EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Cd. Victoria

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Campus
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD VICTORIA

Programa
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

TESIS

HONGOS HIPOGEOS DE LA SIERRA DE SANTA ROSA, GUANAJUATO, MÉXICO

Que presenta

RAFAEL PEÑA RAMÍREZ

Para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

Director

DR. GONZALO GUEVARA GUERRERO

Co-Director

DR. RIGOBERTO GAITÁN HERNÁNDEZ

Ciudad Victoria, Tamaulipas Febrero 2020

Agradecimientos

Agradezco al Tecnológico de Ciudad Victoria, y al programa del Doctorado en Ciencias en Biología, por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica.

También agradezco al Tecnológico Nacional de México por la beca PRODEP 1264-2015-2017, y el apoyo para la realización de mis estudios doctorales.

Agradezco a la dirección que me proporcionaron los doctores en ciencias; Gonzalo Guevara Guerrero, Rigoberto Gaitán Hernández, Jesús García Jiménez, Juan Flores Gracia y Jorge Víctor Horta Vega.

Agradezco el apoyo que hasta el último momento me ha proporcionado el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato a través de Akira Torreblanca Ponce, Omar Cuin Macedo y Claudia Isela Gonzales López.

A la Familia Micológica por la capacitación que me dio en la taxonomía, por la amistad, por la compañía, por los buenos y malos momentos (que fueron pocos).

A mi madre Ita Irma Ramírez Bautista, y mi padre Rafael Peña Carreón y hermanas Irma, Xiomara, Aurora y Oliva, por su apoyo.

Agradezco el apoyo amor y comprensión de mi esposa, Herlinda Estudillo Flores y mis hijas, Lizett y Ruth.

Finalmente, a Dios que me permite desentrañar la gloria de sus manos.

Los cielos cuentan la gloria de Dios y el firmamento anuncia la obra de sus manos

Dedicatoria

A Jehová de los ejércitos

Sola Fide, Sola Gratia, Sola Escriptura

A la Libertad,

la Justicia

y a la Verdad

Resumen

Hay una notable carencia del conocimiento de la diversidad taxonómica de los hongos hipogeos en la República Mexicana, ya que no hay ningún reporte de estos hongos en Guanajuato. En este estado se encuentra la sierra de Santa Rosa que resulta muy interesante por la presencia de un bosque de *Quercus* con clima templado y húmedo. Y dentro de ella se encuentra el área natural protegida Cuenca de la esperanza.

En este trabajo hacemos la propuesta de contribuir al conocimiento micológico de hongos hipogeos, mediante la colecta, y determinación por la caracterización macro y microscópica, confirmando la identificación mediante análisis de DNA.

Como resultado dentro de los Ascomycetes, se reportan doce especies tentativamente nuevas para la ciencia; *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV)*, Pachyphlodes* cuatro especies, en el clado *pfisteri* dos especies*, Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) y *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV), *P. aff. marroninus* (1686 ITCV)*, P. aff. carneous* (1723 ITCV)*. Tuber* clado *separans* dos, *T. aff. separans* 2 (1692 ITCV) y *T. aff. separans* 3 (1672 ITCV), por ultimo *T. incognitum* que ya se ha publicado. Se reportan por primera vez para el estado *T. separans,* e *Hydnobolites aff. cerebriformis*. Asi mismo seis géneros de Basidiomycetes hipogeos se describen macroscópica, filogenética y ultraesctructuralmente para el estado de Guanajuato. Se reportan seis especies tentativamente nuevas para la ciencia; *Melanogaster* sp. (1507 ITCV), *Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV),

Hysterangium sp. 2 (1699 ITCV), *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV). *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV), y *Aroramyces guanajuatensis* ya publicada.

Se reporta una criptoespecie dentro del complejo *Hymenogaster niveus* (1620 ITCV), la cual precisa de un estudio más profundo para poder ser determinada. Se hace el reporte más austral de *Gautieria magnicellaris*. Se presentan comentarios taxonómicos y ecológicos breves.

Índice

Agradecimientos i
Dedicatoria ii

Resumen iii

Contenido ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Lista de Figuras xi
Lista de Tablas ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Capítulo 1. Taxonomía, sistematica molecular y ultraestructura de los hongos hipogeos secuestrados Ascomycetes del A N P Cuenca de la Esperanza, Guanajuato, México. 1
Resumen 1

Abstract 1

Introducción 2
Hipótesis 3
Objetivo general 4
Objetivos específicos 4

Antecedentes 4
Materiales y métodos 8
Recolección de ascomas 8

Determinación taxonómica morfológica 8

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA y análisis filogenético. 8

Ultraestructura 10

Resultados y discusión 11
Género: *Elaphomyces* Nees von Esenbeck 1829 11
Elaphomyces aff. muricatus (1710 ITCV), ... 11
Descripción 11

Discusión 14

Conclusión 17

Género: *Hydnobolites* Tulasne y Tulasne 1843 18
Hydnobolites aff. cerebriformis Tulasne y Tulasne 18
Descripción 18

Discusión 19

Género: *Pachyphlodes* antes *Pachyphloeus* Tulasne y Tulasne 1844 20
Análisis filogenético 22

Pachyphlodes aff. pfisteri 24
Pachyphlodes aff. *pfisteri* 1 (1509 ITCV) 24
Diagnosis 25

Descripción 26

Discusión 28

Conclusión 29

Pachyphlodes aff. pfisteri 2, (1511 ITCV) 29
Diagnosis 29

Descripción 30

Discusión 32

Conclusión 33

Pachyphlodes aff. marroninus 33
Pachyphlodes aff. marroninus (1686 ITCV, 1686.2 ITCV) 33
Diagnosis 34

Descripción 36

Discusión 39

Conclusión 41

Pachyphlodes aff. carneus 1723 ITCV, 1728 ITCV 41
Análisis filogenético 41

Diagnosis 44

Descripción 45

Discusión 46

Conclusión 47

Género: *Tuber* Micheli ex Wigger: Fr. 1780 48
Tuber incognitum Piña Páez, Bonito, Guevara y Castellano 48
Descripción 48

Discusión 49

Complejo Separans 50
Análisis filogenético 50

Tuber separans (1671 ITCV 1681 ITCV 1688 ITCV) 52
Descripción 53

Discusión 55

Tuber aff. separans 1 (1658 ITCV, 1678 ITCV) 55
Tuber *aff.* separans 2 (1692 ITCV) 56
Diagnosis 56

Discusión 57

Conclusión 59

Tuber aff. separans 3 (1672 ITCV) 60

Diagnosis 60

Descripción 60

Discusión 62

Conclusión 63

Literatura citada 64
Resumen 67

Abstract 67

Introduccion 68
Objetivo general 69
Objetivo especifico 69

Antecedentes 70
Materiales y métodos 72
Recolección de basidiomas 72

Determinación taxonómica morfológica 72

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA y análisis filogenético. 72

Ultraestructura 74

Resultados y discusión 75
Género: *Melanogaster* Corda 1831 75
Melanogaster sp. (1507 ITCV) 77
Diagnosis 77

Descripción 77

Discusión 79

Conclusión 81

Género: *Hymenogaster* Vittadini 1831 82
Hymenogaster niveus 85
Discusión 87

Conclusión 87

Género: *Aroramyces* 88
Una nueva especie de hipogeo de México: *Aroramyces guanajuatensis* sp nov, (*Hysterangiaceae*, *Hysterangiales*) 88
Análisis molecular 88

Taxonomía 89

Aroramyces guanajuatensis Peña-Ramírez, Guevara-Guerrero, Z. W. Ge y

Martínez-González, sp. nov 89

Diagnosis 89

Descripción. 89

Discusión 94

Género: *Hysteranguim:* Vittadini 1831 96
Hysterangium sp. 1. 1508 ITCV 96
Diagnosis 96

Descripción 96

Discusión 98

Conclusión 99

Hysterangium sp. 2. (1699 ITCV) 99
Diagnosis 99

Descripción 99

Discusión 101

Conclusión 102

Hysterangium sp. 3 (1704 ITCV) 102
Diagnosis 102

Descripción 102

Discusión 104

Conclusión 106

Género: *Gautieria* Vittadini 1831 107
Gautieria magnicellaris (*Gomphaceae, Gomphales*) 107
Descripción 107

Discusión 109

Conclusión 111

Género: *Arcangeliella* Cavara 1900 112
Arcangeliella sp. (1698 ITCV) 112
Descripción 115

Discusión 118

Literatura citada 120
Adjuntos 124

Lista de Figuras

Figura No.	*Título*	Pág.
Figura 1.1	*Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), ascocarpos a) Superficie verrugosa con costra exterior que incluye raíces y suelo. b - d, Corte transversal en diferentes estados de desarrollo, de juvenil a la madurez. b) Gris claro en la etapa juvenil. c) Blanco algodonoso. d) Masa negra de esporas en la madurez. e) Corte transversal de peridio de dos capas, epicutis con verrugas piramidales truncadas, presencia de la costra en la porción distal de la verruga. Subcutis con cúmulos celulares como torundas de algodón, en las cuales se aprecia la apariencia marmoleada. Microfotografía 50×.	12
Figura 1.2	*Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), capas del Peridio. a) Verrugas piramidales truncadas, amarillas 400 ×. b) Fibras distales en las verrugas 1000×. c) Peridio con cristales traslucidos 1000×. d) Cristales Rojos en el peridio 1000×. e) Área de la verruga color amarillo, 1000×. f) Interfas ente las verrugas y la capa interna, 1000×. g) Peridio interior hialino, 1000×.	13
Figura 1.3	*Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), gleba, asca y esporas. a) Fibras de la gleba en estado algodonoso, 1000×. b) Ascas con esporas inmaduras hialinas, 1000×. c) Ascosporas globosas, 1000×. d) Esporas masivas 1000×. e - g SEM. e) Esporas masivas. f) Asca con ascosporas. g) Ascospora globosa.	15
Figura 1.4	*Hydnobolites aff. cerebriformis* (1698 ITCV) a) Ascoma b) Gleba. c) Asca con esporas inmaduras	18
Figura 1.5	Árbol filogenético del género *Pachyphlodes*, análisis con Mr. Bayes con la mayoría de las secuencias de ITS disponibles.	23
Figura 1.6	Árbol filogenético del grupo *Pachyphlodes pfisteri*, Análisis con Mr. Bayes con todas las secuencias de ITS disponibles a la fecha de la realización de análisis.	25
Figura 1.7	Pachyphlodes *aff.* pfisteri 1, (1509) ITCV ascoma, tejido y asca. a) Aureola en la porción superior. b) vista inferior con hifas surgiendo de la base. c) Gleba amarillo claro con venas estériles de color amarillo traslúcido. d) Corte transversal mostrando excipulum exterior, interior, y gleba, 400 x. e) Excipulum interior, 1000 x. f) Asca y espora 1000 x. g) Asca y espinas de la espora 1000 x	26
Figura 1.*8*	*Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) espora, SEM a) Espora globosa. b) Acercamiento de una espina capitada.	28
Figura 1.9	Pachyphlodes *aff.* pfisteri 2 (1511 ITCV), ascoma, asca y espora. a) Ascoma vista lateral. b) Ascoma vista inferior. c) Asca y esporas 1000 x d) Microscopia electrónica de barrido asca con 8 esporas e) Esporas globosas f) Asca con ocho esporas biseriadas, enfoque en las espinas, 1000 x.	30
Figura 1.10	*Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) excipulum y gleba. a) Células del excipulum exterior, excipulum interior y gleba. 100 x. b) Célula distal de la verruga, 1000 x. c) Excipulum exterior, células pseudo parenquimaticas 1000 x. d) Excipulum interior, células de las hifas, 1000 x. e) Gleba células pseudo parenquimaticas 1000 x.	31
Figura 1.11	Análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes marroninus*, empleando el fragmento ITS y mediante la metodología de Mr. Bayes.	35

Figura 1.12	*Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV), ascoma. a) Ascoma color, tamaño y morfo diversidad. b) Proyección micelial. c) Ascoma vista lateral d) Ascoma; areola superior. e) Gleba blanca con venas blanquecinas y traslúcidas.	36
Figura 1.13	*Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV1686 ITCV), ascoma tejido. a) Peridio de dos capas, gleba y asca formando una empalisada 100 x. b) Epicutis células pseudoparenquimatosas angulares, pared celular amarillo brillante. c) Subcutis hifas entrelazadas d) Gleba hifas entrelazadas.	38
Figura 1.14	*Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV), ascoma asca y ascosporas. a) Ascosporas globosas. b) Ascospora con espinas romas. c) Asca clavada a clavada-cilíndrica, pedicelada, con ocho esporas irregularmente uniseriadas. d) Asca inmadura. Microscopia electrónica de barrido e hasta g. e) Vista masiva de ascosporas f) Ascospora globosa g) Espinas gruesas y capitadas	40
Figura 1.15	Árbol filogenético del grupo *Pachyphlodes carneus* obtenido usando el fragmento ITS mediante la técnica de Mr. Bayes.	43
Figura 1.16	*Pachyphlodes aff. carneus* (1723 ITCV), ascoma, peridio y tejido de gleba. a) Proyección micelial, verrugas estrelladas. b) Gleba café con venas blancas. c) Peridio y gleba. 100 x. d) Epicutis con céluas pseudoparenquimatosas angulares, amarillo brillante, 1000 x. e) Subcutis hifas entrelazadas hialina, 1000 x. f) Gleba con céluas pseudoparenquimatosas angulares e hifas entrelazadas,1000 x.	44
Figura 1.17	*Pachyphlodes aff. carneus* (1723 ITCV) ascoma, asca y ascospora a) Asca y espora 400 x. b) Ascospora 1000 x. c) Ascospora espina enfocada,1000 x. Microscopia electrónica de barrido d - f. d) Asca con espora e) Espora con espinas f) Ascospora.	46
Figura 1.18	*Tuber incognitum* (ITCV 1695). a) Ascoma. b) Gleba. c) Peridio 1000 x. d) Espora 1000 x. e) Espora doble malla 1000 x.	49
Figura 1.19	Árbol filogenético del grupo *Tuber separans*, modelo Mr. Bayes con fragmento ITS de especies y muestras relacionadas.	52
Figura 1.20	*Tuber separans* (1671 ITCV) a) Ascoma. b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x. f) Setas en el peridio 1000x. g) Espora 1000 x. h) Doble malla en la espora 1000 x. i) SEM espora.	54
Figura 1.21	*Tuber aff. separans* 1 (1658 ITCV, 1678 ITCV). a y c, ascoma a y b gleba blanca.	56
Figura 1.22	*Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV). a) Basidioma. b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x. f) Espora alveolos1000 x. g) Espora doble malla1000 x. h) SEM espora i) SEM espora doble malla.	58
Figura 1.23	*Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV) a) Ascoma b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x f) Espora 1000 x.	61
Figura 2.1	Árbol filogenético del género *Melanogaster* con el método Mr. Bayes, con el fragmento ITS.	76
Figura 2.2	*Melanogaster* sp (1507 ITCV), basidioma y tejido. a) Basidioma amarillo con fibras viscidas cafés rodeando la fructificación. b) Cuerpo fructífero inmaduro, gleba blanca con lóculos llenos de una matriz gelatinosa. c) Basidioma café negruzco. d) Gleba negra. e) Peridio y gleba, corte transversal, 100 x. f) Peridio 1000 x. g) Gleba 1000 x.	78
Figura 2.3	*Melanogaster* sp. (1507 ITCV), basidia, espora, y peridio exterior. a) Basidia teñida con floxina 1000 x. b) Basidia con ocho esporas vista	79

	superior, 1000 x. c) Espora. 1000 x. d) Peridio con hifas proyectándose al exterior, 1000 x. e) Espora, 1000 x.	
Figura 2.4	Árbol filogenético del género *Hymenogaster*, fragmento ITS, mediante el análisis de Bayes.	83
Figura 2.5	Árbol filogenético generado mediante el método de Mr. Bayes, con las secuencias más similares a *H. niveus* (1623 ITCV) e *H. niveus* (1720 ITCV).	84
Figura 2.6	*Hymenogaster niveus* 1720 ITCV Basidioma y tejido a) Basidioma. b) gleba. c) corte transversal 100 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 400 x.	85
Figura 2.7	*Hymenogaster niveus* 1720 ITCV, esporas y basidia a-c microcopia óptica 100 x, d-f. microscopia electrónica de barrido. a) Espora en masa. b) Espora. c) Basidia, tuición con floxina. d) Espora en masa. e) Espora citriforme. f) Espora, detalle de la ornamentación.	86
Figura 2.8	Filograma de máxima probabilidad mediante el análisis Bayesiano. Para *Aroramyces* e *Hysterangium*.	91
Figura 2.9	*Aroramyces guanajuatensis* (holotipo ITCV 1613): a y b Basidioma mostrando la superficie del peridio (bar = 0.5 cm). c) Basidioma sección transversal mostrando la gleba (bar = 0.5 cm), d) Sección transversal del peridio de tres capas del peridio (1 epicutis, 2 mesocutis, 3 subcutis) a 400x (bar = 20 µm). e-f basidiospora 1000x (bar = 5 µm), f) crestas irregulares contenidas dentro del utrículo inflado.	92
Figura 2.10	SEM. a) *Aroramyces balanosporus* (848I TCV) y b) *Aroramyces guanajuatensis* (1739 ITCV) bar = 5 µm.	93
Figura 2.11	*Aroramyces guanajuatensis,* holotipo (ITCV 1613) a–f. Peridio sección transversal a–c (barra = 10 µm). a) Epicutis de hifas postradas. Mesocutis, pseudoparenquima angular b) Subcutis la flecha señala las células postradas. c) Subcutis con células grandes isodiamétrias dispersas (flecha). d) Hifas con cristales adheridos (barra = 25 µm), f) Basidia y basidiolos (barra = 10 µm), f) Fíbulas del epicutis, (bar = 5 µm).	94
Figura 2.12	*Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV). Basidioma y tejido. a) Basidiomas. b) Basidioma con cambio de color con el trato. c) Gleba verde con lóculos. d) Peridio 400 x. e) Epicutis 1000 x. f) Subcutis 1000 x. g) Gleba 400 x. h) Gleba 1000 x.	97
Figura 2.13	*Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV). Basidia y espora. a) Basidia clavada, 100 x. b) Espora, 100 x. c) Microscopia electrónica de barrido espora. d) Microscopia electrónica de barrido espora en masa.	98
Figura 2.14	*Hysterangium* sp. 2, (1699 ITCV), Basidioma y tejido. a) Basidioma varios tamaños. b) Gleba blanca inmaduro, a verde en la madurez. c) Peridio 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 40 x. f) Gleba 1000 x.	100
Figura 2.15	*Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV), Basidia y espora. SEM; b - f. a) Espora en masa, 1000 x. b) Espora en masa. c) Basidia con dos esporas. d) Esporas agrupadas. e) Espora vista superior. f) Espora vista lateral.	101
Figura 2.16	*Hysteranguim* sp. 3, (1704 ITCV) Basidioma, gleba y tejido. a) Basidioma varios tamaños b) Gleba café c) Peridio de tres capas 400 x. d) Epicutis 1000 x e) Epicutis células globosas. 1000 x. f) Trama 1000 x.	103
Figura 2.17	*Hysteranguim* sp. 3, (1704 ITCV)), espora microscopia óptica (a y c) y SEM b, d y e. a) Esporas en masa. b) Espora masa. c) Espora pared	105

	celular verde olivo y apéndice hilar pequeño. d) Espora vista lateral. e) Acercamiento de la espora, apéndice hilar cubierto con el perisporeo.	
Figura 2.18	Árbol filogenético del género Gautieria, generado con el método de Mr. Bayes en el cual *Gautieria magnicellaris* (1716 ITCV), se agrupa con *G. magnicellaris*, confirmando la identidad de la muestra.	109
Figura 2.19	*Gautieria magnicellaris* (1716 ITCV), Basidioma, basidia, espora, trama. a) Basidioma mostrando el peridio evanescente. b) Gleba café. c) SEM, espora. d) Espora 1000 x. e) Espora mostrando las quillas longitudinales, 1000 x. f) SEM, espora. g) Basidia 1000 x. h) Basidiola 1000 x. i) Trama 1000 x.	110
Figura 2.20	Análisis filogenético con Mr. Bayes, *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) comparando con géneros relacionados, epigeos *Lactarius*, *Russula*, e hipogeos, *Arcangeliella*, *Gymnomyces, Macowanites* y *Zelleromyces*.	114
Figura 2.21	Árbol filogenético con el método de Mr. Bayes, comparando *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) con diferentes especies de *Lactarius*.	115
Figura 2.22	*Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) Basidioma y tejido. a) Basidioma con estípite. b) Gleba con columella gruesa. c) Laticíferos 1000×. d) Peridio 1000×. e) Epicutis 1000×. f) Subcutis 1000×. g) Gleba células pequeñas 1000×. h) Gleba, subhimenio 1000×.	116
Figura 2.23	*Arcangeliella* sp. (1698 ITCV), basidia y basidiospora. a) Basidia, tinción rojo Congo × 1000. b) Basidia tinción floxina × 1000. c) Espora reacción amiloide positiva × 1000. d) Espora verde olivo-amarillento × 1000. Microscopia electrónica de barrido e hasta i. e) Espora en masa. f y g) Ornamentación reticulada. h) Apéndice hilar vista lateral. i) Apéndice hilar vista superior.	117

Lista de Tablas

Tabla No.	Título	Pág.
Tabla 1.1	Listado de especies del género *Tuber* reportadas para la República Mexicana	6
Tabla 1.2	Análisis filogenético del género *Pachyphlodes* con la mayoría de las secuencias de ITS disponibles.	19
Tabla 1.3	Grupo de *Pachyphlodes pfisteri,* listado de secuencias empleadas para el análisis con el fragmento ITS.	22
Tabla 1.4	Listado de secuencias y especies utilizados para el análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes marroninus*, basado en secuencias de ITS disponibles.	33
Tabla 1.5	Listado de especies y secuencias empledoas en el análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes carneus* con el fragmento ITS, mediante análisis de Mr. Bayes.	41
Tabla 1.6	Listado de especies empleadas en el análisis filogenético del complejo separans dentro del género *Tuber*. Fragmento ITS, número de acceso NCBI y referencias.	50
Tabla 2. 1	Listado de especies y secuencias de ITS utilizadas para el análisis filogenético del genero *Melanogaster*	75
Tabla 2.2	Listado especies y número de registro empleados en el análisis filogenético de *Hymenogaster* relacionado con *H. niveus*.	82
Tabla 2.3	Lista de número de acceso NCBI de los fragmentos LSU e ITS de *Aroramyces guanajuatensis*	88
Tabla 2.4	Lista de especies de *Aroramyces* e *Hysterangium*, números de acceso de GenBank, y referencias para las secuencias LSU usadas en análisis filogenético.	90
Tabla 2.5	Número de acceso de las secuencias de ITS empleadas para este análisis recuperadas del NCBI para el género *Gautieria.*	108
Tabla 2.6	Listado de secuencias utilizadas en el análisis filogenético *Arcangeliella*, muestra 1698 ITCV.	112

Capítulo 1. Taxonomía, sistemática molecular y ultraestructura de los hongos hipogeos secuestrados Ascomycetes del A N P Cuenca de la Esperanza, Guanajuato, México.

Resumen

Este es el primer trabajo de hongos hipogeos en el estado de Guanajuato, mediante microscopia óptica, SEM y biología molecular se describen cinco géneros de Ascomycetes, se reportan doce especies tentativamente nuevas para la ciencia; *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV)*, Pachyphlodes* cuatro especies, en el clado *pfisteri* dos especies*, Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) y *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV), *P. aff. marroninus* (1686 ITCV)*, P. aff. carneous* (1723 ITCV)*. Tuber* clado *separans* dos, *T. aff. separans* 2 (1692 ITCV) y *T. aff. separans* 3 (1672 ITCV), por ultimo *T. incognitum* que ya se ha publicado. Se reportan por primera vez para el estado *T. separans,* e *Hydnobolites aff. cerebriformis*. Se presentan comentarios taxonómicos y ecológicos breves.

Abstract

This is the first research about hypogeus fungi from Guanajuato state. Five Ascomycetes genera are described, by optical microscopy, SEM and DNA analysis. Twelve putative novel spices are described; *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV)*, Pachyphlodes* four species, in *pfisteri* clade two species*, Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) and *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV), *P. aff. marroninus* (1686 ITCV)*, P. aff. carneous* (1723 ITCV)*. Tuber separans* clade two,

T. aff. separans 2 (1692 ITCV) and *T. aff. separans* 3 (1672 ITCV), by last *T. incognitum* already published. *T. separans,* and *Hydnobolites aff. cerebriformis* are reported for the first time to the Guanajuato state. Brief taxonomic and ecological comments are presented.

Introducción

México es un país megadiverso, sin embargo, el conocimiento de la micobiota es muy limitado, pero se debe resaltar que el conocimiento de los hongos hipogeos Ascomycetes es aún más pobre, en este contexto es importante aumentar el conocimiento en estas especies. Respecto al trabajo que se ha realizado en México acerca de hongos Ascomycetes hipogeos cabe hacer notar que la zona norte ha sido la más explorada incluyendo a Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (Castellano *et al.,* 2012, García *et al.,* 2014), seguido en el sur Oaxaca (Gómez-Reyes *et al.,* 2012) y la zona central, Estado de México, Michoacán (Gómez-Reyes *et al.,* 2012 Guevara-Guerrero y Gómez-Reyes, 2013), Puebla y Morelos (Guevara *et al.,* 2008, Gómez-Reyes *et al.,* 2012.), pero no hay ningún reporte en Guanajuato.

En este tenor podemos considerar a la sierra de Santa Rosa como una zona muy interesante. Esta sierra forma parte de la cordillera neovolcánica y atraviesa el estado del noroeste a sureste. La sierra de Santa Rosa incluye 113 mil hectáreas y es una de las áreas más húmedas del estado, debido a su altitud más de 2100 msnm, tiene un clima templado con temperatura promedio de 14ºC, con lluvias en verano y en otoño se presentan lluvias dispersas, (IEEG 1998, García 2011).

La sierra de Santa Rosa está clasificada como zona prioritaria por los siguientes organismos:

Región NABCI 46 Sur del Altiplano Mexicano, U.S. NABCI 2000.

CONABIO: AICA C-32 Sierra de Santa Rosa

CONABIO. RTP- 99 Sierra de Santa Rosa,

CONABIO. RHP- 57 Cabecera del Río Laja CONABIO

De acuerdo con lo anterior, el gobierno del estado de Guanajuato decretó como área natural protegida una zona de 1832 ha dentro de esta sierra con el nombre de Cuenca de la Esperanza.

La cubierta vegetal está formada por bosque de *Quercus* asociada con *Arbutus* sp. (Madroño) y *Arctostaphylos pungens* (Pingüica). Estudios recientes reportan 136 especies de macromicetos (Alejo-Iturvide *et al.,* 2015., Álvarez *et al.,* 2013., Díaz *et al.,* 2013) el entorno ecológico sugiere fuertemente la presencia de hongos hipogeos Ascomycetes en la zona, sin embrago aún no hay ninguna investigación al respecto.

Hipótesis

Es conocido que las especies de *Quercus* establecen relaciones micorrízicas, con diversas especies de hongos por lo tanto, se puede esperar que en el ecosistema de encinos de la sierra de Santa Rosa en Guanajuato se podrían presentar diversas especies de hongos hipogeos Ascomycetes asociados con *Quercus*.

Objetivo general

Determinar la taxonómia, sistematica molecular y ultraestructura de algunas especies de hongos hipogeos Ascomycetes presentes en el área natural protegida Cuenca de la Esperanza en Guanajuato México.

Objetivos específicos

Registrar y determinar las especies de hongos hipogeos *Ascomycetes* y su ubicación filogenética apoyado de su ultraestructura de las especies secuestradas presentes en el ANP Cuenca de la Esperanza Guanajuato.

Antecedentes

No se encontró ningún estudio publicado sobre hongos secuestrados ascomycetes en ANP Cuenca de la Esperanza, ni en el estado de Guanajuato, sin embargo, en otros estudios de la Republica mexicana se han encontrado diversas especies de Ascomycetes. Podemos señalar que en México se han reportado siete especies de *Elaphomyces*; *E. reticulatus*, Estado de México (Trappe y Guzmán 1971). *E. granulatus* Estado de México (Trappe y Guzmán 1971), Jalisco, (Herrera-Fonseca *et al.,* 2002), Tamaulipas (García *et al.,* 2014). *E. appalachiensis* Nuevo León y Tamaulipas, (Castellano *et al.,* 2012, García *et al.,* 2014), Michoacán, (Gómez–Reyes *et al.,* 2018). *E. verroculosus* Estado de México, Hidalgo, Veracruz, (Castellano et al., 2012). *E. aculeatus,* Michoacán, (Gómez –Reyes *et al.,* 2012). *E. maculatus,* Michoacán (Gómez –Reyes *et al.,* 2012). *E muricatus* Fr. Durango, Nuevo León, (Cazares *et al.,* 1992), Michoacán Gómez –Reyes *et al.,* 2012),

Tamaulipas (García 2014). *E. muricatus aff. muricatus*, Estado de México, Oaxaca, (Trappe *et al.,* 1979). *E. muricatus aff. variegatus*, Estado de México (Trappe *et al.,* 1979).

Un género muy interesante es *Hydnobolite*s ya que es diferente de los otros dentro de la familia Pezizaceae, porque los cuerpos fructíferos tienen apariencia de un pequeño cerebro, son blanquecinos, y cerosos-vítreos, cuando inmaduros **(**Montecchi y Sarasini 2000). El taxón presenta nueve especies a nivel mundial, pero solo una, *Hydnobolites cerebriformis* ha sido registrada para México, la primera vez por (Cazares *et al.,* 1992) en Nuevo León la segunda en Tamaulipas, García *et al.,* 2014, y el último reporte por Gómez-Reyes *et al.,* (2018) en Michoacán. Estas tres menciones nos dan idea de lo pobremente estudiado del género en México.

Asi mismo para México se han generado cinco reportes de Pachyphlodes, *P. citrinus* en Nuevo León, (Garza *et al.,* 1985, Cázares *et al.,* 1992), *P. virescens* Nuevo León y Tamaulipas, (Garza *et al.,* 1985, Cázares *et al.,* 1992, García *et al.,* 2014), *P. carneus* (García *et al.,* 2014) *P. marroninus* Nuevo León, Tamaulipas y Tlaxcala. Sin embargo, Healy *et al.,* (2009) menciona una controversia con la identificación *P. citrinus*, sugiriendo que dentro de las colectas mexicanas algunas que se reportaron como *P. citrinus* en realidad son *P. carneus*. Además de las que se reportaron como *P. cf. carneus* Healy *et al.,* (2009), este último se considera un taxón nuevo que espera ser descrito, (Medel *et al.,* 2013).

Cabe resaltar que para la Repúbilca Mexicana se conocen 20 especies del género *Tuber*, ejemplos de la complejidad taxonómica del grupo pudieran ser algunas de

las primeras reportadas; *Tuber maculatum* Vittad (Trappe y Guzmán 1971) que Guevara *et al.*, (2013 b) considera dentro de un complejo de aproximadamente 8.

Tabla 1.1 Listado de especies del género *Tuber* reportadas para la República Mexicana

	Especie	Localidad	Referencia
1	*Tuber maculatum* Vittad dentro de un complejo de aproximadamente 8 especies.	Cañón de Puerto Genovevo, Nuevo León	Trappe y Guzmán 1971 Guevara *et al.*, 2013 b
2	*T. gardneri* Gilkey (sustituye a *T. murinum* Hesse)	Coahuila, cerro del Mercado, Morelos Castaños. Estado de México,	Guevara *et al.*, 2013 b Trappe y Guzmán 1971 Cázares *et al.,* 1992
3	*T. lyonii.* Butters (Sustituye a *T. rufun* Cázares *et al.*, 1992, Trappe y Cázares 2006)	Tamaulipas, Cd Victoria, el Madroño, Nuevo León Municipio Garza García	Guevara *et al.*, 2013 b, Cázares *et al.*, 1992
4	*T. separans* Gilkey,	Nuevo León	Cázares *et al.*, 1992,
5	*T. aestivum*	Ciudad de México	Villarruel-Ordaz y Cifuentes 2007
6	*T. dryophilum* Tul. Et C Tul.	Durango, Pueblo Nuevo, El Rosillo.	Raymundo *et al.*, 2012
7	*T. canaliculatum* Gilkey	Nuevo León. Municipio de Santa Catarina	Guevara *et al.*, 2013 b
8	*T. gibbosum* Harkn estado de México	Estado de México Parque nacional Nevado de Toluca,	Guevara *et al.*, 2013 b
9	*T. malacodermum* Fissher	Monterrey, Nuevo León	Guevara *et al.*, 2013 b
10	*T. regiomontanum* Guevara, Bonito y Rodríguez	Nuevo León	Guevara *et al.*, 2008
11	*T. castilloi* Guevara, Bonito y Trappe,	Nuevo León y Tamaulipas	Guevara *et al.*, 2013
12	*T. guevarai* Bonito y Trappe,	Tamaulipas	Guevara *et al.*, 2013
13	*T. mexiusanum* Guevara, Bonito y Cázares,	Coahuila y Tamaulipas	Guevara *et al.*, 2013
14	*T. miquihuanense* Guevara, Bonito y Cázares	Tamaulipas	Guevara *et al.*, 2013
15	*Tuber guzmanii* Trappe y Cazares	Morelos	Guevara *et al.*, 2013 b
16	*T. bonitoi* Guevara y Trappe,	Veracruz	Guevara-Guerrero *et al.*, 2015
17	*T. brunneum*, Guevara, Bonito y Trappe	Jalisco, La primavera	Guevara-Guerrero *et al.*, 2015
18	*T. psedoseparans* Guevara, Bonito y Trappe	Tequila y sierra de Quila, Jalisco	Guevara *et al.*, 2015
19	*T. tequilanun* Guevara, Bonito y Trappe	Jalisco, La primavera, Tequila	Guevara *et al.*, 2015
20	*T. aztecorum* Guevara, Bonito y Smith	Estado de México Parque Nacional Nevado de Toluca	Guevara-Guerrero *et al.*, 2018

especies, *T. murinum* Hesse, (Trappe y Guzmán 1971), que posteriormente es reclasificada como *T. gardneri* Gilkey, (Guevara *et al.*, 2013 b) también podríamos mencionar a *T. rufum* Pico (Cázares *et al.*, 1992), que Trappe y Cázares (2006) recatalogaron como *Tuber lyonii* Butters

Es muy importante resaltar que del año 2008 al 2018 se han reportado 11 especies de nuevo cuño para la República Mexicana algunas pudiendo ser consideradas como endémicas. Números 10 a 20 en la tabla 1.1.

Un breve resumen de las especies reporatadas se presenta en la tabla 1.1. observándola podríamos mencionar que la mayoría de las especies registradas se reportaron en los estados norteños de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y Durango, incluyendo cinco especies de nuevo cuño, (Trappe y Guzmán 1971, Cázares *et al.,* 1992, Guevara *et al.*, 2008, Raymundo *et al.*, 2012, Guevara *et al.*, 2013 Guevara *et al.*, 2013 b, y se puede resaltar que una parte sustancial de las especies nuevas seis se describen para el centro de la república, Morelos, Jalisco, Veracruz y Estado de México, (Guevara *et al.*, 2013 b, Guevara-Guerrero *et al.*, 2015, Guevara-Guerrero *et al.*, 2018).

Además, podriamos mencionar a *Genea asperula* Trappe, Guzman y Herrera, colectado en un bosque *Quercus-Pinus*, en Chiapas y *Geopora cooperi* Harkn, allada bosque de pino en el Estado de México (Tape y Guzmán 1971). Del mismo modo *Genea arenaria* bajo *Quercus rysophylla*, *Q. canby*, bosque mixto pino encino. En Nuevo León (Cázares *et al*., 1992.)

Materiales y métodos

Recolección de ascomas

La colecta y el estudio macroscópico se realizaron acorde a Hawker (1954) y Castellano *et al.,* (1989). El área de investigación fue seleccionada por la cobertura vegetal conservada. La búsqueda de hongos hipogeos se realizó mediante la selección al azar de árboles de encino y mediante un rastrillo de jardín se escarbó hasta 15 cm de profundidad en un radio de 1.5 m, en todo momento el suelo removido se regresó a la posición original para minimizar el impacto, (Castellano *et al.,* 1989).

Todos los cuerpos fructíferos se fotografiaron en fresco. La determinación del color se realizó a simple vista. Posteriormente se deshidrataron a 50 °C. Para la observación microscópica los cuerpos fructíferos se cortaron con una navaja de rasurar y se rehidrataron con KOH 5 %. Se midieron 30 esporas y las capas celulares de los cortes de peridio y gleba, (Castellano *et al.,* 1989).

Determinación taxonómica morfológica

Cada género fue descrito a nivel de especie con base en la bibliografía especializada. Los registros de cada colecta se depositaron en el herbario micológico José Castillo Tovar (ITCV) del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, México.

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA y análisis filogenético.

La extracción del DNA se realizó con el Kit: Extract-N-Amp kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri). Las muestras se tomaron de los frutos deshidratados, por cada

espécimen se tomó una porción de gleba de 1 - 2 mm de diámetro, se colocó en un tubo de 500 µL. Se añadieron 20 µL de solución de extracción. Posteriormente se incubo a 65ºC durante 10 minutos. A continuación, se incubó a 96ºC por 10 minutos. Después se añadieron 20 µL de solución de dilución. Finalmente se colocó 30 minutos a temperatura ambiente. Para la amplificación de la región ITS se emplearon los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.,* 1990). La reacción de amplificación (PCR) contenía 19.125 µL de agua bidestilada, Buffer 10X 2.5 µL, dNTPs 0.5 µL (0.2 mM cada uno), $MgCl_2$ 1 µL (1.5 mM), Cebadores 0.25 µL (0.2 µM cada uno) Platinun Taq DNA polymerase (Invitrogen Thermo Fisher Scientifics, Carlsbad California) 0.125 µL (2.5 U), DNA 1 µL (menos de 500 ng). Ciclo de reacción, calentamiento inicial 94ºC 5 min, 35 ciclos de 94ºC 1 min 54ºC 1 min, 72ºC 1 min y extensión final 72ºC 10 min.

Los dNTPs y cebadores restantes se removieron mediante ExoSap-IT PCR product cleanup (Applied biosystems Foster City, California) 1 µL, agua grado PCR, mas 3.5 µL de producto de PCR. La mezcla se calentó a 37ºC por 45 minutos, seguida de 80ºC por 15 minutos. La secuenciación se realizó por el método de Sanger con un secuenciador: Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer, empleando el kit: BigDye Sequencing kit. En el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud, del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México.

Análisis del DNA. Excepto por *Aroramyces,* las secuencias fueron ensambladas, editadas y analizadas con el software Geneious Prime. Se seleccionaron

secuencias del National Center for Biotecchnology Information (NCBI), las cuales fueron recuperadas y comparadas con nuestras muestras. El Alineamiento se realizó con el programa MUSCLE, 50 iteraciones, rasurando los extremos, con tres ciclos de alineamiento-rasurado, los arboles filogenéticos se obtuvieron con Mr. Bayes, con un millón de pruebas, considerando una probabilidad Gama, con una frecuencia de submuestreo de 2000, un 25,000 de Calentamiento (burn-in length). En cada caso se seleccionó una especie cercana a las especies o al género como externo, para el enraizamiento del análisis.

Ultraestructura

Las muestras deshidratadas se adhirieron al porta muestra mediante un cinta con pegamento por ambs lados, posteriormente las esporas y el tejido fueron teñidas con oro paladio mediante las sublimación. La microfotogarfia y microscopia electrónica se realizó con el microscopio electrónico JSM5600LV, JOEL, Tokio, Japón.

Resultados y discusión

Género: *Elaphomyces* Nees von Esenbeck 1829

La especie *Elaphomyces muricatus* se caracteriza por presentar un amplio peridio marmoleado color vinaceo a púrpura y verrugas piramidales truncadas Montecchi y Sarasini 2000.

