



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis filogenético y delimitación molecular de
los taxones de *Lactarius* subsección *Croceini*
(Fungi, Russulales)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maricarmen Islas Peralta

Codirectores

M. en C. Alejandro Kong Luz

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Junio, 2022



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis filogenético y delimitación molecular de
los taxones de *Lactarius* subsección *Croceini*
(Fungi, Russulales)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maricarmen Islas Peralta

Comité tutorial

M. en C. Alejandro Kong Luz

Dr. Arturo Estrada Torres

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Alejandro Valdez Mondragón

Dr. Ricardo García Sandoval

Tlaxcala, Tlax.

Junio, 2022

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación de Ciencias Biológicas (CICB) perteneciente a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). Los estudios de Maestría se realizaron en el posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) la cual está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional del Posgrado (PNPC). Se contó con el apoyo de beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Maricarmen Islas Peralta** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Análisis filogenético y delimitación molecular de los taxones de *Lactarius* subsección *Croceini* (Fungi, Russulales)”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., JUNIO 29 DE 2022

DRA. YENDILEBENEZER NAVARRO NOYA

M. en C. ALEJANDRO KONG LUZ

DR. RICARDO GARCÍA SANDOVAL

DR. ALEJANDRO VALDEZ MONDRAGÓN

DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PEREZ



COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Maricarmen Islas Peralta**, con número de matrícula **20190967**, titulada "**Análisis filogenético y delimitación molecular de los taxones de Lactarius subsección Croceini (Fungi, Russulales)**" para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Maricarmen Islas Peralta** fue revisado por mi como director de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de junio, el documento final de la tesis fue procesado con el programa "Plagiarism Detector" marcando poco texto con similitudes (4%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante. Se volvió a procesar el documento y volvió a marcar 1%, sin embargo, examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes están marcadas en la sección del índice y la metodología, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

ATENTAMENTE
Tlaxcala, Tlaxcala, a 15 de junio de 2022

ALEJANDRO KONG LUZ
Director de tesis

"Por la Cultura a la Justicia Social"



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) y a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), por las facilidades otorgadas para cursar mis estudios de maestría, gracias por los conocimientos compartidos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con la beca número: 828191, para poder realizar mis estudios de maestría en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

A los miembros de mi comité: al M. en C. Alejandro Kong Luz, Dr. Arturo Estrada Torres, Dr. Alejandro Valdez Mondragón, Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya y Dr. Ricardo García Sandoval, gracias por sus comentarios, apoyo, observaciones, correcciones, aportaciones, dedicación y paciencia, me ayudaron a mejorar considerablemente este trabajo. Muchas gracias por su tiempo.

Al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CTBC) por darme un espacio para poder estudiar lo más me gusta y brindarme de un grupo de trabajo y amistad.

Agradecimientos personales

A mis padres Blanca Rosa Peralta Hernández y Martín Islas Reyes por ser mi principal fuente de inspiración y apoyo, por brindarme su amor, comprensión y aconsejarme cuando lo necesitaba. Espero poderles retribuirles un poco de todo lo que me han dado. Los amo.

A mi hermana Karina por ser mi compañera y amiga de la vida, te quiero, muchas gracias por siempre estar.

A mi familia, principalmente a mis abuelitos, por ayudarme a crecer siempre como persona y brindarme muy buenos momentos y amor.

Al M. en C. Alejandro Kong Luz por brindarme su conocimiento y amistad.

A la Dra. Mercedes por ser no solamente una docente, sino una amiga, por brindarme su apoyo, conocimiento y darme muy buenos consejos y ánimos.

A mis compañeros de maestría: Mayra, Kevin, Elvira, Frida, Alberto, Violeta, Erick G y Erick G., gracias por las risas y los buenos momentos y su amistad.

A mis amigos, Mayra, gracias por tu amistad incondicional, por siempre estar y por tu apoyo personal y académico principalmente con los mapas. Kevin por ser un gran amigo, por siempre impulsarme a llegar a más y darme ánimos, gracias por los buenos momentos que hemos vivido. Alma por tu generosa amistad, por siempre darme cariño y apoyo. Elvira gracias por las pláticas tan interesantes que me brindas, por tu apoyo y cariño. Ivonne por seguir en mi vida brindándome una de las mejores amistades y hacerme parte de tu familia. Adriana gracias por brindarme tu sincera amistad y hospitalidad, gracias por ser mi compañera en el laboratorio y salidas a campo.

Mi mayor agradecimiento a todos.

Dedicatoria

A mis padres: Martín y Blanca

A mi hermana: Kari

Con amor

Maricarmen

RESUMEN

El género *Lactarius* es un grupo muy diverso de hongos formadores de ectomicorriza que se encuentra en la mayoría de los sistemas forestales, cuya clasificación ha sufrido cambios a medida que su estudio ha avanzado. Sin embargo, los esquemas de clasificación actuales aun no reflejan las relaciones filogenéticas entre los diversos subgrupos y sus especies. En este estudio nos centramos en las relaciones filogenéticas de la subsección *Croceini* del subgénero *Lactarius*, y la delimitación de sus 13 especies. Las relaciones infragenéricas se estudiaron utilizando una filogenia construida a partir de la región espaciadora transcrita (ITS), utilizando máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). La delimitación de especies se realizó con los métodos: 1) Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD); 2) Poisson Tree Process (PTP) y 3) General Mixed Yule Coalescent (GMYC) y se evaluaron en función a su concordancia y a la filogenia de ITS. Los resultados muestran que las relaciones de la subsección *Croceini* no coinciden con la clasificación establecida, sino que se agrupa dentro del subgénero *Russularia*, sin embargo, su posición dentro de este subgénero no es muy clara. Los análisis, encuentran 15 de especies delimitadas, lo cual parece ser afín a las 16 especies establecidas tradicionalmente para *Croceini*. Las especies de *Croceini* se encuentran distribuidas en Europa Asia y América, con patrones de ubicación congruentes con la topología del árbol. Concluimos que *Russularia* es un grupo polifilético, del cual hace falta más representación para ayudar a resolverlo y de esta manera conocer mejor sus relaciones con *Crocein*, así como mayor información morfológica, ecológica y biogeográfica para delimitar mejor las especies que lo conforman.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	Generalidades	3
1.1	Diversidad de hongos a nivel mundial.....	3
1.2	Diversidad en México.....	4
1.3	Biología de los hongos ectomicorrizógenos.....	5
1.4	Historia de la clasificación de <i>Russulales</i>	6
1.4.1	<i>Russulaceae</i>	7
1.5	Taxonomía del género <i>Lactarius</i>	9
1.5.1	Clasificación infragenérica	13
1.6	Género <i>Lactarius</i>	16
1.6.1	Biología del género <i>Lactarius</i>	17
1.6.2	Distribución y ecología.....	17
1.6.3	Macromorfología.....	18
1.7	Subsección <i>Croceini</i>	20
1.8	Herramientas moleculares para la delimitación de especies	21
1.9	Marcadores moleculares para hongos.....	22
2	ANTECEDENTES	25
2.1	Análisis filogenéticos con en el género <i>Lactarius</i>	25
2.2	Clasificación de <i>Lactarius</i> subsección <i>Croceini</i>	25
3	JUSTIFICACIÓN	28
4	HIPÓTESIS	29
5	OBJETIVOS.....	29
5.1	Objetivo General:	29
5.2	Objetivos Particulares:	29
6	METODOLOGÍA	30
6.1	Bases de datos y muestreo taxonómico.....	30
6.1.1	Elección del grupo externo	33
6.1.2	Criterios para la delimitar las especies.....	33
6.2	Análisis filogenéticos	35
7	RESULTADOS.....	37
7.1	Análisis filogenético.....	37

7.2	Análisis de distancias genéticas (<i>p</i>)	43
7.3	Delimitación de especies con métodos moleculares	45
8	DISCUSIÓN.....	49
8.1	Análisis Filogenético.....	49
8.2	Delimitación de especies.....	50
9	CONCLUSIONES.....	59
10	REFERENCIAS	61
11	ANEXOS	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características que usualmente separan a los géneros <i>Lactarius</i> y <i>Lactifluus</i> (De Crop y cols. 2016).....	9
Tabla 2.	Clasificación del género <i>Lactarius</i> propuesta por Hesler y Smith (1979)	14
Tabla 3.	Clasificación del género <i>Lactarius</i> propuesta por Heilmann-Clausen y cols. (1998).....	15
Tabla 4.	Secuencias que pertenecen a la subsección <i>Croceini</i> incluidas en el estudio, con el nombre que le asignamos a la secuencia, su número de acceso y procedencia,	31
Tabla 5	Diferencias entre <i>Lactarius vinaceorufescens</i> y <i>Lactarius indo-chryso-rheus</i> , obtenido de las descripciones de Hesler y Smith (1979) y Das y cols. (2015) respectivamente	53
Tabla 6	Ubicación y hospederos de las especies. De izquierda a derecha se encuentra la identificación de la especie, el color con el que es representada en la delimitación de especies y para su ubicación en el mapa (Figura 8), así como la planta a la que se encuentra asociada (hospedero).	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Espora de <i>Lactarius</i> , en la cual se pueden observar las características que son importantes para la taxonomía. Ilustración tomada y modificada de Brundrett y cols. (1996).	11
Figura 2.	Tipos de pileipellis en <i>Lactarius</i> . A) Cutis, B) Ixocutis, C) Tricoderma, D) Ixotricoderma y E) lamprotricoderma. Ilustración tomada y modificada de Heilmann-Clausen y cols. (1998).	11

Figura 3. Trama de una lámina del himenio. Se observan las diferentes estructuras que componen a una lámina en su exterior: pseudocistidios, esporas, pleurocistidios, basidios y queilocistidios; así como su interior: hifas laticíferas (en el caso de <i>Lactarius</i>) y las hifas que componen la trama. Ilustración tomada y modificada de Heilman-Clausen y cols. (1998). ...	12
Figura 4. Árbol de Máxima Verosimilitud en donde se resumen los principales clados formados para el género <i>Lactarius</i> con un breve desglose de los taxones formados dentro de cada subgénero y la ubicación de la subsección <i>Croceini</i> . Los números sobre las ramas representan los valores de soporte de Bootstrap y PP respectivamente (valores Bootstrap > 80% y PP >.95).....	38
Figura 5 Árbol de Inferencia Bayesiana en donde se resumen los principales clados formados para el género <i>Lactarius</i> con un breve desglose de los taxones formados dentro de cada subgénero y la ubicación de la subsección <i>Croceini</i> , en color negro. Los números sobre las ramas representan los valores de soporte de probabilidades posteriores, los soportes de ramas presentan los valores de probabilidades posteriores (valores significativos >.95).	39
Figura 6. Árbol MV a partir de la región ITS, muestra con mejor detalle la subsección <i>Croceini</i> . Los soportes de ramas presentan los valores de Bootstrap (azul), y probabilidades posteriores (negro). A la derecha se observan los principales clados en los que se puede dividir el árbol de acuerdo a su soporte de rama. Árbol completo en Anexo 4.	42
Figura 7 Árbol de distancias genéticas colapsado de la región ITS, se muestran los principales grupos obtenidos en el análisis. Números sobre las ramas indican valores de soporte de Bootstrap. Los números del lado derecho representan los clados obtenidos con su respectiva ubicación a grandes rasgos.	45
Figura 8. Árbol de ML a partir de la región ITS, los soportes de ramas presentan los valores de Bootstrap (azul), y probabilidades posteriores (negro). Se representan los distintos métodos de delimitación de especies: GMYC, PTP y ABGD, los dos últimos con sus variantes, las cuales son: Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) para PTP; Particiones Iniciales (PI) y Particiones Recursivas (PR) para ABGD. Números bajo las columnas representan el número de especies encontradas en cada análisis. Colores en las barras corresponden a las especies que delimitaron de manera similar, las cuales se enumeran a la derecha del diagrama. Árbol completo en Anexo 5.	48
Figura 9 Distribución de las especies de <i>Croceini</i> de acuerdo con la información obtenida de las secuencias (a nivel de país), los puntos representan a las secuencias de color a la especie a la que pertenecen (de acuerdo a Figura 7), el tamaño de los puntos es de acuerdo con el número de secuencias de esa especie que tiene cierto país. Mapa realizado por la M. en C. Mayra Rocío Cortez Roldán.	57
Figura 10 Asociación de las secuencias con su hospedero, de color verde pináceas, color café fagáceas y morado betuláceas.	58

