *A. muscaria* var. *muscaria* presenta sombrero rojo con escamas y pié blanco; la variedad *alba* presenta píleo, escamas y estípite de blanco a moreno, la variedad *flavivolvata* posee píleo anaranjado, escamas amarillo oscuro y estípite color blanco a crema. Por otro lado, la variedad *formosa* con píleo amarillo a naranja, escamas y pié amarillo oscuro, la variedad *persicina* tiene píleo naranja-amarillento y escamas morenas a amarillas y por último la variedad *regalis* con píleo café, escamas amarillas a morenas (Jenkings y Petersen, 1976). Geml *et al.* (2006) analizaron filogeográficamente especímenes de éstas variedades de *Amanita muscaria* de

distintas regiones, utilizando secuencias ribosomales tanto de la subunidad grande ribosomal como de ITS, así como genes de β-tubulina. El análisis mostró tres principales clados según su distribución geográfica, dándose cuenta además, que sólo en Alaska se encontraban variedades de los tres clados coexistiendo. A partir de ahí, los autores estimaron la historia filogeográfica.

Dicho estudio es un claro caso en el que por sólo unos cuántos caracteres se han obtenido confusiones taxonómicas, lo mismo pudiera estar ocurriendo con las especies con verrugas del género *Disciseda*. Por lo anterior, un análisis filogeográfico pudiera esclarecer dudas sobre estos taxones, y surge la necesidad de analizar otras regiones del genoma, utilizando otros marcadores moleculares para elucidar la situación taxonómica, sistemática y evolutiva del género

CONCLUSIÓN

En base a 168 colecciones del género *Disciseda*, recolectadas en 40 localidades de 17 municipios en el estado de Sonora, durante más de veinte años, se concluye lo siguiente:

Se determinaron seis morfoespecies con alta variabilidad morfológica, lo que provoca confusiones taxonómicas. *Disciseda pillosa* se propone como nueva morfoespecie para la ciencia.

Las localidades donde fructifican las especies de *Disciseda* son disímiles entre sí, con una altitud entre 80 y 1620 msnm, aunque predominan en los ecosistemas áridos y semiáridos, en suelos con textura gruesa. La selva baja caducifolia fue el tipo de vegetación con el mayor número de localidades.

Los taxones se recolectaron durante todo el año, coexisten en la mayoría de las localidades, registrándose en el matorral espinoso el mayor número de colectas y las seis especies determinadas.

Las secuencias ITS1-5.8S-ITS2, discriminan por ornamentación esporal en general, es decir, verrugas, espinas o retículos, pero resultan pobres para separar las morfoespecies, quizás por ser complejos de especies o bien, por requerirse otros marcadores moleculares.

RECOMENDACIONES

Es indispensable realizar análisis de micro ecología, para relacionar los organismos con otros descomponedores y posibles asociaciones con especies vegetales y variables edáficas de manera más puntual.

Surge la necesidad de evaluar otras regiones del genoma de éstos hongos para elucidar sus relaciones evolutivas.

Analizar de igual manera, las especies del género *Abstoma* para determinar la validez del género.

Realizar mayor investigación con regiones ribosomales, o bien, con otros marcadores moleculares de otros hongos gasteroides sonorenses, así como realizar análisis filogeográficos de estas especies.

Anexo 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas obtenidas del género *Disciseda* y. las dos secuencias del género reportadas en la base de datos. En negro, se muestran los sitios altamente conservados, en gris los sitios con poca variación y en blanco los sitios variables.