Elaphomyces aff. muricatus (1710 ITCV),

Figuras 1.1 – 1.3

Descripción

Ascoma 14.5–38.8 × 11.4–34.8 × 9.4–30 mm, promedio 20.6 × 18.39 × 16.56 mm, subgloboso, irregular con verrugas angulares de 3 mm largo, firme, coriáceas, café amarillento, la superficie con costra externa que incluye raíces y suelo. Peridio 1.5–2.5 mm ancho en sección trasversal, blanquecino a café claro hasta café obscuro, en ocasiones vinaceo en la porción interna, formando agregados con venas claras entre ellos dando apariencia marmoleada. Epicutis amarillo claro a ocre, con verrugas piramidales truncadas, 250–390 µm ancho, promedio 325 µm, con vellos fibrilosos, células amarillas, prosenquimatosas, entrelazadas 5–6 µm diámetro, promedio 5.4 µm. Subcutis marmoleado 1500–2040 µm ancho, promedio 1737 µm, pseudoparenquimatoso, células isodiamétrias hialinas 4–8 × 4–7 promedio 6.1 × 5.6, prosenquimatoso, células entrelazadas 5–8 µm diámetro, promedio 5.8 µm. Gleba, los ascomas se encontraron en diferentes estados de madurez, y van de

café-grisáceo claro en la primera etapa, pasando a algodonosa en la siguiente, tornándose en una masa de esporas negras en la madurez.

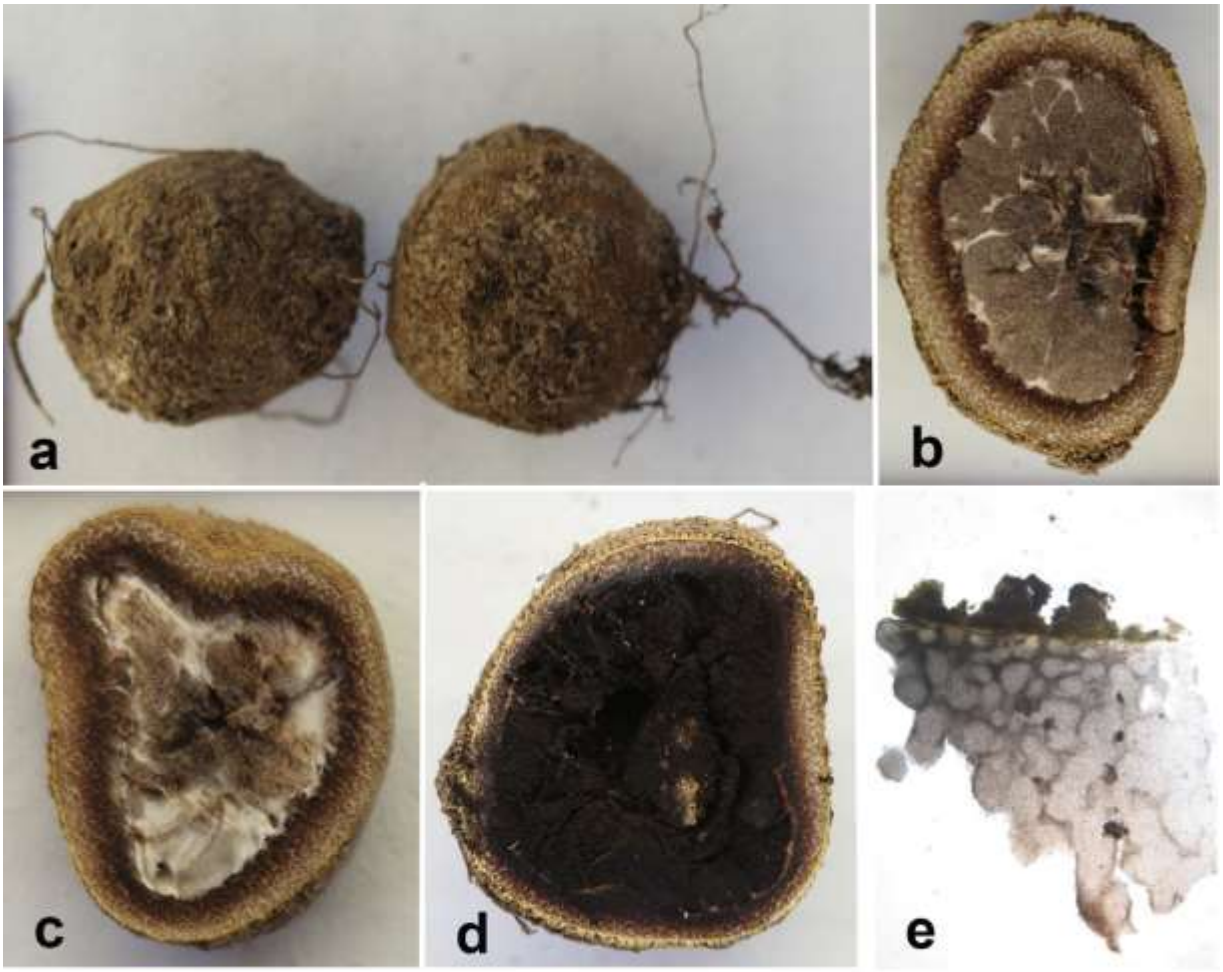

Figura 1.1. *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), ascocarpos a) Superficie verrugosa con costra exterior que incluye raíces y suelo. b - d, Corte transversal en diferentes estados de desarrollo, de juvenil a la madurez. b) Gris claro en la etapa juvenil. c) Blanco algodonoso. d) Masa negra de esporas en la madurez. e) Corte transversal de peridio de dos capas, epicutis con verrugas piramidales truncadas, presencia de la costra en la porción distal de la verruga. Subcutis con cúmulos celulares como torundas de algodón, en las cuales se aprecia la apariencia marmoleada. Microfotografía 50×.

Prosenquimatosa células fibrosas de 2–6 µm de diámetro. Olor suave, sabor no registrado. Asca 26–43 × 26–43 promedio 38 × 34.5 µm, globosa, subglobosa, con dos a tres ascosporas, en ocasiones cuatro, rara vez una. Ascosporas incluyendo espinas 11–23 µm diámetro, promedio 19.2 µm sin espinas 9–19 µm, promedio 15.2, globosa, hialina cuando inmadura, cambiando a café claro a ocre en la madurez. Pared celular delgada 1 µm, espinas generalmente 2 µm, rara vez 1 ó 4 µm.

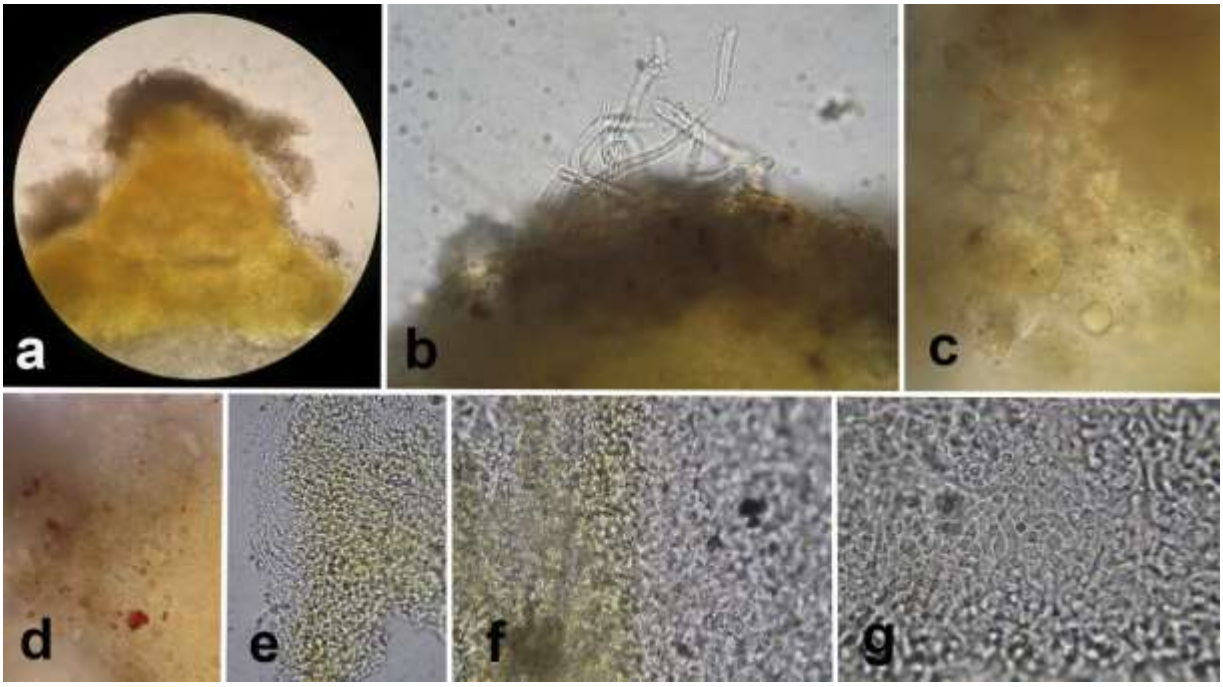

Figura 1.2. *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), capas del Peridio. a) Verrugas piramidales truncadas, amarillas 400 ×. b) Fibras distales en las verrugas 1000×. c) Peridio con cristales traslucidos 1000×. d) Cristales Rojos en el peridio 1000×. e) Área de la verruga color amarillo, 1000×. f) Interfas ente las verrugas y la capa interna, 1000×. g) Peridio interior hialino, 1000×.

Distribución hábitat, ecología; México, Estado de Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo en suelo y mantillo, gregario, nueve ascomas en una colecta asociad a *Quercus* sp. 1533 msnm, octubre.

Materia estudiado México, Estado de Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, 1710 ITCV, N 21º03.868', O 101º13.278'. 2500 msnm.

Discusión

Los ascomas obtenidos en este trabajo presentaron una talla máxima de 14.5–38.8 mm de diámetro más pequeños que los reportados por Gómez-Reyes *et al.,* (2012) con 20–48 mm de diámetro. Gómez-Reyes *et al.,* (2012) reporta respecto peridio 1–3 mm ancho, epicutis 300–500 µm ancho y subcutis 800–2500 µm, *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV) es más delgado que el material michoacano, con un peridio de 1.5–2.5 mm de ancho, epicutis 250–390 µm ancho y subcutis 1500–2040 µm ancho. Pero las hifas observadas en *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), con células del epicutis 5–6 µm de diámetro, y células entrelazadas de 5–8 µm de diámetro de la misma manera las células de las del subcutis 3–6 µm. son más delgadas que las reportadas por Gómez-Reyes *et al.,* (2012. Además, la colecta *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), presenta células isodiamétricas que no se observaron en el reporte de Gómez-Reyes *et al.,* (2012.

Olor; suave, difiere a lo reportado por Montecchi y Sarasini 2000, quienes lo citan con olor desagradable. Asca, según Montecchi y Sarasini (2000) 32 × 40 µm y Gómez-Reyes *et al.,* (2012) 32.5–38 x 35–42 µm, subglobosa a piriforme, en este trabajo se observaron ascas de 26–43 x 26–43 µm, promedio 34.5 x 38 µm, muy

cercano al observado en los trabajos anteriores pero con un rango más amplio, tendiendo de globosa a subglobosa en lugar de piriforme. Respecto al número de esporas por asca se observó de manera similar de 2 a 4 esporas por asca, pero en este trabajo ocasionalmente se encontró solo una espora por asca, pero a diferencia de lo reportado por Montecchi y Sarasini (2000) no encontramos ascas con 6 esporas.

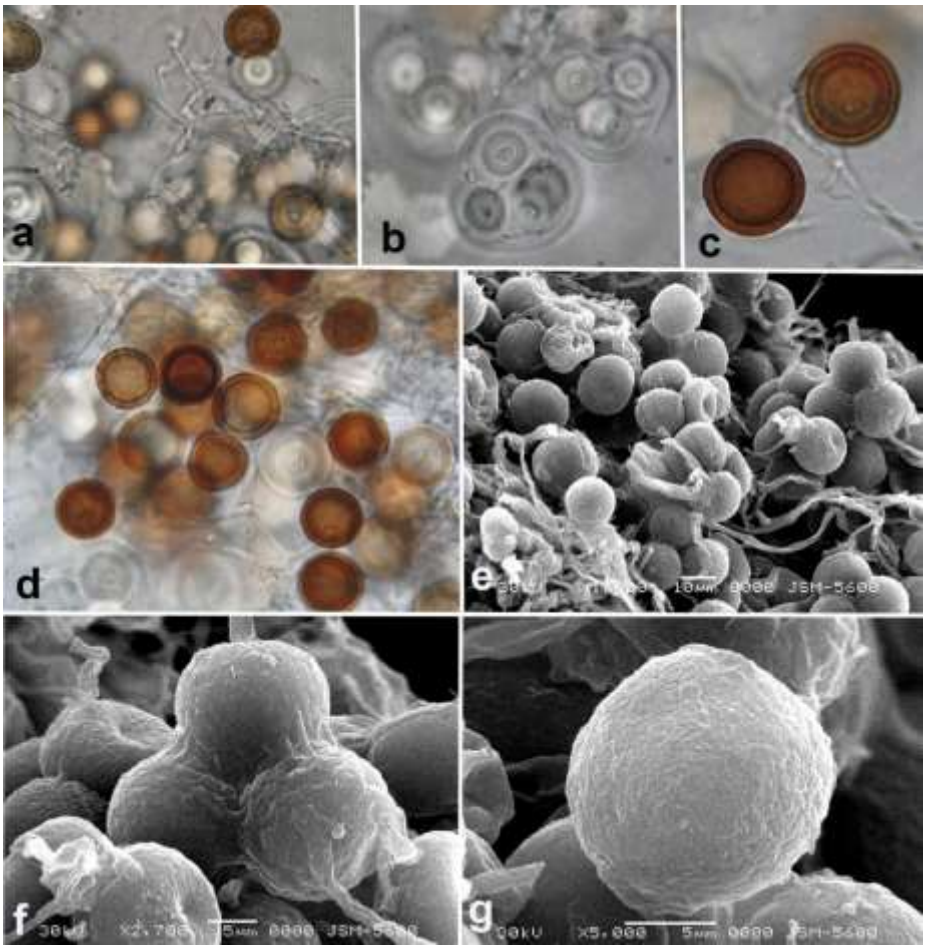

Figura 1.3. *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), gleba, asca y esporas. a) Fibras de la gleba en estado algodonoso, 1000×. b) Ascas con esporas inmaduras hialinas, 1000×. c)

Ascosporas globosas, 1000×. d) Esporas masivas 1000×. e - g SEM. e) Esporas masivas. f) Asca con ascosporas. g) Ascospora globosa.

De acuerdo a la clave para especies de *Elaphomyces* de Norte América propuesta por Castellano *et al.,* (2012) en la cual incluye especies para la República Mexicana, considera esporas de 18–25 µm de diámetro incluyendo las espinas, este tamaño es mayor que el observado en este trabajo, 11–23 µm de diámetro, promedio 19.2 µm. del mismo modo, Trappe *et al.,* (2007) menciona ascosporas de 18–35 µm, sin aclarar que las espinas estén o no incluidas en la medida, de cualquier modo, se observa que la espora encontrada en Guanajuato es de menor tamaño, por otro lado, Gómez-Reyes *et al.,* (2012) reporta ascosporas de 26–30 (32) µm de diámetro incluyendo ornamentación. Esta última medida es la de mayor tamaño reportada para esta especie.

En este caso las espinas observadas son más largas que las mencionadas por Montecchi y Sarasini (2000) con espinas de 1–1.5 µm a veces 2 µm de longitud, y están más cercanas a las reportadas por Gómez-Reyes *et al.,* 2012 quien menciona espinas de 2–3 µm de largo.

Respecto al hábitat, *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), se encontró en un bosque de *Quercus*, esto coincide con lo reportado por Montecchi y Sarasini (2000) y Gómez-Reyes *et al.,* (2012) quienes consideran que *E. muricatus* puede ser encontrada en bosques de pino-encino y que puede estar asociado tanto encinos como a pinos. En Michoacán está asociado con *Quercus rugosa* y *Q. laurina.* Por

otro lado, se diferencia de lo reportado por Trappe *et al.,* (2007), quien menciona que *E. muricatus* puede ser encontrado en asociación con hayas y abedul.

Altitud. La colecta obtenida en este trabajo se encontró alrededor de los 2500 msnm a diferencia de lo reportado por Montecchi y Sarasini (2000) quienes mencionan que *E. muricatus* pude ser encontrado hasta 1200 msnm.

Aunque en términos de estacionalidad *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV) se encontró en el mes de octubre, a pesar de haber muestreado todo el año, en esto se diferencia de lo mencionado por Gómez-Reyes *et al.,* (2012) quien encontró especímenes de julio a octubre, o del verano al otoño según Montecchi y Sarasini (2000), y aún más con la información de Trappe *et al.,* (2007), quien reporta que es posible encontrarlo todo el año.

Conclusión

La información anterior nos permite concluir que la especie encontrada, *Elaphomyces aff. muricatus* (1710 ITCV), aunque cercana a *Elaphomyces muricatus* en realidad posee características únicas que lo hace una especie diferente.

Género: *Hydnobolites* Tulasne y Tulasne 1843

Hydnobolites aff. cerebriformis Tulasne y Tulasne

Figura 1.4 a - c

Descripción

Ascoma 8.6–19×1.7–16.8×6.4–16.4 mm, promedio 13.5×13.2×12.5, subgloboso, lobado a irregular. Peridio, amarrillo claro, liso, blanco aterciopelado en depresiones. Gleba, sólida, amarillo claro. Ascas piriformes, en nuestra muestra las esporas estaban inmaduras.

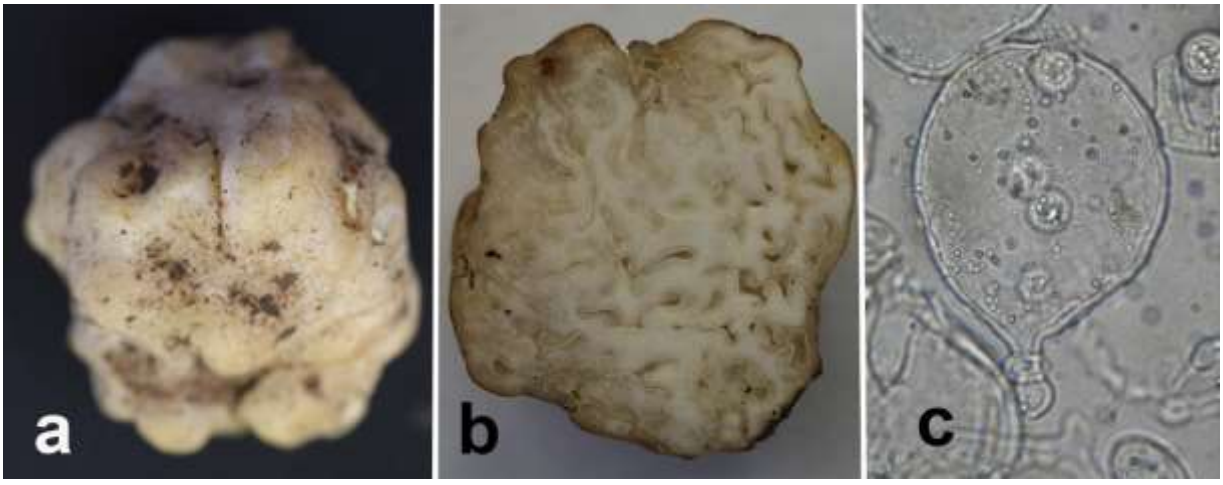

Figura 1.4 *Hydnobolites aff. cerebriformis* (1698 ITCV) a) Ascoma b) Gleba. c) Asca con esporas inmaduras

Localización. México, estado de Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza 1685 (ITCV) N 21º03'54.2'', O 101º13'23''. 2500 msnm. 1696 (ITCV) N 21º03', O 101º13'. 2500 msnm. 1697 ITCV N 21º03'', W 101º13'. 2500 msnm.

Discusión

Todos los datos sugieren que las colectas *Hydnobolites aff. cerebriformis (*1985 ITCV), *Hydnobolites aff. cerebriformis* (1696 ITCV), *Hydnobolites aff. cerebriformis* (1697 ITCV) son *Hydnobolites cerebriformis,* pero el hecho de presentar esporas inmaduras no nos permite una determinación precisa, por lo que se considera que es *Hydnobolites aff.ine cerebriformis.*

Género: *Pachyphlodes* antes *Pachyphloeus* Tulasne y Tulasne 1844

Tabla 1.2 Análisis filogenético del género *Pachyphlodes* con la mayoría de las secuencias de ITS disponibles.

Especies	Numero NCBI	Referencias
Pachyphlodes sp. (1728 ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp. (1723 ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp. (1686 ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp. (1686.2 ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp. (1509 2ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp. (1511 ITCV)	----------	Este trabajo
Pachyphlodes sp.	MH281865.1	Kaminsky et al., NCBI 2018
Pachyphlodes sp.	MH212098.1	Kaminsky et al., NCBI 2018
Pachyphlodes sp.	KY574347.1	Garibay-Orijel y Garcia-Guzman 2017 NCBI
Pachyphlodes sp.	KX844681.1	Barner Horton 2016 NCBI
Pachyphlodes sp.	KX577740.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	KX577738.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	KT899969.1	Healey *et al.,* 2015
Pachyphlodes sp.	KJ720810.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720785.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720784.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720779.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720777.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720774.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720772.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720770.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720766.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720764.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720756.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595002.1	Garibay-Origel y Piña Paez NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595000.1	Garibay-Origel y Piña Paez NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	JX414220.1	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102477.1	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102443.1	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102442.1	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102418.1	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	HQ324990.1	Guevara *et al.* NCBI 2010
Pachyphlodes sp.	GU184031.1	Southworth *et al.,* NCBI 2009
Pachyphlodes sp.	GU184032.1	Southworth *et al.,* NCBI 2009
Pachyphlodes sp.	1 KJ720755.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. virescens	MF462329.1	Healey *et al.,* 2018

P. virescens	KJ720730.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. virescens	EU543198.1	Healey *et al.,* 2009
P. thysellii	JN409339.1	Healey *et al.,* 2013
P. thysellii	JN102437.1	Healey *et al.,* 2013
P. pfisteri	MH211807.1	Kaminsky et al., NCBI 2018
P. pfisteri	MH211765.1	Kaminsky et al., NCBI 2018
P. pfisteri	KU171105.1	Healey *et al.,* 2015
P. pfisteri	KT899968.1	Healey *et al.,* 2015
P. pfisteri	KT899960.1	Healey *et al.,* 2015
P. pfisteri	KJ720811.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. pfisteri	JN102474.1	Healey *et al.,* 2013
P. pfisteri	JN102431.1	Healey *et al.,* 2013
P. nemoralis	NR_158792.1	Healey *et al.,* 2013
P. nemoralis	KU955304.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. nemoralis	KJ720807.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. nemoralis	JN102486.1	Healey *et al.,* 2013
P. melanoxanthus	KU955314.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. melanoxanthus	KJ720795.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. melanoxanthus	JX414217.1	Healey *et al.,* 2013
P. marroninus	KJ720786.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. marroninus	JN409342.1	Healey *et al.,* 2013
P. marroninus	EU543209.1	Healey *et al.,* 2009
P. marroninus	EU427551.1	Healey *et al.,* 2009
P. marroninus	EU427549.1	Healey *et al.,* 2009
P. marronina	MF462327.1	Healey *et al.,* 2018
P. marronina	JN102364.1	Healey *et al.,* 2013
P. Ligericus	KU955293.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. ligericus	KU955291.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. Ligericus	KJ720736.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. depressus	NR_154314.1	Fan y Cai 2015
P. depressus	KP027405.1	Fan y Cai 2015
P. conglomeratus	KY648896.1	Imran y Khalid NCBI 2017
P. conglomeratus	KU955285.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. conglomeratus	KJ720788.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. conglomeratus	JF908512.1	Osmundson *et al.,* 2013
P. citrinus	KU955297.1	Healey *et al.,* NCBI 2016
P. citrinus	KJ720739.1	Healey *et al.,* NCBI 2014
P. citrinus	JN102468.1	Healey *et al.,* 2013
P. carneus	KC152163.1	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2012
P. carneus	JX414189.1	Healey *et al.,* 2013
P. carneus	EU543208.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543206.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543205.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543204.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543203.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543202.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543201.1	Healey *et al.,* 2009
P. carneus	EU543199.1	Healey *et al.,* 2009
P. austo-oregonensis	AY830854.1	Frank *et al.,* 2006
P. aff. conglomeratus	HG797006.1	Ilyas *et al.,* NCBI 2013

P. aff. carneus	KC152162.1	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2012
Hydnobolites cerebriformis	EU784271.1	Brock *et al.,* 2009

Análisis filogenético

El análisis de Mr. Bayes se realizó con la mayoría de las secuencias disponibles lo que nos permitió definir cuatro especies diferentes,.1.- *P. aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) anido junto con KJ720810.1, con una probabilidad posterior de 1 dentro del grupo *P. pfisteri*, KJ720810.1, reportada como *Pachyphlodes* sp. en la actualidad está siendo estudiada por Healy *et al.,* s/f. 2.- *P. pfisteri 2 (*1511 ITCV) se discernió en una rama de manera independiente con una probabilidad posterior de 0.91, entre *P. aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) y *P. fisteri* no encontrándose secuencias similares en el GenBank. 3.- *P. aff. marroninus* (1686 ITCV y *P. aff. marroninus* (1686.2 ITCV) anidaron juntas con una probabilidad posterior de 0.98, anidándose con *P. marroninus* EU 543209.1 Healy *et al.,* (2009) con 0.87 de probabilidad posterior. En nuestro análisis ambas se separan del resto de los *P. marroninus*, con probabilidad posterior de 1. 4.- *P. aff. carneus* (1723 ITCV) y *P. aff. carneus* (1728 ITCV) anidaron juntas con una probabilidad posterior de 1, dentro de la rama de *P. carneus*. Figura 1.5.

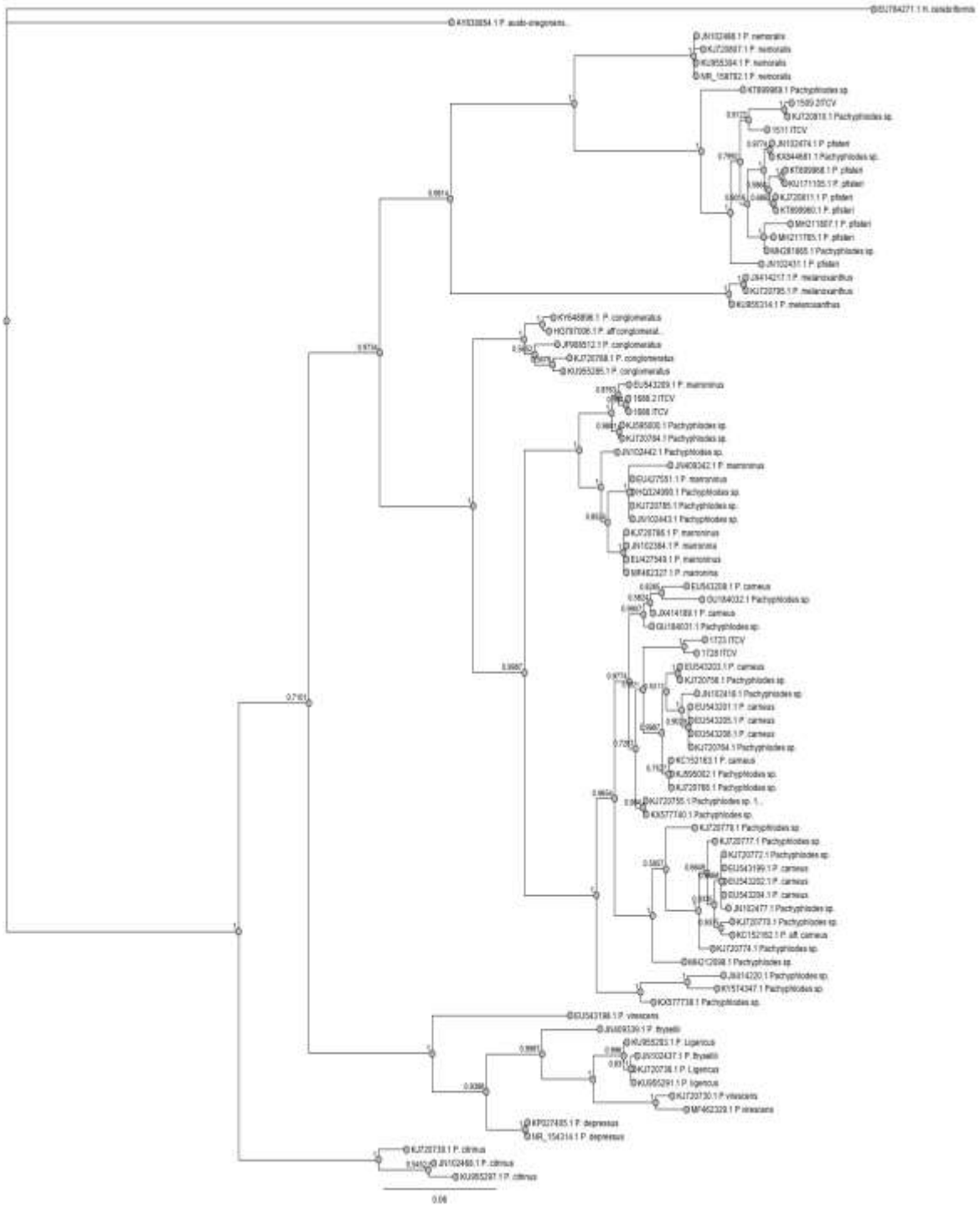

Figura 1.5 Árbol filogenético del género *Pachyphlodes*, análisis con Mr. Bayes con la mayoría de las secuencias de ITS disponibles.

Pachyphlodes aff. pfisteri

Tabla 1.3. Grupo de *Pachyphlodes pfisteri,* listado de secuencias empleadas para el análisis con el fragmento ITS.

especies	Numero NCBI	Referencias
Pachyphlodes sp. 1509 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp. 1511 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp.	DQ437697	Booth y Horton NCBI 2006
Pachyphlodes sp.	EU563481	Morris *et al.,* 2008
Pachyphlodes sp.	HE820338	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	HE820452	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	HE820457	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	HE820472	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	JN102432	Healy *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	KF476920	Williams Vilgalys NCBI 2013
Pachyphlodes sp.	KJ720810	Healy *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KT197140	Rosling *et al.,* NCBI 2015
Pachyphlodes sp.	KT899969	Healy *et al.,* 2015
Pachyphlodes sp.	KX844681	Barner y Horton NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	MH281865	Kaminsky *et al.,* NCBI 2018
P. pfisteri	JN102431	Healy *et al.* 2013
P. pfisteri	JN102474	Healy *et al.,* 2013
P. pfisteri	KJ720811	Healy *et al.,* NCBI 2014
P. pfisteri	KT899961	Healy *et al.,* 2015
P. pfisteri	KT899962	Healy *et al.,* 2015
P. pfisteri	KT899968	Healy *et al.,* 2015
P. pfisteri	KU171105	Healy *et al.,* 2015
P. pfisteri	MH211765	Kaminsky *et al.,* NCBI 2018
P. pfisteri	MH211807	Kaminsky *et al.,* NCBI 2018
P. conglomeratus	JF908512	Osmundson *et al.,* 2013

Pachyphlodes aff. pfisteri 1 (1509 ITCV)

En un segundo ciclo de análisis la colecta *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) mostro una identidad del 100% con KJ720810.1, anidado juntas con una probabilidad posterior de 1. Figura 1.6.

Diagnosis

Pachyphlodes aff. pfisteri 1 (1509 ITCV) Puede diferenciarse de otras especies por un ascoma grande de hasta 25 × 20 mm y una areola amarilla en la porción superior, un excipulum exterior amplio y un excipulum interior delgado. Gleba con células pseudoparenquimatosas. Ascas distribuidas irregularmente en una matriz gelatinosa, piriforme, biseriada de modo irregular. Ascosporas globosas, hialinas. tamaño incluyendo ornamentación 14–20 ×14–19 µm, promedio15.9 × 15.6.

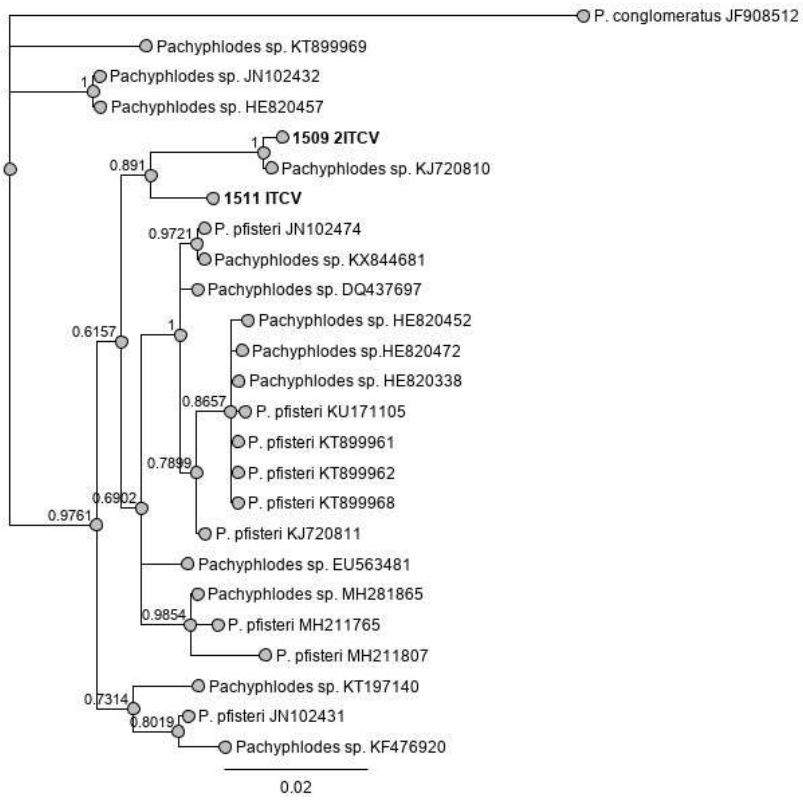

Figura 1.6 Árbol filogenético del grupo *Pachyphlodes pfisteri*, Análisis con Mr. Bayes con todas las secuencias de ITS disponibles a la fecha de la realización de análisis.

Descripción

Figura 1.7, 1.8

Ascoma, comprimido radialmente de manera irregular, 19–25 × 13–20 mm promedio 22 × 16, superficie con verrugas cónicas distribuidas irregularmente, de hasta 0.5 mm de diámetro, cafés con tintes verdosos.

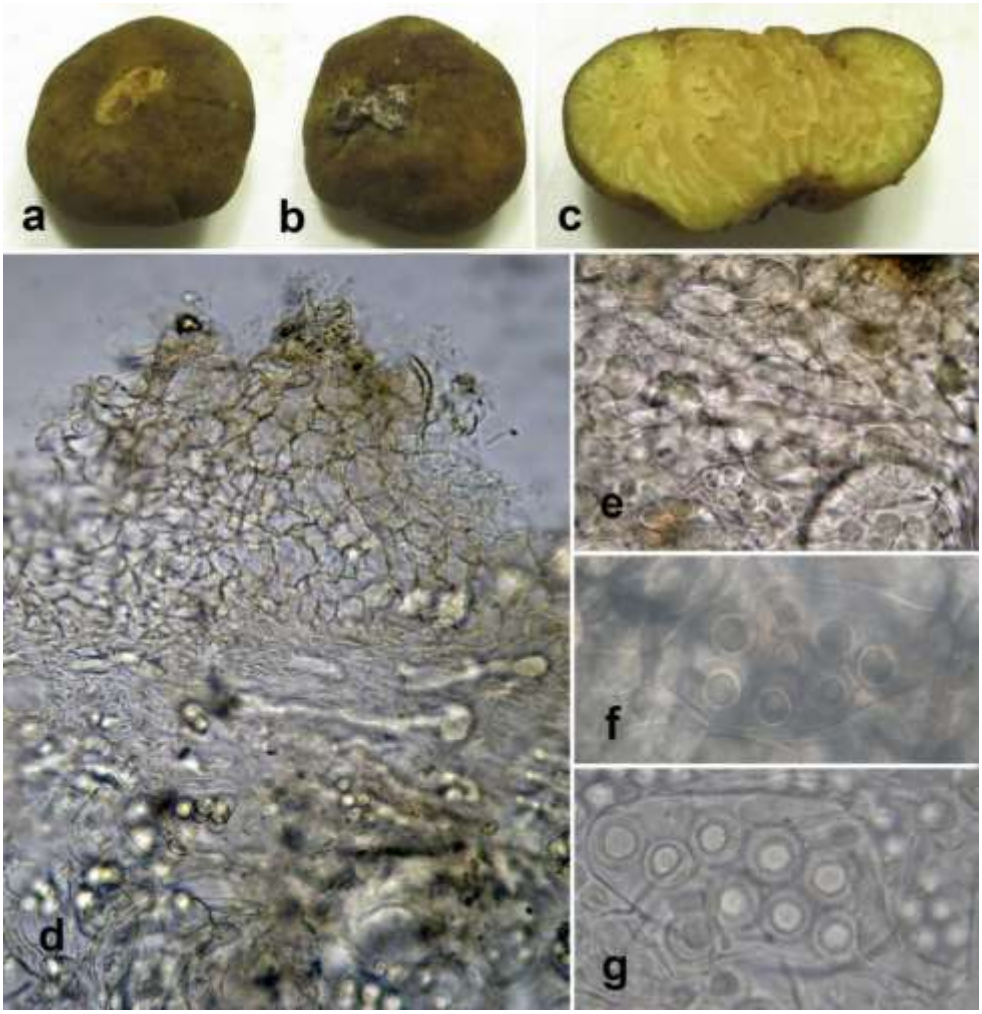

Figura 1.7 Pachyphlodes *aff. pfisteri* (1509 ITCV), ascoma, tejido y asca. a) Aureola en la porción superior. b) vista inferior con hifas surgiendo de la base. c) Gleba amarillo claro con venas estériles de color amarillo traslúcido. d) Corte transversal mostrando excipulum exterior, interior, y gleba, 400 x. e) Excipulum interior, 1000 x. f) Asca y espora 1000 x. g) Asca y espinas de la espora 1000 x.

areola superior amarilla, con un grupo de hifas emanado de la base. Gleba amarillo claro con venas estériles traslúcidas de color amarillento. Figura 1.7 a, b y c.

Peridio, 147–352 µm ancho, promedio 215 µm. Epicutis, 132–312 µm ancho, promedio 182.5 µm, compuesto de textura angularis, con verrugas. Pared celular café amarillenta en las células exteriores y hialina en las interiores. 14–38 × 12–32 µm promedio 27.1 × 19.81. Pared celular de 1 µm en las células externas, células internas con pared celular claramente mas delgada. Figura 1.7 d.

Subcutis 12.5–47.5 µm de grueso, promedio 28.4 µm, compuesto de textura prismática, hialina. Figura 5.3. d y e, pared celular delgada. Gleba con células pseudoparenquimatosas, 6–70 × 6–21 µm, promedio 27 × 12.4 con pared celular 1 µm. Paráfisis, no encontrada. Asca distribuida irregularmente en una matriz gelatinosa, piriforme, medidas incluyendo el pedicelo 91–144 × 27.5–40 µm, promedio 119.1–36.5. Pedicelo 11–42 × 7 –17 µm, promedio 24 × 11.8, bifurcada, típicamente con ocho esporas, biseriadas, arregladas irregularmente a desordenadas. Figura 5.3.f y g. Ascosporas globosas, hialinas, tamaño incluyendo ornamentación 14–20 ×14–19 µm, promedio 15.9 × 15.6, sin ornamentación 12–18 ×12–17 µm, promedio 13.9 × 13.6. Ornamentación en promedio de 1 µm de alto, consiste de espinas cortas y capitadas. Figura 1.8 b.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuato ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo en suelo y en mantillo, gregario. Tres ascomas

en una colecta asociado a Quercus sp. 2500 msnm, N 21.064131 O 101.224159, 2500 msnm, septiembre.