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son un grupo muy diverso de organismos los cuales pueden ser microscópicos unicelulares o macroscópicos multicelulares, por lo que es muy difícil conocer la magnitud de su diversidad. Hasta el 2018 se tiene conocimiento de 144 000 especies de hongos descritas, estimándose la existencia de entre 2 200 000 a 3 800 000 especies, siendo los caracteres moleculares de gran ayuda para hacer más eficiente y certera la delimitación de especies, así como la comprensión de sus relaciones evolutivas (Aguirre-Acosta y cols. 2014, Schoch y cols. 2014, Hawksworth y Lücking 2018, Willis 2018).

Actualmente el uso de técnicas moleculares y de herramientas bioinformáticas ayudan a estimar la biodiversidad. Existen extensas bases de datos para almacenar dicha información como: GenBank y BoldSystems (Benson y cols. 2013, Ratnasingham y Hebert 2007) y bases más especializadas para hongos, como UNITE, que se centran en secuencias de marcadores específicos. La región de ADN más usada en hongos es la región espaciadora transcrita (ITS) que está compuesta por dos espaciadores (ITS1 e ITS2) que se encuentran a los lados del gen 5.8 ribosomal (Köljalg y cols. 2013, Schoch y cols. 2014).

Se ha demostrado que muchos caracteres fenotípicos que son utilizados en hongos son el resultado de procesos evolutivos convergentes por lo que no predicen una relación y esto se ha demostrado mediante la comparación de ADN, de esta forma siguen saliendo a la luz muchas especies crípticas mediante métodos filogenéticos, al igual que las clasificaciones de estos han ido cambiando (Schoch y cols. 2014, Hawksworth y cols. 2011).

Un estudio filogenético molecular de Russulaceae realizado por Buyck et al. (2008) reveló que los géneros *Russula* y *Lactarius* eran parafiléticos y que la familia debería dividirse en cuatro géneros estrechamente relacionados. Tiempo después seguían considerando a *Lactarius* todavía como parafilético por lo que se dividió en los géneros: *Lactifluus* y *Lactarius sensu novo* (De Crop 2016). Este último, se dividió en tres subgéneros: *L.* subgenus *Piperites* (Fr. ex J. Kickx f.) Kauffman, *L.* subgenus *Russularia* (Fr. ex Burl.) Kauffman y *L.* subgenus *Plinthogalus* (Burl.) Hesler & A.H. Sm.

La subsección *Croceini* ha sido clasificada en el subgénero *Lactarius*, sin embargo, diversos estudios que han utilizado herramientas moleculares en diferentes estudios en el género

Lactarius, indirectamente han observado que varias de sus especies más conocidas como *Lactarius chrysorrheus* y *Lactarius vinaceorufescens* se ubican dentro del subgénero *Russularia* (Das y cols. 2015, Wisitrassameewong y cols. 2016, Barge y Cripps 2016, Lee y cols. 2019) lo que da indicios de que ambos subgéneros no son naturales.

1. Generalidades

1.1 Diversidad de hongos a nivel mundial

Los hongos son muy diversos por lo cual es difícil poderles dar una definición, sin embargo, se pueden describir como organismos mayoritariamente filamentosos con crecimiento apical, formados por células eucarióticas, de metabolismo heterótrofo, con pared celular compuesta principalmente por quitina y glucanos (Aguirre-Acosta y cols. 2014). Por la gran diversidad de especies que existen y los estudios que se van realizando, la clasificación de los hongos está en un proceso de cambio constante. Hasta el momento son conocidas 144 mil especies de acuerdo con Kirk y cols. (2008) y Willis (2018), de las cuales 30 mil especies son hongos macroscópicos (Aguirre-Acosta y cols. 2014, Tedersoo y cols. 2014).

La mayoría de las especies no cuentan con datos de secuencias de ADN y muchas de las especies que desconocemos se podrían conocer solo mediante la comparación de secuencias moleculares ya que el conocimiento basado únicamente en la morfología subestima la diversidad fúngica (Zuluaga y cols. 2011, Kõljalg y cols. 2013, Schoch y cols. 2014). Los diferentes estudios han estimado desde 1.5 millones hasta 10 millones de especies, recientemente se considera con más exactitud 3 millones de especies, de las cuales entre 53 mil y 110 mil son hongos macroscópicos (Aguirre-Acosta y cols. 2014, Villarruel-Ordaz y cols, 2015).

De las especies macroscópicas conocidas, aproximadamente 8 mil son formadoras de ectomicorriza, estas pertenecen a 234 géneros, y se estima una riqueza de 20 mil a 25 mil especies (Buyck y cols. 2018). Estas especies tienden a ser más diversas en zonas templadas (Tedersoo y cols. 2014). Las especies formadoras de ectomicorriza se encuentran asociadas con aproximadamente 8 mil especies de plantas forestales, destacando las familias: Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae y Myrtaceae (Oros y cols. 2017).

Los hongos ectomicorrizógenos son abundantes en los sistemas forestales, formando extensas redes que sirven para absorber nutrientes que pueden ser compartidos entre distintos hospederos, usualmente hongos estos son selectivos con las especies de plantas huésped (Garza-Ocañas y cols. 2002, Allen y cols. 1995, Hutchison 1999, Le y cols. 2007, De Crop y cols.

2017). Las condiciones climáticas como las temporadas de lluvia llegan a influir en su presencia y productividad (Hutchison 1999, Tedersoo y cols. 2014).

Los hongos ectomicorrizógenos no tienen un patrón latitudinal bien definido. A diferencia de otros organismos, los hongos Agaricomycetes, grupo al que pertenecen muchos hongos ectomicorrizógenos, se han diversificado más en las zonas templadas o boreales, contrario a lo que plantea la hipótesis de diversidad latitudinal (Tedersoo y cols. 2014, De Crop 2016, Varga y cols. 2019).

Aún existen muchas controversias sobre las estimaciones de la riqueza de especies de hongos y de las delimitaciones de los diferentes grupos existentes, ya que las proposiciones toman en cuenta diferentes factores, ya sea ambientales en la mayoría de ellos o bióticos (como plantas a las que se asocian). En el caso de las micorrizas, además existe un muestreo desigual, centrándose en ciertas regiones o ámbitos (Tedersoo y cols. 2014), aunque Varga y cols. (2019) infieren que realmente existe un pico de las tasas de diversificación en las zonas templadas que es independiente a la densidad del muestreo; aún es necesario un mayor muestreo (Tedersoo y cols. 2014).

1.2 Diversidad en México

México es el tercer país con mayor biodiversidad a nivel mundial, ya que contiene entre el 10 y 12% de las especies descritas en el mundo (Zamorano 2009, Villarruel-Ordaz y cols. 2015). A pesar de lo anterior, el conocimiento que tenemos de la diversidad de los hongos en México es escaso, esto debido principalmente a que: 1) existen pocos trabajos unificadores, 2) el escaso número de expertos que integren las diversas áreas de la sistemática en hongos (Oros y cols. 2017), 3) la micología en México es relativamente reciente, por lo que muchas especies están mal descritas y/o documentadas (Aguirre-Acosta y cols. 2014, Villarruel-Ordaz y cols. 2015). La primera estimación de la riqueza de especies de hongos en México se realizó por Guzmán en 1998 (a y b) en el que estimaba que se conocían 6 500 especies en total, de las cuales 4 500 especies son macromicetos y 2 000 micromicetos, figurando el 6.6% de las especies del mundo en México (Aguirre-Acosta y cols. 2014). Más recientemente se estimó que en México existen 200 mil especies, de las cuales solo se tiene registro de alrededor de 10 mil especies, por lo que se conoce menos del 5%, 6,500 de estas son macromicetos (3.5%). Se considera que la

distribución de la diversidad de los macromicetos es: zonas tropicales > zonas templadas > zonas desérticas. Sin embargo, son necesarios muchos más estudios porque aún no se conoce suficientemente la distribución de las especies en cada estado. (Aguirre-Acosta y cols. 2014).

1.3 Biología de los hongos ectomicorrizógenos

La simbiosis es una estrategia crucial para la subsistencia de muchos organismos, este proceso ha favorecido la diversificación de la vida en la Tierra. Las plantas al asociarse con otros organismos favorecen su adaptación a ciertos nichos ecológicos, mantienen un desarrollo adecuado y estimulan distintos procesos en ambos organismos, incluyendo su coevolución, la cual lleva existiendo al menos 88 millones de años (Heredia-Acuña y cols. 2014, Oros y cols. 2017).

En la simbiosis micorrízica participan alrededor de 8 mil especies de hongos y el 90% de plantas vasculares. Las micorrizas se clasifican de acuerdo con las especies fúngicas y vegetales, se conocen siete tipos: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotrofoide, ericoide y orquideoide (Pérez-Moreno 2004). En la ectomicorriza las especies de hongos y plantas simbiotes son polifiléticos, es decir, la simbiosis ectomicorrízica tiene varios orígenes (alrededor de 80 linajes). Las plantas huésped son árboles mayoritariamente de bosques templados y boreales, con pocos representantes de bosques tropicales, mientras que los hongos, son principalmente Basidiomycota y Ascomycota y muy pocas especies de Mucoromycota (Bruns y cols. 2002, Tedersoo y Nara. 2010, Galindo-Flores y cols. 2015).

La simbiosis ectomicorrízica puede ser considerada “simbiosis difusa” ya que la asociación no implica a ambos organismos completamente, sino que son libres de asociarse sincrónicamente con otros simbiotes (Bruns y cols. 2002). Sin embargo, es notable su alto grado de especificidad con el huésped, lo que significa que un hongo solo puede vivir asociado con una o pocas especies de plantas (Hutchison 1999, De Crop y cols. 2016) y solo desarrolla el esporocarpo cuando está asociado con su hospedero. Por ejemplo, los pinos no pueden crecer en entornos exóticos a menos se encuentren micorrizados (Bruns y cols. 2002).