D_bovista_1902 D_bovista_21601 D_candida_calva 1902 D_candida_10605 D_candida 1809 D_bovista_Dcervina_1902 D_hyalothrix_20605 D_hyalothrix_H41611 D_pillosa_1809 D_stuckertii_14 D_stuckertii_54 D_verrucosa_10605 D_verrucosa_1902 D_verrucosa_22205 D_verrucosa_32205 D_bovista_11601 D_bovista_40605	175 175 175 173 173 164 173 163 178 178 178 178 178 178 178 178 164 164 164
D_bovista_1902 D_bovista_21601 D_candida_calva_1902 D_candida_10605 D_candida_1809 D_bovista Dcervina 1902 D_hyalothrix_20605 D_hyalothrix_H41611 D_pillosa_1809 D_stuckertii_14 D_stuckertii_30605 D_stuckertii_54 D_verrucosa_10605 D_verrucosa_2205 D_verrucosa_32205 D_bovista_11601 D_bovista_40605	234 227 227 226 226 236 236 236 227 222 222 222 222 222 222 222 222 234
D_bovista_1902 D_bovista_21601 D_candida_calva_1902 D_candida_10605 D_candida_1809 D_bovista_Dcervina_1902 D_hyalothrix_20605 D_hyalothrix_H41611 D_pillosa_1809 D_stuckertii_14 D_stuckertii_30605 D_stuckertii_54 D_verrucosa_1902 D_verrucosa_1902 D_verrucosa_32205 D_bovista_11601 D_bovista_40605	294 294 286 286 285 295 295 286 286 286 285 295 286 286 281 281 281 281
D_bovista_1902 D_bovista_21601 D_candida_calva_1902 D_candida_10605 D candida 1809 D bovista Dcervina 1902 D_hyalothrix_20605 D_hyalothrix_H41611 D_pillosa_1809 D stuckertii 14 D stuckertii 30605	354 354 346 346 346 346 346 342 355 355



D stuckertii 54 D verrucosa 10605 D verrucosa 1902 D verrucosa 22205 D verrucosa 32205 D bovista 11601 D bovista 40605 D bovista 1902 D bovista 21601 D_candida_calva_1902 D_candida 10605 D candida 1809 D bovista Dcervina 1902 401 D hyalothrix 20605 D hyalothrix H41611 D pillosa 1809 D stuckertii 14 D stuckertii 30605 D stuckertii 54 D verrucosa 10605 D verrucosa 1902 D verrucosa 22205 D verrucosa 32205 D bovista 11601 D bovista 40605 D bovista 1902 D bovista 21601 D candida calva 1902 D candida 10605 D candida 1809 D bovista Dcervina 1902 461 D_hyalothrix_20605 D hyalothrix H41611 D pillosa 1809 D stuckertii 14 D_stuckertii_30605 D stuckertii 54 D_verrucosa_10605 D verrucosa 1902 D_verrucosa_22205 D verrucosa_32205 D bovista 11601 D bovista 40605 D bovista 1902 D bovista 21601 D candida calva 1902

D_candida_calva_1902 514 D_candida_10605 514 D_candida_1809 514 D bovista Dcervina 1902 511 D hyalothrix 20605 523 D_hyalothrix H41611 523 D_pillosa_1809 510 D_stuckertii_14 534 D_stuckertii_54 534 D_verrucosa_10605 514 D_verrucosa_1902 514 D_verrucosa_22205 511 D_verrucosa_32205 511 D_bovista_11601 511 D_bovista_40605 531

D_bovista_1902 D_bovista_21601



D_candida_calva_1902 D_candida_10605 D_candida 1809 D_bovista_Dcervina_1902 571 D hyalothrix 20605 D_hyalothrix_H41611 583 D pillosa 1809 570 D_stuckertii_14 D_stuckertii_30605 D_stuckertii_54 593 593 D verrucosa 10605 574 D_verrucosa_1902 D_verrucosa_22205 D_verrucosa_32205 574 571 571 D_bovista_11601 D_bovista_40605 571 590

574 574 574

583

593

D_bovista_1902 D bovista 21601 D_candida_calva_1902 D candida 10605 D_candida_1809 D_bovista_Dcervina_1902 D hyalothrix 20605 D hyalothrix H41611 D pillosa 1809 D stuckertii 14 D_stuckertii_30605 D_stuckertii_54 D_verrucosa_10605 D verrucosa 1902 D verrucosa 22205 D verrucosa 32205 D_bovista_11601 D bovista 40605