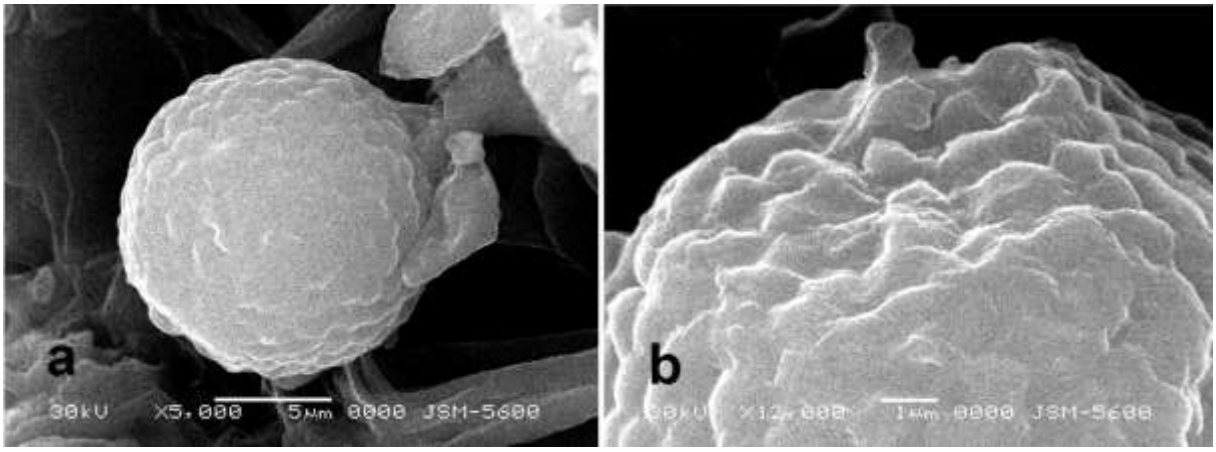

Figura 1.*8 Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) espora, SEM a) Espora globosa. b) Acercamiento de una espina capitada.

Discusión

En un segundo ciclo de análisis filogenético la colecta *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) anidó junto con KJ720810.1 con 99.8 de identidad esta muestra colectada por J. Trappe también fue obtenida en México, pero no se menciona la localidad (Healy *et al.,* NCBI 2014).

Ascoma; *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) es más grande que *P. pfisteri* con un tamaño de hasta 25 × 20 mm, además tiene una areola superior de color amarillo. el peridio de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) de 352.5 µm de ancho es mucho mayor que el de *P. pfisteri*, con 210 µm, de la misma manera el epicutis con un grosor de 312 µm es mayor que el de *P. pfisteri* con140 µm de ancho, pero el subcutis de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) con 47.5 µm es menor que

el de *P. pfisteri* con 70 µm. Asca de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) es más larga que *P. pfisteri,* pero es más delgada con 40 µm de ancho, en contraste con el asca de *P. pfisteri* con 62 µm de ancho. Gleba, *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) tiene células pseudoparenquimatosas a diferencia de *P. pfisteri* que tiene hifas entrelazadas. Las ascosporas de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) tienen un rango más amplio 14–20 µm con un promedio de 15.9, mientras que *P. pfisteri* con 15–18.4 µm promedio 14.7.

Conclusión

Los datos encontrados en este trabajo generan un soporte suficiente para concluir que *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) es una especie no reportada previamente y que se ubica dentro del clado de *P. pfisteri*.

Pachyphlodes aff. pfisteri 2, (1511 ITCV)

En el segundo ciclo de análisis filogenético la muestra *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) continuó separándose en una rama independiente, pero su probabilidad posterior disminuyó a 0.891. Figura 1.6.

Diagnosis

Pachyphlodes aff. pfisteri 2 (1511 ITCV) pude ser distinguido de las otras especies por la combinación de su protuberancia basal única y la ausencia de aureola superior, asca pequeña y pedicelo no bifurcado. Ascospora hasta 20 µm de diámetro.

Holotipo *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511) ITCV Herbario Micológico José Castillo Tovar.

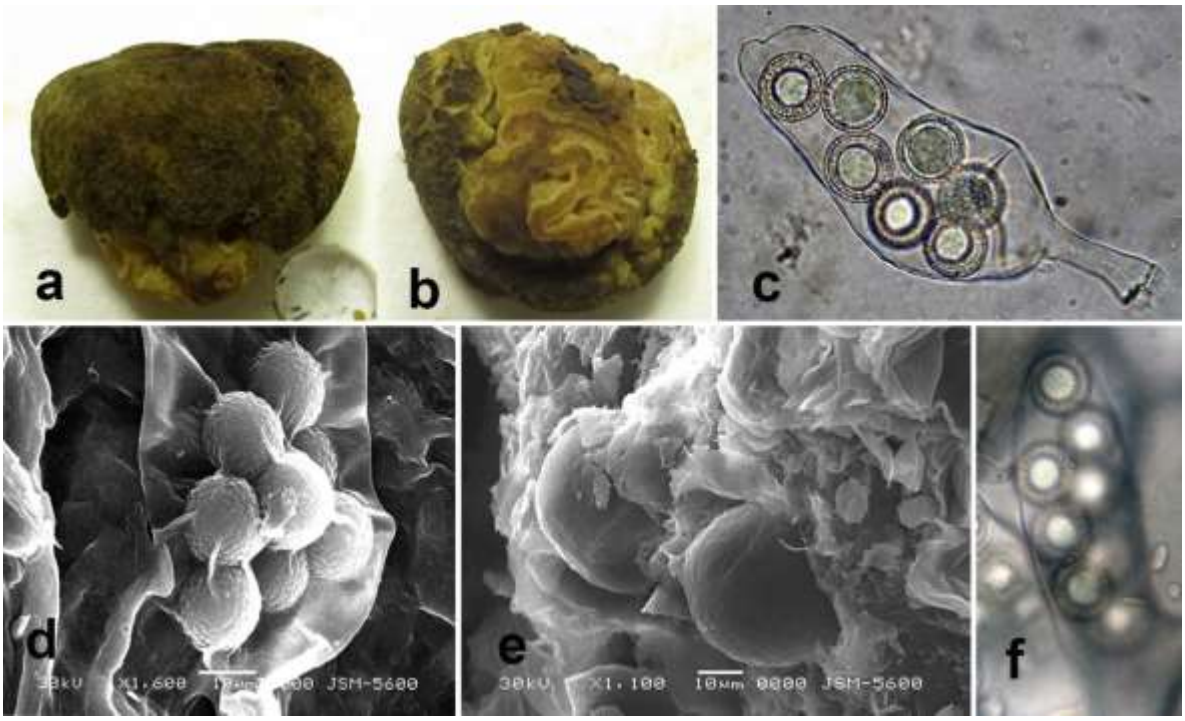

Figura 1.9. Pachyphlodes *aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV), ascoma, asca y espora. a) Ascoma vista lateral. b) Ascoma vista inferior. c) Asca y esporas 1000 x d) Microscopia electrónica de barrido asca con 8 esporas e) Esporas globosas f) Asca con ocho esporas biseriadas, enfoque en las espinas, 1000 x.

Descripción

Figura 1.9, 1.10

Ascoma piriforme, 25 × 19 mm, superficie con verrugas cónicas distribuidas irregularmente, café con tintes verde amarillentos, gleba amarillo claro, con venas estériles traslucidas amarillas, base con una protuberancia conspicua como un estípite de 11 ×5 mm, laberintiforme café amarillenta. Figura 1.9 a y b.

Peridio de dos capas, 85–237.5 µm de ancho, promedio 141.5. Figura 1.10 a. Epicutis 70–185 µm ancho, promedio 109.9, compuesto de textura angularis, con verrugas de hasta 62 µm alto, células exteriores cafés amarillentas en 5 % KOH, 8–35 × 6–35 µm, promedio 22.9 × 18.4. 1 µm, pared celular delgada. Figura 5.6 b y c. Subcutis, 9–35 µm ancho, promedio 20.7, compuesto de textura prismática, hialina, 4–13 µm diámetro, promedio 8.3–5.6 µm, pared celular delgada, paráfisis no se encontró.

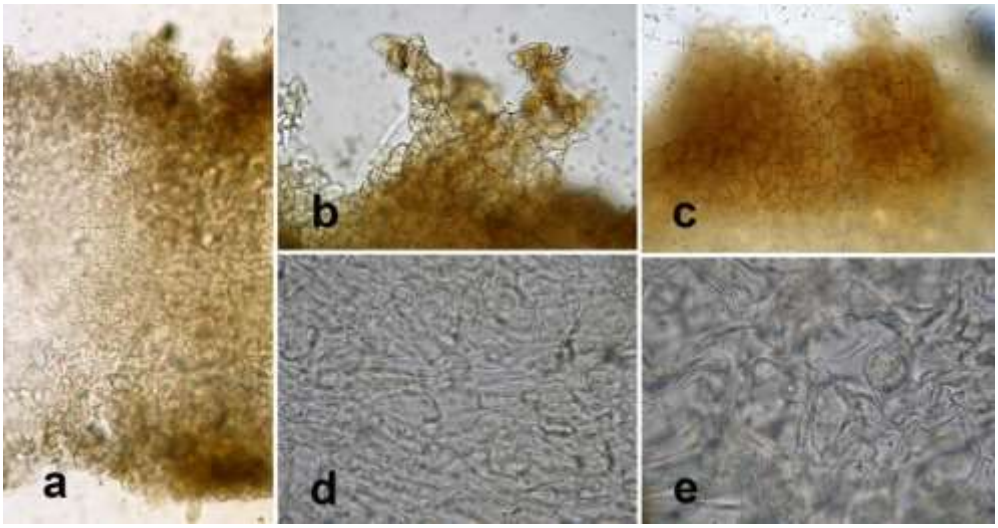

Figura 1.10. *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) excipulum y gleba. a) Células del excipulum exterior, excipulum interior y gleba. 100 x. b) Célula distal de la verruga, 1000 x. c) Excipulum exterior, células pseudo parenquimaticas 1000 x. d) Excipulum interior, células de las hifas, 1000 x. e) Gleba células pseudo parenquimaticas 1000 x.

.Gleba con células pseudoparenquimatosas, 6–70 × 6–21 µm, promedio 27 × 12.4. Figura 5.6 e. Asca distribuida irregularmente en una matriz gelatinosa, forma variable irregular, oval, clavada a piriforme, medida incluyendo pedicelo 90–137 × 35–47 µm, promedio 111.7 × 39.7, pedicelo 7–30 × 7–15 µm, promedio 20.5 × 11.1, no bifurcado. Figura 5.5 c y f. Espora irregularmente organizada biseriada a

desordenada típicamente con ocho esporas. Figura 1.9.c y f. Ascospora globosa, hialina, amarillo claro a oliva, tamaño incluyendo ornamentos15–20 × 15–20 µm, promedio 17.7 × 17.4, excluyendo ornamentos 13–18 × 13–18 µm, promedio 15.7 × 15.4, espina 1 µm alto. Figura 1.9.c hasta f.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Área Natural Protegida Cuenca de la Esperanza. hipogeo en suelo y mantillo solitario, asociado a *Quercus* sp. 2500 msnm N 21.064131 O101.224159. 2500 msnm, septiembre.

Discusión

Escoma *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) 25 × 19 mm es similar a *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) pero es mayor que *P. pfisteri*. 12 × 13 mm, la protuberancia basal de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) es única y esto lo hace claramente diferente de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) además que no tiene aureola superior. El peridio de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) es similar en ancho a *P. pfisteri*, pero el epicutis de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) de hasta 185 µm, es más ancho que el de *P. pfisteri* y con verrugas más cortas, respecto al subcutis el de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) es la mitad de grueso que el de *P. pfisteri*. Comparando *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) con *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (ITCV 1509), el epicutis de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (ITCV 1509) son más anchos que el de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV), y el subcutis es de un ancho similar entre los dos. Gleba *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) y *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) poseen células

pseudoparenquimatosas a diferencia de *P. pfisteri* que tiene hifas entrelazadas. Ascas en *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) son más cortas que en *Pachyphlodes aff. pfisteri* 1 (1509 ITCV) y en *P. fisteri* y no tiene pedicelo bifurcado. Las ascosporas de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) que llegan a 20 µm diámetro, son mayores que las de *P fisteri* con 18.4 µm y ligeramente mayores que las de *Pachyphlodes aff. pfisteri* (1509 ITCV).

Conclusión

Las características mostradas de *Pachyphlodes aff. pfisteri* 2 (1511 ITCV) nos confirman que es una especie que no ha sido reportada con anterioridad.

Pachyphlodes aff. marroninus

Pachyphlodes aff. marroninus (1686 ITCV, 1686.2 ITCV)

En un segundo ciclo de análisis filogenético de las colectas *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV y 1686.2 ITCV), éstas anidaron juntas con una probabilidad posterior de 0.97, separándose de *P. marroninus* EU 543209.1 Healy *et al.,* (2009) con 0.90 de probabilidad posterior, ésta última fue colectada en Tlaxcala México. Cabe mencionar que se añadieron varias secuencias y dos de estas KJ595000 y KJ720784 anidaron juntas con una probabilidad posterior de 0.9, muy cerca de las muestras de Guanajuato, KJ595000 (Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014), colectada cerca de Morelia Michoacán México y KJ720784 (Healy *et al.,* NCBI 2014), Voucher CPP11011 (Mexu) colectada en México, pero en este caso no se menciona la localidad. Cuando *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV y 1686 ITCV) junto con

P. marroninus EU 543209.1 se comparan con KJ595000, y KJ720784. presentan 99.18 % de identidad, y las cuatro se separan del resto de las muestras consideradas *P. marroninus*, con 1 de probabilidad posterior. Figura 1.11.

Tabla 1.4. Listado de secuencias y especies utilizados para el análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes marroninus*, basado en secuencias de ITS disponibles.

Especies	Número NCBI	Referencia
Pachyphlodes sp. 1686 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp. 1686.2 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp.	HQ324990	Guevara *et al.* NCBI 2010
Pachyphlodes sp.	JN102442	Healy *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102443	Healy *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	KJ720784	Healy *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720785	Healy *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595000	Garibay-Origel y Piña-Páez NCBI 2014
P. marroninus	EU427549	Healy *et al.,* 2009
P. marroninus	EU427551	Healy *et al.,* 2009
P. marroninus	EU543209	Healy *et al.,* 2009
P. marroninus	JN409342	Healy *et al.,* 2013
P. marroninus	KJ720786	Healy *et al.,* NCBI 2014
P. marrronina	JN102364	Healy *et al.,* 2013
P. marrronina	MF462327	Healy *et al.,* 2018
P. conglomeratus	JF908512	Osmundson *et al.,* 2013

Diagnosis

Pachyphlodes aff. marroninus (1686 ITCV) sp nov. puede ser distinguida de otras especies por sus verrugas puntiagudas con una gran variabilidad del número de lados con generalmente 4–5, ocasionalmente 3 o 6, pudiendo llegar hasta 8 o 9 lados, 0.5 to 2 mm de ancho. Areola color crema, *Pachyphlodes aff. marroninus* *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) puede presentar tres tipos de cavidades; Areola, cicatriz micelial y una cavidad irregular. Células externas del peridio color amarillo brillante, pared celular de 1 µm.

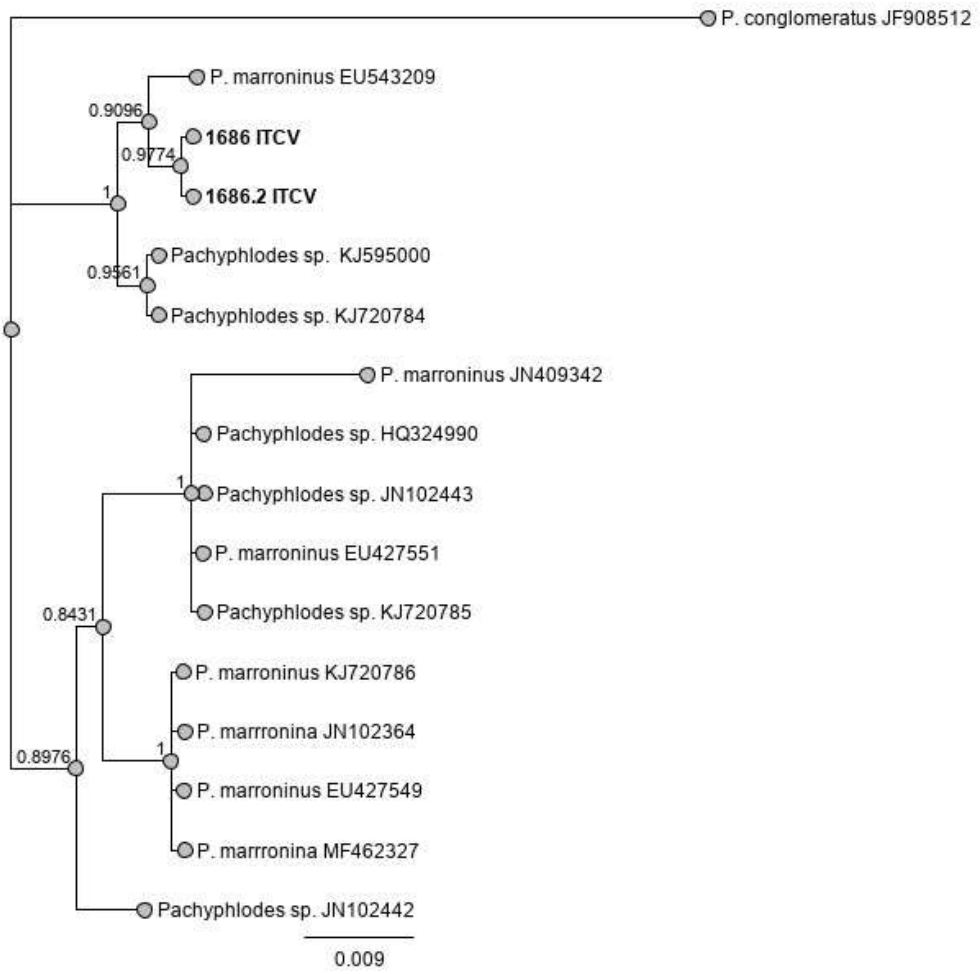

Figura 1.11. Análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes marroninus*, empleando el fragmento ITS y mediante la metodología de Mr. Bayes.

Holotipo *Pachyphlodes aff. marroninus* Peña-Ramírez (1686 ITCV) Herbario MicologicoJosé Castillo Tovar.

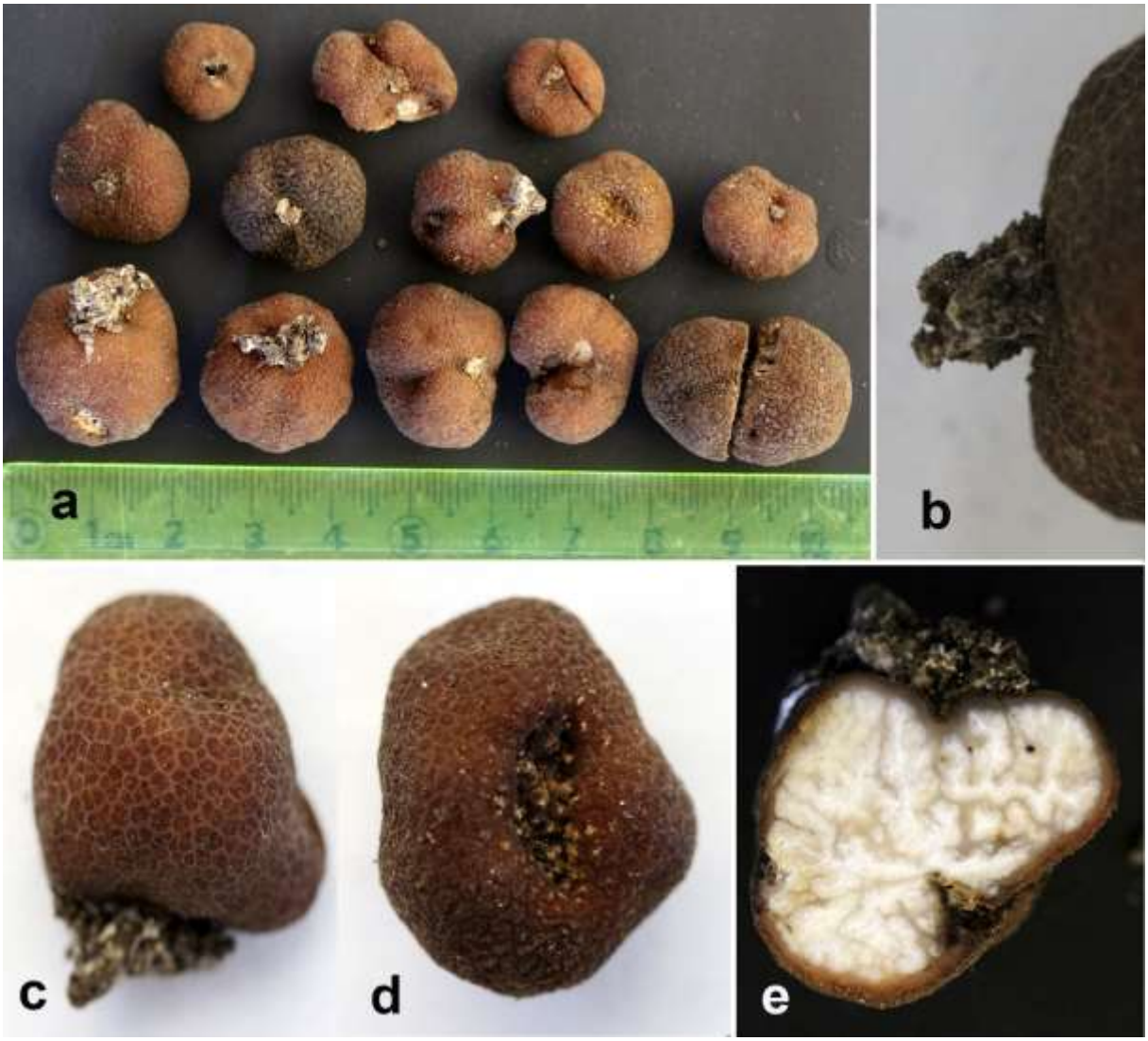

Figura 1.12. *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV), ascoma. a) Ascoma color, tamaño y morfo diversidad. b) Proyección micelial. c) Ascoma vista lateral d) Ascoma; areola superior. e) Gleba blanca con venas blanquecinas y traslúcidas.

Descripción

Fig 1.12-1.14.

Ascoma irregular de simetría radial, lobado a comprimido, algunas veces con cavidades irregulares, 11.4–22.3 × 9.9–20.5 × 7.5–17.3 mm, promedio 16.5 × 14.1 × 10.6, esculpido con verrugas aplanadas poligonales con ápice puntiagudo, con

generalmente 4–5 lados, ocasionalmente 3 o 6, pudiendo llegar a 8 ó 9 lados, 0.5 to 2 mm de ancho, aparentemente las verrugas no están separadas, café rojizo, marrón (café rojizo oscuro) a café obscuro. Porción superior del ascoma con areola crema, 5–7 × 2–2.5 mm. Proyección micelial basal color blanco-cremoso, 3–7 × 2–6 mm, promedio 5 × 4. La proyección micelial puede ser removida de manera natural dejando una oquedad de 2–2.5 mm ancho, la cual no debe ser confundida con la cavidad irregular mencionada previamente. Se debe aclarar que la areola y la proyección micelial no necesariamente se encuentran en posición antipodal, se pueden encontrar a 90º una de la otra. Olor fungoide. Gleba blanca, con venas traslucidas blanquecinas. Figura 1.12 a - d.

Peridio de dos capas 477–710 µm, promedio 563. Figura 1.13 a. Epicutis, células más externas de color amarillo brillante. Células internas hialinas, 460–680 µm, promedio 539, compuesto de textura angularis (pseudoparenquima) 10–42 × 5–26 µm, promedio 22.3 × 13.4. pared celular delgada 1 µm. Figura 5.9 b. Subcutis, 17.5–32.5 µm grueso, promedio 24.7de textura intrincata, hialina con hifas de 5–11 µm de ancho, promedio 7.3. Figura 1.13 c. Gleba, trama 80–520 ancho, promedio 172, textura intrincata con hifas 6–10 µm de ancho, promedio 8.1. Figura 1.13 d. Asca formando una empalizada, clavada a clavada-cilíndrica, pedicelada, medida incluyendo el pedicelo 167–225 × 12.5–32.5 µm, promedio 199 × 25.

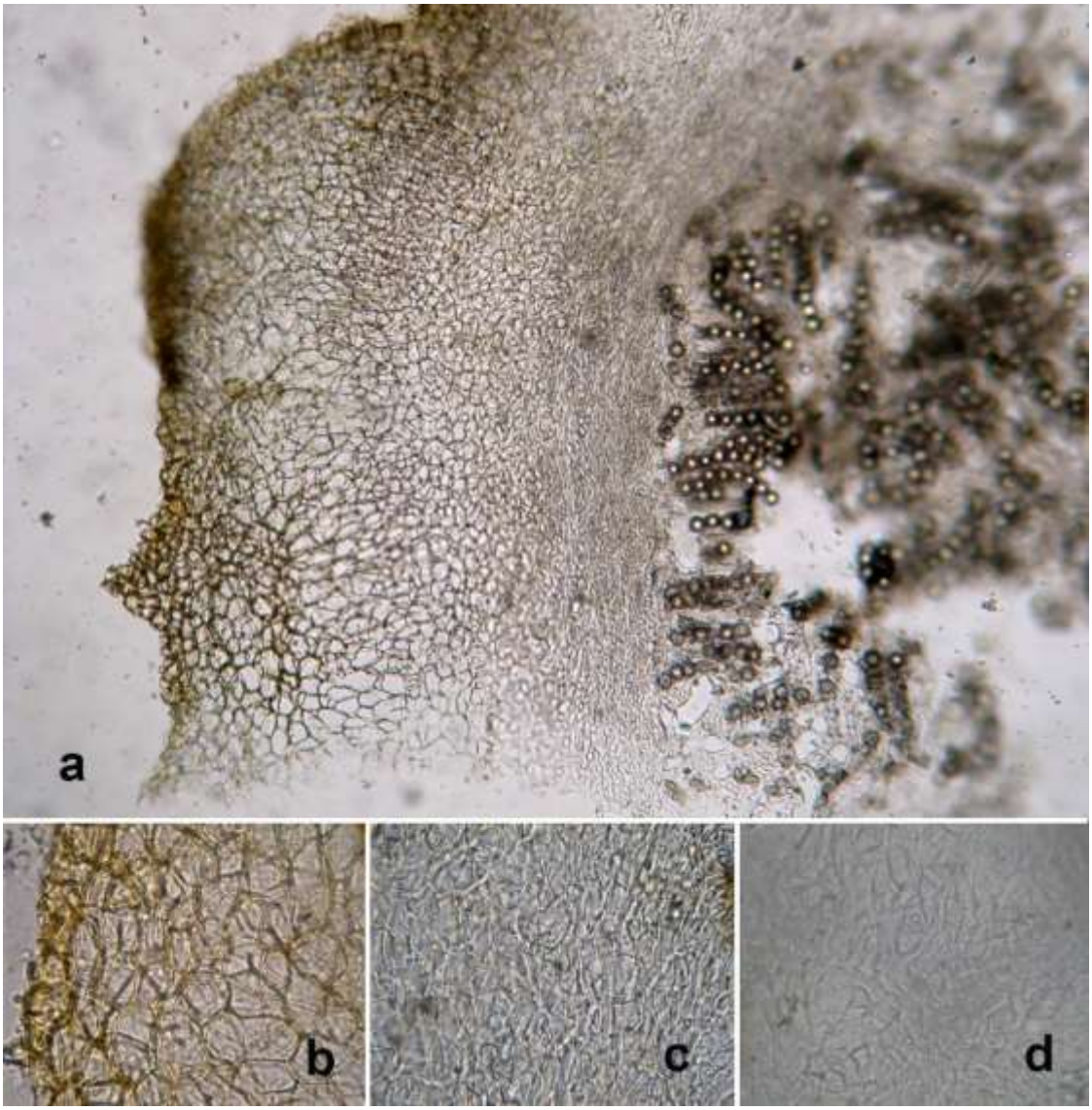

Figura 1.13. *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV1686 ITCV), ascoma tejido. a) Peridio de dos capas, gleba y asca formando una empalisada 100 x. b) Epicutis células pseudoparenquimatosas angulares, pared celular amarillo brillante. c) Subcutis hifas entrelazadas d) Gleba hifas entrelazadas.

.

Pedicelo 18–70 × 8–20 µm, promedio 41.4 × 13.7, con ocho esporas uniseriadas irregularmente. Figura 1.14 c y d. Ascospora globosa con espinas 18–22 × 18–22 µm, promedio 19.8 × 19.4 mayormente19–20 µm, sin espinas 15–18 × 15–18 µm,

promedio 16.3 × 16. Mayormente 16–17 µm, pared de la espora 1 µm ancho, hialina a verdosa, unas cuantas color amarillo verdoso, ornamentadas con espinas gruesas capitadas (1–) 1.5–2(2.5) µm longitud 1–1.3 ancho de la base. Figura 1.14 a, b, e, f, y g.

Discusión

Pachyphlodes aff. marroninus (1686 ITCV, 1686.2 ITCV) anidaron cerca de *P. marroninus* EU543209 MEX: Tlaxcala 9-20-07 Cázares, Healy *et al.,* (2009). KJ595000 y KJ720784. Por otro lado, *P. marroninus* EU427551 MEX: Nuevo León 9-14-83 García (UNL), también colectada en México se agrupo con colectas más al norte. Lo que sugiere que se tiene un nuevo taxón en este trabajo. El ascoma de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) es mayor que el de *P. marroninus* en al menos 5 mm, y las verrugas también son mayores que las de *P. marroninus*. Las verrugas de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) son puntiagudas en contraposición de las de *P. marroninus* que son romas en la punta, también presenta una mayor variabilidad del número de lados en las verrugas. El ascoma de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) es marrón, pero puede ser café obscuro. La areola de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) es crema, por el contrario, la de *P. marroninus* es naranja intenso, además de ser más pequeña que la reportada para *P. marroninus*. Es importante remarcar que *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) puede presentar tres tipos de cavidades; areola, cicatriz micelial y cavidad irregular, esta última puede considerase una clara diferencia con *P. marroninus*.

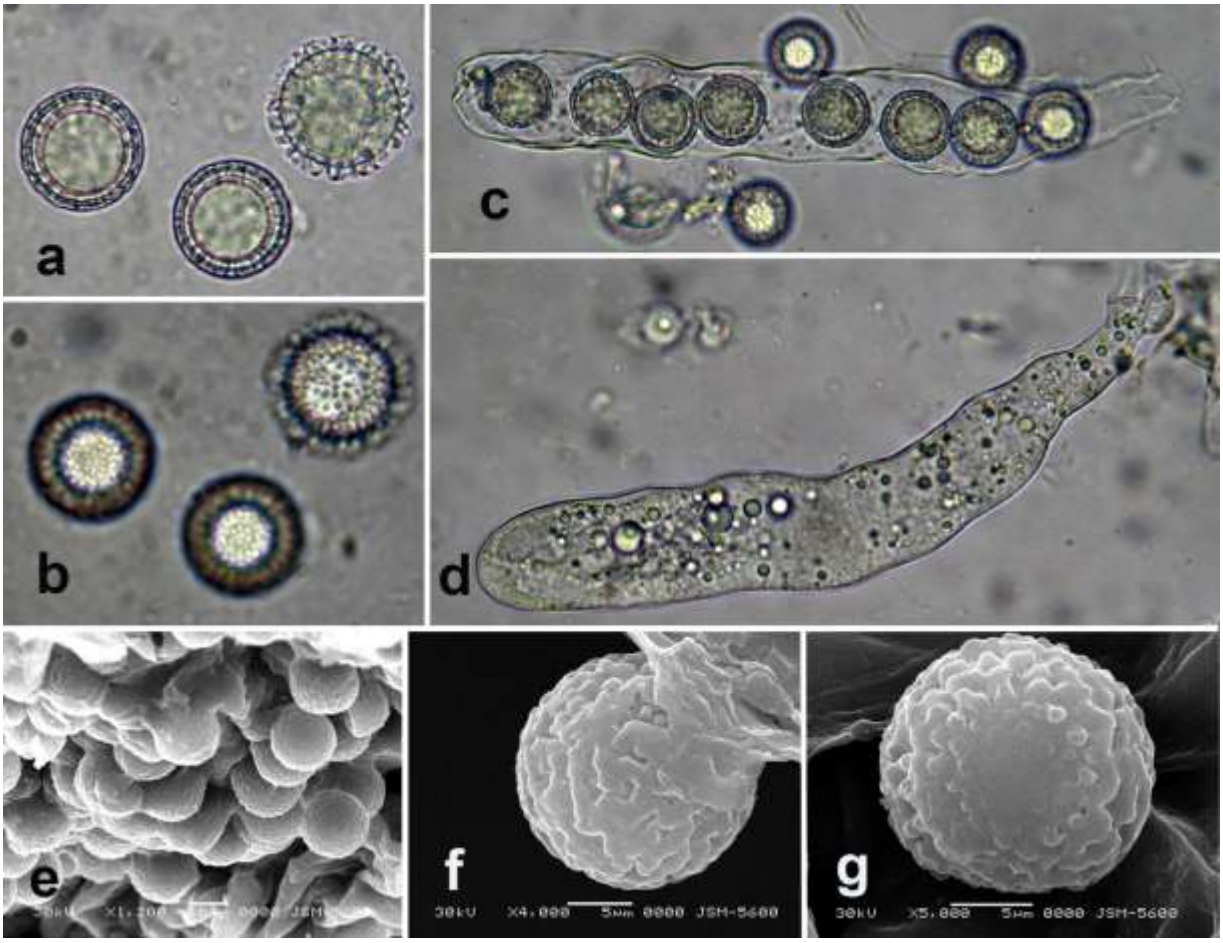

Figura 1.14. *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV), ascoma asca y ascosporas. a) Ascosporas globosas. b) Ascospora con espinas romas. c) Asca clavada a clavada-cilíndrica, pedicelada, con ocho esporas irregularmente uniseriadas. d) Asca inmadura. Microscopia electrónica de barrido e hasta g. e) Vista masiva de ascosporas f) Ascospora globosa g) Espinas gruesas y capitadas.

El peridio de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) más estrecho que el de *P. marroninus*, pero las células del ectal excipulum de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) son más grandes que las de *P. marroninus*, y tienen color diferente a las de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1868 ITCV) que son amarillo brillante mientras que las de *P. marroninus* son rojizas, además difieren en el grosor de la pared celular que son de 1 µm en *Pachyphlodes aff. marroninus* (1686 ITCV) mientras que

en *P. marroninus* las paredes celulares son de 2.5–4 µm. Las ascosporas tienen diámetro similar pero la espina de *Pachyphlodes aff. marroninus* (1868 ITCV) es más pequeña que la de *P. marroninus* tanto en largo como ancho.

Conclusión

Considerando que con la información generada se puede afirmar que *Pachyphlodes aff. marroninus* (1868 ITCV) es una especia nueva para la ciencia.

Pachyphlodes aff. carneus 1723 ITCV, 1728 ITCV

Análisis filogenético

Tabla 1.5. Listado de especies y secuencias empledoas en el análisis filogenético del grupo *Pachyphlodes carneus* con el fragmento ITS, mediante análisis de Mr. Bayes.

Especies	Número NCBI	Referencia
Pachyphlodes sp. 1723 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp. 1728 ITCV	----------	Este documento
Pachyphlodes sp.	EU819509	Palmer *et al.,* 2008
Pachyphlodes sp.	GQ221641	Wolfe *et al.,* NCBI 2009
Pachyphlodes sp.	GU907797	Karpatia *et al.,* 2011
Pachyphlodes sp.	HE820411	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	HE820464	Kluber *et al.,* 2012
Pachyphlodes sp.	JN102380	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102398	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102409	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102418	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102421	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102475	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102482	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102483	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JN102485	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	JX414194	Healey *et al.,* 2013
Pachyphlodes sp.	KJ595001	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595002	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595003	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595004	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ595005	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720754	Healy *et al.,* NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720755	Healy *et al.,* NCBI 2014

Pachyphlodes sp.	KJ720756	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720758	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720760	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720765	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720766	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720768	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720769	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720770	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720771	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720772	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720773	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720777	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720779	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720780	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720781	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KJ720782	Healy *et al.*, NCBI 2014
Pachyphlodes sp.	KX577739	Healy *et al.*, NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	KX577740	Healy *et al.*, NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	KX577741	Healy *et al.*, NCBI 2016
Pachyphlodes sp.	MH212098	Kaminsky *et al.,* NCBI 2018
P. aff.. carneus	KC152162	Garibay-Origel *et al.,* NCBI 2014
P. carneus	EU543199	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543200.1	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543201	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543202	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543203	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543204	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543205	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	EU543206	Healy *et al.,* 2009
P. carneus	JX414189	Healy *et al.,* 2013
P. carneus	KC152163	Garibay *et al.,* NCBI 2012
P. conglomeratus	JF908512	Osmundson *et al.,* 2013

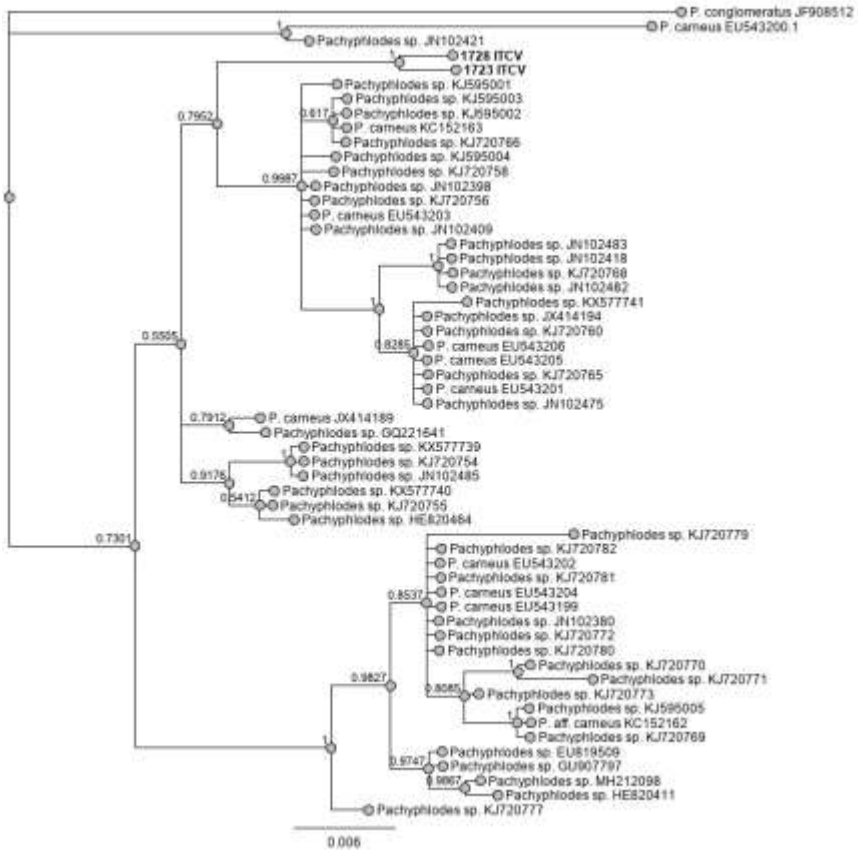

Figura 1.15 Árbol filogenético del grupo *Pachyphlodes carneus* obtenido usando el fragmento ITS mediante la técnica de Mr. Bayes.

En una segunda ronda de análisis específico para *Pachyphlodes carneus* las colectas *Pachyphlodes aff. carneus* (1723 ITCV, 1728 ITCV) anidaron juntas con 1 de probabilidad posterior, en una rama cerca de EU543203 *P. cf. carneus*, Healy *et al.,* (2009), y de KC152163 *P. carneus,* (Garibay *et al.,* NCBI 2012) y algunos *Pachyphlodes sp*., pero separado de *P. carneus,* con una probabilidad posterior de 0.79. Figura 1.15.