La especificidad y reconocimiento que tienen los hongos ectomicorrizógenos con el huésped no ocurre al azar. Las moléculas involucradas en el reconocimiento son: una lectina

que se encuentra en la superficie de las hifas y restos de polisacáridos en las paredes celulares de las raíces (Giollant y cols. 1993, Wisitrassameewong y cols. 2016, De Crop y cols. 2016).

Tanto la planta como el hongo seleccionan uno o más asociados, sin embargo, las plantas se pueden asociar con diversas especies de hongos, mientras que los hongos eligen a pocas especies como hospederos, usualmente pertenecientes a la misma familia (Galindo-Flores y cols. 2015).

La mayoría de las investigaciones basadas en la síntesis de ectomicorrizas *in vitro* indican que llevan un largo periodo de tiempo para formarse, sin embargo, la formación de estas es más rápida con árboles más viejos (Hutchison 1999). Existen, sin embargo, muchas limitantes para poder unificar este tipo de aseveraciones, principalmente por la falta de conocimiento del ciclo de vida de muchos hongos ectomicorrizógenos, así como de sus interacciones ecológicas, ya que algunas especies acorde con las condiciones ambientales, puede comportarse como un hongo saprófito, micorrízico o facultativo, como ocurre en el caso de algunas especies del género *Morchella* (Alvarado-Castillo y cols. 2015).

1.4 Historia de la clasificación de *Russulales*

En 1797 Persoon describió dos géneros pertenecientes a Agaricales a los que nombró *Russula* y *Lactarius*, a ambos los clasificó en un orden propio al que llamó *Russulales*, debido a que se diferenciaban por distintas características morfológicas (Pegler y Young 1979, De Crop 2016, De Crop y cols. 2021), principalmente microscópicas, como la forma en que se parten (fractura frágil), ya que el trama contiene esferocitos, la ornamentación de las esporas amiloides y la presencia de hifas que contienen gotitas de aceite en el citoplasma (gloeopleróticas). *Russula* se distinguen por tener esporocarpos coloridos y llamativos, mientras que las especies pertenecientes a *Lactarius* segregan látex cuando los esporocarpos son lesionados. Asimismo, en este orden se incluyeron otros taxones que contenían una mezcla de estas características, pero con otro tipo de basidiocarpo (como hongos coraloides, poroides, hidnoides y corticoides) (De Crop 2016).

En los últimos años, el uso de herramientas moleculares nos ha ayudado a tener una perspectiva más certera sobre el orden Russulales (De Crop y cols. 2017, Varga y cols. 2019). Datos moleculares han apoyado la existencia de un clado rusuloide compuesto por taxones

corticoide, resupinado, discoide, clavarioide, pileado y gasteroide, con himenóforos lisos, poroides, hidnoides, laminares o laberintoides (Hibbett y Binder 2002, Larsson y Larsson 2003). Sin embargo, morfológicamente no todos comparten la presencia de esferocitos y la ornamentación amiloide en las esporas, por lo que el clado Russulales se soporta morfológicamente por la presencia de gleocistidios y un sistema de hifas gloeopleróticas (Larsson y Larsson 2003, Miller y cols. 2006).

1.4.1 *Russulaceae*

Anteriormente la clasificación de los Russuláceos se basaba en caracteres morfológicos como la forma del esporocarpo. Así, se clasificaban a los que tenían una forma agaricoide dentro de *Russula* y *Lactarius*, las especies pleurotoides se clasificaron en el género *Pleurogala* (Readhead y Norvell 1993) y las especies hipogeas fueron colocadas dentro de los géneros *Arcangeliella* Cavara, *Gastrolactarius* R. Heim ex J.M. Vidal, *Zelleromyces* Singer y A.H. Sm., *Cystangium* Singer y A.H. Sm., *Elasmomyces* Cavara, *Gymnomyces* Masee y Rodway, *Martellia* Mattir. y *Macowanites* Kalchbr (Miller y cols. 2001, Binder y Bresinsky 2002, Verbeken y cols. 2014). Sin embargo, posteriormente se comprendió que estas formas del esporocarpo se originaron varias veces tanto en *Russula* como en *Lactarius* (Verbeken 1998b, Buyck y Horak 1999, Henkel y cols. 2000). Así, por ejemplo, las especies hipogeas que ahora se ubican en *Lactarius* pertenecían a *Arcangeliella*, *Gastrolactarius* y *Zelleromyces* y en *Russula* se encuentran los que pertenecían a *Cystangium*, *Elasmomyces*, *Gymnomyces*, *Martellia* y *Macowanites* (Miller y cols. 2001, Verbeken y cols. 2014). De esta forma, los grupos anteriormente mencionado fueron abandonados y se ha corroborado que las formas pileado-estipitadas han aparecido en los diferentes linajes de hongos durante su evolución (Varga y cols. 2019). Análisis posteriores indicaron que a la familia Russulaceae también pertenecen taxones corticioides de tres géneros: *Boidinia* Stalpers y Hjortstam, *Gloeopeniophorella* Rick y *Pseudoxenasma* K.H. Larss. y Hjortstam (Larsson y Larsson 2003, Miller y cols. 2006, Verbeken y cols. 2014).

Hasta el momento, los especímenes estudiados y utilizados para realizar las clasificaciones provenían principalmente de Europa. Buyck y cols. (2008) agregaron taxones tropicales a una filogenia de Russulaceae y encontraron dificultades para distinguir *Lactarius* y *Russula*

morfológicamente, identificando que ambos taxones no estaban bien definidos y excluyeron a un grupo de especies de *Russula*, con características similares pero que impedían que *Russula* fuera monofilético. De esta manera, *Russula sensu novo* es el género de *Russulaceae* más grande con más 800 especies descritas (Buyck y cols. 2008, Kirk y cols. 2008, Looney y cols. 2016), así, se definió al género *Russula* con especies principalmente agaricoides, de contexto quebradizo ya que contiene esferocitos en la trama, con colores muy brillantes en el píleo y con un estípote contrastantemente muy blanquecino.

El grupo de especies excluidas de *Russula*, en conjunto con algunas especies de *Lactarius*, forman actualmente el género *Multifurca* (Buyck y cols. 2008), este fue conformado más concretamente por la antigua subsección *Ochricompaetae* Bills y O.K. Mill., de *Russula*, la especie asiática *Russula zonaria* Buyck y Desjardin y la americana *Lactarius furcatus* Coker. Las especies de *Multifurca* se caracterizan por poseer láminas con múltiples bifurcaciones, el píleo muy zonado al igual que el contexto, color de esporada amarillo oscuro y presencia de látex en algunas especies. Actualmente, se incluyen seis especies, que se encuentran en Asia, Oceanía y Norteamérica (De Crop y cols. 2017).

Lactarius estaba constituido anteriormente por dos clados, uno al que pertenecían la mayoría de las especies que se encontraban principalmente en ambientes templados y el segundo que contenía pocas especies provenientes de ambientes tropicales. Ambos grupos fueron separados, al demostrarse por medio de un análisis filogenético molecular que *Lactarius* no era un grupo monofilético (Buyck y cols. 2008), sin embargo, la especie tipo (*Lactarius piperatus*) se encontraba en el clado de menor tamaño, por lo que, para evitar los múltiples cambios nomenclaturales que se tendrían que hacer, se apeló a la propuesta de que el clado mayor conservara el nombre de *Lactarius* (Buyck y cols. 2010), lo que fue aceptado en el Congreso Internacional de Botánica en 2011. Ahora *Lactarius sensu novo* está constituido mayoritariamente por especies de distribución templada, reconociéndose a *Lactarius torminosus* como la nueva especie tipo (De Crop y cols 2016, De Crop y cols. 2017).

El grupo más pequeño, con aproximadamente 150 especies, se llama *Lactifluus*, cuya especie tipo es *Lactifluus volemus* Fr. (De Crop y cols. 2016); ambos géneros, *Lactarius* y *Lactifluus* están bien sustentados por análisis moleculares, pero no se han encontrado características morfológicas que los separen de una manera precisa, sin embargo, no existen

características que se encuentren únicamente en cada subgénero, aunque sean diagnósticas y llegan a ser inútiles al momento de reconocer especies, especialmente en zonas tropicales, dichas características son las que se muestran en la tabla 3.

Tabla 1. Características que usualmente separan a los géneros *Lactarius* y *Lactifluus* (De Crop y cols. 2016).

<i>Lactarius</i>	<i>Lactifluus</i>
Píleo zonado y con tendencia a ser viscoso.	Píleo no zonado y con tendencia a ser seco o aterciopelado.
Trama del himenóforo principalmente compuesto únicamente por hifas.	Trama del himenóforo compuesta mayoritariamente de esferocitos.
Se encuentran especies hipogeas descritas.	Se conocen especies pleurotooides descritas.
Es poco común observar paredes gruesas en la pellis y el himenóforo.	Paredes gruesas en pileipellis, stipitipellis y trama del himenóforo.

1.5 Taxonomía del género *Lactarius*

En el reino Fungi, el género *Lactarius* Pers. 1797 se clasifica en el Subreino Dikarya, debido a que sus hifas presentan dos núcleos haploides la mayor parte de su ciclo de vida, en el filo Basidiomycota, debido a que produce meiosporas externas en células llamadas basidios, dentro del subfilo Agaricomycotina, dado que en sus hifas existe la presencia de septos doliporo-parentosoma, en la clase Agaricomycetes, porque las basidiosporas germinan sin formar esporas secundarias y/o células levaduriformes, en el orden Russulales, a causa de que tienen gleocistidios en el himenio y las esporas son amiloides, y finalmente pertenecen a la familia Russulaceae debido a que sus basidiomas presentan células globosas, llamadas esferocitos y filamentosas, la llamada trama heterómera (Kong 1995, Hibbet 2007, Monedero-García 2011). Todas las especies conocidas de la familia son ectomicorrizógenas, por lo tanto, no pueden sobrevivir sin estar asociadas con plantas hospederas (Monedero-García 2011).

Las basidiosporas pueden variar de forma globosa a elíptica y tienen ornamentación amiloide, la cual puede variar desde verrugas o espinas aisladas hasta un retículo, varía en altura incluso, puede estar ausente en un área por arriba del apéndice (llamada placa supra-

apendicular). La ornamentación presenta una reacción amiloide, es decir, se tiñe de negro azulado con el reactivo de Melzer. También tiene presencia de hifas lactíferas, que producen un líquido llamado látex. El género *Russula* se separa de *Lactarius* por no tener la capacidad de segregar látex y difiere del género *Lactifluus* debido a que la superficie del píleo a menudo es viscosa, con ixocutis o un ixotricodermio y a menudo presenta zonaciones de colores claros y oscuros. En *Lactifluus* la superficie del píleo es seca, no zonada y la mayoría de las especies tienen una distribución con influencia más tropical. En el género *Multifurca* las láminas presentan bifurcaciones consecutivamente 2-3 veces en todo su largo, mientras que en *Lactarius* son enteras o con muy pocas bifurcaciones (Buyck y cols. 2008).