TGAT	TGCTCTCTGGC <mark>C</mark> AGTTCAGCTACTAAC <mark>T</mark> GTCCACTG <mark>-</mark> TTGGACAACA <mark>C-</mark> T-TAATO
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTACTAAC <mark>T</mark> GTCCACTG <mark>-</mark> TTGGACAACA <mark>C-T</mark> -TAATC
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTACTAAC <mark>T</mark> GTCCACTG <mark>-</mark> TTGGACAACA <mark>C-T</mark> -TAATC
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTAC <mark>C</mark> AACCGTCCACTG <mark>GA</mark> TGGACAAC <mark></mark> T-TAATC
TGAT	TGCTCTCTGACTAGTTCAGCTCCTAA <mark>T</mark> CGTCCACT <mark>TG</mark> TTGGACAAT <mark>A</mark> CA <mark>T</mark> ATAATC
TGAT	IGCTCTCTG <mark>ACTAGTTCAGCTC</mark> CTAA <mark>T</mark> CGTCCACT <mark>TG</mark> TTGGACAAT <mark>A</mark> CA <mark>T</mark> ATAATC
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTACTAACCGTCCACT <mark>T-</mark> TTGGACAACAC- <mark>T-</mark> TAATC
TGAT	TGCTCTC <mark>AG</mark> T <mark>CT-GTTCAGCTAC</mark> CAA <mark>T</mark> CGTCCACTC-TTGGACAATATATATC
TGAT	IGCTCTC <mark>AGTCT-GTTCAGCTAC</mark> CAATCGTCCACTC-ITGGACAAT <mark>A</mark> TACCTC
TGAT	TGCTCTC <mark>AG</mark> TCT-GTTCAGCTAC <mark>CAAT</mark> CGTCCACT <mark>C-TTGGACAATA</mark> TACCTC
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTACTAAC <mark>T</mark> GTCCACTG <mark>-</mark> TTGGACAACA <mark>C-</mark> T-TAAT(
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTACTAAC <mark>T</mark> GTCCACTG-TTGGACAACA <mark>C-</mark> T-TAAT(
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTAC <mark>C</mark> AACCGTCCACTG <mark>-A</mark> TGGACAAC <mark></mark> T-TAATC
TGAT	tgctctctggctagttcagctac <mark>c</mark> aaccgtccactg <mark>-a</mark> tggacaac <mark></mark> t <mark>-</mark> taato
TGAT	TGCTCTCTGGCTAGTTCAGCTAC <mark>C</mark> AACCGTCCACTG-A <mark>TGGACAAC</mark> T-TAATC
TGAT	TGCTCTCTAGCTAGTTCAGCT <mark>TCTAAC</mark> TGTCCACT-ATTGGACAA <mark>TA</mark> TATAATO
648	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 631	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 631 627	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ
648 647 631 631 631 627 643	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AAATTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AAATTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ
648 647 631 631 627 643 643	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 643	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 627 648	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AAATTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 627 648 648	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 643 648 648 648	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AAAATTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 643 648 648 648 648 631	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AAGTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCCGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCCGAACTTAAGCATATCAATZ
648 647 631 631 627 643 643 627 648 648 648 631 631	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 627 648 648 648 631 631 626	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 643 648 648 648 631 626 626	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
648 647 631 631 627 643 643 643 648 648 631 631 626 626 626 626	AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACCTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ AACTTCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATZ

Adaskaveg, J. E. y R. L. Gilbertson (1986). Cultural studies and genetics of sexuality of Ganoderma lucidum and G. tsugae in relation to the taxonomy of the G. lucidum complex. *Mycologia* **78**: 694-705.

Ahmad, S. (1959). Morphology of *Disciseda cervina*. *Mycologia* **42**: 148-160.