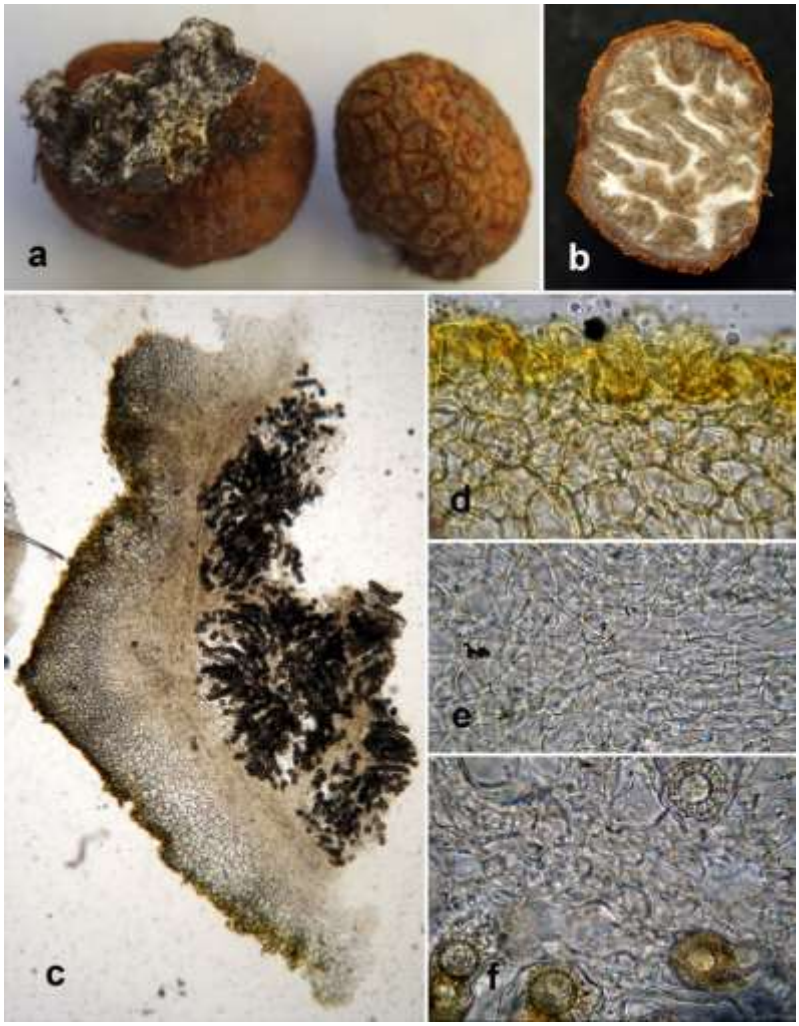

Figura 1.16 *Pachyphlodes aff. carneus* (1723 ITCV), ascoma, peridio y tejido de gleba. a) Proyección micelial, verrugas estrelladas. b) Gleba café con venas blancas. c) Peridio y gleba. 100 x. d) Epicutis con céluas pseudoparenquimatosas angulares, amarillo brillante, 1000 x. e) Subcutis hifas entrelazadas hialina, 1000 x. f) Gleba con céluas pseudoparenquimatosas angulares e hifas entrelazadas,1000 x.

Diagnosis

Pachyphlodes aff. carneus (1723 ITCV) puede ser distinguida de otras especies por su gleba café con venas blancas, y con textura angular hialina, además de hifas entrelazadas y esporas de 14–18 µm de diámetro excluyendo espinas, 20–23 incluyendo espinas.

Holotipo (1723 ITCV) Herbario Micologico José Castillo Tovar.

Descripción

Figura 1.16, 1.17

Ascoma ligeramente comprimido 13.3–15.8 × 10.8–12.6 × 7.9–8.7 mm, promedio 15.5 × 11.7 × 8.3 mm, esculpido con verrugas pequeñas y aplanadas, poligonales, con una marca estrellada en el ápice, con 5 lados a veces 4 rara vez 6, cada lado de aproximadamate1 up to 2.5 mm ancho. Color naranja brillante ceroso, a naranja oscuro. Areola 6 × 4 mm similar al peridio. Proyección micelial color crema 9–13 × 3–7 mm, promedio 11 × 5 mm ancho. Gleba Café con venas blancas.

Peridio, 166–447.5 µm ancho, promedio 287.6. Epicutis, células externas amarillo brillante, celas internas hialinas 160–430 µm ancho, promedio 272, compuesto de pseudoparenquima, pared celular 1 µm ancho, con células de 10–48 × 10–35 µm ancho, promedio 28.3 × 19.3, cambiando gradualmente al subcutis, hifas postradas entrelazadas, hialina 6–29 µm ancho, promedio 15.8. cerca de la gleba, hifas 4–7 µm ancho, promedio 6.2, pared celular de 1 µm grueso. Gleba. Trama 21–777 µm grueso 148.2, hifas de 5–9 µm al septo, promedio 6.2, con células isodiamétricas de 5–15 × 5–10 µm ancho, promedio 9.7 × 7.4, pared celular 1 µm ancho. Asca formando una empalizada, clavada-cilíndrica a cilíndrica, pedicelada. 167.5–247 × 30–45 µm, promedio 210 × 35.5, con ocho esporas uniseriadas irregularmente 8. Ascosporas globosas, 14–18 × 14–17 µm diámetro, promedio 16.7 × 16 mayormente 16–17 excluyendo espinas. 20–23 × 19–23 µm diámetro, promedio 21.4 × 20.8 mayormente 20–22, incluyendo espinas.

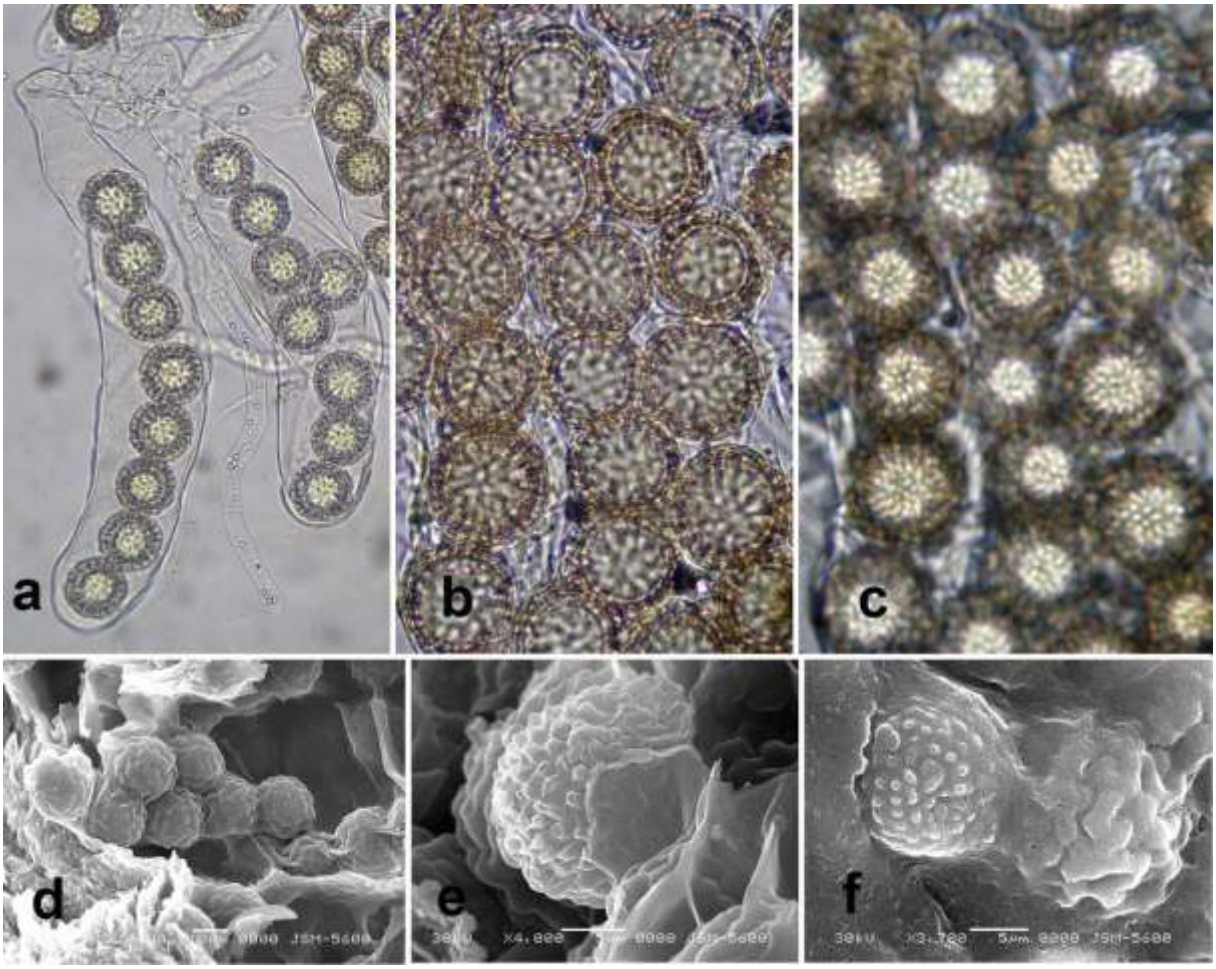

Figura 1.18. *Pachyphlodes aff. carneus* (1723 ITCV) ascoma, asca y ascospora a) Asca y espora 400 x. b) Ascospora 1000 x. c) Ascospora espina enfocada,1000 x. Microscopia electrónica de barrido d - f. d) Asca con espora e) Espora con espinas f) Ascospora.

Espora pared celular 1–2 µm de ancho, café pálido ornamentado con espinas gruesas y capitadas 2–3 µm de alto, promedio 2.38, mayormente 2, ancho en la base1 µm.

Discusión

La colecta *Pachyphlodes aff. carneus* (1686 ITCV) con gleba café y venas blancas se diferencia de *P. carnea* que tiene una gleba amarilla con venas obscuras *P.*

carnea posee esporas de menor tamaño 14 µm de diámetro comparando con *Pachyphlodes aff. carneus* (1686 ITCV) 14–18 µm excluyendo espinas y 20–23 µm incluyendo espinas.

Conclusión

Considerando que con la información generada se pude afirmar que *Pachyphlodes aff. carneus* (1686 ITCV) es una especia nueva para la ciencia.

Género: ***Tuber*** Micheli ex Wigger: Fr. 1780

En este trabajo se obtuvieron 5 especies dentro del género, la primera es *Tuber incognitum* que se ha publicado recientemente, (Piña-Paéz et al., 2018), y cuatro especies dentro del complejo *separans* mismo que puede observase en el análisis filogenético en la 1.17

Tuber incognitum **Piña Páez, Bonito, Guevara y Castellano**

Figura 1.18

La identidad con *Tuber incognitum* se determinó mediante la comparación del fragmento ITS de *T. incognitum* (ITCV 1695), el cual tiene una identidad del 99.2 %, con la secuencia KJ595014 que es el paratipo de *T incognitum* Boucher MEXU 25995, (Piña-Paéz et al., 2018).

Descripción

Ascoma de 9.2–14.2 mm de diámetro, subgloboso a ligeramente irregular, blanco con áreas café claro al secarse, glabro con canales que continúan con las venas dentro de la gleba. Gleba rosa a café claro con tonos purpura inmadura, café oscuro en la madurez, marmoleado con venas blancas. Olor suave ligeramente ácido.

Peridio bicapa 350–400 µm, Epicutis 175– 244 de ancho, células angulares isodiamétricas de 6–15 µm de ancho, pared celular 1.75–5 µm de ancho, amarillo a hialino en KOH. Subcutis 110– 140 µm de ancho, hifas postradas 4.5– 7 µm de ancho, Pared celular delgada, hialina en KOH.

Ascosporas; asca monoesporada 23–35 × 19–25 µm, Q = 1.09 1.59; biesporada 18–29 × 17–22 µm, Q = 1.0–1.61; triesporada 30–42 × 26–31 µm, Q = 1.11–1.2; tetraesporada 23–27 × 19–25 µm, Q = 1.08–1.26 color naranja amarillento en KOH, pared celular > 2 µm de ancho,

Distribución hábitat, ecología; México estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP cuenca de la esperanza, hipogeo, gregario, bajo *Quercus* sp. 2534 msnm, N 21°03'50", O 101°13'23",10 de octubre de 2016.

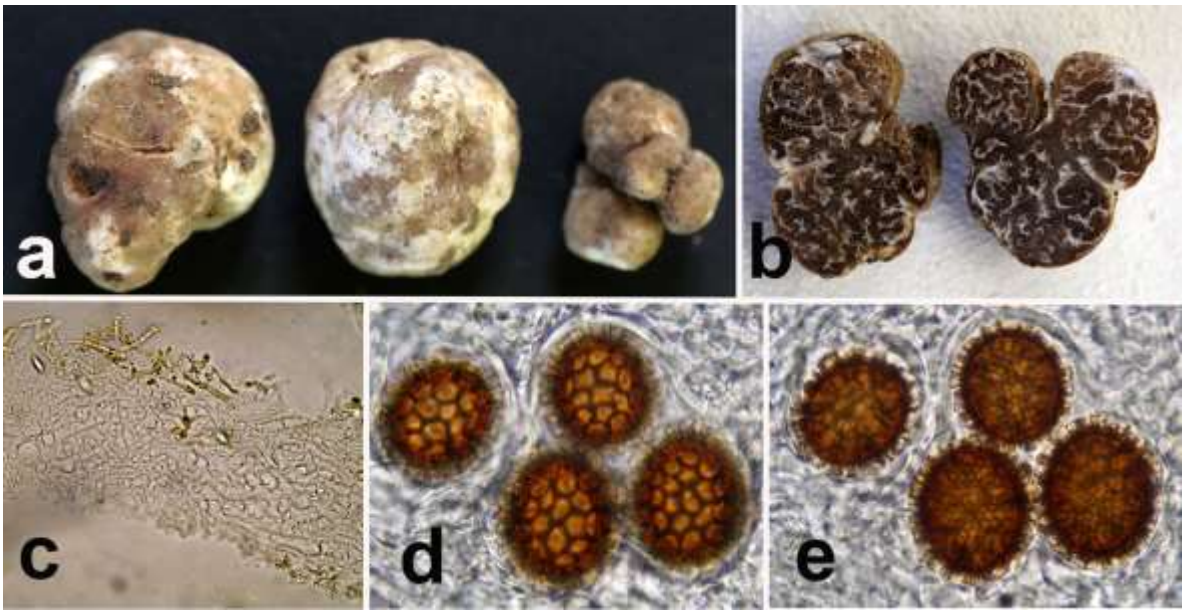

Figura 1.18. *Tuber incognitum* (ITCV 1695). a) Ascoma. b) Gleba. c) Peridio 1000 x. d) Espora 1000 x. e) Espora doble malla 1000 x.

Discusión

Al comparar los datos de muestras de otros estados; asca monospórica 45 -55 × 34-44 µm (Q = 1.3), biesporada 37 -43 × 29-32 µm (Q = 1.25), triesporada 30 -42 ×

26-31 µm (Q = 1.2), tetraesporada 28 -33 × 24-28 µm (Q = 1.09-1.25), pentaesporada 25 -28 × 20-28 µm (Q = 1.2-12.5), se observa un menor tamaño en la colecta de Guanajuato lo que nos indica que se tiene un ascoma en estado juvenil,

Complejo *Separans*

Análisis filogenético

El análisis discernió cuatro grupos de muestras, la primera con tres colectas *Tuber separans* 1 (1671 ITCV, 1681 ITCV, 1688 ITCV), que claramente anidan con la especie *Tuber separans*, con 0.92 de probabilidad posterior, la siguiente *Tuber aff. separans* 1 (1658 ITCV, 1678 ITCV), anidó con las muestras KC152254 KC152255 colectadas en la República Mexicana sin mencionar la localidad, (Garibay-Origel 2012, NCBI), el tercer clado segregó a *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV), con 0.99 de probabilidad posterior muy cerca de *T. separans* pero permaneciendo independiente. El último es *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV, 1684 ITCV) que anida independientemente dentro del mismo clado de *T. separans* con 1 de probabilidad posterior. Figura 1.19

Tabla 1.6. Listado de especies empleadas en el análisis filogenético del complejo separans dentro del género *Tuber*. Fragmento ITS, número de acceso NCBI y referencias.

Especies	Número NCBI	Referencia
Tuber sp. (1658 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1671 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1672 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1678 ITCV)	----------	Este documento

Tuber sp. (1681 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1684 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1688 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp. (1692 ITCV)	----------	Este documento
Tuber sp.	MG761431	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	MG761430	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	MG761428	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	MG761426	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	MG761423	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	MG761397	Bowman y Arnold 2018
Tuber sp.	KY574434	Garibay-Orijel y García-Guzmán 2017. NCBI
Tuber sp.	KU245954	Garay-Serrano *et al.,* 2015. NCBI
Tuber sp.	KT897487	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897486	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897485	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897484	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897483	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897482	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897480	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897476	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897475	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897474	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897472	Guevara *et al.,* 2015
Tuber sp.	KT897478	Guevara *et al.,* 2015
T. cf. separans	KY489771	Ramos *et al.,* 2018.
T. cf. separans	KC152264	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152262	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152261	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152260	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152259	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152258	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152257	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152256	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152255	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. cf. separans	KC152254	Garibay-Origel 2012, NCBI
T. separans	HM485388	Bonito *et al.,* 2010
T. separans	HM485387	Bonito *et al.,* 2010
T. separans	HM485386	Bonito *et al.,* 2010
T. separans	HM485385	Bonito *et al.,* 2010
T. separans	GQ221448	Murat *et al.,* 2009
T. puberulum	AJ969625.1	Tederso *et al.,* 2006

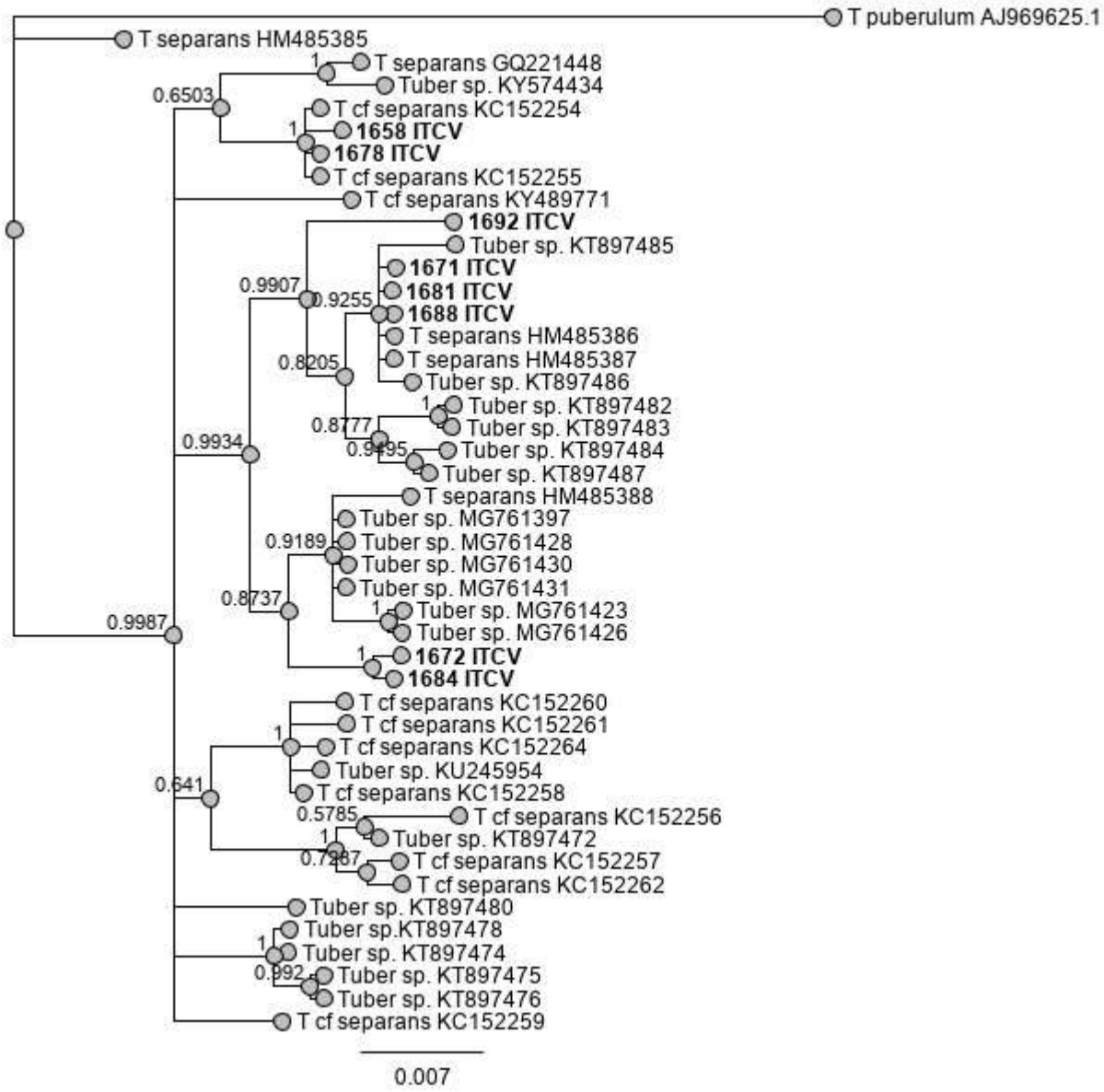

Figura 1.19. Árbol filogenético del grupo *Tuber separans*, modelo Mr. Bayes con fragmento ITS de especies y muestras relacionadas.

Tuber separans (1671 ITCV 1681 ITCV 1688 ITCV)

Figura 1.20

Descripción

Ascoma 12.5-12.8 × 11-11.5 × 8-10 mm Irregular, lobado, blanco aterciopelado, con parches café claro-crema al trato. Gleba café marmoleada con venas blancas. Olor no registrado.

Peridio bicapa 250- 625 µm de ancho, Epicutis amarillo en las capas más externas hialino al interior, células isodiamétricas 3-19 × 3-17 µm, con hifas entrelazadas 3-17 µm de ancho, pared celular 1 µm, amarillo a hialina en KOH. Setas septadas con hasta ocho septos y de hasta 59 µm de largo. Subcutis 115-495 µm, hifas entrelazadas 3 - 6 µm de ancho en el septo con células isodiamétricas distribuidas al azar 4-16 × 4-12 µm. Pared celular 1 µm, hialina en KOH. Ascospora, globosa, ampliamente elipsoide a elipsoide, excluyendo la ornamentación alveolada doble reticulada en asca monoesporada 34-52 × 25-43 µm (Q = 1-1.56), biesporada 30-42 × 25-33 µm (Q = 1-1.5), triesporada 27-37 × 21-31 µm (Q = 1.-1.4), espora café amarillento con tintes naranjas en KOH. Pared celular de 1 µm, retículo de 4 hasta12 alveolos a lo largo de la superficie, las paredes alveolares de hasta 10 µm de alto. Asca subglobosa a elipsoide, 71-94 × 57-84 µm, sin pedicelo hialina en KOH, hifas postradas, entrelazadas rodeando las ascas, cilíndricas 3 -10 µm de ancho en el septo, con células isodiamétricas esparcidas al azar 3-23 × 4-13 µm, de pared celular delgada, hialina en KOH.

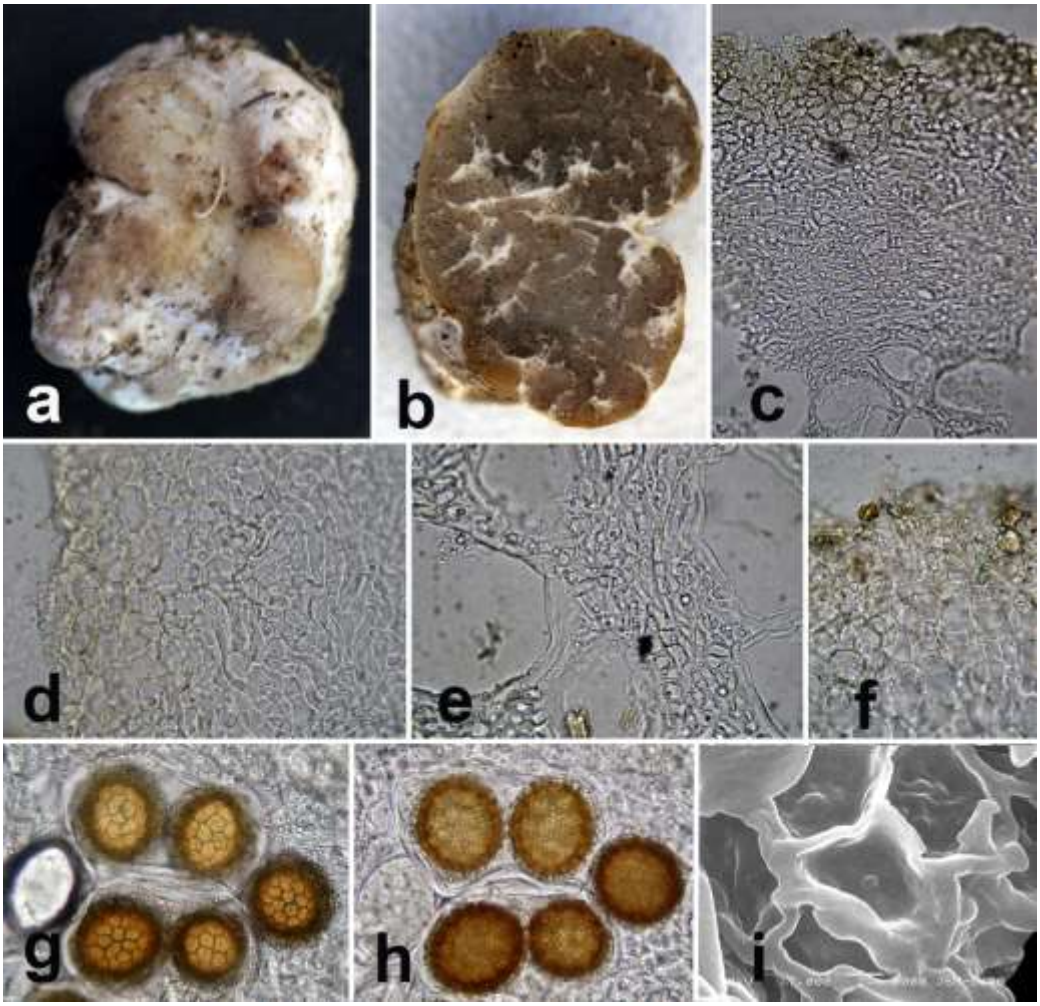

Figura 1.20. *Tuber separans* (1671 ITCV) a) Ascoma. b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x. f) Setas en el peridio 1000x. g) Espora 1000 x. h) Doble malla en la espora 1000 x. i) SEM espora.

Distribución hábitat, ecología; México, Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo, bajo *Quercus* sp. 2537 msnm, N 21°04'11.9", O 101°13'11.6", 3 de octubre 2016.

Material examinado, Las Palomas bajo *Quercus* sp. 2480 msnm, N 21°03'46.5", O 101°13'28.2", 14 de septiembre 2016 (ITCV 1671). Las Palomas bajo Quercus sp. 2527 msnm, N 21°03'51", O 101°13'24.4", 14 de septiembre 2016 (ITCV 1681).

Discusión

Tuber separans (1671 ITCV 1681 ITCV 1688 ITCV) es similar a T. separans (Gilkey 1916), en el grosor total del peridio bicapa, y la morfología celular, epicutis de células isodiamétricas, y subcutis con hifas postradas entrelazadas, pero el tamaño de la espora de la muestra guanajuatense es ligeramente menor que lo repostado por Gilkey, en contraste, el tamaño de espora de *Tuber separans* (1671 ITCV 1681 ITCV 1688 ITCV) es mayor que el reportado por Cázares et al., (1992).

***Tuber aff. separans* 1 (1658 ITCV, 1678 ITCV).**

Figura 1.21

Descripción: Ascoma 9.3 -13 × 6.7 -10 × 8.9 - 9.4 mm irregular y en ocasiones lobado, crema pálido a café claro, con parches café claro, con canales que continúan con las venas dentro de la gleba. Gleba blanco translúcido, marmoleado con venas blancas cuando inmaduras. Olor fúngico, los ascomas estaban inmaduros por lo que no se continuo con la descripción microscópica.

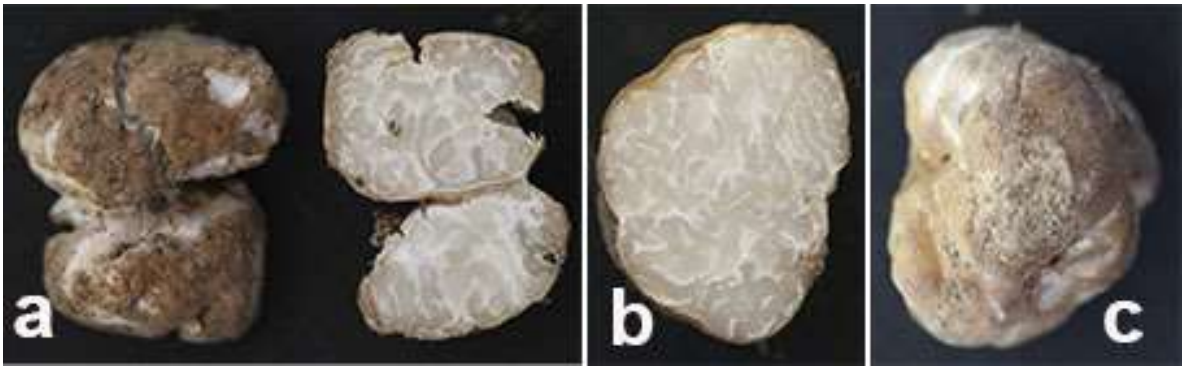

Figura 1.21. *Tuber aff. separans* 1 (1658 ITCV, 1678 ITCV). a y c, ascoma a y b gleba blanca.

Material examinado. México, Guanajuato, Guanajuato, Las Palomas, bajo *Quercus* spp., hipogeo, solitario, 2509 msnm, N 21˚ 03' 44.3", O 101˚13 ' 30.9 ", 30 de agosto de 2016, ITCV 1658, 1469 msnm, 21˚ 03' 54.8" N, 101˚13 ' 26.9 ", O 19 septiembre 2016, ITCV 1678.

***Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV)**

Figura 1.22

Diagnosis

Tuber aff. separans 2 (1692 ITCV) se caracteriza por un peridio moncapa de 100 - 142.5 µm de ancho, con setas septadas emergiendo de una verruga diminuta, con hasta 3 septos, de hasta 41 µm de largo, ascosporas en asca monoesporada 42-50 × 30-45 µm (Q = 1-1.4), biesporada 23-44 × 20-36 µm (Q = 0.81-1.63), triesporada 22-46 × 20-32 µm (Q = 0.81-2), tetraesporada 18-32 × 17-27 µm (Q = 096-1.3).

Descripción

Ascoma 10.2 × 8.8 × 7.5 mm Irregular, lobado, blanco aterciopelado, con parches café claro-crema al trato. Gleba café marmoleada con venas blancas. Olor suave. Peridio de una capa 100 -142.5 µm, hialino de células isodiamétricas 8-37 × 6-24 µm, pared celular 1-2 µm, hialina en KOH. Setas septadas que surgen de una verruga diminuta, con hasta 3 septos, de hasta 41 µm de largo. Ascospora, globosa, ampliamente elipsoide a elipsoide, excluyendo la ornamentación alveolada doble reticulada, en asca monoesporada 42-50 × 30-45 µm (Q = 1-1.4), biesporada 23-44 × 20-36 µm (Q = 0.81-1.63), triesporada 22-46 × 20-32 µm (Q = 0.81-2), tetraesporada 18-32 × 17-27 µm (Q = 096-1.3), espora café amarillento con tintes naranjas en KOH. Pared celular de 1 µm, retículo de 6 hasta14 alveolos a lo largo de la superficie, las paredes alveolares de hasta 8 µm de alto. Asca subglobosa, elipsoide a piriforme, 69-89 × 41-75 µm, sin pedicelo hialina en KOH, hifas postradas, entrelazadas rodeando las ascas, cilíndricas 2 -5 µm de ancho en el septo, pared celular delgada, hialina en KOH.

Distribución hábitat, ecología; México, Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, 2534 msnm, hipogeo, bajo Quercus spp. N 21°03'50", O 101°13'23", 10 de octubre 2016.

Discusión

Tuber aff. separans 2 (1692 ITCV) tiene un peridio mono capa compuesto de células isodiamétricas, lo que la diferencia de *T. separans,* que es de dos capas, además

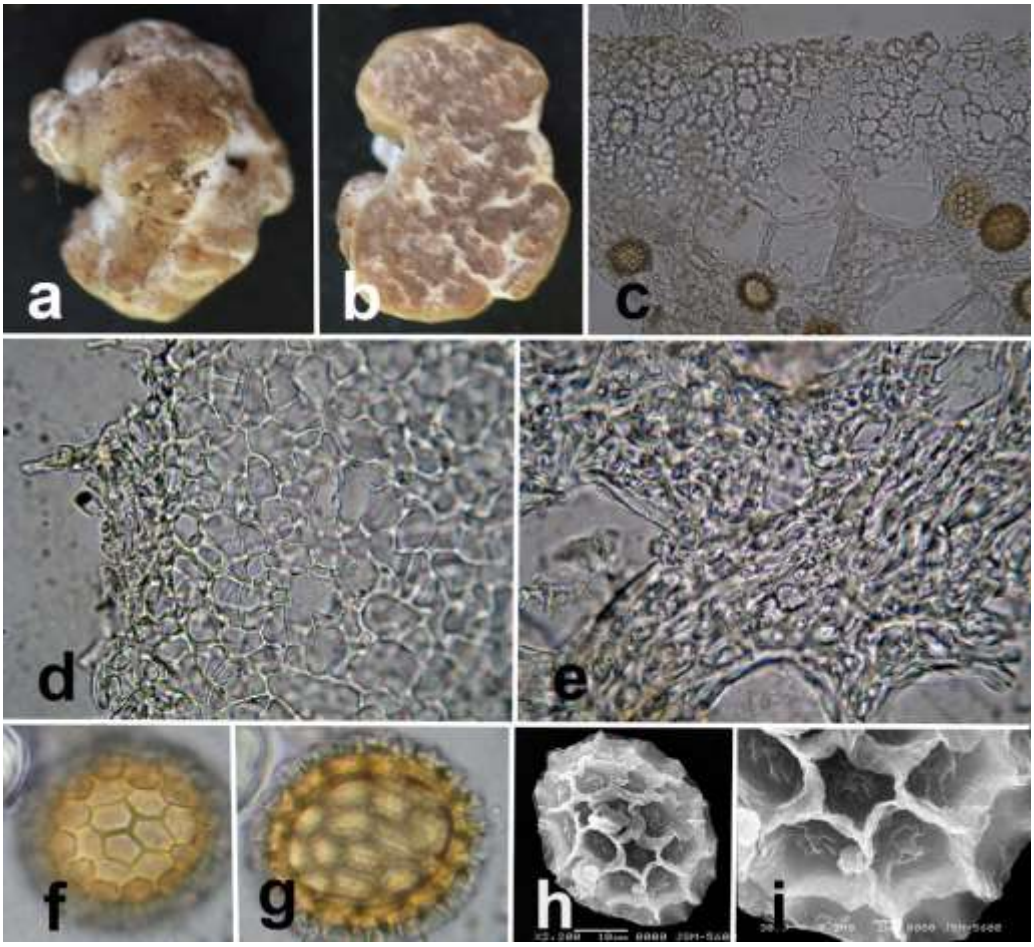

Figura 1.22. *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV). a) Basidioma. b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x. f) Espora alveolos1000 x. g) Espora doble malla1000 x. h) SEM espora i) SEM espora doble malla.

de consideran el grosor ya que *el peridio de Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) tiene 100 -142.5 µm de ancho, a diferencia de los 200 a-625 µm de ancho reportado para *T separans*, (Gikey 1916, Cazares *et al.,* 1992). Por otro lado, al comparar el tamaño de espora si conjuntamos los tres datos que se tiene (Gikey 1916, Cazares *et al.,*

1992), y *Tuber separans* (1671 ITCV), se puede observar que *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV), que es cercano al tamaño reportado por Gilkey (1916) 40-48 ×*48-56* µm, pero mayor al reportado por Cazares *et al.*, (1992) , 33-56 x 25-40 más 4 µm de la ornamentación a cada lado. Y que en esporas de ascas monospóricas *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) presenta esporas mayores que *Tuber separans* (1671 ITCV), pero en esporas de ascas bi y triesporadas *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) tiene esporas de menor tamaño que *Tuber separans* (1671). Podemos mencionar que tanto en *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) como en *Tuber separans* (1671 ITCV), el tamaño de las esporas va disminuyendo conforme aumenta el número de esporas por asca. Un dato que surge en este trabajo es que en el peridio *Tuber separans* (1671) tiene setas septadas con hasta ocho septos y de hasta 59 µm de largo a diferencia de *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) que presenta setas septadas que surgen de una verruga diminuta, con hasta 3 septos, de hasta 41 µm de largo, lo que podríamos proponer como un caracter de importancia taxonómica.

Conclusión

Con los datos mencionado podríamos considerar a *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) como una especie no reportada para la ciencia, dentro del complejo separans.

Tuber aff. separans 3 (1672 ITCV)

Figura 1.23

Diagnosis

Tuber aff. separans 3 (1672 ITCV) se caracteriza por un peridio bicapa 85 -170 µm de ancho, epicutis 45 -127.5 µm de ancho de células isodiamétricas, setas de punta roma de hasta tres septos, y hasta 30 µm de largo, en ocasiones con punta bifurcada. Subcutis 25 -105 µm de ancho, formado por hifas postradas entrelazadas. Esporas en asca monoesporada 34-37 × 27-29 µm (Q = 1.26-1.33), biesporada 30-44 × 25-37 µm (Q = 0.81-1.63), triesporada 31-32 × 25-28 µm (Q = 1.1-1.28),

Descripción

Ascoma 9.4-11 × 8.2-8.4 × 6 mm, irregular, lobado, blanco aterciopelado, con parches café claro-crema al trato. Gleba blanca cuando inmadura tornándose a café marmoleada con venas blancas. Olor suave.

Peridio bicapa 85 -170 µm de ancho, Epicutis 45 -127.5 µm de ancho amarillo en las capas más externas hialino al interior, células isodiamétricas 7-20 × 5-18 µm, pared celular 1 µm, amarillo a hialina en KOH. Setas de punta roma de hasta tres septos, y hasta 30 µm de largo, en ocasiones con punta bifurcada. Subcutis 25 -105 µm de ancho, hifas entrelazadas 3 - 6 µm de ancho en el septo. Pared celular 1 µm, hialina en KOH. Ascospora, globosa, ampliamente elipsoide a elipsoide, excluyendo la ornamentación alveolada doble reticulada en asca monoesporada 34-37 × 27-29 µm (Q = 1.26-1.33), biesporada 30-44 × 25-37 µm (Q = 0.81-1.63), triesporada 31-32 × 25-28 µm (Q = 1.1-1.28), espora café amarillento con tintes naranjas en KOH.

Pared celular de 1 µm, retículo de 4 hasta10 alveolos a lo largo de la superficie, las paredes alveolares de hasta 10 µm de alto. Asca subglobosa a elipsoide, 66-88 × 60-55 µm, sin pedicelo hialina en KOH, hifas postradas, entrelazadas rodeando las ascas, cilíndricas 3 -7 µm de ancho en el septo, pared celular delgada, hialina en KOH.