El género *Lactarius* se caracteriza macroscópicamente por presentar basidiomas coloridos y exudación de látex. La base para distinguir entre las diversas especies de *Lactarius* a nivel macroscópico son diferentes características del píleo, láminas, trama, látex y estípite, entre ellas se encuentra el tamaño, forma, textura, ornamentación, color, entre otras. Sin embargo, las características macroscópicas son solamente un primer acercamiento a la posible especie, ya que las características microscópicas proporcionan algunos de los caracteres más importantes taxonómicamente. Los caracteres microscópicos importantes son las características de las esporas (tamaño, forma, tipo de ornamentación, tamaño de la ornamentación) (Figura 1); los tipos de pileipellis como: cutis, ixocutis, tricotermo, ixotricodermo y lamprotricotermo (Figura 2); las células del himenio, como los diferentes tipos de cistidios (pleurocistidios, queilocistidios y pseudocistidios), en los cuales se observa la morfología (forma, tamaño, número de septos, forma del ápice) para distinguirlos (Figura3), y otras células como los basidios y células marginales (Heilmann-Clausen y cols. 1998, Monedero-García 2011).

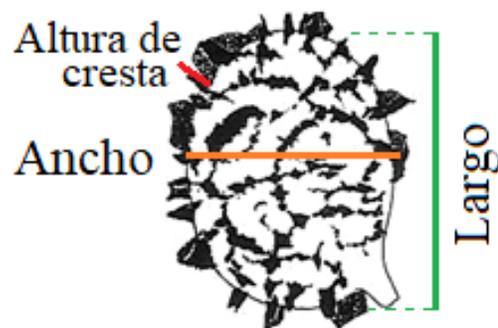


Figura 1. Espora de *Lactarius*, en la cual se pueden observar las características que son importantes para la taxonomía. Ilustración tomada y modificada de Brundrett y cols. (1996).

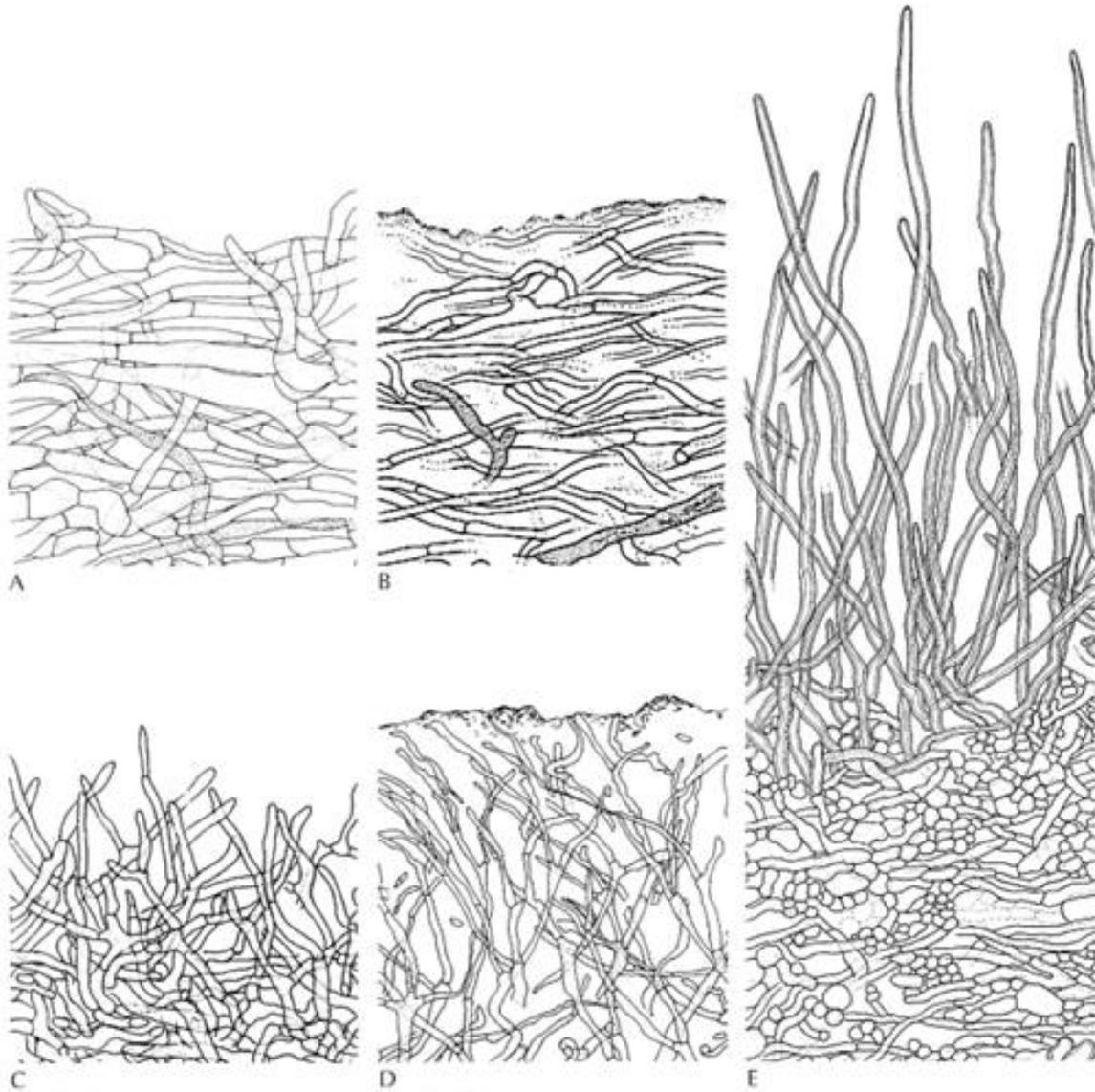


Figura 2. Tipos de pileipellis en *Lactarius*. A) Cutis, B) Ixocutis, C) Tricoderma, D) Ixotricoderma y E) lamprotricoderma. Ilustración tomada y modificada de Heilmann-Clausen y cols. (1998).

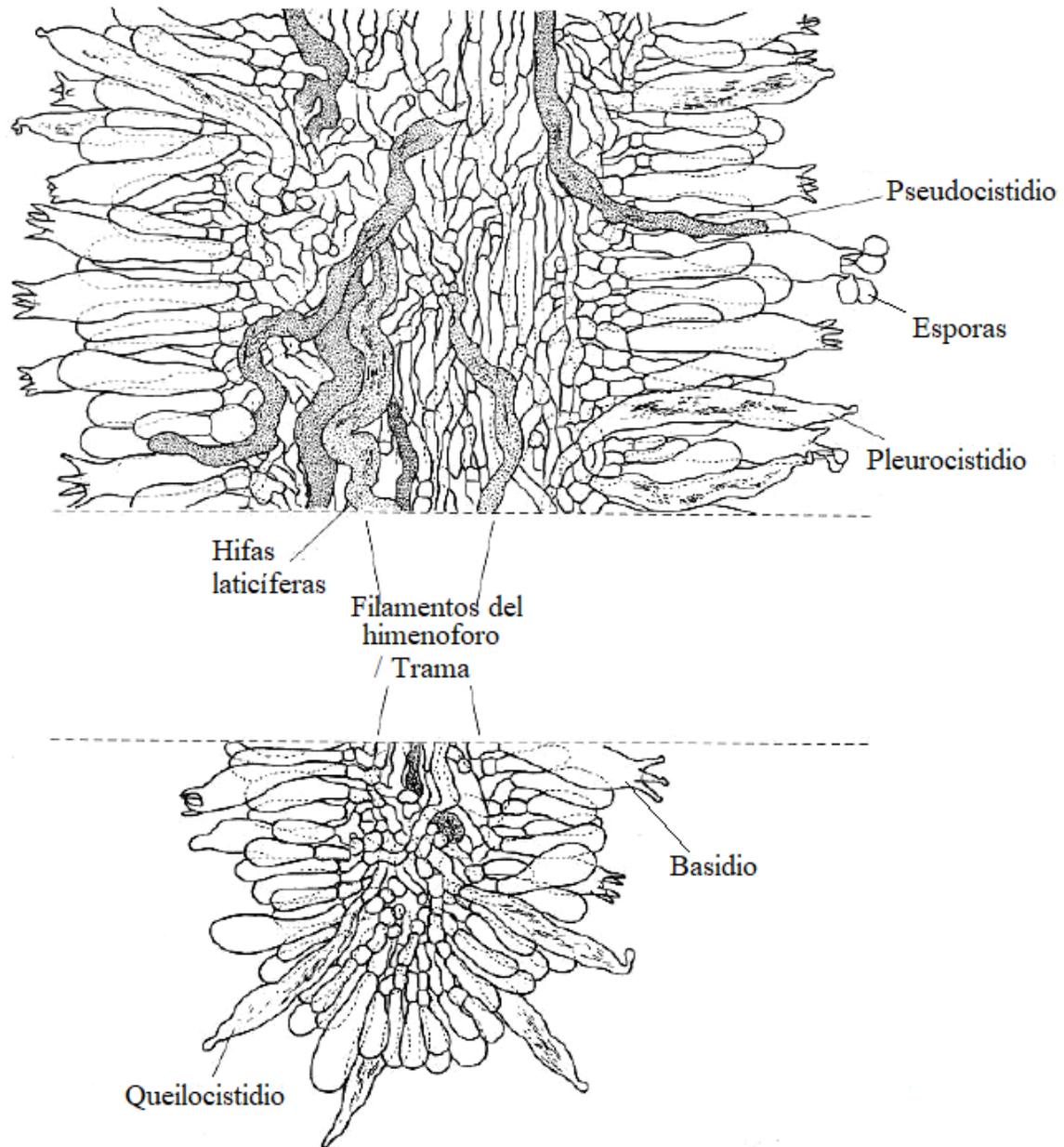


Figura 3. Trama de una lámina del himenio. Se observan las diferentes estructuras que componen a una lámina en su exterior: pseudocistidios, esporas, pleurocistidios, basidios y queilocistidios; así como su interior: hifas laticíferas (en el caso de *Lactarius*) y las hifas que componen la trama. Ilustración tomada y modificada de Heilmann-Clausen y cols. (1998).

A continuación, se presenta la clasificación actual del género *Lactarius*.

Dominio: Eukaryota Chatton, 1925

Reino: Fungi Whittaker, 1969

Phylum: Basidiomycota Moore, 1980

Subphylum: Agaricomycotina Dowell, 2001

Clase: Agaricomycetes Doweld, 2001

Orden: Russulales Kreisel, Kirk, Cannon y David, 2001

Familia: Russulaceae Lotsy, 1907

Género: *Lactarius* Pers, 1797

1.5.1 Clasificación infragenérica

Existen diferentes clasificaciones a nivel de subgénero, pues los caracteres a este nivel siguen siendo vastos, y dichas clasificaciones se han ido modificando a lo largo del tiempo de acuerdo con las características utilizadas. Uno de los primeros en establecer una clasificación formal utilizando caracteres macroscópicos fue Fries en 1821 (Kong 1995). Las clasificaciones infragenéricas actuales tienen como base las características microscópicas de la estructura del píleo (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998).