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Aparicio-Navarro, A., A. Quijada-Mascareña, T. Quintero-Ruiz y A. Búrquez (1994). Nuevos gasteromicetos para la micobiota de Sonora. México. *Ecológica* **3**: 11-14.
- Arvayo-Ortiz, R. M., M. Esqueda, E. Acedo-Felix, A. Sanchez y A. Gutierrez (2011). Morphological Variability and Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) Crops. *American Journal of Agricultural an Biological Sciences* 6(1): 114-121.
- Ayliffe, M. A., P. N. Dodds y G. J. Lawrence (2001). Characterization of a Btublin genes. *Mycological Research* **105**: 818-826.
- Baldauf, S. L. y J. D. Palmer (1993). Animals and fungi are each others closest relatives—congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(11558-11562).
- Bates, S. T., R. W. Roberson y D. E. Desjardin (2009). Arizona gasteroid fungi I: Lycoperdaceae (Agaricales, Basidiomycota). *Fungal Diversity* 37: 153-207.
- Belkhiri, A., J. Buchko y G. Klassen (1992). The 5S Ribosomal RNA Gene in *Pythium* Species: Two Different Genomic Locations. . *Molecular Biology Evolution* **9**(6): 1089-1102.
- Binder, M. y D. S. Hibbett (2006). Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycologia* **98**: 971-981.
- Blanz, P. A. y M. Unseld (1987). Ribosomal RNA as a taxonomic tool in mycology. *The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi*. G. S. Hoog, M. T. Smith y A. C. Weijman. Amsterdam, Elsevier: 247-258.
- Bonifaz, A. (2000). Propiedades de los hongos. *Micología Médica Básica*. Méndez-Editores. México: 9-32.
- Brock, P. M., H. Döring y M. I. Bidartondo (2008). How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytologist* **181**: 719–724.
- Buyck, B., C. Cruaud, A. Couloux y V. Hofstetter (2011). Cantharellus texensis sp. nov. from Texas, a southern lookalike of C. cinnabarinus revealed by tef-1 sequence data. *Mycologia* **103**(1037-1046).
- Calonge, F. D. (1998). Flora Mycológica Ibérica Vol. 3: Gasteromycetes, I. Lycoperdales, Nidulariales, Phallales, Sclerodermatales, Tulostomatales. Madrid, Jardín Botánico de Madrid.

Calonge, F. D., G. Guzmán y F. Ramírez-Guillén (2004). Observaciones sobre los Gasteromycetes de México depositados en los herbarios XAL y XALU. *Boletin de la Sociedad Micológica de Madrid* **28**: 337-370.