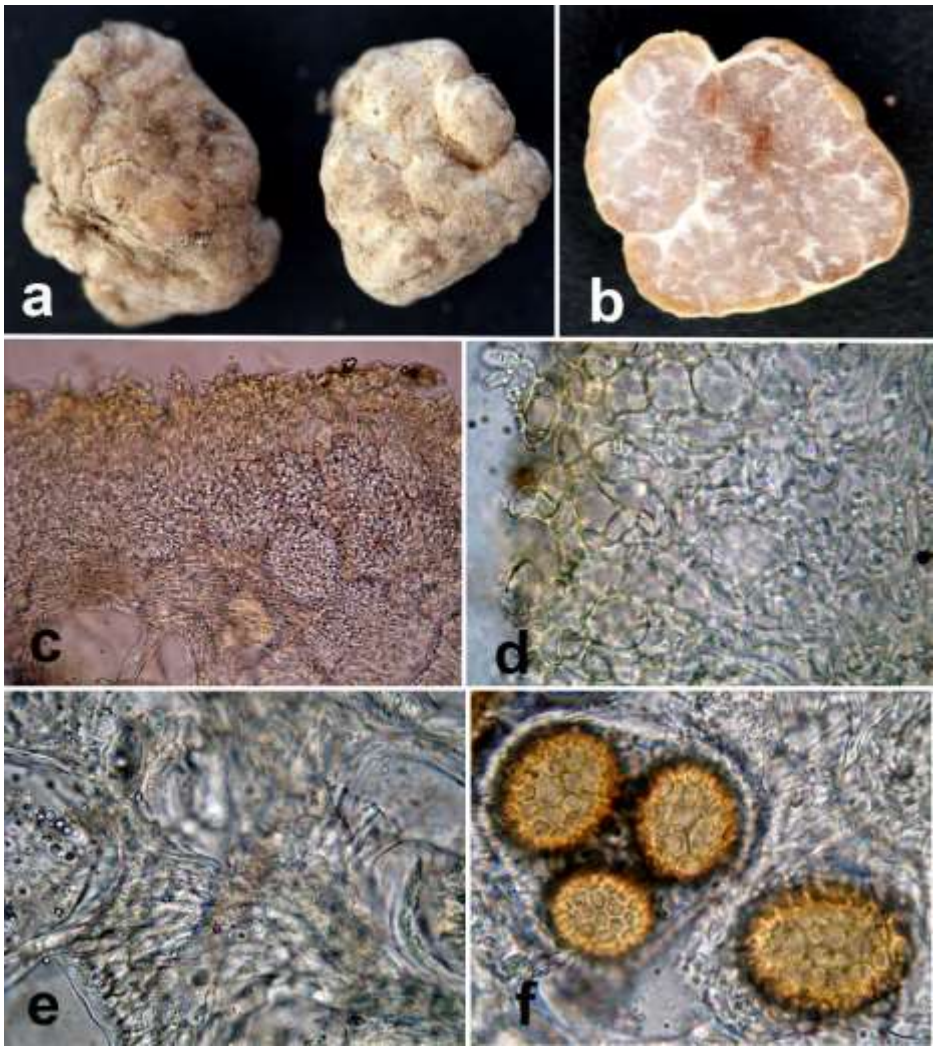

Figura 1.23. *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV) a) Ascoma b) Gleba. c) Corte transversal 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 1000 x f) Espora 1000 x.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo bajo Quercus spp. 2518 msnm, N 21°03'46.5", O 101°13'28.5", 14 de septiembre 2016

Discusión

Tuber aff. separans 3 (1672 ITCV) tiene un peridio bicapa con epicutis de células isodiamétricas y subcutis de hifas postradas entrelazadas en esto es semejante a T separans, pero se defenecía en el grosor ya que el peridio de *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV) tiene 85 -170 µm de ancho, mucho menor que los 200 a-625 µm de ancho reportados para *T. separans*. Así mismo una diferencia notable son las setas de punta roma de hasta tres septos, y hasta 30 µm de largo, en ocasiones con punta bifurcada que posee *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV), muy diferentes en tamaño y forma de las observadas en *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV) y *Tuber separans* (1671 ITCV). En Cuanto a la espora *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV), tiene poca variación entre las esporas según el número de esporas por asca, monoesporada 34-37 × 27-29 µm (Q = 1.26-1.33), biesporada 30-44 × 25-37 µm (Q = 0.81-1.63), triesporada 31-32 × 25-28 µm (Q = 1.1-1.28),un dato que podría ser importante una vez que se pudieran colectar diversos ejemplares, en esto se diferencia de *Tuber separans* (1671 ITCV) y de *Tuber aff. separans* 2 (1692 ITCV), en los cuales el tamaño de la espora no tiene una variación que correlacione con el número de esporas por asca.

Conclusión

Con los datos mencionado podríamos considera a *Tuber aff. separans* 3 (1672 ITCV) como una especie no reportada para la ciencia, dentro del complejo separans.

Literatura citada

Alejo-Iturvide F, M Márquez-Lucio, C González-López, G De la Riva-De la Riva (2015) Inventario de macrohongos en la zona de la reserva de la biósfera en la sierra Gorda de Guanajuato. *Revista de ciencias naturales y agropecuarias* 2 (4) 568-573.

Álvarez ADVM, MJ Sánchez, J Colli, IF Alejo. 2013. Biodiversidad de hongos macromicetos de la sierra de Santa Rosa Guanajuato. Memorias: Primer Simposio Nacional la Biodiversidad Fúngica en México: conocimiento actual y perspectivas. Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ Campus Juriquilla. Noviembre 20 a 22, 2013. Juriquilla Querétaro Mex.

Bonito GM, AP Gryganskyi, JM Trappe, R Vilgalys, (2010) A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. Mol. Ecol. 19 (22) 4994-5008

Barner JC, TR Horton (2016) NCBI.

Bowman EA, AE Arnold (2018) Distributions of ectomycorrhizal and foliar endophytic fungal communities associated with *Pinus ponderosa* along a spatially constrained elevation gradient Am. J. Bot. In press.

Brock PM, H Doring, MI Bidartondo (2009) How to know unknown fungi: the role of an herbarium. New Phytology 181(3) 719-724.

Castellano MA, JM Trappe, Z Maser, Ch Maser (1989) Key to Spore of the Genera of Hypogeous Fungi of North Temperate Forest. Mad River Press. Eureka California EEUU.

Castellano MA, GG Guevara, JJ García, JM Trappe (2012) *Elaphomyces appalachiensis* and *E. verruculosus* sp. nov. (Ascomycota Eurotiales, Elaphomycetaceae) from Eastern North America*. Revista Mexicana de Micología* 35 17-22.

Cázares E, J García, J Castillo, JM Trappe (1992) Hypogeous Fungi from Northern Mexico. Mycologia 84(3):341-359.

Díaz HDV, L Corona, OV Orlanzzini, LD Montaño, MJ Colli, IF Alejo (2013) Biodiversidad de hongos macromicetos de la sierra Gorda de Guanajuato, México. Memorias: Primer Simposio Nacional la Biodiversidad Fúngica en México: conocimiento actual y perspectivas. Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ Campus Juriquilla. Noviembre 20 a 22, 2013. Juriquilla Querétaro Mex.

Fan L, S-P Cai (2015) *Pachyphloeus depressus*, a new green truffle from China. Mycotaxon 130(3) 613-620.

Frank JL, S Barry, D Southworth (2006) Mammal mycophagy and dispersal of mycorrhizal inoculum in Oregon white oak woodlands. Northwest Sci 80(4) 264-273.

Frank JL, D Southworth (2011) NCBI.

García LA (2011) Organización de la sociedad ante el cambio climático. Programa de desarrollo Sierra de Santa Rosa Guanajuato; México Cuerpos de conservación de Guanajuato A. C. 47 pp.

García J, R Valenzuela, T Raymundo, LJ García, G Guevara, F Garza, E Cázares, E Ruiz-Cancino (2014) Macro hongos asociados a encinares (*Quercus* sp.) en algunas localidades del estado de Tamaulipas, México. Biodiversidad tamaulipeca 2(1) 103-140.

Gómez-Reyes VM, IR Hernández-Salmerón, A Terrón-Alfonso, G Guevara-Guerrero (2012) Estudio Taxonómico de *Elaphomyces* sp. (*Ascomycota, Eurotiales*), *Elaphomycetaceae* de Michoacán, México. *Revista mexicana de Micología* 36 57-62.

Garibay Orijel, R., M Contreras Pacheco, C Pina Paez, N.V. Ivanova (2012) NCBI.

Garibay OR, PC Piña (2014) NCBI.

Garay-Serrano E, MP Ortega-Larrocea, F Reverchon, I Suarez-Quijada (2015) NCBI.

Garibay OR, MO Garcia-Guzman (2017) NCBI.

Garza F, J García, J Castillo, (1985) Macromicetes asociados a los bosques de *Quercus rhyzophylla* en algunas localidades del centro del estado de Nuevo León. Revista Mexicana de Micología 1:423-438

Gilkey HM, (1916) A revision of the Tuberales of California. University of California publications in Botany. Vol 6, No 11. Pp 275-356.
Gómez–Reyes VM, G Vázquez-Marrufo, AM Ortega-Gómez, G Guevara-Guerrero (2018) Hypogeous Ascomycetes of the western portion of the transversal volcanic System, Mexico. Acta Botánica Mexicana 125:37-48
Guevara G, G Bonito, E Cázares, J Rodríguez, R Vilgalys, JM Trappe (2008) *Tuber regiomontanum*, new species of truffle from Mexico.
Guevara G, G Bonito, R Healy, R Vilgalys (2010) NCBI.
Guevara G, G Bonito, Trappe JM, G Williams, RA Healy, Ch Schadt, R Vilgalys (2013) New North American truffles (*Tuber* spp) and their ectomycorrhizal associations. Mycologia 105(1) 194-209.
Guevara G., Bonito G, E Cázares (2013b). Revision of genus *Tuber* (*Tuberaceae*: P*ezizales*) from Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidaad.84: 39-49.
Guevara-Guerrero G, VM Gómez-Reyes (2013) Hongos hipogeos del Estado de México. Memorias: Primer Simposio Nacional la Biodiversidad Fúngica en México: conocimiento actual y perspectivas. Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ Campus Juriquilla. 20 al 22 de noviembre de 2013. Juriquilla Querétaro Mex.
Guevara-Guerrero G, G Bonito, E. Cázares-González, R. Healy, R. Vigalys y JM Trappe (2015) Novel Tuber spp. (*Tuberaceae*, Pezizales) in the Puberulum Group from Mexico. Ascomycete.org 7(6): 367-37.
Guevara-Guerrero G, G Bonito, ME Smith, R Healy, ACII Grupe, E Cázares E, MA Castellano, JM Trappe (2018) Tuber aztecorum sp.nov., a truffle species from Mexico belonging to the Maculatum clade (Tuberaceae, Pezizales). Mycokeys 30: 61-72.
Hawker LE, (1954) British hypogeous fungi. Philosophical Transactions of the royal Society Biology 237:429-456.
Healy RA, G Bonito, G Guevara (2009) The Truffle *Pachyphloeus* in the U.S. and Mexico: Phylogenetic analysis and new species. Mycotaxon 107:61-71.
Healy RA, ME Smith, GM Bonito, DH Pfister, ZW Ge, GG Guevara, G Williams, K Stafford, L Kumar, T Lee, C Hobart, J Trappe, R Vilgalys, DJ McLaughlin (2013) High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. Mol. Ecol 22(6) 1717-1732.
Healy R, G Bonito, ME Smith, K Nara, A Kinoshita, CP Paez NCBI 2014
Healy R, C Hobart, GE Tocci, L Bona, Z Merenyi, A Paz-Conde, ME Smith (2015) Fun with the discomycetes: revisiting collections of Korf's anamorphic Pezizales and Thaxter's New England truffles leads to a connection between forms and the description of two new truffle species: *Pachyphlodes pfisteri* and *P. nemoralis*. Ascomyceteorg 7 (6), 357-366.
Healy RA, HT Horner, G Bonito, DJ McLaughlin, ME Smith (2018) An ultrastructural study of spore wall development and septal pores in species of the *Pachyphlodes* (*Pezizaceae, Pezizales*) lineage, with a description of the new species *Pachyphlodes annagardnerae* Mycol Prog 17 (1-2), 45-63.
Healy R, G Bonito, C Piña-Paes, K Nara, A Kinoshita, Z Merenyi, JM Trappe, DH Pfister, HT Horner, DJ McLaughlin, GG Guevara, Z Bratak, JL Frank, R Garibay-Orijel, ME Smit (2016) NCBI.
Herrera-Fonseca M de J, L Guzmán-Dávalos, O Rodríguez (2002) Contribución al conocimiento de la micobiota de la región de San Sebastián del oeste, Jalisco. Acta Botánica Mexicana 58:19-50.
Ilyas SA, Razaq, AN Khalid, TD Bruns (2013) NCBI
Imran A. A Khalid s/f. sin publicar, recuperada del NCBI, enviada 2017.
Instituto de Ecología del estado de Guanajuato (IEEG) (1998) Programa de manejo para el área natural protegida Cuenca de la esperanza. Periódico oficial. 29 de diciembre de 1998.
Kaminsky BS, ME Smith, R Healy, B Spakes (s/f) Fungi of the Ordway Swisher Biological Station. Sin publicar, recuperada del NCBI, enviada 2018.
Karpatia AS, SS Handel, J Dighton, TR Horton (2011) *Quercus rubra*-associated ectomycorrhizal fungal communities of disturbed urban sites and mature forests. Mycorrhiza 21 (6), 537-547.

Kluber LA, SR Carrino-Kyker, KP Coyle, JL Deforest, CR Hewins, AN Shaw, KA Smemo, DJ Burke (2012) Mycorrhizal Response to Experimental pH and P Manipulation in Acidic Hardwood Forests PLoS ONE 7(11), E48946.

Lancelloti E, M Lotti M, A Zambonelli, A Franceschini. 2016. Chap 7 The puberulum group sensu lato (whitish truffles). In: True Truffle (Tuber spp) in the world. Soil, Ecology, Systematics and Biochemistry. Zambonelli A., Lotti M. and Murat C. Editors. Springer International Publishing Switzerland.

Medel R, R Castillo, J Marmolejo, Y Baesa (2013) Analysis of the Pezizaceae family (*Pezizales: Ascomycota)* in Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad S21-S38.

Montecchi A, M Sarasini (2000) Funghi Ipogei d'Europa. Ed. Associazione Micologica Bresadola, Fundazione Centro Studi Micologici dell'A.M.B. Trento Italiy. 714 pp.

Murat C, S Jeandroz, Y Wang, G Bonito, Y Chen, K Nara, A Konoshita, H Sasaki, P-G Liu, R Vilgalys, Y Wang, J Trappe, F Le Tacon. 2009. NCBI.

Osmundson TW, VA Robert, CL Schoch, LJ Baker, A Smith, G Robich, L Mizzan, MM Garbelotto (2013) Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project PLoS ONE 8 (4), E62419.

Rosling A, MG Midgley, T Cheeke, H Urbina, P Fransson, RP Phillips (2015) Phosphorus cycling in deciduous forest soil differs between stands dominated by ecto-and arbuscular mycorrhizal trees. Sin publicar, recuperado de NCBI, enviado 2015.

Palmer JM, DL Lindner, TJ Volk (2008) Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin. Mycorrhiza 19 (1) 27-36.

Piña PC, GM Bonito, G Guevara-Guerrero, MA Castellano, R Garibay-Origel, JM Trappe, RR Peña. (2018) Description and distribution of tuber incognitum sp nov. And tuber annieae in the Transmexican Volcanic Belt. 41: 17-27.

Raymundo T, R Díaz-Moreno, S Bautista-Hernadez, E Aguirre-Acosta, R Valenzuela. (2012) Diversidad de ascomicetes macroscópico en bosque de Bayas municipio de Pueblo Nuevo, Durango, Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad. 83: (1) 1-14

Southworth D, J Donahue, JL Frank, J Gibson (2009) NCBI.

Tedersoo L, K Hansen, BA Perry, R Kjoller (2006). Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhizal. New Phytol. 170 (3), 581-596.

Trappe JM, G Guzmán (1971) Notes of some Hypogeous Fungi from Mexico. Mycologia 63 (2): 317-332.

Trappe JM, G Guzmán, C Vázquez-Salinas (1979) Observaciones sobre la identificación, distribución y usos de los hongos del genero *Elaphomyces* en México. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 13:145-150.

Trappe JM, E. Cázares (2006) *Tuber guzmanii*, a new truffle from southern México. International Journal of Medicinal Mushrooms 8:279-282.

Trappe JM, F Evans (2007) Field guide to North American truffles. Ten Speed Press, Berkeley Cal. EEUU. 136 pp.

U.S. NABCI Committee (2000) North American Bird Conservation Initiative. Bird Conservation Regions Descriptions. A supplement to the North American Bird Conservation Initiative. Bird Conservation region map. 44 pp.

Villarruel-Ordaz JL, BJ Cifuentes (2007) Macromicetos de la cuenca del Rio Magdalena y zonas adyacentes, Delegación la Magdalena Contreras, México D. F. Revista Mexicana de Micología 25:59-68.

Williams GC, RJ Vilgalys (2013) NCBI.

White TJ, T Bruns, S Lee, J Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for fhylogenetics. PCR Protocols A guide to methods and Aplications. Cap. 38 315-322.

Capítulo 2. Taxonomía, sistematica molecular y ultraestructura de los hongos hipogeos secuestrados *Basidiomycetes* del A N P Cuenca de la Esperanza, México

Resumen

Seis géneros de Basidiomycetes hipogeos se describen macroscópica, filogenética y ultraesctructuralmente para el estado de Guanajuato. Se reportan tres especies nuevas para la ciencia; *Melanogaster* sp. (1507 ITCV), *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV), y *Aroramyces guanajuatensis* ya publicada. Tres especies posiblemente nuevas; *Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV), *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV), *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV).

Se reporta una criptoespecie dentro del complejo *Hymenogaster niveus* (1620 ITCV), la cual precisa de un estudio más profundo para poder ser determinada. Se hace el reporte más austral de *Gautieria magnicellaris*. Se presentan comentarios taxonómicos y ecológicos breves.

Abstract

Six hypogeous basidiomycetes genera are described, macroscopically, phylogenetically and ultrastructurally, to Guanajuato state. Six sp. nova are reported, *Melanogaster* sp. (1507 ITCV), *Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV), *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV), *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV). *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV), and *Aroramyces guanajuatensis* already published. *Hymenogaster niveus* (1620 ITCV), is reported as criptoespecies, suggesting more study to final identification. The

Southernmost report of *Gautieria magnicellaris* is made. Brief taxonomic and ecological comments are presented.

Introduccion

Los hongos hipogeos secuestrados Basidiomycetes se caracterizan por presentar basidiosporas que nacen externamente en células conocidas como basidias y todo su ciclo de vida lo llevan a cabo en el subsuelo (Castellano et al., 1989; Trappe et al., 2009).

Se considera que los hongos hipogeos derivan evolutivamente de especies epigeas, como el caso de *Suillus* que se considera ancestro del género *Rhizopogon*, (Bruns et al., 1989) así mismo, esta relación ampliada dentro de la familia Boletaceae, el género *Suillus* hongo epigeo estipitado, *Gastroboletus* que posee un estípite muy reducido y *Truncocolumella* que solo tiene columella, finalmente Rhizopogon que carece de ella, (Trappe y Cázares 1990).

Se supone que estas modificaciones son producto de presiones climáticas como descenso de temperatura y poca humedad, y que los llevó a una interacción zoocórica en la dispersión de esporas, para esto los hongos han generado mecanismos de atracción mediante olores y constituyéndose en un alimento rico de minerales y proteínas en temporada o zonas carentes de ellas, (Trappe y Cázares 1990). Insecto de diferentes especies consumen hongos hipogeos tal es el caso de diversos escarabajos, dípteros, Fogel y Peck (1975)Venados, ardillas, campañoles, rata canguro y wallabies, son consumidores de hongos hipogeos (Maser et al.,

2008) entre muchos otros esto nos da una idea de las diversas posibilidades de distribución de esporas en pequeña y a mayor distancia, considerando la posibilidades que debido a los hábitos de cada especie el bolo fecal pueda caer en las condiciones más adecuadas para la germinación y posterior micorrización de las raíces (Fogel y Trappe 1978)

Hipótesis

Es conocido que las especies de *Quercus* establecen relaciones micorrízicas, con diversas especies de hongos, por lo tanto, se puede esperar que en el ecosistema de encinos de la sierra de Santa Rosa en Guanajuato se podrían presentar diversas especies de hongos hipogeos Basiciomicetes asociados con *Quercus*.

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de las especies de hongos secuestrados ***Basidiomycetes*** del estado de Guanajuato, Mexico.

Objetivo especifico

Determinar las especies de hongos hipogeos *Basidiomycetes* presentes en el ANP Cuenca de la Esperanza Guanajuato, Mexico

Establecer la ubicación filogenética molecular de las especies de los hongos hipogeos Basidiomycetes del ANP Cuenca de la Esperanza mediante el empleo del fragmento de los espaciadores internos que se transcriben, de los genes ribosomales (ITS, internal trenscribed spacer) y apoyado de analis ultraestructural de las especies mas interesantes.

Antecedentes

Al igual que los ascomicetes no se encontró ningún estudio publicado sobre hongos hipogeos secuestrado basidiomicetos sin embargo, alguno estudios sobre este grupo de hongos *e.g*. con respecto a M*elanogaster* podríamos decir que el primer hongo hipogeo reportado para México fue uno de este género, *Melanogaster varigartus* var. *mexicanus* por Lumholz colectado en Chihuahua en 1902. Rebautizado a *M. umbrinigleba.* Posteriormente se reporta *M. ambiguos* en el estado de Morelos (Trappe y Guzmán 1971, Cázares *et al.,* 1992) reporta a *M. variegatus* en el estado de Nuevo León. Finalmente se ha reporta una última especie *M. minysporus* en Nuevo León, (Cázares *et al.,* 2008). Asi mismo, Hymenogaster farinaceus se describio para el estado de Veracruz, (Trappe y Guzmán 1971) de un material colectado en 1964, aunque aclaran que la asignación de especie es tentativa porque la espora presentó características divergentes al tipo de la especie, del mismo modo *Hymenogaster sublilacinus* Smith se reportó para el estado de Coahuila, (Cazares et al., 1992) asociado a *Pinus* y *Abies*,

Respecto a género Aroramyces recietemente se han descrito dos nuevas especies para México *A. balanosporus* G. Guevara y Castellano, encontrado en el estado de Jalisco y *A. herrerae* G. Guevara, Gómez-Reyes y Castellano colectado en Michoacán, ambos asociados a *Quercus*, (Guevara-Guerrero *et al.,* 2016).

Por otro lado, a pesar que en 1929 Zeller y Dodge realizaron un amplio estudio de los *Hysterangium* de norte América, no mencionan a México en el estudio, y no es sino hasta 1971 que Trappe y Guzmán reportan *Hysterangium separabile* en Estado

de México, posteriormente Castellano (1990) hace referencia al trabajo de Trappe, pero nunca menciona a México. García *et al.,* (2005), reporta *Hysterangium* en Tamaulipas, pero no menciona especies, en contraste Guevara *et al.,* (2008) realiza el primer reporte de *H. aureum* para México, en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, además presenta tres especies nuevas*, H. quercicola*, en Tamaulipas, *H. latisporum* en Tamaulipas, Nuevo León y Michoacán, finalmente *H. velatisporum* de Tamaulipas, Coahuila y Querétaro. (García *et al.,* 2014) confirma la presencia de estas cuatro especies en Tamaulipas.

En 1953 Pilát reporta *Gautieria. morchelliformis var magnicellaris*. Este reporte se basa en dos colecciones del herbario Corda que presentaba esporas con medidas de 19.5 22 x 11 14 µm, y de una colecta propia con esporas de 20-25 (27) x 13-14 µm, que consideró ligeramente mayores que las reportadas por Vittadini (1831) para el tipo. La colecta de Pilát presentaba cámaras grades (4–8 x 3–4 mm), razón del nombre *magnicellaris*, en 1174 Stewart sugiere establecer a *Gautieria magnicellaris* como especie, y finalmente fue publicada por Cázares *et al.,* en 1992. La descripción de Cázares se basó en dos colectas. una de Agua Blanca Coahuila y otra de Zaragoza Nuevo León. En un trabajo posterior Bidartondo y Bruns (2002) se obtuvo la secuencia del ITS de la muestra de Nuevo León, esta secuencia es la que utilizamos en el presente trabajo. Posteriormente en 2014 (García *et al.,*) reportó a *G. magnicellaris* en Tamaulipas.

Materiales y métodos

Recolección de basidiomas

La colecta y el estudio macroscópico se realizaron acorde a Hawker (1954) y Castellano *et al.,* (1989). El área de investigación fue seleccionada por la cobertura vegetal conservada. La búsqueda de hongos hipogeos se realizó mediante la selección al azar de árboles de encino y mediante un rastrillo de jardín se escarbó hasta 15 cm de profundidad en un radio de 1.5 m, en todo momento el suelo removido se regresó a la posición original para minimizar el impacto, (Castellano *et al.,* 1989).

Todos los cuerpos fructíferos se fotografiaron en fresco. La determinación del color se realizó a simple vista. Posteriormente se deshidrataron a 50 °C. Para la observación microscópica los cuerpos fructíferos se cortaron con una navaja de rasurar y se rehidrataron con KOH 5 %. Se midieron 30 esporas y las capas celulares de los cortes de peridio y gleba, (Castellano *et al.,* 1989).

Determinación taxonómica morfológica

Cada género fue descrito a nivel de especie con base en la bibliografía especializada. Los registros de cada colecta se depositaron en el Herbario Micológico José Castillo Tovar (ITCV) del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, México.

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA y análisis filogenético.

La extracción del DNA se realizó con el Kit: Extract-N-Amp kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri). Las muestras se tomaron de los frutos deshidratados, por cada

espécimen se tomó una porción de gleba de 1 - 2 mm de diámetro, se colocó en un tubo de 500 µL. Se añadieron 20 µL de solución de extracción. Posteriormente se incubo a 65ºC durante 10 minutos. A continuación, se incubó a 96ºC por 10 minutos. Después se añadieron 20 µL de solución de dilución. Finalmente se colocó 30 minutos a temperatura ambiente. Para la amplificación de la región ITS se emplearon los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.,* 1990). La reacción de amplificación (PCR) contenía 19.125 µL de agua bidestilada, Buffer 10X 2.5 µL, dNTPs 0.5 µL (0.2 mM cada uno), $MgCl_2$ 1 µL (1.5 mM), Cebadores 0.25 µL (0.2 µM cada uno) Platinun Taq DNA polymerase (Invitrogen Thermo Fisher Scientifics, Carlsbad California) 0.125 µL (2.5 U), DNA 1 µL (menos de 500 ng). Ciclo de reacción, calentamiento inicial 94ºC 5 min, 35 ciclos de 94ºC 1 min 54ºC 1 min, 72ºC 1 min y extensión final 72ºC 10 min.

Los dNTPs y cebadores restantes se removieron mediante ExoSap-IT PCR product cleanup (Applied biosystems Foster City, California) 1 µL, agua grado PCR, mas 3.5 µL de producto de PCR. La mezcla se calentó a 37ºC por 45 minutos, seguida de 80ºC por 15 minutos. La secuenciación se realizó por el método de Sanger con un secuenciador: Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer, empleando el kit: BigDye Sequencing kit. En el laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud, del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México.

Análisis del DNA. Excepto por *Aroramyces*, las secuencias fueron ensambladas, editadas y analizadas con el software Geneious Prime. Se seleccionaron

secuencias del National Center for Biotecchnology Information (NCBI), las cuales fueron recuperadas y comparadas con nuestras muestras. El Alineamiento se realizó con el programa MUSCLE, 50 iteraciones, rasurando los extremos, con tres ciclos de alineamiento-rasurado, los arboles filogenéticos se obtuvieron con Mr. Bayes, con un millón de pruebas, considerando una probabilidad Gama, con una frecuencia de submuestreo de 2000, un 25,000 de Calentamiento (burn-in length). En cada caso se seleccionó una especie cercana a las especies o al género como externo, para el enraizamiento del análisis.

Ultraestructura

Las muestras deshidratadas se adhirieron al porta muestra mediante un cinta con pegamento por ambos lados, posteriormente las esporas y el tejido fueron teñidas con oro paladio mediante las sublimación. La microfotogarfía y microscopia electrónica se realizó con el microscopio electrónico JSM5600LV, JOEL, Tokio, Japón.

Resultados y discusión

Género: *Melanogaster* Corda 1831

En el análisis filogenético las colectas *Melanogaster* sp. (1505 ITCV) y *Melanogaster* sp. (1507 ITCV, anidan juntas con una probabilidad posterior de 1. Así mismo con una probabilidad posterior de 0.95, se anidan en una rama con *Melanogaster broomeianus, M. vareigatus, M. luteus, M. rivularis* y *M. vittadini*, y muy intersantemente *Alpova trappeii* se une con este grupo Tabla 2.1. Figura 2.1.

Tabla 2. 1 Listado de especies y secuencias de ITS utilizadas para el análisis filogenético del genero *Melanogaster*

Especies	Numero NCBI	Referencia
Melanogaste sp. (1505 ITCV)	----------	Este documento
Melanogaste sp. (1507 ITCV)	----------	Este documento
Alpova trappei	AF074920	Grubisha *et al.,* 2002
Melanogaster sp.	MF352733	Suz *et al.,* 2017
Melanogaster sp.	KY462394	Truong *et al.,* 2017
Melanogaster sp.	KT968556	Gordon NCBI 2015
Melanogaste sp.	JN022515	Frank y Southworth NCBI 2011
Melanogaster sp.	JN022499	Frank y Southworth NCBI 2011
M. vittadini	AJ555525.1	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. variegatus	AJ555524.1	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. variegatus	AJ555522	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. tuberiformis	AJ555527	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. rivularis	HQ714731.1	Moreau *et al.,* 2011
M. macrossporus	AJ555526	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. macrosporus	AJ555528	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. luteus	HQ714780	Moreau *et al.,* 2011
M. luteus	HQ714794	Moreau *et al,.* 2011
M. intermedius	EU784372	Brock *et al.,* 2009
M. intermedius	AJ555515	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. euryspermus	AY918954.1	Frank *et al.,* 2006
M. cf. tuberiformis	AJ555521.1	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. cf. tuberiformis	AJ555521	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. cf. intermedius	EU784371.1	Brock *et al.,* 2009
M. broomeianus	AJ555531	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. broomeianus	AJ555530	Halasz *et al.,* NCBI 2003

M. broomeianus	AJ555517	Halasz *et al.,* NCBI 2003
M. ambiguus	KX438335	Szmidla *et al.,* NCBI 2016
M. ambiguus	AJ555512	Halasz *et al.,* NCBI 2003
Paxilus rubicundulus	NR147640	Jargeat *et al.,* 2016

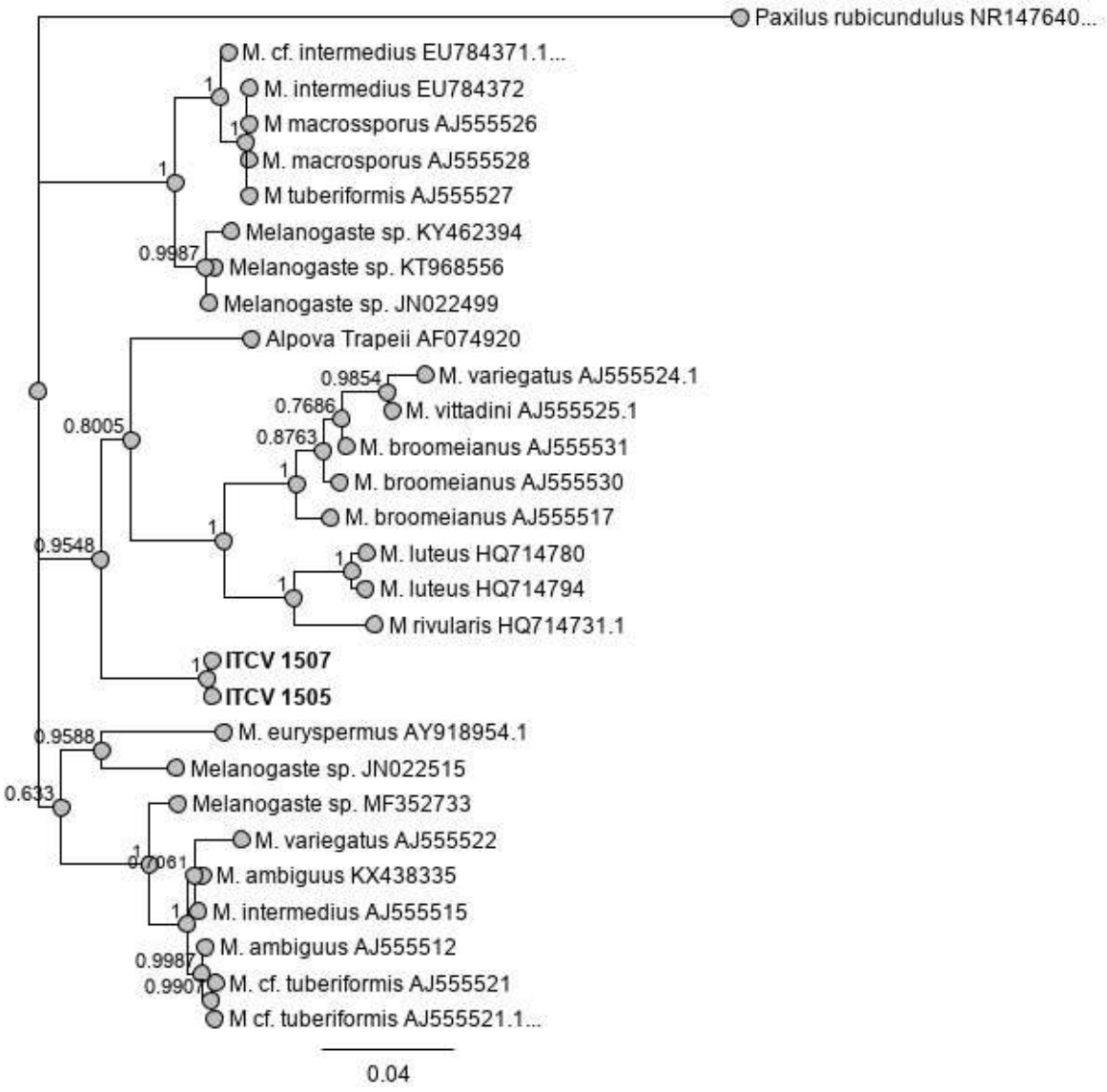

Figura 2.1 Árbol filogenético del género *Melanogaster* con el método Mr. Bayes, con el fragmento ITS.

Melanogaster sp. (1507 ITCV)

Fig 2.2 -2.3

Diagnosis

Se distingue por poseer un basidioma amarillo con parches cafés, fibras cafés viscidas y un peridio de una sola capa de tamaño intermedio, esporas medianas no truncada

Holotipo *Melanogaster* sp. (1507 ITCV) Herbario José Castillo Tovar

Descripción

Basidioma 18–42 × 10–21 mm, fusiforme, subgloboso, liso, víscido, amarillo con manchas cafés, cambia a café oscuro con el trato, fibras cafés, viscidas, alrededor del cuerpo fructífero, tendiendo a concentrarse en algunos puntos, gleba gelatinosa, blanca cuando inmadura, tornándose negra en la madurez, algunos lóculos dispersos, rellenos por un líquido viscoso al ser cortado. Sin columella.

Peridio 22.5–140 µm ancho, no separable, hifas entrelazadas, células más externas color amarillo, hifas proyectándose al exterior, células internas hialinas, 3–8 µm diámetro al septo, promedio 4.8, Pared celular menos de 1 µm. fíbulas presentes.

Localización, México, estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, N 21º03', O 101º13. 2500 msnm. 14 septiembre de 2015.

Trama15–147.5 µm ancho, promedio 62.2, hifas entrelazadas, hialinas, inmersas en una matriz gelatinosa, 2–5 µm diámetro al septo, 3.9 promedio, pared celular menor de 1 µm de grueso. Basidia 32 × 7 µm, clavada, hialina. Basidiospora 7–11 × 3–6 µm, promedio 9.9 × 5, obovoide a fusiforme, lisa, café en masa, café claro sola, de

una a tres gútulas, pared celular delgada. Figura 2.3 a-e. Olor fungóide. Sabor no registrado.

Figura 2.2. *Melanogaster* sp (1507 ITCV), basidioma y tejido. a) Basidioma amarillo con fibras viscidas cafés rodeando la fructificación. b) Cuerpo fructífero inmaduro, gleba blanca con lóculos llenos de una matriz gelatinosa. c) Basidioma café negruzco. d) Gleba negra. e) Peridio y gleba, corte transversal, 100 x. f) Peridio 1000 x. g) Gleba 1000 x.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, Hipogeo solo o gregario, en suelo y mantillo, asociado a *Quercus sp*. 2500 msnm, septiembre.

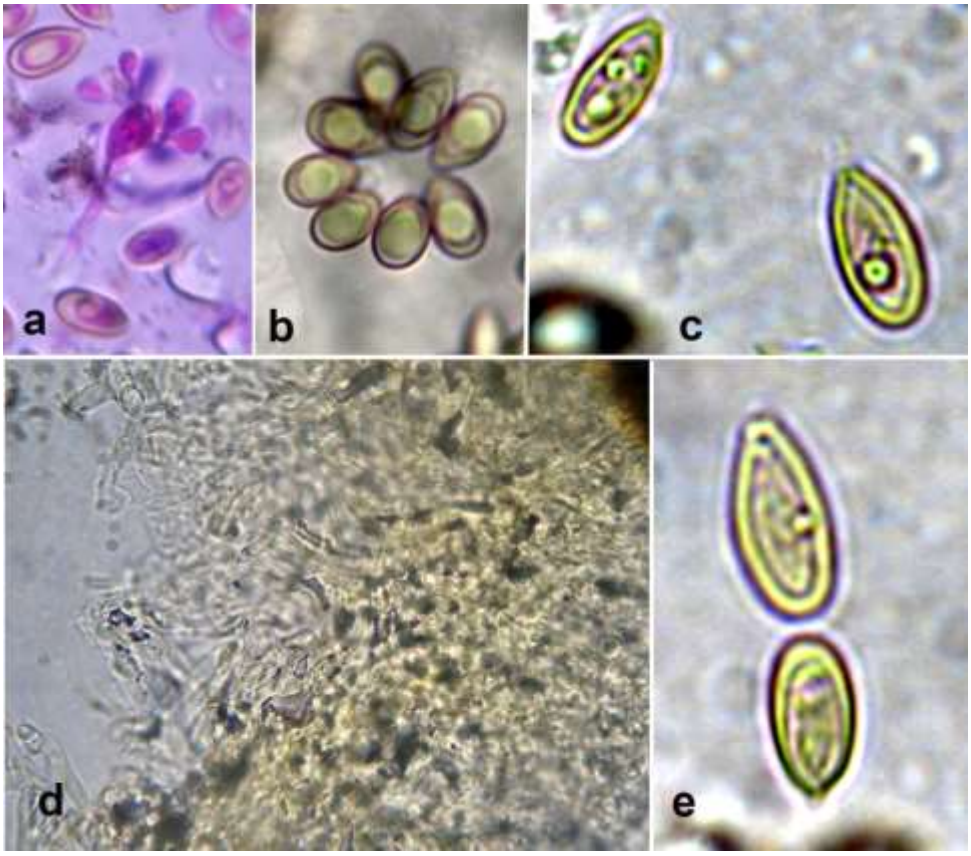

Figura 2.3 *Melanogaster* sp. (1507 ITCV), basidia, espora, y peridio exterior. a) Basidia teñida con floxina 1000 x. b) Basidia con ocho esporas vista superior, 1000 x. c) Espora. 1000 x. d) Peridio con hifas proyectándose al exterior, 1000 x. e) Espora, 1000 x.

Discusión

El basidioma de *Melanogaster* sp. (1507 ITCV) 18–42 × 10–21 mm, es más grande que el de *M. variegatus* 10–15 × 20–5 mm, pero en tamaño *Melanogaster* sp. (1507

ITCV), es muy similar a *M. bromeianus* 20 –40 mm, pero difiere en el color y la presencia de tomento. Por otro lado *M. luteus* 0.7–1.2 × 0.4–1,0 mm, y *M. rivularis* 0.6–2.5 × 0.4–1.8 cm resultan mucho más pequeños al ser comparado con otros. *Melanogaster* sp. (1507 ITCV) tiene fibras al igual que *M. variegatus*, *M. broomeianus* y *A. trappei*, a diferencia de *M. luteus* y *M. rivularis* que no las tienen. Gleba, *M variegatus* y *M. luteus* poseen venas, mientras que el material estudiado no las tiene, en esto es similar a *M. bromeianus.* Peridio *M variegatus* 270–350 µm, *M. luteus* 208–430 (500) µm y *A. trappei* 200–300 µm tienen dos capas y el peridio es más grueso que el de la colecta 1507 ITCV 22.5–140 µm mientras que *M. rivularis* 90–135 tiene dos capas, pero el peridio es más delgado que el de *Melanogaster* sp. (1507 ITCV).

El tamaño de la espora es muy similar al de *M. variegatus*, (6 .5–) 8–10.5 × 5–6.5 (–11) pero en menos multiforme y es café claro, por otro lado la espora de *M. bromeianus* (5–) 6–8.4 (–11) × (2.5–) 3.5–4.0 (–4.5) es truncada y ligeramente mayor que la de la colecta 1507 ITCV 7–11 × 3–6 µm la cual no es truncada, las esporas de *M. luteus,* (4.7) 5.3–*6.01*–6.8 (7.6) × (2.2) 2.4–*2.75*-3.0 (3.5), *M. rivularis* (4.2) 5.1–*5.65*–6.2 × 2.7–*2.91*–3.1 µm y *A. trappei* 4.6.5 (8.5) × 1.8–3 (3.5) µm, son claramente más pequeñas que 1507 ITCV. Basidia *Melanogaster* sp. (1507 ITCV) 32 × 7 µm, muy similar a *M. luteus* en tamaño y forma 18–24 (32) × 5–6.5. (Zeller y Dodge 1936, Montecchi y Sarasini 2000).