Hesler y Smith, en su clasificación de 1979 reconocen un total de 6 subgéneros, 18 secciones, 5 subsecciones y 5 estirpes (Tabla 1), a comparación de la clasificación que realizaron Heilmann-Clausen y colaboradores en 1998 (Tabla 2), que reconocen 6 subgéneros, de los cuales, comparten 5 con Hesler y Smith y cuya especie tipo es la misma: *Lactarius*, *Plinthogalus*, *Lactifluus*, *Piperites* y *Russularia*, cambiando esencialmente en algunas secciones.

En la clasificación realizada por Hesler y Smith el subgénero *Plinthogalus* se compone por 2 secciones: *Plinthogalus* y *Fumosi*, mientras que en la de Heilmann-Clausen y cols. solo se compone de la sección *Plinthogali*. En cuanto al subgénero *Lactifluus*, la primera clasificación

contiene 4 secciones, mientras que en la segunda solo una. Al subgénero *Piperites* Hesler y Smith lo dividen en 3 secciones mientras que para Heilmann-Clausen es su subgénero más grande, y contiene 7 secciones, compartiendo 2 secciones: *Atroviridi* y *Piperites*. El subgénero *Russularia* para Hesler y Smith se encuentra dividido en 5 secciones, mientras que para Heilmann-Clausen solamente en tres. Dichas clasificaciones se basaban únicamente en caracteres morfológicos tanto macro como microscópicos (Zuluaga y cols. 2011), por lo que el concepto de especie utilizado no solo para este grupo de hongos, sino en general era el concepto de especie morfológica (Matute y Sepúlveda 2019).

Posteriormente estas clasificaciones cambiaron, como se explica en la historia de su clasificación, sin embargo, al no existir una clasificación clara actual, ambas clasificaciones siguen siendo ampliamente utilizadas, aunque se conoce que actualmente son aceptados tres subgéneros para *Lactarius*: *L.* subg. *Russularia*, *L.* subg. *Lactarius* y *L.* subg. *Plinthogalus* (Verbeken y Nuytinck 2013, Triantafyllou y cols. 2015, Wisitrassameewong y cols. 2016).

Tabla 2. Clasificación del género *Lactarius* propuesta por Hesler y Smith (1979)

Taxon Infragenérico	Especie tipo
Subgénero <i>Lactarius</i>	<i>L. deliciosus</i> L. ex Fr. Gray, 1821
Subgénero <i>Plinthogalus</i> (Burl.) Hesler et Smith	
Sección <i>Plinthogalus</i>	<i>L. lignyotus</i> Fr., 1855
Sección <i>Fumosi</i> Hesler et Smith	<i>L. fumosus</i> Peck, 1872
Subgénero <i>Lactifluus</i> (Bul.) Hesler et Smith	
Sección <i>Lactifluus</i>	<i>L. volemus</i> (Fr.) Fr. 1848
Estirpe <i>Higrophoroides</i>	
Sección <i>Allardii</i> Hesler et Smith	<i>L. allardii</i> Coker, 1918
Sección <i>Piperati</i> Fr. Am. Hesler et Smith	<i>L. piperatus</i> (Fr.) S. F. Gray 1821
Sección <i>Albati</i> (Bat.) Sing.	<i>L. vellereus</i> (Fr.) Fr., 1838
Estirpe <i>Deceptivus</i>	
Estirpe <i>Subvellereus</i>	
Subgénero <i>Piperites</i> (Fr.) Kauffm.	
Sección <i>Atroviridi</i> Hesler et Smith	<i>L. atroviridis</i> Peck, 1889
Sección <i>Aspideini</i> (Sing.) Hesler et Smith	<i>L. aspideus</i> (Fr.) Fr., 1838

Estirpe <i>Speciosus</i>	
Estirpe <i>Aspideus</i>	
Sección <i>Piperites</i>	
Subsección <i>Piperites</i>	<i>L. torminosus</i> (Schaeff.) Gray, 1821
Subsección <i>Scrobiculati</i> Hesler et Smith	<i>L. scrobiculatus</i> (Scop.) Fr., 1838
Subsección <i>Croceini</i> (Burl.) Sing.	<i>L. croceus</i> Burl., 1908
Subgénero <i>Tristes</i> Hesler et Smith	
Sección <i>Violaceo-Maculati</i> Hesler et Smith	<i>L. subpalustris</i> Hesler y A. H. Sm., 1979
Sección <i>Pseudomyxadium</i> Hesler et Smith	<i>L. kauffmanii</i> Hesler y A. H. Sm., 1979
Sección <i>Tristes</i>	<i>L. maculosus</i> Murrill, 1916
Sección <i>Colorati</i> (Bat.) Hesler et Smith	<i>L. glyciosmus</i> (Fr.) Fr., 1838
Subgénero <i>Russularia</i> (Fr.) Kauffm.	
Sección <i>Triviales</i> Hesler et Smith	<i>L. affinis viridilactis</i> (Kauffman) Hesler y A. H. Sm., 1979
Sección <i>Pseudo-Aurantiaci</i> Hesler et Smith	
Subsección <i>Pseudo-Aurantiaci</i>	<i>L. substriatus</i> A. H. Sm., 1960
Subsección <i>Quieti</i>	<i>L. quietus</i> (Fr.) Fr., 1838
Sección <i>Thejogali</i> Hesler et Smith	<i>L. thejogalus</i> (Fr.) S. F. Gray 1821
Sección <i>Russularia</i>	<i>L. subdulcis</i> (Pers.) Gray, 1821
Sección <i>Subsquamosi</i> Hesler et Smith	<i>L. alpinus</i> Peck, 1875

Tabla 3. Clasificación del género *Lactarius* propuesta por Heilmann-Clausen y cols. (1998)

Taxón infragenérico	Especie Tipo
Subgénero <i>Piperites</i> (Fr.) Kauffman	<i>L. torminosus</i> (Schaeff.) Gray, 1821
Sección <i>Atroviridi</i> Hesler y A.H. Sm.	
Sección <i>Glutinosi</i> Quéll.	
Subsección <i>Pyrogalini</i> Singer	
Subsección <i>Trivialini</i> (Hesler y A.H. Sm.)	
Subsección <i>Pallidini</i> Bon	
Sección <i>Uvidi</i> (Konr.) Bon	

Subsección <i>Uvidini</i> Konr.	
Subsección <i>Aspideini</i> Singer	
Sección <i>Zonarii</i> Quél.	
Subsección <i>Scrobiculati</i> Hesler y A.H. Sm.	
Subsección <i>Croceini</i> (Burl.) Singer	
Subsección <i>Zonarii</i> Quél.	
Sección <i>Dapetes</i> Fr.	
Sección <i>Piperites</i> Fr.	
Sección <i>Colorati</i> (Bat.) Hesler y A.H. Sm.	
Subsección <i>Coloratini</i> (Bat.) Singer	
Subsección <i>Rufini</i> Singer	
Subgénero <i>Russularia</i> (Fr.) Kauffman	<i>L. subdulcis</i> (Pers.) Gray, 1821
Sección <i>Russularia</i> Fr.	
Sección <i>Tabidi</i> Fr.	
Sección <i>Olentes</i> Bat.	
Subgénero <i>Plinthogalus</i> (Burl.) Hesler y A.H. Sm.	<i>L. lignyotus</i> Fr., 1857
Sección <i>Plinthogali</i> (Burl.) Singer	
Subgénero <i>Lactifluus</i> (Burl.) Hesler y A.H. Sm.	<i>L. volemus</i> (Fr.) Fr., 1838
Sección <i>Lactifluus</i> (Burl.) Hesler y A.H. Sm.	
Subgénero <i>Lactarius</i> (Fr.) Pers.	<i>L. piperatus</i> (L.) Pers., 1797
Subgénero <i>Lactariopsis</i> (Henn.) R. Heim.	<i>L. zenkeri</i> (Henn.) Singer 1942
Sección <i>Albati</i> (Bat.) Singer	

1.6 Género *Lactarius*

1.6.1 Biología del género *Lactarius*

Desde 1924 que Melin confirmó con éxito que *Lactarius* es ectomicorrizógeno, se planteó que todas las especies del género son ectomicorrizógenas obligadas, ya que se ha demostrado que no pueden degradar compuestos como la celulosa y la lignina (Hutchison 1999). Aunque algunas especies se llegan a encontrar sobre troncos, dichas especies no son saprobias, ya que sus hifas están conectadas con el suelo (Hesler y Smith 1979). Así, *Lactarius* es uno de los géneros más grandes formadores de ectomicorrizas (cuenta con más de 500 especies descritas), se encuentra en casi todos los ecosistemas con alto grado de especificidad del huésped y sus especies fungen como colonizadoras en etapa tardía (Hutchison 1999, Le y cols. 2007).

La interacción simbiótica ocurre entre sus hifas y las raíces de plantas leñosas, formando un manto alrededor de las raíces, además de que el hongo también desarrolla una estructura donde se lleva a cabo la transferencia de nutrientes llamada red de Hartig, que se desarrolla a través del apoplasto del córtex de la raíz y que es en donde entran en contacto a nivel celular ambos organismos y donde ocurre el intercambio del carbono fijado por la planta por nutrientes minerales (P, Zn, N, Ca, Na y K), agua y protección (Pérez-Moreno y Read 2004, Bruns y cols. 2002, Galindo-Flores y cols. 2015).

1.6.2 Distribución y ecología

Aunque el género *Lactarius* fue descrito en Europa, se considera de presencia cosmopolita, es decir, se encuentra también en América, Asia, Oceanía y África, principalmente en zonas templadas donde pueden ser bastante abundantes (Hesler y Smith, 1979, Oros-Ortega y cols. 2017), aunque actualmente se está estudiando con mayor ahínco en zonas tropicales (Morris y cols. 2008, Looney y cols. 2016). Se encuentra en diferentes ecosistemas como bosques templados, boreales, mediterráneos, de coníferas, tropicales y selvas, principalmente a nivel de suelo, afines a suelos ácidos (Hesler y Smith 1979, Hutchison 1999, Wisitrassameewong y cols. 2016, Adamčík y cols. 2019).

Se encuentra asociado principalmente a pináceas y árboles caducifolios como fagáceas y betuláceas, con quienes se estima que se asociaron hace aproximadamente 157.78 millones de

años (Wisitrassameewong y cols. 2016). Hasta el momento se sabe que las especies pertenecientes a *Lactarius* tienden a ser especialistas con su hospedero (Bruns y cols. 2002, Wisitrassameewong y cols. 2016, De Crop y cols. 2016), relacionándose solo con una especie o un género de árboles como *L. quietus* que se asocia solo con *Quercus* o *L. blennius* que se asocia con *Fagus* (Heilmann-Clausen y cols. 1998).

Větrovský y cols. (2020) reportaron, que existen alrededor de 88,636 de secuencias de *Lactarius* en las bases de datos, muestreadas entre 2016 y 2018, que han ayudado a delimitar especies, a realizar hipótesis filogenéticas más exactas, así como definir su presencia en ciertos territorios. De esta manera se conoce mejor qué especies forman parte o no de la micobiota de los países, trabajo que se sigue realizando no solo en este grupo (Kõljalg y cols. 2013, Varga y cols. 2019, Rannala 2020).