- Cifuentes, J., M. Villedas, L. Pérez Ramírez y S. Sierra (1986). Hongos. *Manual de Herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos.* . México Distrito Federal, UNAM-Consejo nacional de la Flora de México, A.C.: 55-64.
- Coleman, A. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryotic evolutionary comparisions. *Trends in Genetics* **19**(7): 370-375.
- Cunningham, G. H. (1944). The gasteromycetes of Australia and New Zeland, Vaduz.
- Czernaiev, B. M. (1829). Systema Mycologicum.
- Czernaiev, B. M. (1845). Nouveaux cryptogames de l'Ukraine et quelques mots sur la flore de ce pays. *Bulletin de la Société impériale des Naturalistes de Moscou* **18**(2): 132-157.
- Den Baker, H. C., G. C. Zuccarello, T. W. Kuyper y M. E. Noordeloos (2004). Evolution and host specificity in teh ectomycorrhizal genus *Leccinum*. *New Phytologist* **163**: 201-215.
- Dios, M. M. (2001). La Biodiversidad Fúngica de la Provincia de Catamarca. *Revista de Ciencia y Técnica* **VII**(07): 121-126.
- Domínguez, L. S. (1989). Contribución al conocimiento de los Gasteromycetes del centro de la Argentina. Doctorado, Universidad Nacional de Argentina.
- Dörfelt, H. y H. Nowak (2002). *Disciseda nigra* ein verkannter Gasteromycet. *Feddes Repertorium* **113**: 24–29.
- Dring, D. M. (1964). Gasteromycetes of West Tropical Africa. *Mycological Papers* **98**(15): 1-60.
- Dring, D. M. (1973). Gasteromycetes. *The Fungi* G. C. Ainsworth y A. S. Sussman: 451-478.
- Eckblad, F. E. y H. J. Ellingsen (1984). Gasteromycetes from China collected by Dr. Harry Smith 1921-1923, 1924-1925 and 1934. *Sydowia : Annales mycologici* **37**: 29-41.
- Esqueda, M., M. Coronado, A. H. Gutiérrez-Saldaña, R. Valenzuela, S. Chacón y R. Gilbertson (2010). Hongos. *Diversidad Biológica de Sonora*. T. Van-Devender y F. Molina Frener. México, UNAM.
- Esqueda, M., E. Pérez-Silva y T. Herrera (1995). New records of gasteromycetes for Mexico. *Documents Mycologiques* **98**(100): 151-160.
- Esqueda, M., E. Pérez-Silva, T. Herrera, M. Coronado y A. Estrada-Torres (2000). Composición de gasteromicetos en un gradiente de vegetación de Sonora, México. Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica **71**: 39-62.
- Geml, J., A. Laursen, K. O'neill, C. Nusbaum y L. Taylor (2006). Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology* 15: 225-239.
- Gillespie, J. J., J. Johnston, J. Cannone y R. Gutell (2006). Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA

genes of *Apis mellifera* (Insecta:Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Molecular Biology* **15**(5): 657-686.