Conclusión

Los datos presentados sugieren muy firmemente que *Melanogaster* sp. (1505 ITCV,1507 ITCV) es una especie no reportada previamente.

Género: *Hymenogaster* Vittadini 1831

En el primer análisis de las regiones ITS disponibles se observa que las muestras se separan en dos grupos uno colectas *H. niveus* (1620 ITCV) afín a *H. niveus* e *H. mutabilis* y las colectas *H. niveus* (1623 ITCV) e *H. niveus* (1720 ITCV) se concentran con otro grupo donde también se presenta *H. niveus* acompañada de *H. tener*. Fig 2.4. Posteriormente se realizó otro análisis con las especies más cercanas a *H. niveus* (1623 ITCV) e *H. niveus* (1720 ITCV), KM576608 una muestra ambiental europea, Suz *et al.,* 2014., pero se agrupa con secuencias de *H niveus, H, tener, H. alnicola, H gikeyae H. rubyensis*, mismas que se encuentran

Tabla 2.2 Listado especies y número de registro empleados en el análisis filogenético de *Hymenogaster* relacionado con *H. niveus*.

Especies	Número NCBI	Referencias
Hymenogaster sp. (1620 ITCV)	----------	Este documento
Hymenogaster sp. (1623 ITCV)	----------	Este documento
Hymenogaster sp. (1720 ITCV)	----------	Este documento
Hebeloma celatum	KT218443	Grilli *et al*., 2016
H. niveus	GU479256	Stielow *et al*., 2011
H. arenarius	DQ328114	Francis 2005 NCBI
H. mutabilis	GU479235	Stielow *et al.,* 2011
H. mutabilis	GU479288	Stielow *et al.,* 2011
Hymenogaster sp.	KU878599	Tomes y Horton 2016
Hymenogaster sp.	KU878606	Tomes y Horton 2016
H. niveus	GU479344	Stielow *et al.,* 2011
Hymenogaster sin cultivar	HF675446	Kaptrurska *et al.,* 2013
Hymenogaster sin cultivar	HF675437	Kaptrurska *et al.,* 2013
Hymenogaster sp.	JX030266	Tourtellot *et al.,* 2012
Hymenogaster sp.	JX030221	Tourtellot *et al.,* 2012
H. arenarius	GU479233	Stielow et al., 2011
H. arenarius	GU479232	Stielow et al., 2011
H. pusillus	GU479227	Stielow et al., 2011
H. pusillus	GU479228	Stielow et al., 2011
H. niveus	GU479314	Stielow et al., 2011
H. niveus	KX438329	Szmidla et al., 2016
H. niveus	GU479320	Stielow et al., 2011

H. niveus	KX438331	Szmidla et al., 2016
H. niveus	KX438330	Szmidla et al., 2016
H. niveus	GU479307	Stielow et al., 2011
H. niveus	KU878613	Tomes y Horton 2016
H. niveus	GU479255	Stielow et al., 2011
Hymenogaster sp.	KM576608	Suz el al., 2014
H. alnicola	AF325632	Peintner *et al.,* 2001
Hymenogaster sp.	JX030291	Tourtellot *et al.,* 2012
H. tener	EU784364	Brock *et al.,* 2009
Hymenogaster sp.	JX030230	Tourtellot *et al.,* 2012
H. niveus	JX258839	Tourtellot *et al.,* 2012
Hymenogaster sp.	JF273526	Ding *et al.,* 2011
H. tener	AF325633	Peintner *et al.,* 2001
Hymenogaster sp.	JX030291	Tourtellot *et al.,* 2012
H. gilkeyae	AY558774.1	Izzo *et al.,* 2004
H. rubyensis	AY945303.1	Smith *et al.,* 2005

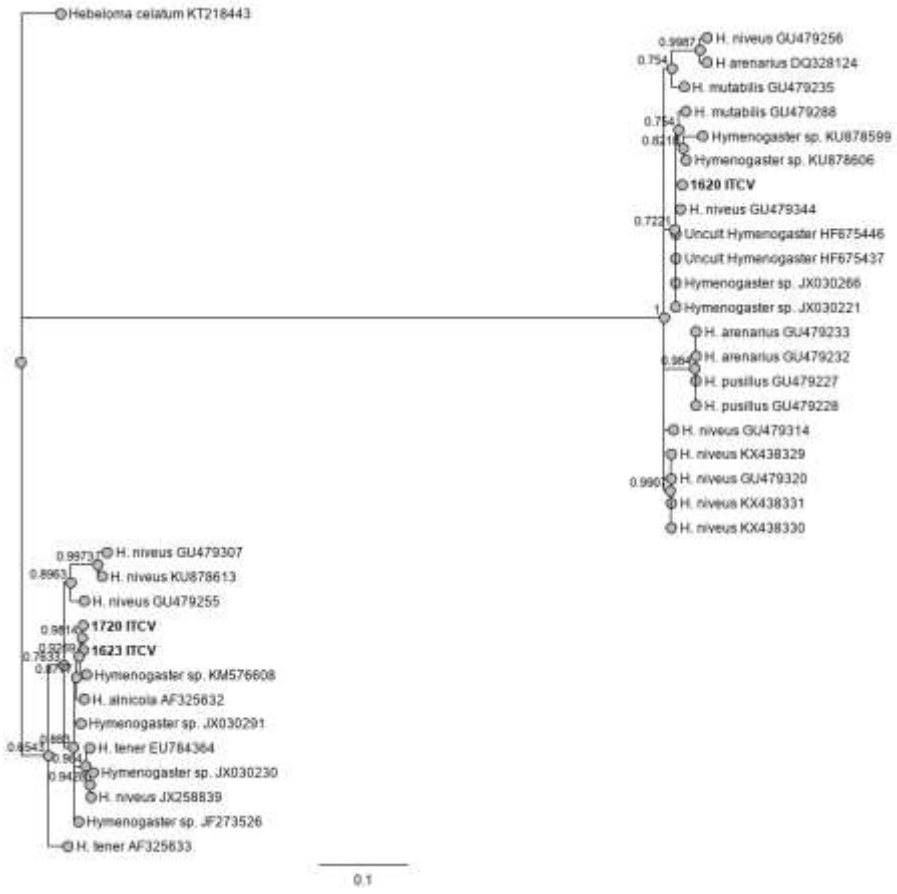

Figura 2.4. Árbol filogenético del género *Hymenogaster,* fragmento ITS, mediante el análisis de Bayes.

estrechamente relacionadas dentro del complejo *H. niveus*, ya sea por la similitud morfológica o por una identificación equivocada, en esto los arboles filogenéticos son similares a los presentados por Stielow *et al.,* 2011. Los datos están acordes con Stielow *et al.,* 2011, quien considera que existen cripto especies dentro de *H. niveus*. Figura 2.5.

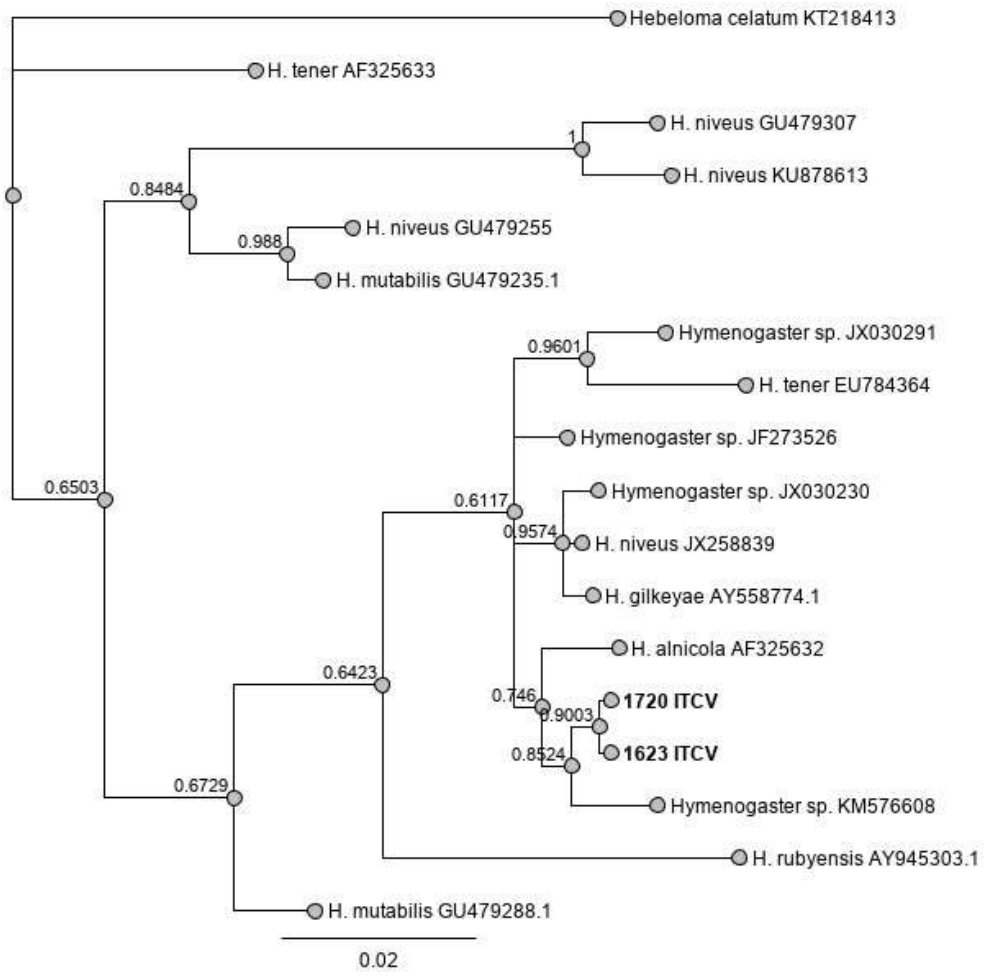

Figura 2.5 Árbol filogenético generado mediante el método de Mr. Bayes, con las secuencias más similares a *H. niveus* (1623 ITCV) e *H. niveus* (1720 ITCV).

Hymenogaster niveus

Figuras 2.6, 2.7

Basidioma globoso, subgloboso irregular, lobado, 4.5–19 × 4.1–18.9 × 2.8–11.3 mm, promedio 9.12 × 8.53 × 11.3 mm, blanco, peridio liso aterciopelado, no separable de la gleba, Gleba café con lóculos, olor fúngico, sabor no registrado.

Peridio 17.5–145 µm, promedio 67.3, prosenquimatoso 3–10 µm de ancho en el septo, hifas entrelazadas, hialinas.

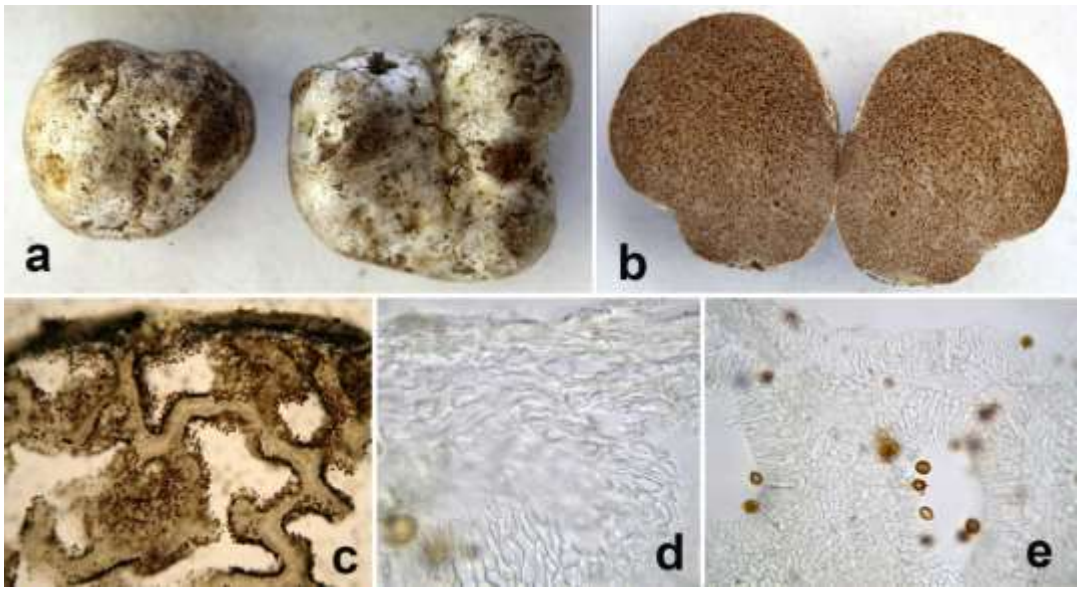

Figura 2.6. *Hymenogaster niveus* 1720 ITCV Basidioma y tejido a) Basidioma. b) gleba. c) corte transversal 100 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 400 x.

Gleba, Trama 60–92.5 µm, promedio 74.85, pseudoparenquimatosa isodiamétrica angular, hialina, 3–35 × 1–27 µm, promedio 14.7 × 9.6. Basidia cilíndrica de dos esporas, hialina, 11–26 × 4–7 µm, promedio 17.6 × 5.5. Basidiosporas, citriformes, elongadas, ovaladas, papilada, sin ornamentación 10–16 × 5–10 µm, promedio 13.2 × 7.9, con ornamentación 13–20 × 8–14 µm, promedio 17 × 11.7. café-dorado,

perisporio, verrugoso, espinoso, arrugado, apéndice hilar hasta 3 µm, promedio 1.97. Ornamentación verrugosa 1–3 µm, promedio 1.9.

Distribución hábitat, ecología; Hipogeo en mantillo, gregario. Asociado a *Quercus sp*. 2500 msnm, México, estado de Guanajuato, Guanajauto, ANP Cuenca de la Esperanza, N 21º04'4.5'', O 101º13'03.2''. 2500 msnm.

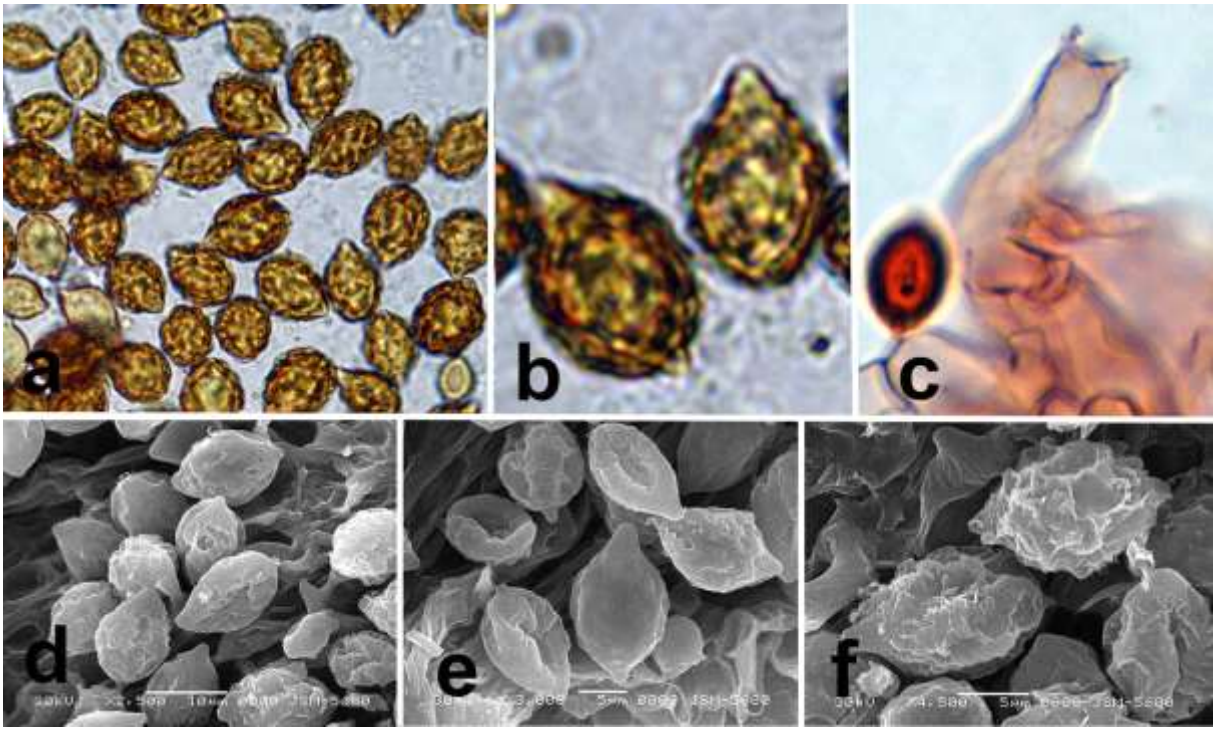

Figura 2.7. *Hymenogaster niveus* 1720 ITCV, esporas y basidia a-c microcopia óptica 100 x, d-f. microscopia electrónica de barrido. a) Espora en masa. b) Espora. c) Basidia, tuición con floxina. d) Espora en masa. e) Espora citriforme. f) Espora, detalle de la ornamentación.

Material examinado 1623 ITCV México, estado de Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza. Asociado a *Quercus sp,* 19 nov 2015, N.21º03'49.4'', O 101º13'54.5'' 2460 msnm.1720 ITCV México, estado de Guanajuato, ANP Cuenca de la

Esperanza. Asociado a *Quercus sp,* 16 octubre 2016, N 21º04'4.5'', O 101º13'03.2''. 2500 msnm.

Discusión

Hymenogaster niveus se distingue por lo blanco de su peridio, el peridio de 200 a 300 y de hasta 500 µm, hifas entrelazadas, Basidiosporas de 13–19 × 7–12 µm, (Montecchi y Sarasini, 2000), en contraste *H. niveus* (1720 ITCV) tiene un peridio de hasta 145 µm ancho notablemente más delgado de los reportado para *H. niveus*, así mismo, las esporas son ligeramente mayores llegando a la longitud de 20 y hasta 14 µm de ancho, con base en esto podríamos considerar dos posturas para nuestra colecta, primero las muestras amplían los parámetros considerados para *H. niveus*, o que pertenece a una criptoespecie afín a *H niveus* esto estaría en consonancia con Stielow *et al.*, 2011 quien propone que *H. niveus* contiene varias criptoespecies. Consideramos que ésta especie en particular necesitaría un estudio más profundo para poder hacer una sistemática y taxonomía más completa. Así mimo al observar el análisis filogenético, las colectas de este trabajo se agrupan con muestras solo identificadas a nivel de género y con diversas especies, esto nos habla de lo complejo del estudio de este género y en particular de *H. niveus*.

Conclusión

Podemos considerar que *H. niveus* (1623 ITCV) e *H. niveus* (1720 ITCV) pertenecen al complejo *H. niveus*, quedando por definirse como posible criptoespecie.

Género: *Aroramyces*

Una nueva especie de hipogeo de México: *Aroramyces guanajuatensis* sp nov, (*Hysterangiaceae*, *Hysterangiales*)

Análisis molecular

Se obtuvieron las secuencias de los fragmentos ITS y LSU de 12 muestras de *A. guanajuatensis.* Tabla 2.3. Las secuencias ITS y LSU son idénticas respectivamente. Basado en esto se eligieron solo cuatro secuencias para el análisis filogenético. Para esto se emplearon seis secuencias de *Aroramyces* y 22 de *Hysterangium,* Tabla 2.4. Después del análisis Bayesiano *A. guanajuatensis,* se agrupa como grupo mono filetico con una probabilidad posterior de 1. Figura 2.6, dando soporte al nuevo taxón.

Tabla 2.3 Lista de número de acceso NCBI de los fragmentos LSU e ITS de *Aroramyces guanajuatensis*

Especie, Número de herbario	LSU número NCBI	ITS número NCBI
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1689)	MK761021	MN392935
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1691)	MK761022	MN392936
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1694)	MK761023	MN392937
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1711)	MK761024	MN392938
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1610)	MK761025	MN392939
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1610)	MK811035	----------
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1613)	MK761026	MN392940
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1613)	MK811036	----------
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1729)	MK761027	MN392941
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1731)	MK761028	MN392942
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1734)	MK761029	MN392943
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1738)	MK761030	MN392944
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1739)	MK761031	MN392945
Aroramyces guanajuatensis (ITCV 1741)	MK761032	MN392946

Taxonomía

Aroramyces guanajuatensis **Peña-Ramírez, Guevara-Guerrero, Z. W. Ge y Martínez-González, sp. nov.**

Figuras 2.9 2.10 y 2.11.

Diagnosis

Aroramyces guanajuatensis se caracteriza por un peridio 167–240 µm ancho, con hifas algodonosas de hasta 170 µm longitud. Mesocutis, variable en su estructura. Subcutis amarillento, esporas con utrículo inflado e irregular.

Descripción.

Basidioma 4.4–17 × 3.9–13.5 × 3.2–11.2 mm, globoso, subgloboso a irregular, algunas veces comprimido cuando crecen juntos. Peridio, blanco a café claro, fibriloso o tomentoso, frecuentemente con parches algodonosos de hifas blancas, conteniendo restos de suelo, piedras hojas y raíces. Peridio separable y frágil, exponiendo porciones de gleba. < 0.5 mm ancho, mayormente hialina, la porción externa café claro con un anillo obscuro cerca de la gleba. Gleba café. Trama gelatinizada, lóculos irregulares columella dendroide, gris traslucido. Olor fungoide; sabor no registrado. Basidioma duro al secarse.

Peridio de tres capas, 165–240 µm de grueso. Epicutis 7.5–22.5 µm de grueso, hifas hialinas a café rojizas, de pared delgada, entrelazadas, postradas o erectas de 2–9 µm de ancho al septo, formando grupos dispersos cespitosos de hifas ramificadas, hifas setales de hasta 170 µm de largo, con abundantes estructuras cristalinas adheridas en las paredes celulares, fíbulas presentes. Mesocutis 55–105 µm de

ancho, células hialinas, isodiamétricas, globosas a subglobosas, pseudoparénquima angular. 4–35 × 3–24 µm, algunas irregulares, hifas entrelazadas, 3–11 µm de ancho pared celular 1–2 µm, fíbulas ausentes. Subcutis 22.5–95 µm de ancho de hifas postradas entrelazadas, 3–4 µm de ancho con grandes células pseudoparenquimatosas dispersas, de hasta 37.5 × 30 µm, fíbulas ausentes.

Tabla 2.4 Lista de especies de *Aroramyces* e *Hysterangium*, números de acceso de GenBank, y referencias para las secuencias LSU usadas en análisis filogenético.

Especie	GenBank	Referencia
Aroramyces balanosporus G. Guevara y Castellano	MK811031	Este documento
A. guanajuatensis	MK761024	Este documento
A. guanajuatensis	MK811036	Este documento
A. guanajuatensis	MK811035	Este documento
A. guanajuatensis	MK761031	Este documento
A. gelatinosporus (J.W. Cribb) Castellano	DQ218524	Hosaka *et al.,* 2008
A. radiatus (Lloyd) Castellano, Verbeken y Walleyn	DQ218525	Hosaka *et al.,* 2008
Aroramyces sp.	KY686203	Nuske y Abell sin publicar
Aroramyces sp.	DQ218527	Hosaka *et al.,* 2008
Aroramyces sp.	DQ218530	Hosaka *et al.,* 2008
Hysterangium aff.ine Mase y Rodway	DQ218546	Hosaka *et al.,* 2008
H. album Zeller y C.W. Dodge	DQ218490	Hosaka *et al.,* 2008
H. aureum Zeller	DQ218491	Hosaka *et al.,* 2008
H. calcareum R. Hesse	DQ218492	Hosaka *et al.,* 2008
H. clathroides Vittad	AF213121	Humpert *et al.,* sin publicar
H. coriaceum R. Hesse	AF213122	Humpert *et al.,* sin publicar
H. coriaceum R. Hesse	AY574686	Giachini *et al.,* 2010
H. crassum (Tul y C. Tul) E, Fisch	AY574687	Giachini *et al.,* 2010
H. epiroticum Pacioni	DQ218495	Hosaka *et al.,* 2008
H. fragile Vittad	DQ218496	Hosaka *et al.,* 2008
H. hallingi Castellano y J.J. Muchovej	DQ218497	Hosaka *et al.,* 2008
H. inflatun Rodway	DQ218549	Hosaka *et al.,* 2008
H. membranaceum Vittad	DQ218498	Hosaka *et al.,* 2008
H. neotunicatun Castellano y Beever	DQ218550	Hosaka *et al.,* 2008
H. pompholyx Tul. y C. Tul.	DQ218499	Hosaka *et al.,* 2008
H. rugisporum Castellano y Beever	DQ218500	Hosaka *et al.,* 2008
H. salmonaceum G.W. Beaton, Pegler y T.W.K. Young	DQ218501	Hosaka *et al.,* 2008
H. separabile Zeller	DQ974810	Smith *et al.,* 2007
H. separabile Zeller	DQ218502	Hosaka *et al.,* 2008
H. spegazzinii Castellano y J.J. Muchovej	DQ218503	Hosaka *et al.,* 2006
H. stoloniferum Tul. y C. Tul.	AF336259	Binder y Bresinsky 2002
H. strobilus Zeller y C.W. Dodge	DQ218504	Hosaka *et al.,* 2006

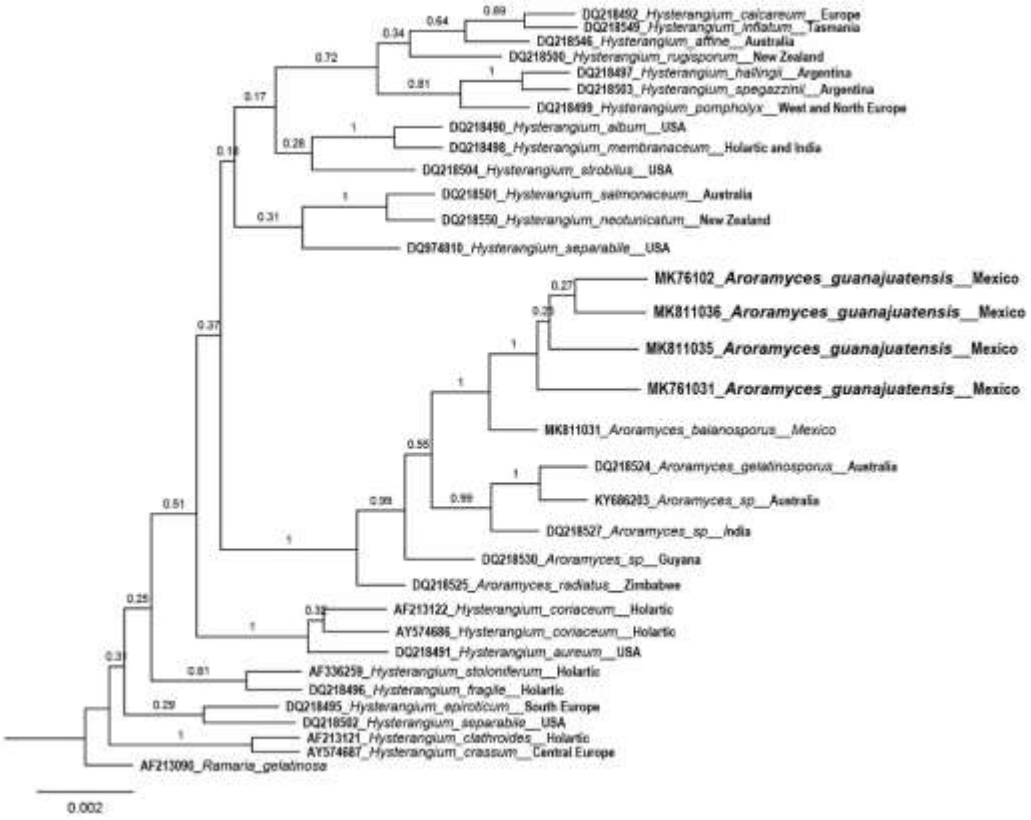

Figura 2.8. Filograma de máxima probabilidad mediante el análisis Bayesiano. Para *Aroramyces* e *Hysterangium*.

Trama, hifas entrelazadas hialinas, 4 µm de ancho, embebidas en una matriz gelatinosa, fíbulas presentes. Basidia fusoide a clavada, hialina, 14–48 × 9–12 µm, promedio = 32.5 × 10.3 µm, pared celular 1 µm ancho. Basidiosporas elipsoides a ampliamente elipsoides, simétricas, hialinas café claro, ligeramente rojizas en KOH, café claro en masa, excluyendo el utrículo 9–13 × 6–7 µm, promedio = 11 × 6.1 µm, Q = 1.5–2.17, Q promedio = 1.8; con utrículo 12–17 × 7–10 µm, promedio = 14.47 ×

8.27 µm, Q = 1.5–2.13, promedio = 1.76. Ornamentación; crestas irregulares contenidas dentro del utrículo inflado, apéndice hilar de apariencia rectangular en sección transversal, 1–3 × 4–6 µm, promedio = 1.97 × 5.2 µm. Ápice obtuso. Utrículo inflado de hasta 3 µm, promedio = 1.43 µm, ocasionalmente el utrículo es asimétrico.

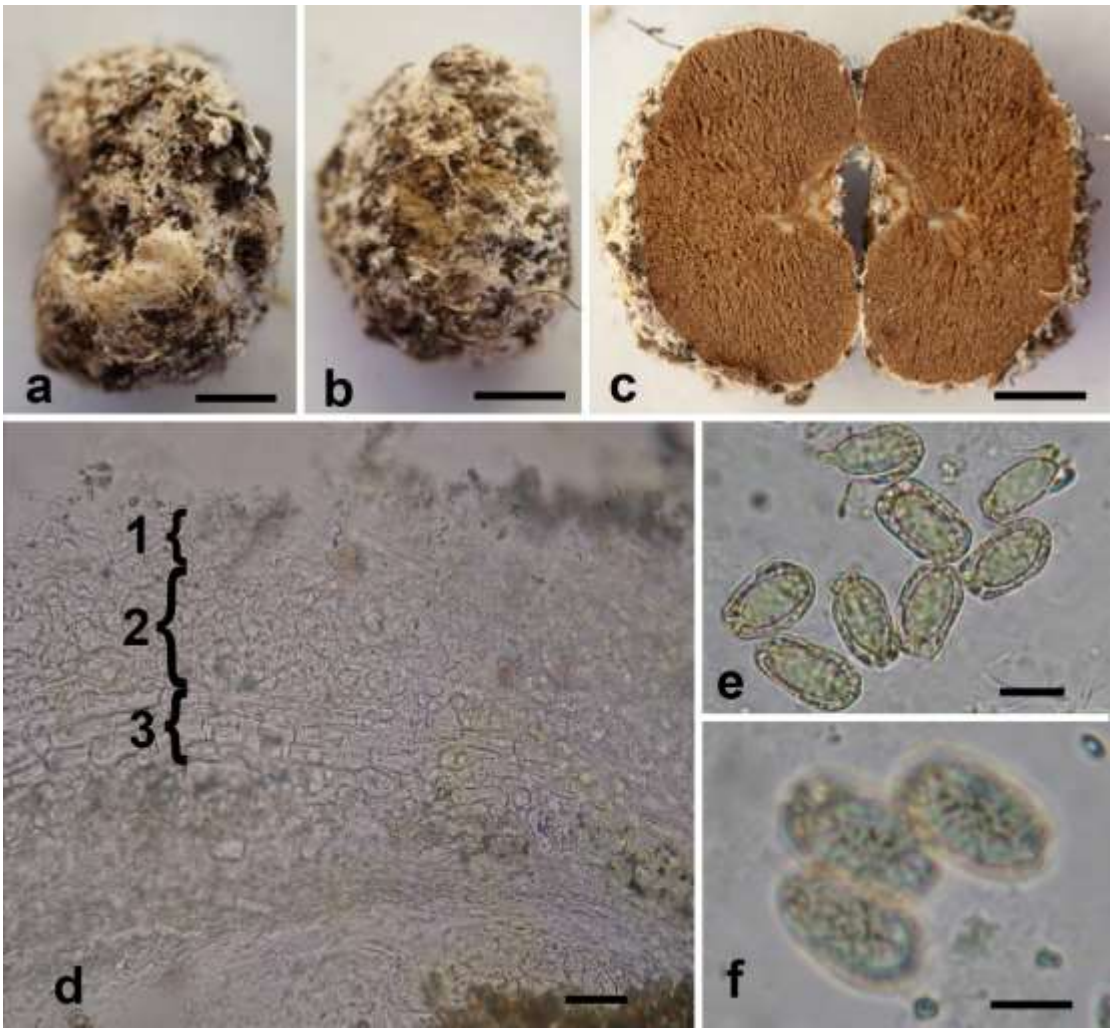

Figura 2.9. *Aroramyces guanajuatensis* (holotipo ITCV 1613): a y b Basidioma mostrando la superficie del peridio (bar = 0.5 cm). c) Basidioma sección transversal mostrando la gleba (bar = 0.5 cm), d) Sección transversal del peridio de tres capas del peridio (1 epicutis, 2 mesocutis, 3 subcutis) a 400x (bar = 20 µm). e-f basidiospora 1000x (bar = 5 µm), f) crestas irregulares contenidas dentro del utrículo inflado.

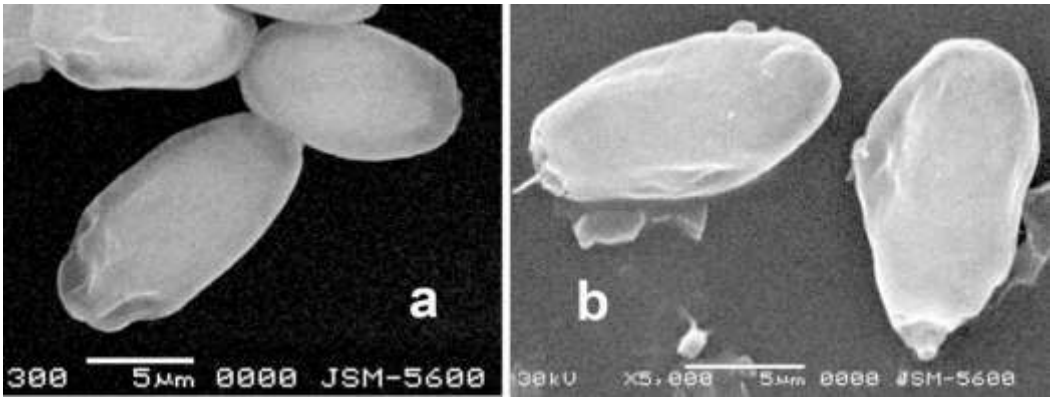

Figura 2.10. SEM. a) *Aroramyces balanosporus* (848I TCV) y b) *Aroramyces guanajuatensis* (1739 ITCV) bar = 5 µm.

Material examinado. México, estado de Guanajuato, Guanajauto, Área Natural Protegida Cuenca de la Esperanza: N 21°04.075', W 101°13.193', 2500 m, 26 octubre 2016, paratipo (1610 ITCV). N 21°03891', W 101°13.531', 2457 m, 5 octubre 2016, (1689 ITCV). N 21°03.891', W 101°13.533', 2464 m, 5 octubre 2016, (1691 ITCV). N 21°03.88', W 101°13.561', 2471 m, 5 octubre 2016, (1694 ITCV). N 21°03.85', W 101°13.278'. 2533 m, 19 octubre 2016 (1711 ITCV). N 21°03.741', W 101°13.461'. 2500 m, 14 noviembre 2016, (1729 ITCV). N 21°03.901', W 101°13.551'. 22 diciembre 2016, (1738 ITCV). N 21°03.905', W 101°13.018'. 2458 m. 22 diciembre 2016, (1739 ITCV). N 21°04.045', W 101°13.018'. 2508 m, 6 marzo 2017, (1741 ITCV).

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato. Área Natural Protegida Cuenca de la Esperanza. Hipogeo, bajo *Quercus* sp. a 2530 msnm. N 21º03.87', O 101º13.193'. Octubre a diciembre. La colecta de marzo estaba seca al ser hallada.

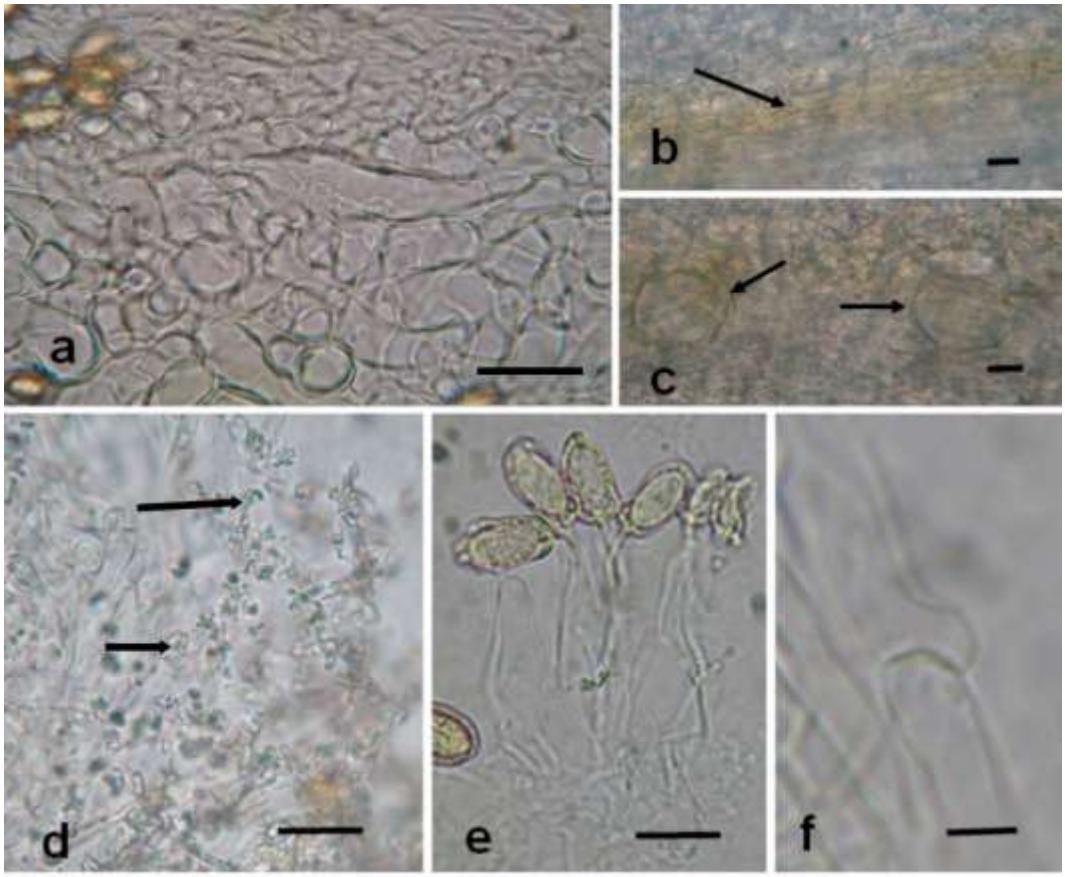

Figura 2.11. *Aroramyces guanajuatensis,* holotipo (ITCV 1613) a–f. Peridio sección transversal a–c (barra = 10 µm). a) Epicutis de hifas postradas. Mesocutis, pseudoparenquima angular b) Subcutis la flecha señala las células postradas. c) Subcutis con células grandes isodiamétrias dispersas (flecha). d) Hifas con cristales adheridos (barra = 25 µm), f) Basidia y basidiolos (barra = 10 µm), f) Fíbulas del epicutis, (bar = 5 µm).

Discusión

En el análisis Bayesiano las especies de *Aroramyces* anidan juntos y se les añaden varias especies no descritas mencionadas por Nuske y Abell (sin publicar) y por Hosaka *et al.,* (2008). El clado del género *Aroramyces* segrega entre dos clados de grupos de especies de *Hysterangium*. La proximidad del *Aroramyces* e

Hysterangium, está en concordancia con Hosaka *et al.,* (2006, 2008). *Aroramyces balanosporus* y *A. guanajuatensis* están estrechamente relacionadas, pero difieren tanto molecular como morfológicamente. Figura 2.9. El resultado da un claro soporte para considerar *Aroramyces guanajautensis* como una especie independiente, con una probabilidad posterior de 1.