1.6.3 Macromorfología

1.6.3.1 Color.

Morfológicamente *Lactarius* es muy diverso, resaltando que los esporocarpos son de una amplia gama de colores, y usualmente el color presente en el píleo lo está en el estípite pero más tenue. La coloración es uno de los caracteres más importantes para distinguir entre especies y de especial utilidad ya que los pigmentos no se disuelven con el agua, sin embargo, se pueden tornar ligeramente blancos con la edad y en climas secos, mientras que algunas especies se tornan oscuras o más intensas con la humedad. El color en el estípite tiende a oscurecerse con la edad (Heilmann-Clausen y cols. 1998, Hesler y Smith 1979).

El color en las láminas es más pálido en los ejemplares jóvenes, las cuales con la maduración de las esporas se vuelven más coloridas, en especial las especies que tienen esporada de un color más distintivo. El color del látex es mayoritariamente blanco, crema o acuoso inmediatamente después de ser exudado, pero tiende a cambiar después de un momento de exposición, dicha reacción permite diagnosticar a nivel de subgénero, el látex también puede llegar a manchar el color de la trama (Hesler y Smith 1979).

1.6.3.2 Textura superficial.

La textura en la superficie del píleo de *Lactarius* varía mucho y es de los caracteres más importantes, principalmente para distinguir entre secciones y subgéneros. Macroscópicamente se distinguen superficies pegajosas o viscosas (Subgénero *Piperites*), pilosas (Sección *Piperites* y *Scrobiculati*), secas y lisas (Subgénero *Russularia*), secas-aterciopeladas (Subgénero *Plintogalus*) y con sensación a fieltro o escamosas (Sección *Colorati*). Usualmente la textura macroscópica se ve reflejada en la estructura microscópica del pileipellis (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998).

El estípite suele ser seco y liso, sin embargo, también pueden ser pegajosos y aterciopelados. Una característica especial en el estípite de este género son los escrobículos, los cuales se observan como hoyos superficiales, estos están presentes en muchas especies principalmente del subgénero *Lactarius*, estos se desarrollan en especímenes jóvenes donde pequeñas gotas se adhirieron al estípite (Hesler y Smith 1979).

1.6.3.3 Sabor y olor.

Muchas especies tienen un sabor acre fuerte, también se puede percibir como ardiente, en otras especies se puede percibir un sabor suave, amargo o ligeramente ácido. El látex también presenta un sabor acre por lo que algunos especímenes secos o viejos presentan un sabor suave, a comparación de los más jóvenes de la misma especie; otras especies tienen el mismo sabor en el látex y trama, por lo que es importante probarlos por separado (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998).

En cuanto al olor, la mayoría de las especies de *Lactarius* tienen un aroma afrutado, pero en algunas es especiado. El olor en *Lactarius* es duradero, llegándose a intensificar en especímenes secos (Hesler y Smith 1979).

1.6.3.4 Utilidad.

Por ser un género ectomicorrizógeno su principal valor se encuentra en la silvicultura. También, son considerados recursos naturales no maderables, ya que varias especies son comestibles y tienden a ser muy apreciadas por su valor culinario y comercial, aportando un ingreso a las familias, de las poblaciones aledañas a los bosques. Entre las especies que destacan por su comestibilidad se encuentren: *Lactarius deliciosus*, *L. salmonicolor*, *L. sanguifluus*, *L.*

rubrilacteus, *L. subpurpureus*, *L. chelidonium*, *L. volemus*, *L. hygrophoroides*, *L. corrugis* y *L. indigo*. Las especies que no son comestibles no son mortales, por lo que simplemente no tienen valor culinario o solo llegan a causar leves malestares (Hesler y Smith 1979, Niveiro y cols. 2009, Bello-Cervantes 2019).

1.7 Subsección *Croceini*

De acuerdo con Hesler y Smith en 1979, *Croceini* agrupa a las especies de *Lactarius* que se distinguen morfológicamente por presentar un píleo glabro, más o menos viscoso, a menudo zonado, con el margen entero o pruinoso o muy poco aterciopelado, látex de color blanco que cambia rápidamente a color amarillo o mancha los tejidos de amarillo, pileipellis en forma de un ixocutis y abundantes cistidios en el himenio. De acuerdo con Heilmann-Clausen y cols. (1998) las especies pertenecientes a *Croceini* cuentan con un carpóforo de seco a viscoso, suave, los especímenes jóvenes a veces tienen el margen velutinoso, el látex se torna amarillo y tienen abundantes macrocistidios.

De acuerdo con Hesler y Smith (1979), el grupo se encontraba conformado por 10 especies: *Lactarius vinaceosporus*, *L. carolinensis*, *L. maculatipes*, *L. incarnato-zonatus*, *L. croceus*, *L. ausablensis*, *L. colorascens*, *L. chrysorrhoeus*, *L. albolutescens* y *L. vinaceorufescens*; cuya especie tipo es *Lactarius croceus*. Se han descrito especies adicionales de *Croceini*, las cuales son: *Lactarius xanthogalactus* Peck; *L. lacteolutescens* Montoya, Bandala y G. Moreno; *L. xanthogalus* Verbeken y E. Horak; *L. indochrysorrhoeus* K. Das. y Verbeken; *L. citrinus* H. Lee, Wisitr. y Y.W. Lim y *L. lutescens* H. Lee, Wisitr. y Y.W. Lim. Por lo que hasta el momento se conocen 16 especies pertenecientes a *Croceini*, encontrándose principalmente en bosques del hemisferio norte (Verbeken y Nuytinck 2013), a excepción de *Lactarius xanthogalus* descrito en Papúa Nueva Guinea, sin embargo, con una vista rápida a páginas que son una base de datos abiertos en línea como lo es GBIF nos podemos percatar que varias de estas especies tienen registrada una distribución mucho más amplia llegando a zonas tropicales en América.

1.8 Herramientas moleculares para la delimitación de especies

Las especies son una de las unidades fundamentales de la biología y su estudio se vincula a los procesos de especiación. Debido a esto son de interés para la biología evolutiva, diversidad, ecología, y biogeografía de los organismos, incluyendo a los hongos (De Queiroz 2005, Sato y cols.2020). Dado que la especiación es un proceso continuo, se han implementado diferentes herramientas para su delimitación, aunadas a diferentes conceptos de especie (De Queiroz 2007, Martínez 2015, Matute y Sepúlveda 2019). El concepto biológico de especie es uno de los pilares, pero de poca utilidad para especies que no se reproducen únicamente de manera sexual, como los hongos (Matute y Sepúlveda 2019).

Para poder delimitar especies se pueden utilizar diferentes líneas de evidencias (morfología comparada, filogenia, ecología, etc.) y enfoques los cuales pueden ser a nivel genético hasta biogeográfico como: topología de árboles filogenéticos, morfometría, marcadores moleculares para evaluar distancias (p) génicas, presencia o ausencia de flujo génico, modelaje de nicho ecológico, entre otros. (DeSalle y Siddall 2005, Martínez 2015).

El reconocimiento y clasificación de las especies sigue siendo un punto de discusión, ya que tanto las evidencias utilizadas para su delimitación como los conceptos para definir las solo toman en cuenta un enfoque o solo una parte del espectro de la especiación (genético, molecular, ecológico, aislamiento, fenético, genealógico. monofilético, etc.). La taxonomía integradora unifica varias evidencias, lo que proporciona mayor evidencia para delimitar linajes, mejores conclusiones y fortalece las hipótesis (DeSalle y Siddall 2005, De Queiroz 2007, Martínez 2015).

Bajo el concepto unificado de especie, cada evidencia que anteriormente ayudaba a definir cada concepto es ahora una de las muchas evidencias de la especiación, por lo que todas son igual de importantes y el uso de varias puede aportar robustez a una hipótesis dada (DeSalle y Siddall 2005, De Queiroz 2007).

Las evidencias más utilizadas actualmente son los métodos de delimitación molecular, los cuales se fundamentan en el grado de aislamiento genético entre especies, la mayoría de los métodos se basan en patrones observados en árboles filogenéticos, entre los que se encuentran: Poisson Tree Process (PTP; Zhang y cols. 2013), General Mixed Yule Coalescent (GMYC; Pons

y cols. 2006) y Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP; Yang y Ranala 2010), mientras que Automated Barcode Gap Discovery (ABGD; Puillandre y cols. 2012) solo se basa en distancias genéticas.

Los diferentes enfoques moleculares para detectar los límites de las especies en hongos se centraron en detectar diferencias entre agrupaciones genéticas. Los enfoques se pueden dividir en los que buscan la concordancia genética y los que se basan en coalescencia. La coalescencia se basa en comprender la relación de las especies hasta un ancestro común (De Queiroz 2007). Uno de los métodos de coalescencia es usar diferentes patrones de ramificación intraespecífica para distinguir entre especies y poblaciones, bajo el supuesto de que intraespecíficamente los eventos de ramificación serán más frecuentes que interespecíficamente, esta es la base de GMYC y PTP (Matute y Sepúlveda 2019).

De las 144 mil especies actualmente registradas de hongos (Aguirre-Acosta y cols. 2014, Willis 2018) la mayoría fueron determinadas únicamente mediante morfología, lo cual ha generado diferentes controversias, principalmente por la existencia de un gran número de especies crípticas (Zuluaga y cols. 2011, Schoch y cols. 2014, Hawksworth y cols. 2011). El uso de las herramientas moleculares ayudó a aclarar muchas relaciones no solo a nivel de especie, sino se han reestructurado varios grupos, como sucedió en los russuláceos (De Crop, 2016, De Crop y cols 2017); actualmente se han utilizado los métodos de delimitación en hongos Ascomycota como lo realizado por Maharachchikumbura y cols. (2021) donde utilizaron 6 métodos de delimitación (ABGD, bPTP, GMYC, TCS, STACEY y BPP) para la delimitación del género *Phyllosticta*. Las herramientas moleculares nos han ayudado a aclarar las relaciones evolutivas y por consecuencia a reestructurar las clasificaciones (Aguirre-Acosta E. y cols. 2014, Schoch y cols. 2014, Hawksworth y Lucking 2018, Willis 2018).

1.9 Marcadores moleculares para hongos

Los datos moleculares al igual que los morfológicos son utilizados para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas, estimar variación en poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas. Estos caracteres moleculares son utilizados para estudiar a todos los seres vivos, lo que permite establecer hipótesis de homología, existen diferentes tipos y se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos (Alcántara 2007).

Los caracteres moleculares aun no son considerados parte de la descripción de las especies, pero es importante incluirlas en el diagnóstico (Rannala 2020). Los caracteres moleculares pueden provenir de biomoléculas como proteínas y secuencias génicas. En el caso de las secuencias génicas la delimitación de especies es basada en secuencias de ADN: ADN nucleolar (nADN), ADN de cloroplasto (clADN), ADN mitocondrial (mtADN) y ADN ribosómico (rADN), las cuales han ayudado a la identificación de especies, ya que contienen información sobre el grado de aislamiento genético entre ellas. De esta forma, en especies crípticas, las poblaciones aisladas son especies putativas o potenciales (Paz y cols. 2011, Kõljalg y cols. 2013, Pons 2006, Rannala 2020).