- Grgurinovic, C. A. (1997). *Larger fungi of South Australia*, Botanic Gardens of Adelaide and State Herbarium.
- Gularte Cortéz, V., I. Goulart Baseia y R. M. Borges Da Silveira (2010). Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: *Arachnion* and *Disciseda* (Lycoperdaceae). *Acta Biológica Paranaense* **39**: 19-27.
- Guzmán, G. y T. Herrera (1969). Macromicetos de las zonas áridas de México. Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica **40**(1): 1-92.
- Guzmán, G. y T. Herrera (1973). Especies de macromicetos citadas de México, IV. Gasteromicetos. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* **7**: 105-119.
- Heim, R. (1971). The interrelationships between the Agaricales and Gasteroymcetes. *Evolution in Higher Basidiomycetes*. Knoxville, Tenesse, United States, University of Tennessee Press: 505–534.
- Hennings, P. (1902). Beiträge zur Pilzflora Südamerikas: 2. Hedwigia 41(62): 190-246.
- Hernández-Navarro, O. E. (2011). *Diversidad de Hongos Gasteroides en el matorral espinoso, municipio La Colorada, Sonora, México.* Licenciatura, Universidad de Sonora.
- Herrera, T. y M. Ulloa (2004). *El Reino de los Hongos: Micología básica y aplicada*, Fondo de Cultura Económica
- Hibbett, D. S., E. Pine, E. Langer, G. Langer y M. Donoghue (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 12002-12006.
- Hosaka, K., S. T. Bates, R. E. Beever, M. A. Castellano, I. W. Colgan, L. S. Domínguez, E. R. Nouhra, J. Geml, A. J. Giachini, S. R. Kenney, N. B. Simpson, J. S. Spatafora y J. M. Trappe (2006). Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia* **98**(6): 949-959.
- Hynson, N. A. y T. D. Bruns (2009). Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society* **1675**(276): 4053-4059.
- Jenkings, D. T. y R. H. Petersen (1976). A neotype specimen for *Amanita* muscaria. Mycologia **68**: 463-469.
- Joseph, N., E. Krauskopf, M. I. Vera y B. Michot (1999). Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research* **27**(23): 4533-4540.
- Kers, L. E. (1975). The Genus Disciseda (Gasteromycetes) in Sweden. *Svensk Botanisk Tidskrift* **69**: 405-438.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Kirk, P. (2008). Index Fungorum. Fecha de Acceso 20/04/2012, 2012, desde http://www.indexfungorum.org.
- Kretzer, A. M. y T. D. Brunds (1999). use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. *Molecular Phylogenetic Evolution* **13**: 483-492.
- Krüger, D., M. Binder, M. Fischer y H. Kreiser (2001). The Lycoperdales. A Molecular Approach to the Systematics of Some Gasteroid Mushrooms. *Mycologia* **93**(5): 947-957.
- Laferriére, J. E. y R. L. Gilbertson (1992). Fungi of Nabogame, Chihuahua, México. *Mycotaxon* **44**(73-87).
- Larsson, E. y M. Jeppson (2008). Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycological Research* **112**(1).
- Lehninger (2004). Principles of Biochemistry, W. H. Freeman.
- Lewin, B. (2008). Genes IX. México.
- Liu, Y. L., J. S. Farris, M. Kallersjo y A. Tehler (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymease II subunit. *Molecular Biology Evolution* **16**: 1799-1808.
- Liu, Y. L. y B. D. Hall (2004). Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 4507-4512.
- Lizárraga, M., M. Esqueda, A. H. Gutiérrez-Saldaña, C. Piña y F. Barredo-Pool (2010). El género *Disciseda* (Agaricales, Agaricaceae) en la Planicie Central del Desierto Chihuahuense, México. *Revista Mexicana de Micología* 32: 41-47.
- Lutzoni, F., F. Kauff y C. J. a. Cox (2004). Assembling the fungal tree of life; progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* **91**: 4507-4512.
- Malencon, G. (1931). La série des Asterosporées. *Trav. Cryp. dediés à L. Mangin*: 337-396.
- May, T. W. y J. M. S. Shingles (2003). *Fungi of Australia: Catalogue and bibliography of Australian Fungi* Melbourne, ABRS/CIRO Publishing.
- Meza-Moller, A., M. Esqueda, F. Sánchez-Teyer, G. Vargas-Rosales, A. Gardea y M. Tiznado-Hernández (2011). Genetic Variability in *Rhizoctonia solani Isolated from Vitis vinifera* Based on Amplified Fragment Length Polymorphism. *American Journal of Agricultural an Biological Sciences* 6(3): 317-323.
- Michelot, D. y L. M. Melendez-Howell (2003). *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research* **107**: 131-146.
- Mitchel, D. H., S. W. Chapman y G. Grimes (1975). Studies of Disciseda (Gasteromycetes) in Colorado. *Mycologia* **67**: 586-596.
- Moncalvo, J.-M., H.-F. Wang y R.-S. Hseu (1995). Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional, taxonomic characters. *Mycological Research* **99**(12): 1489-1499.
- Moreno, G., A. Altés y C. Ochoa (2003). Notes on some type materials of *Disciseda* (Lycoperdaceae). *Persoonia* **18**: 215-223.

Moreno, G., A. Altés, C. Ochoa y J. E. Wright (1992). *Abtoma friabilis* sp. nov. (Gasteromycetes) from Baja California, México. . *Mycotaxon* **45**: 235-240.