El apéndice hilar es mayor en *Aroramyces guanajuatensis* comparado con *A. balanosporus*. Las células isodiamétricas del mesocutis de *A. guanajuatensis* difieren de *A. balanosporus* cuyo mesocutis posee células con formas diversas. El utrículo asimétrico de *Aroramyces herrerae* de hasta 6 µm de ancho difiere de *A. guanajuatensis* que rara vez llega a los 3 µm de ancho. Los tres *Aroramyces* mexicanos están relacionados con *Quercus* sp. Interesantemente *A. radiatus* de África tiene esporas más pequeñas 10–12(–13.5) × 6–7(–8) µm, y está asociado a *Brachystegia spiciformis* (*Caesalpinioideae*) y a *Upaca* sp. (*Euphorbiaceae*). Por otro lado, la espora de *Aroramyces gelatinosporus* de Australia tiene tamaño similar pero el peridio es de una sola capa y está asociado con *Eucalyptus* sp. (*Mirtaceae*) (Castellano *et al.,* 2000; Lloyd 1925).

Género: *Hysteranguim:* Vittadini 1831

Hysterangium sp. 1. 1508 ITCV

Figs. 2.12, 2.13

Diagnosis

La colecta *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) es caracterizada por su combinación única de color rosa pálido al trato, peridio de tres capas de 160–257 µm de ancho, epicutis embebido en una secreción gomosa que es muy característica. Basidiosporas diminutamente verrugosas. 10–15 × 5–7 µm.

Descripción

Basidioma 14–18 × 9–14 mm de diámetro, globoso a subgloboso, blanco en fresco y color rosa pálido al trato, superficie lisa. Gleba verde oscuro, lóculos pequeños a grandes, de forma irregular, vacíos. Rizomorfos único o múltiples, grueso, concolor con el peridio, unido a la base. Columella gelatinosa, delgada, dendroide, gris translúcida. Olor no registrado. Sabor no registrado.

Peridio fácilmente separable de la gleba,160–257 µm ancho, promedio 196.7. Tricapa. Epicutis 10–82.5 µm ancho, promedio 31.25, células café dorado 5–17 × 4–10 promedio 11.1 × 5.8, embebido en una secreción gomosa, pared celular delgada. Mesocutis 52.5–165 µm ancho, promedio 106.25, de células pseudoparenquimatosas hialinas 6–41 × 4–14 µm, promedio 14 × 8.3, pared celular 1–2 µm ancho. Subcutis 35–97.5 µm grueso, promedio 59.25, hifas densamente entrelazadas periclinales, café dorado, 2–10 µm de diámetro, fíbulas ausentes.

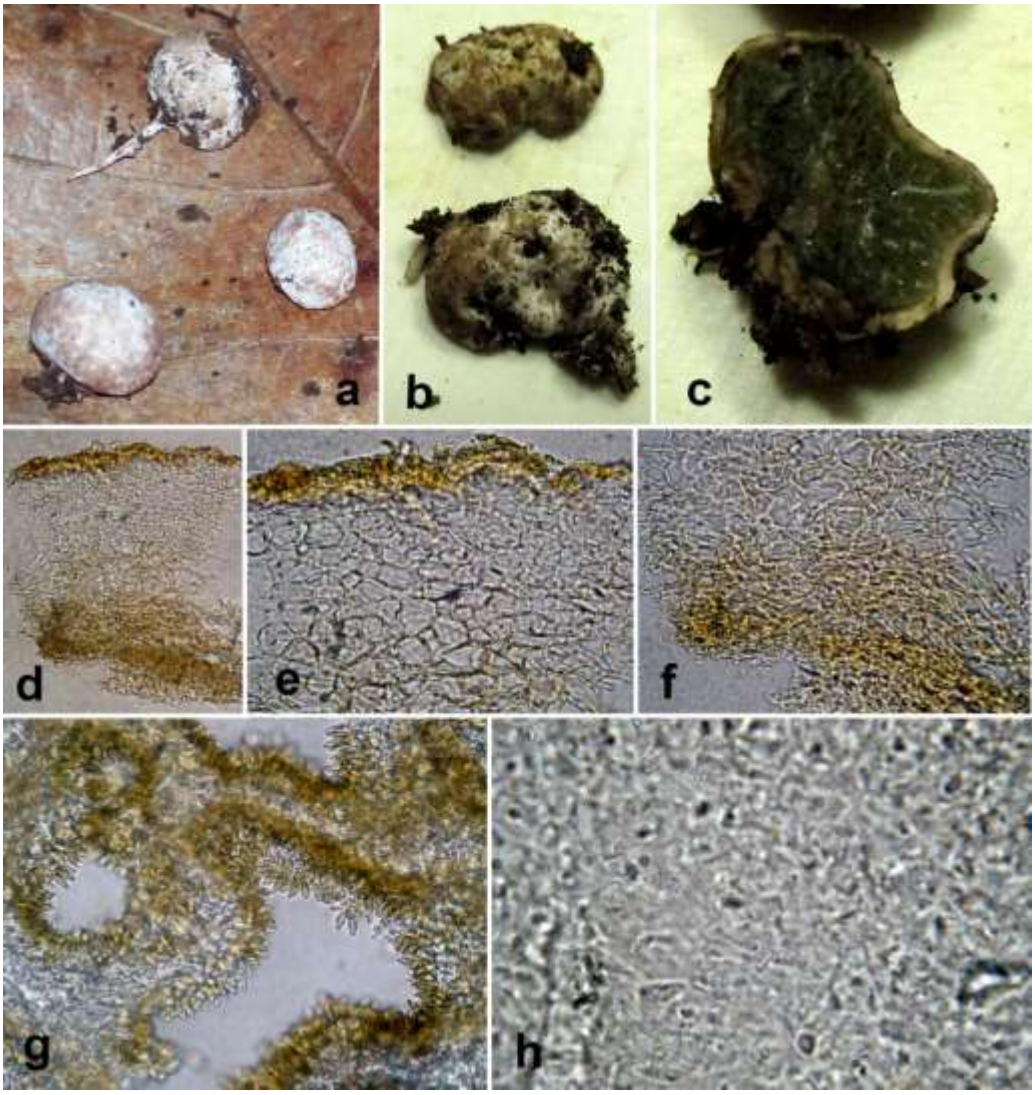

Figura 2.12. *Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV). Basidioma y tejido. a) Basidiomas. b) Basidioma con cambio de color con el trato. c) Gleba verde con lóculos. d) Peridio 400 x. e) Epicutis 1000 x. f) Subcutis 1000 x. g) Gleba 400 x. h) Gleba 1000 x.

Trama 55–600 µm ancho, promedio 244. Con hifa hialina, gelatinizada, compacta entrelazada, fíbulas ausentes. Basidia clavada, hialina, con cuatro esporas, frecuentemente colapsada 26–47.5 × 5–9 µm, promedio 35.3 × 6.15. Basidiosporas diminutamente verrugosas 10–15 × 5–7 µm, promedio 12.9 × 5.7, fusoide, ápice

papilado, base pedicelada, pared de la espora menor a 1 µm, utrículo distinto, arrugado, en KOH olivo claro, café amarillento en masa.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo en suelo y mantillo, gregario. asociado a *Quercus sp*., N 21º03', O 101º13, 2500 msnm, septiembre.

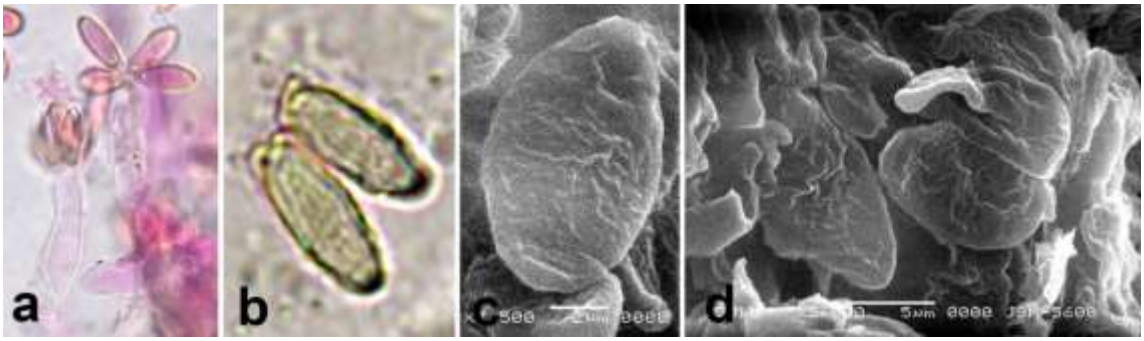

Figura 2.13. *Hysterangium* sp. 1 (1508 ITCV). Basidia y espora. a) Basidia clavada, 100 x. b) Espora, 100 x. c) Microscopia electrónica de barrido espora. d) Microscopia electrónica de barrido espora en masa.

Discusión

Hysterangiun sp. 1 (1508 ITCV) es blanco, similar a *H. coriaceum* y *H. rhodocarpum*, pero difiere en que se mancha con el trato, ya que *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) es rosa pálido a diferencia de *H. coriaceum* y *H. rhodocarpum* que se manchan de colores intensos, *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) es tricapa a diferencia de los anteriores que solo poseen dos capas, es importante remarcar que el epicutis está embebido en una secreción gomosa muy característica. Por otro lado, el peridio de *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) de 160–257 µm de ancho, es más delgado que el peridio de *H. coriaceum* 300–450 µm and *H. rhodocarpum* 440–540 µm, respecto a la espora del mterial estudiado difiere de *H. coriaceum* y *H. rhodocarpum* ya que

estas dos últimas tienen espora lisa a diferencia de nuestra colecta que es diminutamente verrugosa, así mismo *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) difiere en el tamaño de la espora 10–15 × 5–7 µm, ya que tiene un rango más amplio que *H. coriaceum* 11–14 × 4–5 y *H. rhodocarpum* 12–13 × 4.5–5, (Castellano 1990).

Conclusión

Los datos presentados nos permiten considerar a *Hysterangiun* sp. 1 (1508 ITCV) como una posible especie nueva para la ciencia.

Hysterangium sp. 2. (1699 ITCV)

Figs. 2.14, 2.15.

Diagnosis

Hysterangium sp. 2 (1699 ITCV) es caracterizada por la combinación única de un peridio monocapa de 272–297µm de ancho, con una espora diminutamente verrugosa 12–17 × 5–7 µm.

Descripción

Basidioma 3.6–16.1 × 2.3–14.6 × 2–12 mm, promedio 7.42 × 6.71 × 5.76 globoso a subgloboso depresión basal, blanco en fresco, al trato se torna café claro, superficie lisa. Gleba blanca cuando inmadura, tornándose verde claro al madurar, lóculos 0.1–3.5 × 0.1–1 mm de forma irregular, vacíos, rizomorfos únicos a numerosos, hasta de 0.8 mm en la base, grueso, concolor con el peridio, unido a la base. Columella gelatinosa, delgada, dendroide, gris translúcida. Olor ligeramente ácido. Sabor no registrado. Peridio fácilmente separable de la gleba, 272–297µm

grueso, promedio 285.8, células entrelazadas, una pequeña capa exterior color amarillo brillante, las células del interior son hialinas, 5–9 µm de diámetro, promedio 6.5, pared celular delgada, fíbulas ausentes.

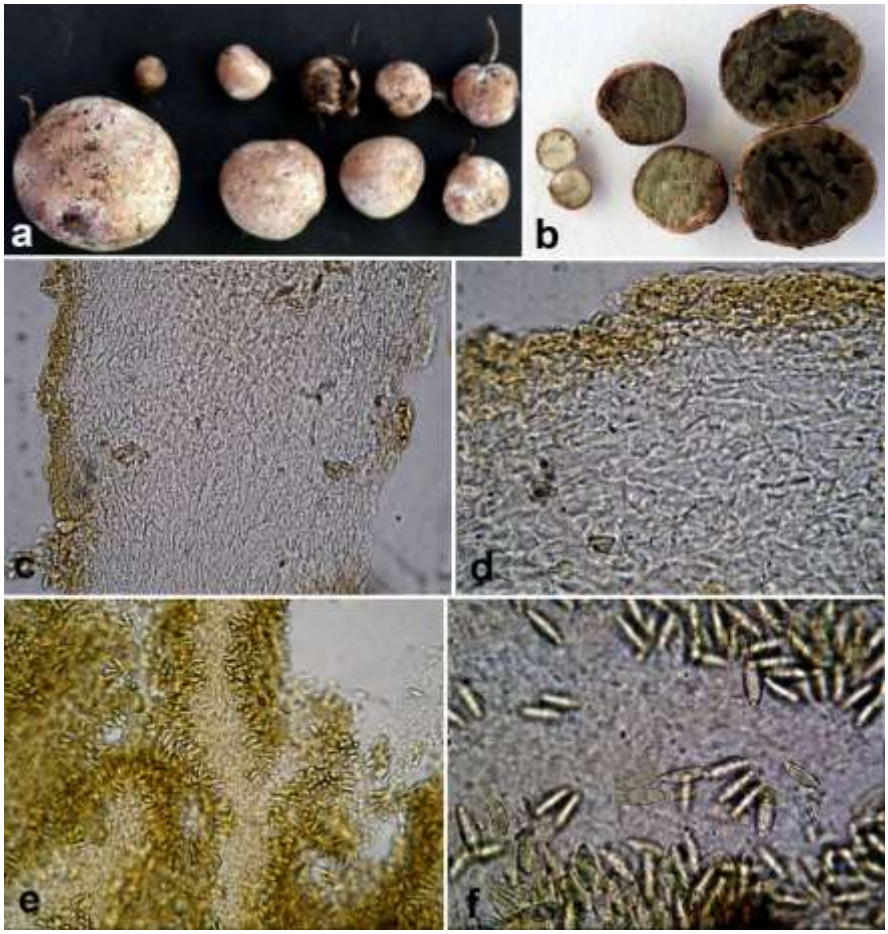

Figura 2.14. *Hysterangium* sp. 2, (1699 ITCV), Basidioma y tejido. a) Basidioma varios tamaños. b) Gleba blanca inmaduro, a verde en la madurez. c) Peridio 400 x. d) Peridio 1000 x. e) Gleba 40 x. f) Gleba 1000 x.

Trama 32.5–162.5 µm ancho, promedio 67, con hifas muy estrechamente entrelazadas, hialinas gelatinizadas, pared celular delgada, fíbulas ausentes. Basidia con dos esporas, evanescente. Espora, sin apéndice hilar 11–17 × 5–7 µm, promedio 13.9 × 5.8, con apéndice hilar 12–17 × 5–7 µm, promedio 15.3 × 5.8,

diminutamente verrugosa, fusoide, apéndice hilar 1–2 µm, ápice papilado, pared celular delgada, en KOH color olivo claro en solitario y café amarillento en masa.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuenca de la Esperanza, Hipogeo en suelo y mantillo, gregario, asociado a *Quercus sp*. N 21º03.9', O 101º13.35', 2500 msnm, octubre.

Discusión

La colecta *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV) con un peridio monocapa es similar a *H. membranaceum* y a *H. strobilus*, pero el peridio de 1699 ITCV con 272–297 µm de grosor, es más grueso que el de *H. strobilus* 100–200 µm grueso.

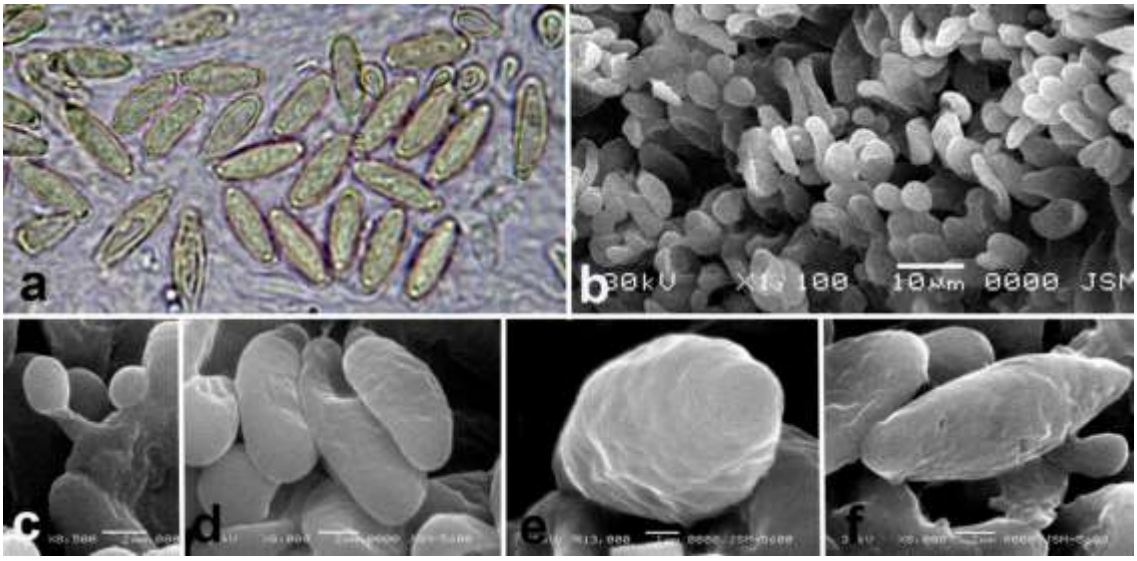

Figura 2.15. *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV), Basidia y espora. SEM; b - f. a) Espora en masa, 1000 x. b) Espora en masa. c) Basidia con dos esporas. d) Esporas agrupadas. e) Espora vista superior. f) Espora vista lateral.

Por otro lado la espora de *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV) es diminutamente verrugosa, mientras que las esporas de *H. membranaceum* y *H. strobilus* poseen

verrugas de mayor tamaño, el tamaño de la espora de *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV) 12–17 × 5–7 µm es cercano al de *H. estrobilos* 12–17 (–18) × 5–6 µm, pero la espora de *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV) es menor que la de *H. membranacea* 15–18 (–20) × 6–7 (–8) µm, (Castellano 1990).

Conclusión

Los datos presentados nos dan la evidencia suficiente para considerar a *Hysterangium* sp. 2 (1699 ITCV) como una posible especie nueva para la ciencia.

Hysterangium sp. 3 (1704 ITCV)

Diagnosis

Figura 2.16, 2.17

La colecta *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) está caracterizada por la combinación única de un peridio de tres capas de 272.5–512.5 µm de grosor. Epicutis 57.5–200 µm de grueso, hifas entrelazadas café claro. Mesocutis 150–167.5 µm ancho, células pseudo-parenquimaticas hialinas. Subcutis 22.5–175 µm de ancho, con hifas entrelazadas café claro y espora de 11–16 × 5–8 µm.

Descripción

Basidioma 7.9–19.4 × 6.3–14.5 × 5.6–12.5 mm, promedio 14.2 × 11.9 × 10.6, globoso a subgloboso con una depresión basal, blanco en fresco, cambia a café claro con el trato, superficie lisa aterciopelada. Gleba café, muy compacta, cámaras vacías, lóculos pequeños 0.1–10.1–0.5 mm, irregulares. Rizomorfos numerosos, blancos filiformes, unidos a la base, en ocasiones distribuidos en el basidioma.

Columella gelatinosa, delgada, dendroide, gris traslúcida. Olor no registrado. Sabor no registrado.

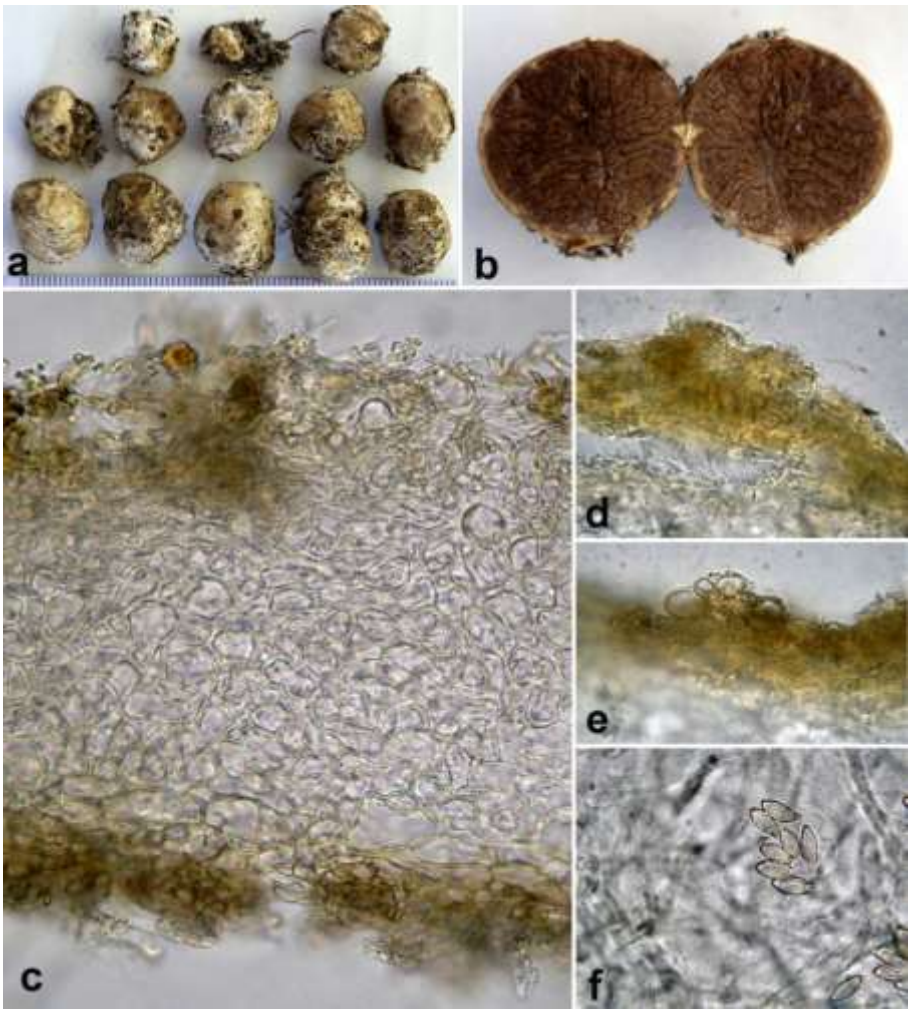

Figura 2.16. *Hysteranguim* sp. 3, (1704 ITCV) Basidioma, gleba y tejido. a) Basidioma varios tamaños b) Gleba café c) Peridio de tres capas 400 x. d) Epicutis 1000 x e) Epicutis células globosas. 1000 x. f) Trama 1000 x.

Peridio fácilmente separable de la gleba 272.5–512.5 µm ancho, promedio 383.9, tres capas. Epicutis 57.5–200 µm ancho, promedio 113.5, pared celular delgada, hifas entrelazadas, café claro, 3–5 µm de diámetro, promedio 3.8, hifa proyectada

hacia el exterior, fíbulas ausentes. Mesocutis 150–167.5 µm ancho, promedio 158.5, hialino, células pseudoparenquimáticas 5–23 × 6–32 µm, promedio 13.3 × 19.2, pared celular 1–2 µm de grueso. Subcutis 22.5–175 µm ancho, promedio 112, pared celular delgada, hifas entrelazadas, café claro, células de 3–12 µm de diámetro, promedio 5.3, fíbulas ausentes

Trama 42.5–287.5 µm ancho, promedio 133.5, con hifas estrechamente entrelazadas hialinas, gelatinizadas 1–5 µm de diámetro, promedio 3.2, fíbulas ausentes. Basidia evanescente.

Espora 11–16 × 5–8 µm, promedio 13.7 × 6.4, fusoide, lisa, ápice papilado apéndice hilar 1 µm, pared de la espora 1 µm ancho, utrículo presente, sola color olivo claro, café amarillento en masa.

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajuto, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo en suelo y mantillo, gregario, sociado a *Quercus sp*., N 21º03.95', O 101º13.35', 2500 msnm octubre.

Discusión

La colecta *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) es similar a *H. occidentale*, *H. ochraceogleba* y *H. album* pero su basidioma 7.9–19.4 × 6.3–14.5 × 5.6–12.5 mm es más pequeño que *H. occidentale* que puede llegar hasta 6 cm, *H. ochraceogleba* presenta pocos y pequeños rizomorfos y *H. album* carece de ellos, contrariamente *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) tiene numerosos rizomorfos al igual que *H. occidentale*.

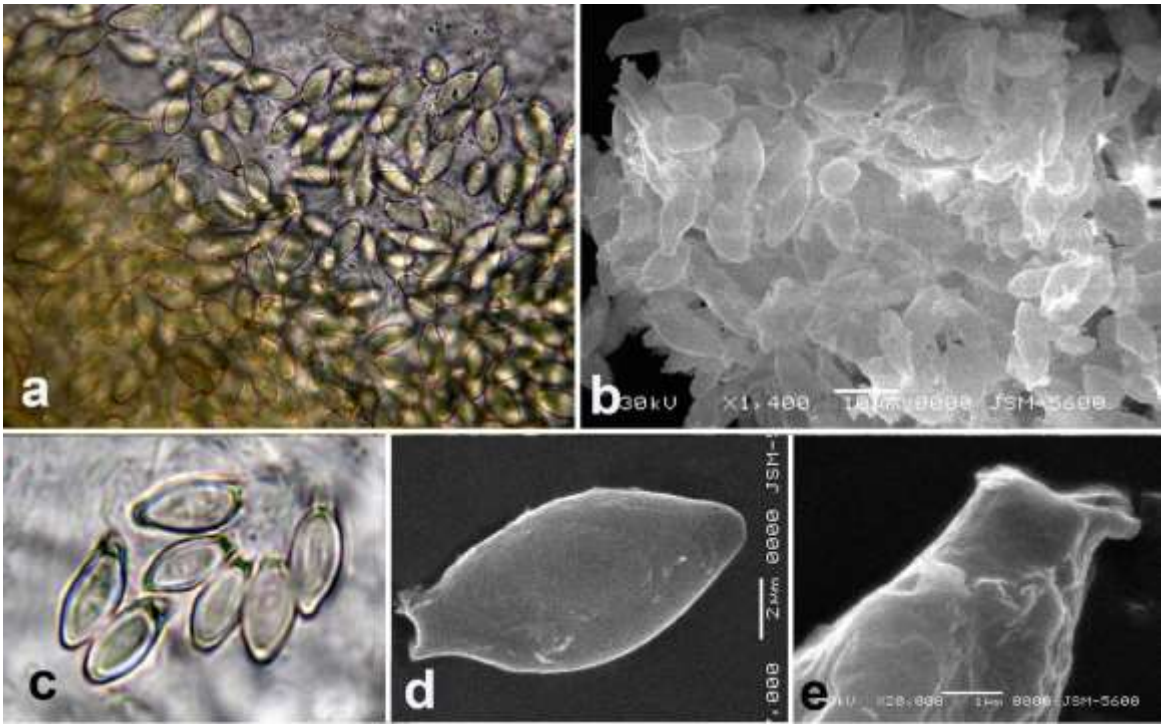

Figura 2.17. *Hysteranguim* sp. 3, (1704 ITCV)), espora microscopia óptica (a y c) y SEM b, d y e. a) Esporas en masa. b) Espora masa. c) Espora pared celular verde olivo y apéndice hilar pequeño. d) Espora vista lateral. e) Acercamiento de la espora, apéndice hilar cubierto con el perisporeo.

El peridio monocapa de *H. ochraceogleba* 300–400 µm ancho, y *H. album* 100–200 µm grueso es claramente distinto y más delgado que el de *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) cuyo peridio es tricapa 272.5–512.5 µm de ancho, pero resulta más delgado que el peridio de dos capas de *H. occidentale* 380–770 µm de ancho, por lo que es importante hacer notar que el hecho que la colecta *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) posee un peridio de tres capas con células externas cafés hialinas en el mesocutis y cafés en la porción interna lo hace diferente de cualquier otro, (Castellano, 1990). Sin embargo, la espora de *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) que mide11–16 × 5–8

µm tiene dimensiones similares a *H. ochraceogleba* 12–15 (–19) × 5.5–7 µm, *H. album* 17–20 × 6–7 µm, *H. occidentale* 12–16 (–19) × 5–7(–8) µm.

Conclusión

Las características presentadas por la colecta *Hysterangium* sp. 3 (1704 ITCV) nos lleva a concluir que es una posible especie no descrita anteriormente.

Género: *Gautieria* Vittadini 1831

Gautieria magnicellaris (*Gomphaceae, Gomphales*)

En un trabajo de colecta de un año con 4 visitas por mes solo se encontró un basidioma de *Gautieria magnicellaris* (Pilát) Stewar y Trappe.

En el análisis filogenético la muestra *Gautieria* sp. (1716 ITCV) se agrupa con *G. magnicellaris* número NCBI AF377058, con 1 de probabilidad posterior. Figura 2.18.

Descripción

Figura 2.18, 1.19.

Basidioma subgloboso 13.9 × 12.6 × 11.5 mm. Peridio evanescente exponiendo los lóculos ocres a café. Gleba café, columella ramificada blanca grisácea, lóculos de hasta de 3 mm de diámetro. Basidiospora subglobosa, ampliamente elipsoide a elipsoide, (15) 18 – 24 × 11 – 16 (19) µm promedio 20.63 × 13.53 µm, incluyendo apéndice hilar y perisporeo de 1 – 3 µm ancho con 10 a 13 crestas longitudinales; apéndice hilar de 4 µm en la base, Amarillo café. Basidia clavada 40 – 60 × 15 – 18 µm, hialina, pared celular delgada. Trama incluyendo himenio 157.5 – 425 µm ancho, promedio 248 µm, hifas entrelazadas, hialinas 3 –7 diámetro. pared celular delgada.

Distribución hábitat, ecología; Estado de Guanajuato, Guanajuato, ANP Cuneca de la Esperanza Solitario bajo Quercus sp., 2500 msnm 1716 ITCV N 21º 03' 55.1", O 101º 13' 15.6", 24 de octubre 2016.

Tabla 2.5. Número de acceso de las secuencias de ITS empleadas para este análisis recuperadas del NCBI para el género *Gautieria.*

Especies	Número NCBI	Referencia
G. caudata	AF377057	Bidartondo y Bruns 2002
G. caudata	AY558750.1	Izz *et al.,* 2004 NCBI
G. chilensis	AF377069	Bidartondo y Bruns 2002
G. crispa	DQ974732.1	Smith *et al.,* 2007
G. gautierioides	AF377062	Bidartondo y Bruns 2002
G. graveolens	FN666413	Camele and Rana 2010 NCBI
G. graveolens	JF908017	Osmundson et al., 2013
G. magnicellaris	AF377058	Bidartondo y Bruns 2002
G. magnicellaris 1716 ITCV	**MK909905**	Este documento
G. monticola	AF377076.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377078.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377079.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377087.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377091.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377101.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. monticola	AF377105	Bidartondo y Bruns 2002
G. morchelliformis	AF377067	Bidartondo y Bruns 2002
G. otthii	AF377072	Bidartondo y Bruns 2002
G. otthii	AF377073	Bidartondo y Bruns 2002
G. pterosperma	AF442137.1	Bidartondo y Bruns 2002
G. pterosperma	JN022504.1	Frank y Southwort 2011 NCBI
G. xinjiangensis	JX860192	Bau Liu 2012 NCBI
G. xinjiangensis	NR_153450	Bau Liu 2012 NCBI
Gautieria sp.	AF377056	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377060	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377061	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377063	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377064	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377065	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377068	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377070	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377071	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377085	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377102	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377104	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	AF377106	Bidartondo y Bruns 2002
Gautieria sp.	DQ365642	Dunham et al., 2007
Gautieria sp.	JN022505	Frank y Southwort 2011 NCBI
Gautieria sp.	JN022506	Frank y Southwort 2011 NCBI
Gautieria sp.	KY462409	Truong *et al.,* 2017
Gautieria sp.	KY462601	Truong *et a.,* 2017
Gautieria sp.	KY462630	Truong *et al.*, 2017
Gautieria sp.	MG773849	Matheny et al., 2017 NCBI
Gautieria sp.	MH930304	Mujic y Smith 2018 NCBI
Gautieria sp.	MK607602	Russell Grootmyers 2019 NCBI

Ramaria botrytis	AF377055.1	Bidartondo y Bruns 2002

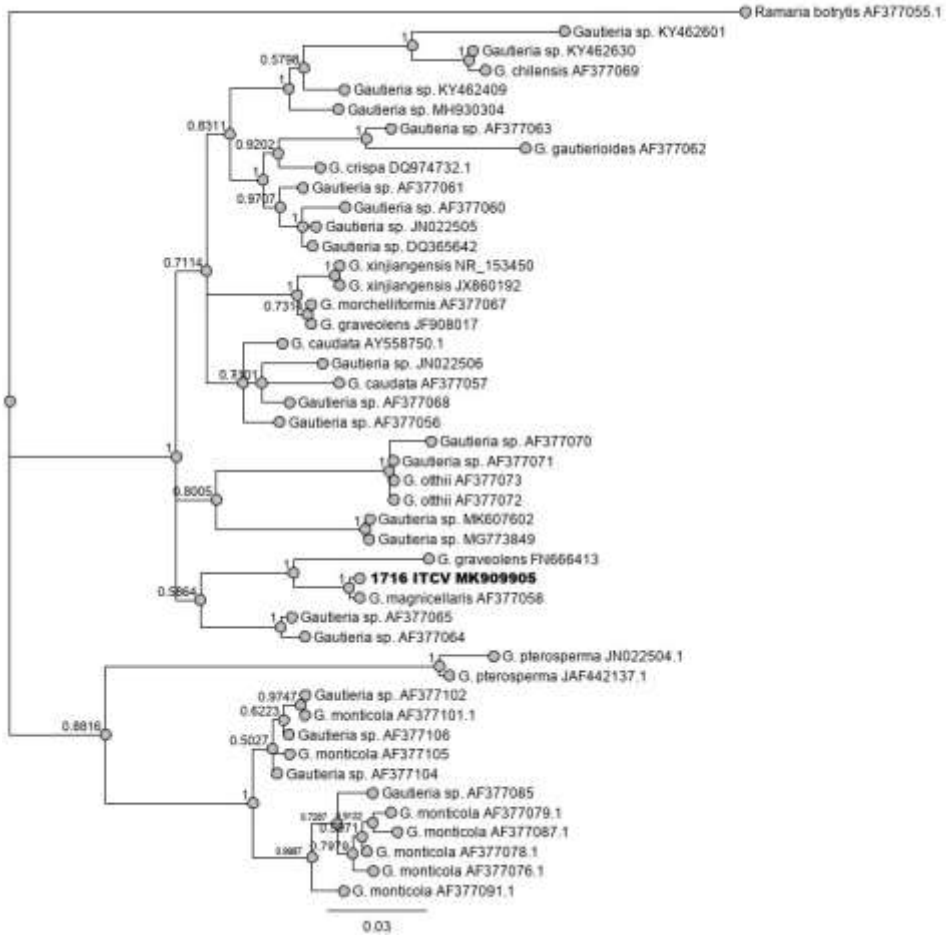

Figura 2.18. Árbol filogenético del género *Gautieria*, generado con el método de Mr. Bayes en el cual *Gautieria magnicellaris* (1716 ITCV), se agrupa con *G. magnicellaris*, confirmando la identidad de la muestra.

Discusión

Pilát (1953) lo reporta como una especie muy escasa, en nuestro trabajo encontramos datos similares ya que de 134 colectas solo se obtuvo un basidioma. Las esporas encontradas en este trabajo (15) 18 – 24 × 11 – 16 (19) µm, promedio 20.63 × 13.53 µm son más cortas que la mencionadas por Cazares *et al.,* 1992, 21

– 29 × 12 – 15.5 µm pero son más anchas lo que amplía la morfoclasificación de la mismas hasta subglobosas para esta especie.

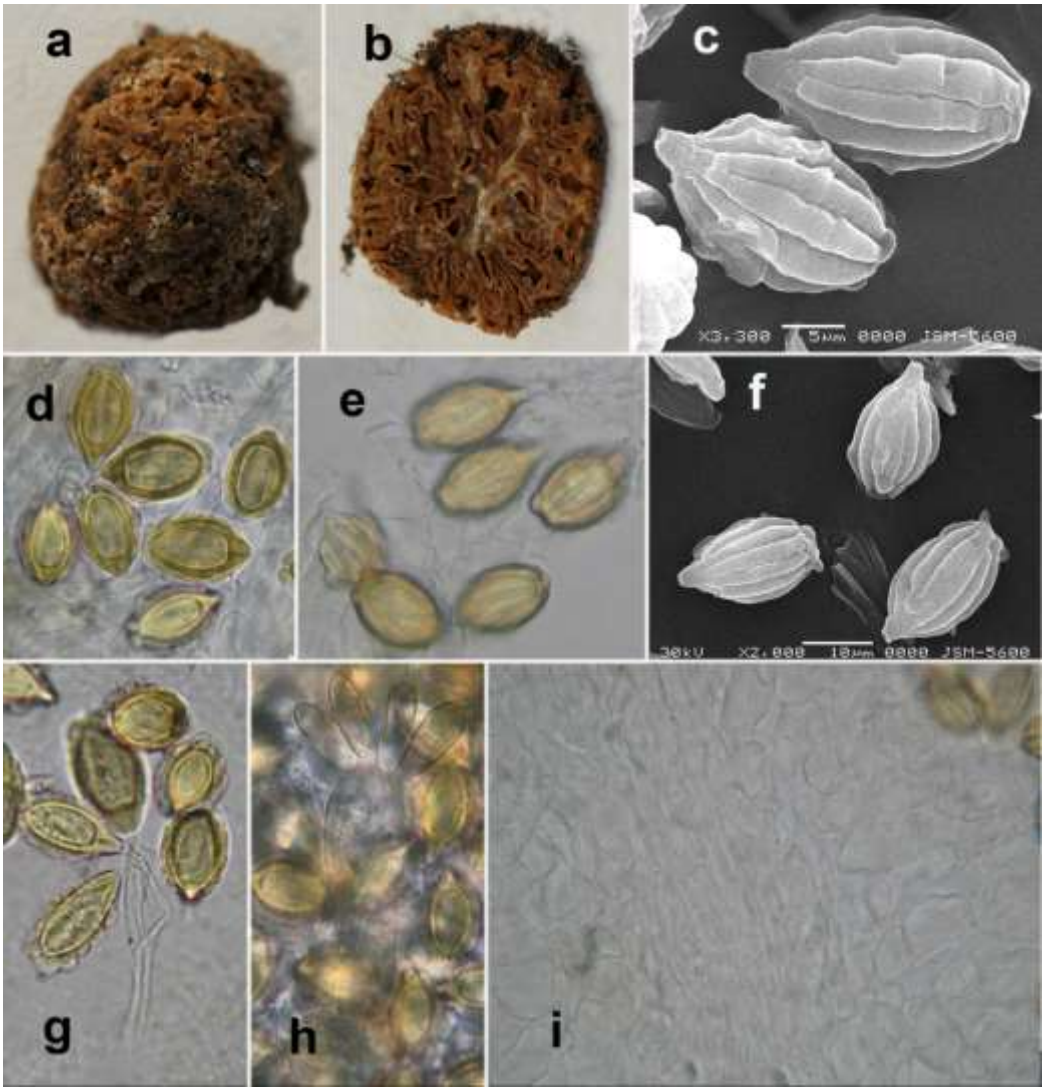

Figura 2.19. *Gautieria magnicellaris* (1716 ITCV), Basidioma, basidia, espora, trama. a) Basidioma mostrando el peridio evanescente. b) Gleba café. c) SEM, espora. d) Espora 1000 x. e) Espora mostrando las quillas longitudinales, 1000 x. f) SEM, espora. g) Basidia 1000 x. h) Basidiola 1000 x. i) Trama 1000 x.

También las esporas de *Gautieria* sp. (1716 ITCV) son más cortas que las descritas por Pilát (1953) 20–25 (27) x 13—14 µm. Stewart (1974) menciona que las cámaras

de hasta 10 mm de largo son un caracter consistente a diferencia de él nuestra muestra se acerca más a los datos reportados por Pilát (1953) con lóculos de 4–8 x 3–4 mm, mientras que *Gautieria* sp. (1716 ITCV) presenta lóculos de hasta 3 mm diámetro.

Conclusión

Los datos nos permiten concluir que *G. magnicellaris* está presente en la Sierra de Santa Rosa, Guanajuato y hasta el momento éste reporte es el más austral para *G. magnicellaris*.