En el 2003, el Código de Barras de la vida (DNA Barcoding) fue propuesto por Hebert y colaboradores, a grandes rasgos se basa en el uso de una región de ADN estandarizada para identificar rápidamente a una especie mediante solo una muestra de tejido del organismo. Se obtiene la secuencia específica del grupo al que pertenece el organismo a identificar y se compara con las secuencias de otros organismos que se encuentran almacenadas en una base de datos (Paz y cols. 2011). Así, se han establecido diversos porcentajes de variación en el Código de Barras por taxones, en el caso de los eucariotas es 1.5%, este es también utilizado en hongos macroscópicos (1.5 - 2%), mientras que para hongos microscópicos es de 1% (Kõljalg y cols 2020).

Estas secuencias tienen dos principales usos, uno que tiene una función diagnóstica, ya que nos permite distinguir entre especies y otro para delimitar a las especies, en ambas, los tipos y cantidad de datos requeridos son diferentes. DeSalle y Siddall (2005) lo representa mediante un círculo llamado “círculo taxonómico”, el cual representa el enfoque de taxonomía integradora, en el cual proponen el uso de caracteres moleculares en la taxonomía, pero no como la única fuente de información para reconocer o delimitar especies con diferentes evidencias (morfología, reproducción, ADN, geografía y ecología).

Se propuso el uso del ITS y de la subunidad grande del ADNr (LSU, por sus siglas en inglés) como códigos de barras y, aunque aún no existe un consenso para su uso en los hongos, estos se han usado para identificar (Paz y cols. 2011) y delimitar las diversas especies (Rosenblad y cols. 2016). La región ITS ha sido la más utilizada en hongos ya que cuenta con ciertas regiones de rápida evolución que lo han convertido en una piedra angular en la inferencia

filogenética (Rosenblad y cols. 2016). Actualmente se considera como una fuente adicional para el descubrimiento de especies nuevas, así como una ayuda para su reconocimiento y delimitación (Paz y cols. 2011, Kõljalg y cols.2013).

Aunque hay muchas copias de ITS por genoma, este puede llegar a ser muy variable en algunas especies, lo que hace que no delimite a todas las especies, pero si a la mayoría. Actualmente se están investigando otras regiones que pueden ayudar a delimitar e identificar las especies, por ejemplo, regiones del ADN ribosómico nuclear nSSU y tres de genes codificantes (RPB1, RPB2 y la proteína de mantenimiento de minicromosomas MCM7) (Paz y cols. 2011, Kõljalg y cols. 2013, Oros y cols. 2017).

La delimitación de especies se puede definir como la práctica que ayuda a determinar qué grupo de organismos constituyen especies o linajes diferentes (Rannala 2020). Los caracteres morfológicos han sido la principal fuente de información para la taxonomía fúngica, estos se hicieron cada vez más minuciosos, posteriormente se agregaron más y diferentes, tales como caracteres fisiológicos y químicos (Morrone 2013). Los caracteres morfológicos llegan a ser bastante plásticos, especialmente en ciertos grupos de organismos, como los hongos, por lo cual pueden ser poco informativos (Wisitrassameewong y cols. 2016, Rannala 2020).

De hecho, muchas especies de hongos que se identifican como especies cosmopolitas son complejos de especies crípticas, especies que a nivel práctico no se pueden distinguir por su apariencia (morfológicamente irreconocibles) (Sáez 2009). Wisitrassameewong y cols. (2016) afirmaron que muchas especies no tienen una distribución cosmopolita, sino que el endemismo regional es más común, por lo que es necesario tomar en cuenta muchos caracteres incluyendo los ecológicos para delimitar a las especies.

La capacidad de detectar polimorfismos a través de los caracteres moleculares, ayuda a separar de manera más puntual a las especies dentro de un taxón dado, ya sea basándose en filogenias previamente realizadas o en un grupo de secuencias correctamente alineadas, ya que de esta se forman las hipótesis de homología (De Luna y Mishler 1996, Alcántara 2007).

Con la incorporación de las técnicas moleculares en los estudios sistemáticos, la herramienta más utilizada para delimitar especies en la mayoría de los grupos es la filogenética, en la cual los grupos se pueden definir por un número determinado de caracteres, en principio

autapomorfos (únicos y exclusivos del taxón), que dan la evidencia de que dicho linaje es monofilético (Aguilera y Silva 1997).

2 ANTECEDENTES

2.1 Análisis filogenéticos con en el género *Lactarius*

El objetivo de los análisis filogenéticos es obtener una hipótesis de filogenia que refleje la historia evolutiva en cierto grupo taxonómico (Hibbett y cols. 2018). En el pasado, la clasificación de la familia Russulaceae se basaba principalmente en el tipo o forma del esporocarpio, ubicando a las especies agaricoides dentro de los géneros *Russula* Pers. y *Lactarius* Pers. Sin embargo, la clasificación cambió cuando se aclaró que otras formas del esporocarpio que se habían clasificado en géneros diferentes como las pleurotoides, secuestradas y con velo se derivaron tanto de *Russula* como de *Lactarius* y su ubicación como parte de estos dos géneros se sustentó con análisis morfológicos y moleculares (Buyck y Horack 1999, De Crop 2016).

El género *Lactarius* fue descrito en 1797 y actualmente tiene descritas más de 500 especies. La utilización de caracteres moleculares ha influido en la clasificación tradicional, generando hipótesis que han servido como base para la construcción de nuevas clasificaciones, han ayudado a inferir relaciones filogenéticas, aclarar procesos evolutivos y explicar la variabilidad genética. A pesar de que *Lactarius* es de los géneros más estudiados, aún se desconoce mucho de su diversidad (Le y cols. 2007, Wisitrassameewong y cols. 2016).

Anteriormente *Lactarius* comprendía varios subgéneros (Tablas 1, 2). Actualmente, son aceptados tres subgéneros: *L. subg. Russularia* (P. ex Burl.) Kauffman, *L. subg. Piperites* (P. ex J. Kickx f.) Kauffman y *L. subg. Plinthogalus* (Burl.) Hesler y A.H. Sm. (Triantafyllou y cols. 2015, Wisitrassameewong y cols. 2016). Para llegar a ello, la clasificación ha sufrido innumerables cambios con base en herramientas moleculares y morfológicas principalmente (Miller y cols. 2001, Verveken 2014). Sin embargo, aún es necesario incluir aspectos ecológicos como su asociación micorrízica.

2.2 Clasificación de *Lactarius* subsección *Croceini*

En 1908 Burlingham introduce el grupo *Croceae* del género *Lactaria* (forma ortográfica de *Lactarius*) sin definir un rango taxonómico específico para ubicar a *Lactaria crocea* y especies afines. Posteriormente, en 1962, Singer propuso formalmente al grupo como la subsección *Croceini* del género *Lactarius* sección *Lactarius* (Hesler y Smith 1979). Hesler y Smith (1960) lo elevaron a nivel de sección bajo el nombre de *Crocei*. Sin embargo, en clasificaciones posteriores como la de Hesler y Smith (1979) y Heilmann-Clausen y cols. (1998) fue clasificado como subsección dentro del subgénero *Piperites*, pero en la sección *Piperites* y en la sección *Zonarii*, respectivamente.

Le y cols. (2007) concluyeron que el único clado bien soportado dentro del subgénero es la sección *Deliciosi* y además observaron problemas en la delimitación de los subgéneros *Lactarius* y *Russularia*. En la actualidad el subgénero *Piperites* se considera un sinónimo del subgénero *Lactarius* (Buyck y cols. 2008) y existen muy pocos análisis filogenéticos representativos para aclarar las relaciones entre los diferentes grupos dentro de este subgénero, Lee y cols. (2019) encontraron en su estudio que molecularmente el subgénero *Lactarius* no es monofilético.

Actualmente se considera que *Croceini* se encuentra dentro del subgénero *Lactarius*. Sin embargo, Das y cols. (2015) utilizando datos moleculares para ubicar cuatro especies nuevas, mostraron que *Lactarius indo-chryso-rheus* K. Das y Verbeke, *Lactarius chryso-rheus* Fr., y secuencias afines a *Lactarius chryso-rheus*, forman un clado que se agrupa dentro del subgénero *Russularia*, relacionándose con secuencias de *L. quietus* (Fr.) Fr., *L. helvus* (Fr.) Fr., *L. subdulcis* (Pers.) Gray, y *L. rufus* (Scop.) Fr.

Posteriormente, Wisitrassameewong y cols. (2016) realizaron un estudio sobre la diversidad y relaciones evolutivas de *Russularia*, encontrando que las secuencias de *Lactarius chryso-rheus* y *L. vinaceo-rufescens* A. H. Smith, especies pertenecientes a la subsección *Croceini*, se agruparon con una secuencia de *Lactarius* aff. *subzonarius* Jahn, del subgénero *Russularia*, por lo que en dicho estudio las incluyeron en dicho subgénero.

Barge y Cripps (2016) realizaron un análisis filogenético de las especies de *Lactarius* encontradas en Yellowstone utilizando datos moleculares, encontrando que una secuencia identificada como *Lactarius chryso-rheus* se agrupó en el mismo clado que *Lactarius helvus* y

L. camphoratus, dos especies pertenecientes al subgénero *Lactarius*. Dichos autores no discutieron este resultado.

Lee y cols. (2019) realizaron una revisión taxonómica del género *Lactarius* en Corea basándose en caracteres moleculares y encontraron que, las especies de *Croceini*: *Lactarius chrysorrheus*, *L. vinaceorufescens*, *Lactarius lutescens*, H. Lee, *L. citrinus* H. Lee, *L. xanthogalactus* Peck, los cuales se anidaron dentro del clado del subgénero *Russularia*, muy cerca a *L. brachycystidiatus* X.H. Wang. Dichos autores, fueron los únicos que discutieron su posición filogenética e hicieron una comparación morfológica de las especies y grupos implicados. Morfológicamente afirman que 9 de las 16 especies coreanas que se agruparon en su árbol dentro del subgénero *Russularia* tienen látex blanco. Mientras que la decoloración amarilla del látex y la zonificación del píleo son caracteres compartidos entre las especies del grupo *chrysorrheus* (*L. chrysorrheus*, *L. citrinus*, *L. indo-chrysorrheus*, *L. lutescens*, *L. vinaceorufescens* y *L. xanthogalactus*)

Pudimos observar que en todos los trabajos las especies de *Croceini* se agrupan dentro del subgénero *Russularia*, pero relacionándose con diferentes especies pertenecientes a diferentes secciones dentro de este. La mayoría de los miembros del subgénero *Russularia* tienen el píleo con una superficie seca y basidiomas de color marrón anaranjado a marrón rojizo, tallo seco blanco con látex blanco lechoso o acuoso, en algunas especies volviéndose amarillo azufre (Heilmann-Clausen et al. 1998, Wisitrassameewong 2015, Wisitrassameewong et al. 2016).