- Moreno, G., M. Esqueda, E. Pérez-Silva, T. Herrera y A. Altés (2007). Some interesting gasteroid and secotioid fungi from Sonora, Mexico. . *Persoonia* **19**: 265-280.
- Moreno, G., M. Lizárraga, E. M. y M. L. Coronado (2010). Contribution to the study of gasteroid and secotioid fungi of Chihuahua, Mexico. *Mycotaxon* **112**: 291-315.
- NCBI. (2012). National Center for Biotechnology Information. Fecha de Acceso Abril 30, 2012, desde http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.
- Nilsson, R. H., E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg y K.-H. Larsson (2008). Intraespecific ITS variability in the kindom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and its implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics* **4**: 103-201.
- Nilsson, R. H., M. Ryberg, E. Kiristiansson, K. Abarenkov, K.-H. Larsson y K. Urmas (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* **1**(1): e59.
- O'Donnell, K. y E. Cigelnik (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetic Evolution* **7**(1): 103-116.
- Ochoa, C. y G. Moreno (2006). Hongos gasteroides y secotioides de Baja California, México. *Boletin de la Sociedad Micológica de Madrid* **30**: 121-166.
- Park, Y.-J., O.-C. Kwon, E.-S. Son, D.-E. Yoon, W. Han, J.-Y. Nam, Y.-B. Yoo y C.-S. Lee (2012). Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. African Journal of Microbiology Research 6(25): 5417-5425.
- Pegler, D. N., T. Laessoe y B. M. Spooner (1995). *British Puffballs, Earthstars and Stinkhorns: An Account of the British Gasteroid Fungi*, Royal Botanic Garden.
- Pérez-Silva, E., M. Esqueda y T. Herrera (1994). Contribución al conocimiento de los gasteromicetos de Sonora. *Revista Mexicana de Micología* **10**: 77– 101.
- Persoon, D. H. (1801). Synopsis Methodica Fungorum.
- Piña, C. (2010). Diversidad de Hongos Gasteroides en la Sierra de Mazatán, Sonora. Licenciatura, Universidad de Sonora.
- Piña, C., M. Esqueda y A. Altés (2010). First record of *Tulostoma gracilipes* (Agaricales, Agaricaceae) for the Americas. *Mycotaxon* **113**: 371-376.
- Rehner, S. A. y E. Buckley (2005). A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* **97**: 84–98.
- Robinson, M. M., B. Chiang y P. A. Horgen (2001). A phylogeny of the genus *Agaricus* based on mitocondrial *atp6* secuences. *Mycologia* **93**: 30-37.
- Rodríguez, T. A., C. B. Xoxonostle y V. M. (2004). Ecología Molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista de Fitotecnia Mexicana* **23**: 267-278.

- Rogers, S. y A. Bendich (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* **9**: 509-520.
- Saccardo, P. A. (1888). Sylloge Fungorum, Sumptibus auctoris typis Seminari.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen y F. B. Consortium (2012). Nuclear ribosomal interla transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(16): 6241-6246.
- Schubert, K., J. Z. Groenewald, U. Braun, J. Dijksterhuis, M. Starink, C. F. Hill y P. zalar (2007). Biodiversity in the *Cladosporium* herbarum complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58: 105-156.
- Singer, R. (1986). *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Weinheim, Alemania, J. Cramer.
- Skouboe, P., J. C. Frisvad, J. W. Taylor, D. Lauritsen, M. Boysen y L. Rossen (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research* **103**(07): 873-881.
- Smith, T. L. (1989). Disparate evolution of yeast and filamentous fungi indicated by phylogenetic analysis of gyceraldehye-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 7063-7066.
 Solomon, E. L. Borg v, D. Martin (2008). *Biology*, Bolmont, California.
- Solomon, E., L. Berg y D. Martin (2008). *Biology*. Belmont, California.
- Stockinger, H. y C. S. Walker, A. (2009). 'G*lomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Thiers, H. (1984). The Secotioid Syndrome. *Mycologia* 76: 1-8.
- Urista, E., J. García y J. Castillo (1985). Algunas especies de gasteromicetos del norte de México. *Revista Mexicana de Micología* **1**: 471-523.
- Warner, J. (2001). Nascent Ribosomes Minireview. Cell 107: 133-136.
- Whittaker, R. H. (1959). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* **163**: 150-160.
- Wright, J. E. y V. L. Suárez (1990). South American Gasteromycetes IV. The genus Abstoma. Cryptogamic Botany 1: 372-383.
- Zeller, S. M. (1947). More notes on Gasteromycetes. *Mycologia* **39**: 282-312.
- Zeller, S. M. y A. H. Smith (1964). The genus Calvatia in North America. *Lloydia* **27**: 148-186.