Género: *Arcangeliella* Cavara 1900

El género *Arcangeliella* fue acuñado por Cavara y fue nombrado en honor al botánico italiano G. Arcangeli, las características principales son; hongos hipogeos, frutos tuberiformes irregulares, subagaricoides, alveolados a gleba sublamelada, estípite, columella, hifas laticíferas, esferocistos en el peridio y en el contexto. Esporas heterotrópicas y balitosporas, (Montechi y Sarasini 2000). Este género está muy pobremente estudiado en México ya que solo se hace una mención del género para el estado de Tamaulipas, pero sin epíteto específico y sin definir localidad (Guevara *et al.,* 2014).

Arcangeliella sp. (1698 ITCV)

En un inicio al analizar la colecta *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) en general con banco de genes del NCBI considerando los fragmentos de ITS disponibles, de manera sorpresiva nuestra muestra se anido junto con *Lactarius* en lugar de *Arcangeliella.* Figura 2.20.

En un análisis posterior la muestra *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) se comparó con diversas especies de *Lactaruis* y se ubica en la rama de *L fumosus* y *L. fumosibrunneus*, con probabilidad posterior de 1, y *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) anidando específicamente con una ectomicorriza sin cultivar, FJ196933.1 con una probabilidad posterior de 0.988. Figura 2.21, (Taxonomy ID: 228206) esta última es una muestra ambiental que se relacionó con *Lactarius*, (Morris *et al.,* 2009), fue

colectada asociada a *Quercus crassifolia* y *Q. laurina* en el parque Huizteco a 4.5 Km al norte of Taxco, estado de Guerrero.

Tabla 2.6. Listado de secuencias utilizadas en el análisis filogenético *Arcangeliella*, muestra 1698 ITCV.

Especies	Número NCBI	Referencia
Arcangeliella sp.(1698 ITCV)	----------	Este trabajo
Arcangeliella sp.	JQ991639.1	Qiong,D. and Guo,L.D.2012 NCBI
Arcangeliella sp.	JF960610.1	Horton *et al.,* 2011, NCBI
Arcangeliella sp.	KF386765.1	Frank. 2013. NCBI.
Arcangeliella sp.	KF386764.1	Frank. 2013. NCBI.
Arcangeliella sp.	KF386762.1	Frank. 2013. NCBI.
Arcangeliella sp.	KF386753.1	Frank. 2013. NCBI.
A. borziana	AF373599.1	Peter *et al.,* 2001
A. crassa	AY558740.1	Izzo *et al.,* 2004 NCBI
Gymnomyces sp.	KF386756.1	Frank. 2013. NCBI.
Lactarius sp.	FJ196933	Morris *et al.*, 2009
Lactarius olivaceopardalis	KF386751.1	Frank. 2013. NCBI.
L. acris	EF560659	Le *et al.* 2007 NCBI
L. acris	JQ446084	Stubbe y Verbeken 2012
L. acris	KF432962	Wisitrassameewong *et al.,* 2014
L. albidocinereus	MF152855	Shi *et al.* 2018
L. albidocinereus	NR_156343	Shi *et al.* 2018
L. aff. acris	JQ446090	Stubbe y Verbeken 2012
L. azonites	JQ446087	Stubbe y Verbeken 2012
L. azonites	JQ446096	Stubbe y Verbeken 2012
L. azonites	KR082889	Shi *et al.* 2018
L. crassus	KT968581.1	Gordon 2015. NCBI
L. fulginosus	JQ446131	Stubbe y Verbeken 2012
L. fumosibrunneus	JN797632	Garay-Serrano et al., 2012
L. fumosibrunneus	JQ691945	Garay-Serrano et al., 2012
L. fumosus	EU819483	Palmer *et al.,* 2008
L. fumosus	KJ705224	Berube 2014 NCBI
L. picinus	GU258279	Stubbe *et al.,* 2010
L. picinus	JQ446130	Stubbe y Verbeken 2012
L. picinus	JQ446132	Stubbe y Verbeken 2012
L. pterosporus	AJ889962	Kjoller 2005. NCBI
L. pterosporus	JQ446135	Stubbe y Verbeken 2012
L. pterosporus	KF432963	Wisitrassameewong *et al.,* 2014
L. rubrilacteus	KF386759.1	Frank. 2013. NCBI.
L. ruginosus	AY606954	Eberhardt y Verbeken 2004
L. ruginosus	EF560660	Le *et al.,* 2007 NCBI
L. ruginosus	JQ446141	Stubbe y Verbeken 2012
Lactarius sp.	FJ196933	Morris *et al.*, 2009
L. silviae	EU846241.1	Eberhardt y Verbeken 2004
L. southwothiae	JX415331.1	Frank 2012. NCBI
L. southwothiae	KF386755.1	Frank. 2013. NCBI.

Macowanites sp.	MH975015.1	Russel 2018 NCBI
Macowanites sp.	MF540760.1	Wan *et al.,* 2017 NCBI
Macowanites sp.	MF540758.1	Wan *et al.,* 2017 NCBI
Macowanites sp.	MF503292.1	Nuske y Abell 2017 NCBI
Macowanites sp.	MF503290.1	Nuske y Abell 2017 NCBI
Macowanites sp.	KY697596.1	Nuske y Abell 2017 NCBI
Macowanites sp.	DQ273440.1	Bergemann y Garbelotto 2006
Macowanites sp.	AY750167.1	Cline 2004
Macowanites sp.	AY558787.1	Izzo *et al.,* 2004. NCBI
M. vinaceodorus	AJ438034.1	Vidal *et al.,* 2002
M. luteiroseus	EU019946.1	Lebel y Tonkin 2007
M. clorinosmus	KT968578.1	Gordon 2015. NCBI
M. carmineus	GU222323.1	Johnston *et al.,* 2009
M. ammonphilus	AF230890.1	Calonge y Martin 2000
Russula sp.	KF386752.1	Frank. 2013. NCBI.
R. brevipes	KF386757.1	Frank. 2013. NCBI.
R. cremoricolor	KF386761.1	Frank. 2013. NCBI.
R. xerampelina	KF386758.1	Frank. 2013. NCBI.
Zelleromyces gardneri	JN022500.1	Frank y Southworth 2011 NCBI

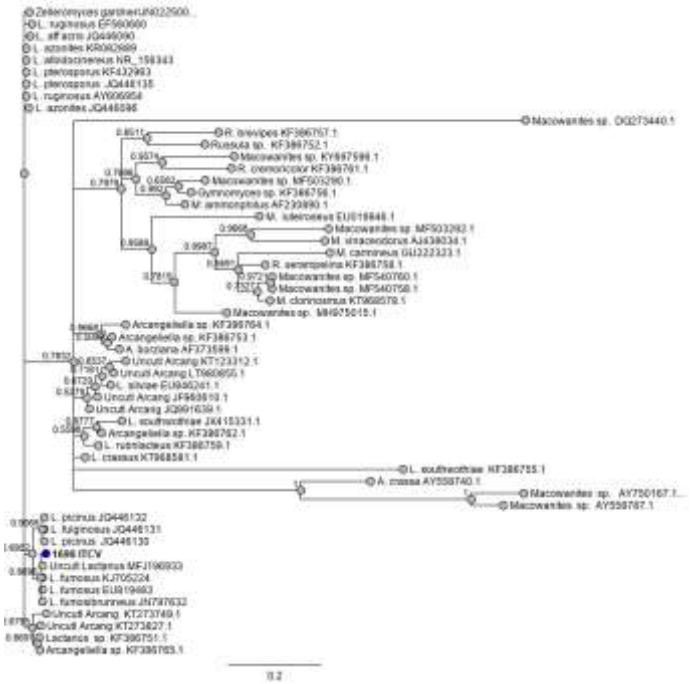

Figura 2.20. Análisis filogenético con Mr. Bayes, *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) comparando con géneros relacionados, epigeos *Lactarius*, *Russula*, e hipogeos, *Arcangeliella*, *Gymnomyces, Macowanites* y *Zelleromyces*.

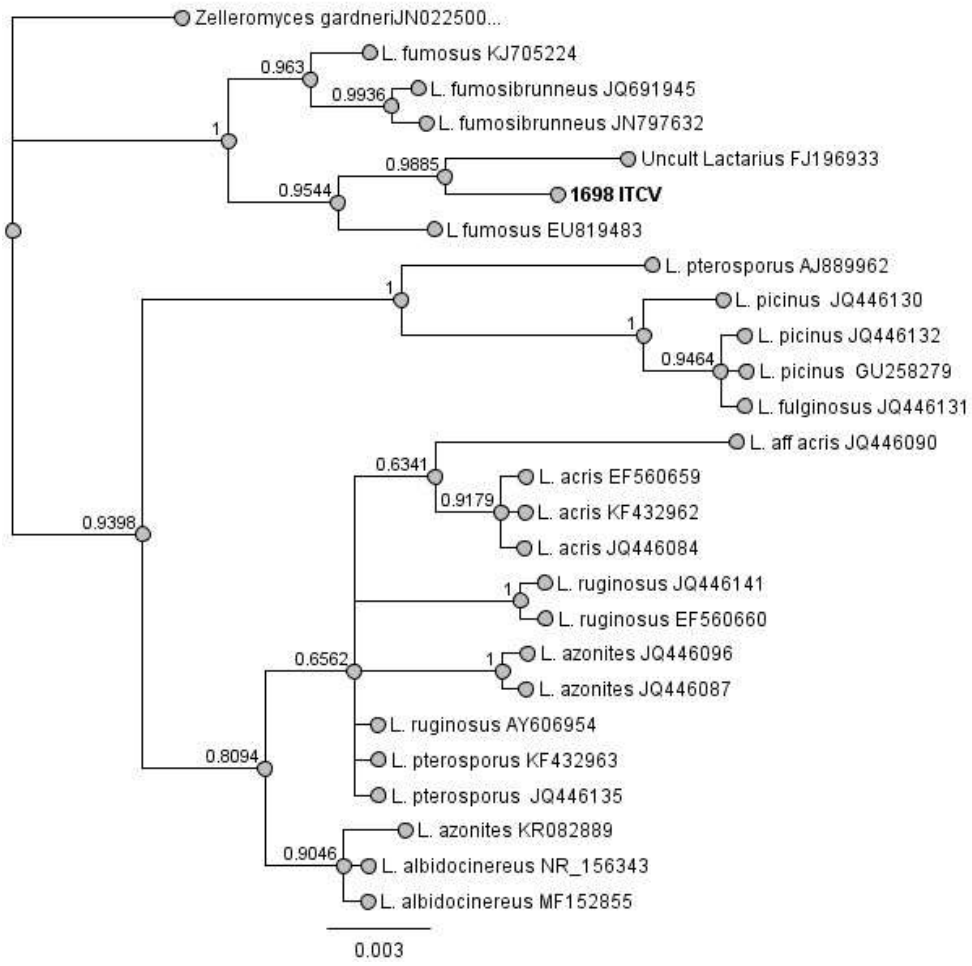

Figura 2.21. Árbol filogenético con el método de Mr. Bayes, comparando *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) con diferentes especies de *Lactarius*.

Descripción

Figura 2.22, 2.23

Macrocaracteres; Basidioma 13 × 11 × 8.6 mm irregular, con lóbulos pequeños, surcado en la base con un estípite pequeño, 2 × 2 mm. Peridio húmedo, crema a café claro, café oscuro en cuando muy maduro, evanescente cerca del estípite

exponiendo los primordios laminares localizados de modo radial alrededor de la base, con una costra de partículas de suelo adheridas por la exudación de látex.

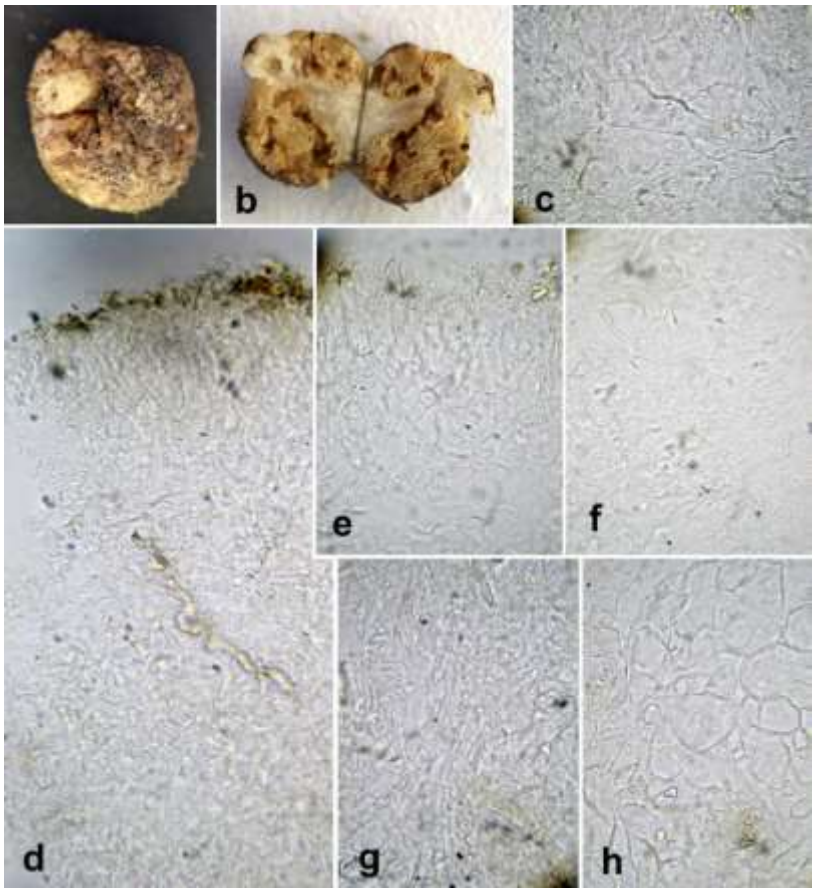

Figura 2.22. *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) Basidioma y tejido. a) Basidioma con estípite. b) Gleba con columella gruesa. c) Laticíferos 1000×. d) Peridio 1000×. e) Epicutis 1000×. f) Subcutis 1000×. g) Gleba células pequeñas 1000×. h) Gleba, subhimenio 1000×.

Gleba loculada, laberintiforme, color crema ceroso, con venas blanquecinas columella en forma de cono invertido de hasta 4 mm en la porción superior reduciéndose al 2 mm en la base del estípite, látex transparente, en la muestra colectada muy escaso posiblemente por ser muy madura. Olor no registrado, Sabor no registrado.

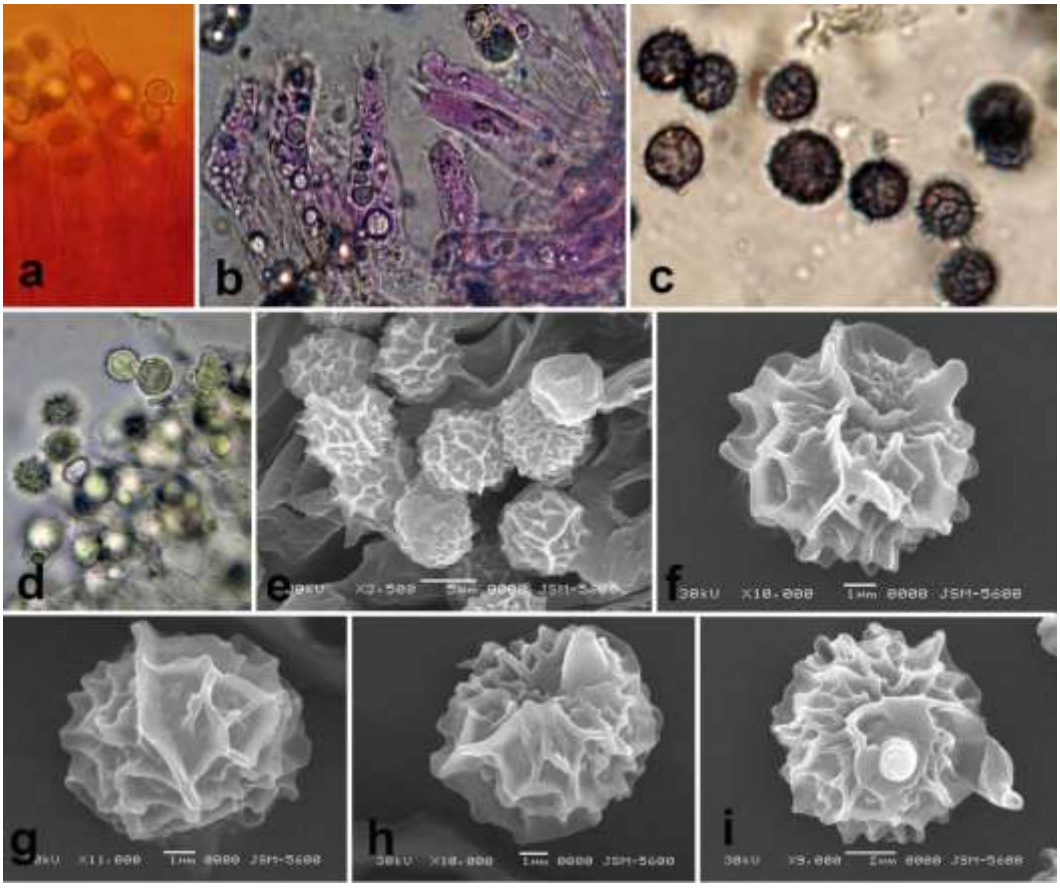

Figura 2.23. *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV), basidia y basidiospora. a) Basidia, tinción rojo Congo × 1000. b) Basidia tinción floxina × 1000. c) Espora reacción amiloide positiva × 1000. d) Espora verde olivo-amarillento × 1000. Microscopia electrónica de barrido e hasta i. e) Espora en masa. f y g) Ornamentación reticulada. h) Apéndice hilar vista lateral. i) Apéndice hilar vista superior.

Microcarateres; Peridio bicapa, 295–702.5 µm, promedio 427. Epicutis 45 –90 µm, promedio, hifas en empalizada 3–7 µm de diámetro al septo, con células isodiamétrias insertadas al azar 7-15 × 5-12 µm, promedio 11.2 × 9.2 µm , con una línea de células exteriores color café claro a café oscuro, con las interiores hialinas, Subcutis 250 –695 µm, promedio 427, hifas entrelazadas 3–6 µm de diámetro al

septo, hialinas, mezclada con abundantes células isodiamétricas 3-12 × 3-6 µm, promedio 10.3 × 7.7 µm hialinas.

Gleba; trama células isodiamétrias 10-33 × 8-30 µm promedio 22.2 × 18 mezclada con hifas entrelazadas 4–6 µm, promedio 4.7 µm de diámetro al septo, hialinas. Esporas globosas a subglobosas, sin ornamentación 5-7 × 4 –7 µm, promedio 5.9 × 5.33. con ornamentación 7-9 × 7-9 µm, promedio 7.93 × 7.37 µm, verde olivo claro, reticulada, amiloidea, balitospórica, asimétrica, ornamentación de 0.5-1.5 µm, promedio 1.02, apéndice hilar cónico de 0.5-1.5 µm longitud. Basidia 35-105 × 10-12.5 µm, promedio 64.1 × 11.81 µm, con 4 esporas, esterigma cónico, curvado al interior, de hasta 12 µm, Basidolas cilíndricas 58-84 × 9-11 µm, promedio 68.5 × 9.9 µm, laticíferos poco frecuentes, de hasta 185 µm longitud. No se observaron esferocistos

Distribución hábitat, ecología; México, estado de Guanajuato, Guanajauto, ANP Cuenca de la Esperanza, hipogeo en suelo, gregario. dos basidiomas en una colecta asociado a *Quercus sp*., N 21º 03' 52.5", O 101º 13' 21.4"2513 msnm, 10 octubre.

Discusión

Arcangeliella sp. (1698 ITCV) comparte con *A. parva* y *A saylorii* la espora reticulada pero se diferencia en el tamaño ya que la espora de *A saylorii* mide 5.5-8.2 × 5-5.8 mientras que la espora de la colecta *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) ITCV 7-9 × 7-9, como se pude observar el tamaño y forma de la espora de *A saylorii* es más pequeña y tiende a ser elipsoidal, lo que la diferencia claramente de *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV). Mientras que *A. parva* mide 7.5 -9.6 × 5.5-.7 µm con un rango de

longitud más amplio pero mucho más estrecha dándole forma elipsoidal lo que diferencia claramente de *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV). *A saylorii* es de color rosa a rosa naranja diferenciándola de *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) Por otro lado *A. parva* tiene el mismo color que *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV). Pero una diferencia clara es que el peridio de *A. parva* nunca deja expuestas las lamelas permaneciendo bien cerrado a diferencia de *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) que, si las deja expuesta, (Thiers 1984) Se decidió incluir nuestro espécimen en el género *Arcangeliella* por presentar látex, estípite y esporas amilóides, por otro lado, la muestra *Arcangeliella* sp. (1698 ITCV) podría clasificarse como *Lactarius*, una vez que se defina la controversia con respecto al género, (Trappe 2002, Vidal *et al.,* 2019*)*.

Literatura citada

Berube JA, J Gadomski, R Labbe, R Leboeuf, P Gagne, J Dube, C Maaref, J Labrecque, H Lambert (2014) NCBI.

Bergemann SE, M Garbelotto (2006) High diversity of fungi recovered from the roots of mature tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) in northern California. Can. J. Bot. 84 (9), 1380-1394.

Bidartondo MI, TD Bruns (2002) Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropioideae (Ericaceae): specificity for fungal species group. Molecular Ecology 11, 557-569.

Binder M, A Bresinsky (2002) Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. Mycologia Vol 94 (1), 85-9.

Brock, PM, H Doring, MI Bidartondo (2009) How to know unknown fungi: the role of an herbarium New Phytology181(3) 719-724.

Bruns T, R Fogel, TJ White, JD Palmer (1989) Accelerated evolution of a false-truffle from a mushroon ancestor. Nature. 339 140-142.

Calonge FD, MP Martin (2000) Morphological and molecular data on the taxonomy of *Gymnomyces*, *Martellia* and *Zelleromyces* (*Russulales*) Mycotaxon 76, 9-15.

Castellano MA, JM Trappe, Z Maser, Ch Maser (1989) Key to Spore of the Genera of Hypogeous Fungi of North Temperate Forest. Mad River Press. Eureka California EEUU.

Castellano M A (1990) The taxonomy of the Genus *Hysterangium* (Basidiomycotina, *Hysterangiaceae*) with Notes on its Ecology. Ph. degree Thesis. Oregon State University. 232 pp.

Castellano MA, AVerbeken, R Walleyn, D Thoen (2000). Some new or interesting sequestrate Basidiomycota from African woodlands. Karstenia 40: 11–21.

Cázares E, J García, J Castillo, JM Trappe (1992) Hypogeous fungi from Northern Mexico. Mycologia 84:3 341-359.

Cázares E, G Guevara, J Garcia, JM Trappe (2008) Melanogaster minysporus sp. nov. Un nuevo mimebro secuestrado de los boletales de México. Revista Mexicana de Micologia 28 67-69.

Cline E (2004) Mycorrhizal fungi communities of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings and trees: effects of proximity to residual trees Thesis. University of Washington, Seattle, WA, USA.

Ding Q, Y Liang, KQ Pei, KP Ma (2011) NCBI.

Dunham SM, KH Larsson, JW Spatafora (2007) Species richness and community composition of mat-forming ectomycorrhizal fungi in old- and second-growth Douglas-fir forests of the HJ Andrews Experimental Forest, Oregon, USA. Mycorrhiza 17 (8), 633-645.

Eberhardt U, A Verbeken (2004) Sequestrate *Lactarius* species from tropical Africa: *L. angiocarpus* sp. nov. and *L. dolichocaulis* comb. Nov Mycol. Res. 108 (PT 9), 1042-1052.

Fogel R, JM Trappe (1978) Fungus Consumtion (Mycophagy) by small animals. Norrthwest Science, 52 (1) 1-31.

Fogel R, S Peck (1975) Ecological studies of hypogeus fungi. I Coleoptera associated with sporocarps. Micologia 67 (4) 741-747.

Francis (2005) NCBI.

Frank JL, S Barry, D Southworth. (2006) Mammal mycophagy and dispersal of mycorrhizal inoculum in Oregon white oak woodlands. Northwest Sci. 80, 264-273.

Frank JL, D Southworth (2011) NCBI.

Frank JL (2012) NCBI.

Frank JL (2013) NCBI.

Garay-Serrano E, VM Bandala, L Montoya (2012) Morphological and molecular identification of the ectomycorrhizal association of *Lactarius fumosibrunneus* and *Fagus grandifolia* var. mexicana trees in eastern Mexico. Mycorrhiza 22 (8), 583-588.

García JJ, KD Pedraza, BCI Silva, MRL Andrade, TJ Castillo, (1998). *Hongos del estado de Queretaro*. Ed. UAQ.

García J, Y Ramírez, S Castillo, A Moreno (2005) Micofagia por roedores en los bosques templados de Tamaulipas. Biodiversidad Tamaulipeca 1: 232–236.

García J, R Valenzuela, T Raymundo, LJ García, G Guevara, F Garza, E Cázares, E Ruiz-Cancino (2014) Macro hongos asociados a encinares (*Quercus* spp.) en algunas localidades del estado de Tamaulipas, México. Biodiversidad tamaulipeca 2(1) 103-140.

Giachini AJ, K Hosaka, E Nouhra, J Spatafora, JM Trappe (2010) Phylogenetic relationships of the Gomphales based on nuc-25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-atp6-DNA combined sequence. Fungal Biol 114 (2-3) 224-234.

Grilli E, H Beker, U Eberhardt, N Schuetz, M Leonardi, A Vizzini (2016) Unexpected species diversity and contrasting evolutionary hypotheses in Hebeloma (Agaricales) sections Sinapizantia and Velutipes in Europe. Mycol. Prog. 15:5.

Grubisha LC, JM Trappe, R Molina, JW Spatafora (2002) Biology of the ectomycorrhizal genus Rhizopogon. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences Mycologia 94 (4), 607-619.

Guevara GG, MA Castellano, JJ Garcia, GE Cázares, JM Trappe (2008) Hysterangium (*Hysterangiales, Hysterangiaceae*) from northern Mexico. Revista Mexicana de Micología 28:95-100.

Guevara GG, E Cázares-González, G Bonito, RA Healy, B Stielow, J Grcía, F Garza-Ocañas, M Castellano, J Trappe (2014) Hongos hipogeos de Tamaulipas México. Biodiversidad tamaulipeca 2:1 87-101

Guevara-Guerrero, G., Castellano M.A., Gómez-Reyes V. 2016. Two new *Aroramyces* species (Hysterangiaceae, Hysterangiales) from México. IMA Fungus 7(2):235-238.

Gordon M (2015) NCBI.

Halasz K, Z Brate, S Rudnoy (2003) NCBI

Hawker LE (1954 British Hypogeous Fungi. Philosiphical Transactions of the Royal Society B. 429-546.

Horton BM, M Glen, C Mohammed (2011) NCBI.

Hosaka K, ST Bates, RE Beever, MA Castellano, W III Colgan, LS Dominguez, ER Nouhra, J Geml, AJ Giachini, SR Kenney, NB Simpson, JW Spatafora, JM 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.

Hosaka K, MA Castellano, JW Spatafora (2008) biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). Mycological Research 112:448-462.

Humpert AJ, EL Muench, A Giachini, MA Castellano, JW Spatafora (1999) NCBI.

Izzo AD, M Meyer, M North, JM Trappe, TD Bruns (2004) NCBI.

Jargeat P, PA Moreau, H Gryta, JP Chaumeton, M Gardes (2016) *Paxilus rubicundulus* (*Boletales Paxillaceae*) and two new Alder Sppecific ectomycorrhizal species, *P olivellos and P. adelphus*, from Europe and North Africa. Fungal Bbiology. 120 (5), 711-728.

Johnston PR, D Park, I Dickie (2009) NCBI.

Kapturska D, M Winter, R Ullrich, M Hofrichter, H Nilsson, M Hartmann, D Krueger (2013) NCBI.

Kjoller R (2005) NCBI.

Le HT, D Stubbe, A Verbeken, J Nuytinck, S Lumyong, DE Desjardin (2007) NCBI.

Lebel T, JE Tonkin (2007) Australasian species of Macowanites are sequestrate Russula (*Russulales*, Basidiomycota). Aust. Syst. Bot. 20, 355-381.

Lloyd CG, (1925) Mycological Writings, Mycological Notes 7: 1304.

Maser C, AW Claridge, JM Trappe (2008) Trees, truflles and Beast: how forest función. Rutger University Press. New Brunswick, New Jersey, and London. 280 pp.

Montecchi A, M Sarasini (2000) Funghi Ipogei d'Europa. Ed. Associazione Micologica Bresadola, Fundazione Centro Studi Micologici dell'A.M.B. Trento Italiy. 714 p.

Moreau PA, J Rochet, F Richard, F Chassagne, S Manzi, M Gardes (2011) Taxonomy of Alnus-associated hypogeous species of *Alpova* and *Melanogaster* (*Basidiomycota, Paxillaceae*) in Europe. Cryptogamie Mycologie 32 (1), 33-62.

Morris MH, MA Pérez-Pérez, ME Smith, CS Bledsoe (2009) Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus spp*.) in a tropical cloud forest FEMS Microbiol. Ecol 69:274-287.

Murat C, S Jeandroz, Y Wang, G Bonito, Y Chen, K Nara, A Konoshita, H Sasaki, P-G Liu, R Vilgalys, Y Wang, J Trappe, F Le Tacon. 2009. NCBI.

Nuske SJ, SE Abell (2017) NCBI.

Osmundson TW, VA Robert, CL Schoch, LJ Baker, A Smith, G Robich, L Mizzan, MM Garbelotto (2013) Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcodes equencing Project PLoS ONE 8 (4), E62419.

Palmer JM, DL Lindner, TJ Volk 2008. Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin Mycorrhiza 19 (1), 27-36.

Peintner U, NL Bougher, MA Castellano, JM Moncalvo, MM Moser, JM Trappe, R Vilgalys (2001) Multiple origins of sequestrate fungi related to Cortinarius (*Cortinariaceae*). Am. J. Bot. 88 (12), 2168-2179.

Peter M, U Buchler, F Ayer, S Egli (2001) Ectomycorrhizas and molecular phylogeny of the hypogeous russuloid fungus *Arcangeliella borziana* Mycol. Res. 105, 1231-1238.

Pilát A (1953) Uber aine neue varietat von Gautieria morchellaeformis Vitt. *Sidowia 7*,8-13.

Piña PC, GM Bonito, G Guevara-Guerrero, MA Castellano, R Garibay-Origel, JM Trappe, RR Peña. (2018) Description and distribution of tuber incognitum sp nov. And tuber annieae in the Transmexican Volcanic Belt. 41: 17-27.

Qiong D, LD Guo (2012) NCBI.

Ramos A, E Garay-Serrano, E Cesar, L Montoya, VM Bandala (2018) Ectomycorrhizas of two species of tuber (clade Puberulum) in the Mexican subtropical cloud forest Symbiosis. En prensa

Russel SD (2018) NCBI.

Shi S-F, Wang X-H, T Bau (2018) Three new species of *Lactarius* (*Russulaceae, Russulales)* from Northeast China, Mycoscience In press.

Smith ME, JM Trappe, DM Rizzo (2005) NCBI.

Smith M.E., Douhan G.W., Rizzo D. M. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* Woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. New Phytologist 174 (4), 847-863.

Stewart EL (1974) The genus *Gautieria* Vitt. *(Hymenogastrales, Basidiomycetes).* Ph.D. Thesis, Oregon State Univ., Corvallis.

Stielow B, Z Bratek, AK Orczan, S Rudnoy, G Hensel, P Hoffmann, HP Klenk, M Goker (2011) Species delimitation in taxonomically difficult fungi: The case of Hymenogaster. PLoS ONE 6:1, E15614.

Stubbe D, J Nuytinck, A Verbeken (2010) Critical assessment of the *Lactarius gerardii* species complex (Russulales.) Fungal Biol 114 (2-3): 271-283.

Stubbe D, A Verbeken (2012) L*actarius* subg. *Plinthogalus*: the European taxa and American varieties of *L. lignyotus* re-evaluated. Mycologia 104 (6): 1490-1501.

Suz LM, N Barsoum, S Benham, HP Dietrich, KD Fetzer, R Fischer, P Garcia, J Gehrman, F Kristofel, M Manninger, S Neagu, M Nicolas, J Oldenburger, S Raspe, G Sanchez, HW Schrock, A Schubert, K Verheyen, A Verstraeten, MI Bidartondo (2014) Environmental drivers of ectomycorrhizal communities in Europe's temperate oak forests. Mol. Ecol. 23:22, 5628-5644

Suz LM, S Kallow, K Reed, MI Bidartondo, N Barsoum. (2017) Pine mycorrhizal communities in pure and mixed pine-oak forests: abiotic environment trumps neighboring oak host effects. Forest Ecology and Management 406, 370-380

Szmidla H, K Sikora, D Hilszczanska (2016) NCBI.

Thiers HD (1984) The Genus Arcangeliella Cav. In the Western United States. Sydowia 37: 296-308.

Tomes AL, TR Horton (2016) NCBI.

Tourtellot SG, TR Horton, WA Powell, CA Maynard (2012) NCBI.

Trappe JM, E Cázares (1990) Evolución, ecología y micofagia en los hongos hipogeos. TRev. Mex, Mic. 6: 33-40.

Trappe JM, G Guzmán (1971) Notes on some hypogeous fungi from Mexico. Mycologia 63:2, 317-332.
Trappe JM, T Lebel, MA Castellano (2002) Nomenclatural revision in the sequestrate russuloid Genera. Micotaxon 81 195-214.
Trappe JM, R Molina, DL Luoma, E Cázares, D Pliz, JE Smith, MA Castellano, SL Miller, MJ Trappe (200)9 Diversity, Ecology, and Concservation of truflle fungi in forest of the Pacific Nortwest. Forest Service, Pacific Northwest Research Sation. General Technical Report. 194 pp.
Truong C, AB Mujic, R Healy, F Kuhar, G Furci, D Torres, T Niskanen, PA Sandoval-Leiva, N Fernandez, JM Escobar, A Moretto, G Palfner, D Pfister, E Nouhra, R Swenie, M Sanchez-Garcia, PB Matheny, ME Smith. (2017) How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. New Phytol. 214 (3), 913-919.
Vidal JM, FD Calonge, MP Martin (2002) *Macowanites ammophilus* (Russulales) a new combination based on new Evidences Rev. Catalana Micol. 24, 69-74.
Vidal JM, P Alvarado, M Liozides, G Konstantinidis, P Chachula, P Mleczko, A Vizzini, M Krakhmalnyi, A Paz, J Cabero, V Kaounas, M Slavova, B Moreno-arroyo, J Llistosella (2019) A phylogenetic and taxonomic revisión of sequestrate *Russulaceae* in Mediterranean and temperate Europe. Perrsoonia 42; 125-185.
Villarruel-Ordaz JL, BJ Cifuentes (2007) Macromicetos de la cuenca del Rio Magdalena y zonas adyacentes, Delegación la Magdalena Contreras, México D. F. Revista Mexicana de Micología 25:59-68.
Vittadini C (1831) Monographia Tuberacearum. Milano.
Wan S-P, W-J Xu, F-Q Yu (2017) NCBI.
White TJ, T Bruns, S Lee, J Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In innis MA, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, Eds. PCR protocols a guide to methods and applications. Academic press Inc. New York 315-322.
Wisitrassameewong K, J Nuytinck, KD Hyde, A Verbeken (2014) *Lactarius subgenus Russularia* (Russulaceae) in Southeast Asia: 1. Species with very distant gills Phytotaxa 158 (1) 23-42.
Zeller SM, W Dodge, (1929) Hysterangium of North America. Annals of Missouri Botanical Garden 16:83.129.
Zeller SM, CW Dodge (1936) Melanogaster. Annals Missouri Botanical Garden 23:639-655.
Szmidla H, K Sikora, D Hilszczanska (2016) NCBI.

Anexos

MycoKeys 41: 17–27 (2018)
doi: 10.3897/mycokeys.41.28130
http://mycokeys.pensoft.net

RESEARCH ARTICLE

MycoKeys

Description and distribution of *Tuber incognitum* sp. nov. and *Tuber anniae* in the Transmexican Volcanic Belt

Carolina Piña Páez[1], Gregory M. Bonito[2], Gonzalo Guevara-Guerrero[3], Michael A. Castellano[4], Roberto Garibay-Orijel[1], James M. Trappe[4], Rafael Peña Ramírez[3]

1 *Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria Delegación Coyoacán, A.P. 70-233, C.P. 04510 Ciudad de México, México* **2** *Department of Plant, Soil and Microbial Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA* **3** *Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Av. Portes Gil 1301 Pantitlan, 87010 Ciudad Victoria, Tamaulipas, México* **4** *US Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station, Forestry Sciences Laboratory, Corvallis, Oregon, 97331, USA*

Corresponding author: *Roberto Garibay-Orijel* (rgaribay@ib.unam.mx)

Academic editor: *K. Hyde* | Received 3 July 2018 | Accepted 12 September 2018 | Published 11 October 2018

Citation: Piña Páez C, Bonito GM, Guevara-Guerrero G, Castellano MA, Garibay-Orijel R, Trappe JM, Ramírez RP (2018) Description and distribution of *Tuber incognitum* sp. nov. and *Tuber anniae* in the Transmexican Volcanic Belt. MycoKeys 41: 17–27. https://doi.org/10.3897/mycokeys.41.28130

Abstract

The genus *Tuber* is a lineage of diverse ectomycorrhizal, hypogeous, sequestrate ascomycete fungi that are native to temperate forests in the Northern Hemisphere. Recently, many new species of *Tuber* have been described in North America and Asia, based on morphological characteristics and molecular data. Here we describe and illustrate a new species, *Tuber incognitum*, based upon phylogenetic analysis and morphological description. We also present a new record for *Tuber anniae* in México. These two *Tuber* species are distributed in the Transmexican Volcanic Belt in the states of México, Michoacán, Guanajuato, Querétaro and Tlaxcala at altitudes between 2,000 and 3,200 meters. These species are associated with *Pinus* (*T. anniae*) and *Quercus* forests (*T. incognitum*).

Keywords

Sequestrate fungi, truffles, Ascomycota, Systematics, new species

Copyright: *Carolina Piña Páez et al.* This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

MycoKeys 61: 27–37 (2019)
doi: 10.3897/mycokeys.61.36444
http://mycokeys.pensoft.net

RESEARCH ARTICLE

MycoKeys

A novel sequestrate species from Mexico: *Aroramyces guanajuatensis* sp. nov. (Hysterangiaceae, Hysterangiales)

Rafael Peña-Ramírez[1,2], Zai-Wei Ge[2], Rigoberto Gaitán-Hernández[4], César Ramiro Martínez-González[4], Gonzalo Guevara-Guerrero[1]

1 *Instituto Tecnológico de Cd. Victoria, Av. Portes Gil 1301 Pte. C.P. 87010, Cd. Victoria Tam, Mexico* **2** *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 132, Lanhei Road, Kunming 650201, China* **3** *Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec # 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Veracruz, Mexico* **4** *Universidad Nacional Autónoma de México, Profesor de Asignatura B, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico*

Corresponding author: *Gonzalo Guevara-Guerrero* (guevarags@hotmail.com)

Academic editor: *Marc Stadler* | Received 23 May 2019 | Accepted 16 October 2019 | Published 11 December 2019

Citation: Peña-Ramírez R, Ge Z-W, Gaitán-Hernández R, Martínez-González CR, Guevara-Guerrero G (2019) A novel sequestrate species from Mexico: *Aroramyces guanajuatensis* sp. nov. (Hysterangiaceae, Hysterangiales). MycoKeys 61: 27–37. https://doi.org/10.3897/mycokeys.61.36444

Abstract

Knowledge of sequestrate Hysterangiaceae fungi in Mexico is very limited. In the present study, a new member of the family, *Aroramyces guanajuatensis* **sp. nov.**, is described. This species is closely related to *A. balansiporus*, but differs from the latter in possessing a tomentose peridium 165–240 µm thick, with occasional large terminal hyphae up to 170 µm, a variable mesocutis (isodiametric to angular), and distinct bright yellowish subcutis. In contrast, *A. balansiporus* possesses a fibrillose peridial surface with shorter hyphae, a peridium 200–450 µm thick, and a mainly hyaline isodiametric mesocutis with a slightly wider subcutis. The phylogenetic analysis of the LSU gene separated *A. guanajuatensis* from *A. balansiporus* with a Bayesian posterior probability (PP) = 1. This is the third *Aroramyces* species described for the American continent.

Keywords

Truffle, truffle-like, sequestrate fungi, hypogeous fungi

Copyright Rafael Peña-Ramírez et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.