Las especies pertenecientes a la sección *Subscuamulosi* se distinguen porque la superficie del píleo es seca y fibrilosa a escamosa al principio, o húmeda y \pm glabra y en algunos se vuelve fibrilosa a areolada al desvanecerse (si es escamosa, las escamosas se componen de fascículos de hifas), con el margen barbudo (estrigoso) y látex blanco como leche que no presenta cambios (Hesler y Smith 1979). Representadas en los estudios por las especies *Lactarius helvus* y *L. subzonarius*.

La sección *Pseudo-Aurantiaci* que vemos representada en estos estudios por la especie *Lactarius quietus* suelen tener el píleo zonado, viscoso que seca rápidamente, un margen desnudo a poco pruinoso con presencia de queilo, pleuro y macrocistidios en el himenio y

exudación de látex blanco a blanco acuoso que cambia a amarillo. (Hesler y Smith 1979, Lee y cols. 2019).

Las especies pertenecientes a la sección *Russularia* tienen el píleo mayormente seco, el estípote, llega a ser viscoso al principio y se seca muy pronto, usualmente de basidiocarpos frágiles y de tamaño pequeño a mediano, y exuda un látex blanco que no cambia (Hesler y Smith 1979). En los estudios es representado por las especies *Lactarius subdulcis*, y *L. lanceolatus*.

La sección *Olentes* se caracteriza por una estructura de la pileipellis en forma de hipoepitelio, el margen del píleo no es tomentoso y exuda látex blanco que no tiene cambios al exponerse al aire. En los estudios es representado por la especie *Lactarius camphoratus*.

Finalmente, la especie *Lactarius brachycystidiatus* con quien aparece asociado el grupo *Croceini* únicamente en Lee y cols. (2019) se caracteriza por tener el píleo con una superficie seca, lisa o con escamas adnatas a veces con brillo sedoso, exuda un látex blanco acuoso que no presenta decoloración al exponerse al aire, el estampado de sus esporas es blanco. Esta especie fue descrita hace poco en 2017 donde propusieron colocarla tentativamente en la sección *Colorati* perteneciente al subgénero *Lactarius* ya que posee un píleo escamoso con hifas bastante anchas en la pileipellis y las basidiosporas reticuladas, sin embargo, Wisitrassameewong et al. (2014) y Lee y cols. (2019) la ubican dentro de *Russularia*.

3 JUSTIFICACIÓN

En los esquemas de clasificación actuales del género *Lactarius* no reflejan las relaciones filogenéticas de *Croceini* respecto a otras secciones o subsecciones, por lo que el presente estudio generará información sobre las relaciones filogenéticas de la subsección *Croceini*. Los métodos de delimitación de especies basados en caracteres moleculares nos permitirán reconocer de forma más objetiva el número de especies que forman la subsección *Croceini*, por lo que la presente tesis pretende contribuir al conocimiento general de *Lactarius* subsección *Croceini* a nivel mundial.

4 HIPÓTESIS

- Las especies de la subsección *Croceini* se agruparán dentro del subgénero *Russularia*.
- Será un grupo hermano de la sección *Pseudo-Aurantiaci*.

5 OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General:*

Evaluar con base en caracteres moleculares las relaciones filogenéticas y la delimitación molecular de especies de la subsección *Croceini*.

5.2 *Objetivos Particulares:*

1. Establecer las relaciones filogenéticas de las especies que forman la subsección *Croceini* y evaluar la posición sistemática de esta subsección dentro de los subgéneros y secciones de *Lactarius*.
2. Delimitar con base en la región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) las diferentes especies que integran a la subsección *Croceini* del género *Lactarius*, utilizando al menos tres métodos.

6 METODOLOGÍA

6.1 Bases de datos y muestreo taxonómico

En el presente trabajo se utilizó la región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) ya que es el marcador generalmente utilizado en hongos (Rosenblynd y cols. 2016). Las secuencias de ITS de los especímenes del género *Lactarius* se obtuvieron de las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y UNITE (<https://unite.ut.ee/>). En total se incluyeron 185 secuencias de la región ITS pertenecientes a los tres subgéneros de *Lactarius* (*L. subg. Russularia*, *L. subg. Piperites* y *L. subg. Plinthogalus*) (Tabla 4), dando énfasis a especies de los subgéneros *Russularia* y *Lactarius* (*Piperites*) (Anexo 1), así como a secuencias de especies pertenecientes a la subsección *Croceini*, sobre todo a aquellas relacionadas con *L. chrysorrheus* (Tabla 3). También se incluyeron secuencias de taxones de las subsecciones *Scrobiculati*, *Zonarii* y *Lactarius* que se han relacionado anteriormente con *Croceini* dentro del subgénero *Lactarius* (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998).

Las secuencias que forman la matriz de caracteres (Apéndice 1) se seleccionaron buscando que contaran con una mayor robustez informativa, ya sea que fuesen del holotipo o que fueran una secuencia de referencia. Las secuencias fueron alineadas con el programa MAFFT (Multiple sequence Alignment using Fast Fourier Transform) versión 7 en línea (Katoh y Standley 2013), con las opciones predeterminadas. Una vez obtenido el alineamiento, se editó manualmente. El alineamiento consta de 761 caracteres incluyendo gaps.

Aunque a *Croceini* actualmente está constituido por 16 especies, en las bases de datos solo están presentes 9 especies (*Lactarius maculatipes*, *L. croceus*, *L. colorascens*, *L. chrysorrheus*, *L. vinaceorufescens*, *L. indochrysorrheus*, *L. xanthogalactus*, *L. citrinus* y *L. lutescens*) para el presente estudio se tomaron en cuenta 5 de ellas (*L. colorascens*, *L. chrysorrheus*, *L. vinaceorufescens*, *L. indochrysorrheus*, *L. xanthogalactus*). Ya que se realizó una búsqueda en blast con la secuencia de *Lactarius chrysorrheus* que es material de referencia y estas especies mencionadas eran las más cercanas.

Tabla 4. Secuencias que pertenecen a la subsección *Croceini* incluidas en el estudio, con el nombre que le asignamos a la secuencia, su número de acceso y procedencia,

Subsección <i>Croceini</i> (Burl.) Sing.		
Nombre de la secuencia	# de Acceso	Procedencia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786458	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786459	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787208	Austria
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KT165289	Italia
<i>ECM_Quercus_petraea</i>	FM995570	Francia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786650	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787211	Austria
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786460	Hungría
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KF133261	Italia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786461	Hungría
<i>ECM_Lactarius</i>	FJ210740	Italia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787214	Austria
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787213	Austria
<i>ECM_Lactarius</i>	DQ990840	Italia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787212	Austria
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786467	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786463	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0788014	Francia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0786464	Hungría
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787210	Austria
<i>Lactarius_chrysorrheus_RefSeq</i>	UDB011470	Estonia
<i>ECM_Quercus</i>	KY794693	Alemania
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0788016	Francia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0788018	Francia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787911	Francia
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	UDB015752	Estonia
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	JF908324	Italia
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KT165286	Eslovaquia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0788015	Francia
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	UDB019764	Estonia
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0787368	Reino Unido
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KJ742396	Bélgica
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KJ742397	Francia
<i>Lactarius_obscuratus</i>	UDB000864	Alemania
<i>ECM_Pinus_sylvestris</i>	MF352750	Reino Unido
<i>ECM_Quercus</i>	UDB0788012	Francia
<i>ECM_Lactarius_chrysorrheus</i>	KX449473	Francia

ECM_ <i>Quercus_suber</i>	AM930233	Portugal
ECM_ <i>Quercus_petraea</i>	KM576492	Francia
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KT165290	Bélgica
ECM_ <i>Abies_balamifera</i>	MK069510	Canadá
ECM_ <i>Abies_balamifera</i>	MK069511	Canadá
ECM_ <i>Picea_rubens</i>	MK069512	Canadá
ECM_ <i>Pinus_clausa</i>	KX899308	USA
ECM_ <i>Pinus_clausa</i>	KX899734	USA
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	GU256225	USA
ECM_ <i>Lactarius</i>	KX816119	USA
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	EU569286	México
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MK397223	México
ECM_ <i>Quercus</i>	FJ196932	México
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MN612772	Colombia
<i>Lactarius</i>	KF937341	Colombia
ECM_ <i>Castanea_dentata</i>	MG674538	USA
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MK167433	China
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MT560360	China
ECM_ <i>Pinus</i>	MT522558	China
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MK167405	China
<i>Lactarius_parallelus</i>	MH984997	Corea del Sur
ECM_ <i>Abies_balamifera</i>	MK069509	Canadá
ECM_ <i>Lactarius</i>	KF359597	USA
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	FJ596871	USA
<i>Lactarius_vinaceorufescens</i>	KJ705219	Canadá
ECM_ <i>Pinus_banksiana</i>	FJ769539	USA
ECM_ <i>Pinus</i>	MH809946	Canadá
ECM_ <i>Betula_papyrifera</i>	KC876312	Canadá
ECM_ <i>Pinus_ponderosa</i>	MG761555	USA
<i>Lactarius_vinaceorufescens</i>	MK131496	Canadá
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KT875046	México
ECM_ <i>Betula_papyrifera</i>	KC876313	Canadá
<i>Lactarius_vinaceorufescens</i>	KJ705217	Canadá
ECM_ <i>Pinus_thunbergii</i>	LC029804	Japón
<i>Lactarius_indochrysorrheus</i>	KJ742391	India
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	KC185407	Taiwán
<i>Lactarius_hatsudake</i>	MH984970	Corea del Sur
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	MH910553	USA
<i>Lactarius_aff_chrysorrheus</i>	KJ742398	USA
<i>Lactarius_aff_chrysorrheus</i>	KJ742399	USA
<i>Lactarius_cremicolor</i>	MH984942	Corea del Sur

<i>Lactarius</i>	MH985024	Corea del Sur
ECM_ <i>Pinus_amamiana</i>	LC364251	Japón
<i>Lactarius_chrysorrheus</i>	AF096983	España
ECM_ <i>Lactarius</i>	KJ173926	China
<i>Lactarius_colorascens</i>	MT237509	USA
<i>Lactarius_xanthogalactus</i>	EU726293	USA
ECM_ <i>Quercus_wislizeni</i>	EF411111	USA
ECM_ <i>Pseudotsuga_menziesii</i>	AM231787	USA
ECM_ <i>Pseudotsuga_menziesii</i>	AM231790	USA
ECM_ <i>Pseudotsuga_menziesii</i>	AM231788	USA
ECM_ <i>Pseudotsuga_menziesii</i>	AM231791	USA
<i>Lactarius_xanthogalactus</i>	DQ974745	USA
ECM_ <i>Lithocarpus_densiflorus</i>	DQ273390	USA
ECM_ <i>Pseudotsuga_menziesii</i>	AM231792	USA
ECM_ <i>Quercus_kelloggii</i>	KC791080	USA

6.1.1 Elección del grupo externo

El criterio de comparación con el grupo externo es para enraizar las tipologías (Morrone, 2013), se utilizaron cinco especies del subgénero *Plinthogalus* (*Lactarius lavandulus* <EF560675>, *L. atromarginatus* <UDB039619>, *L. fallax* <JQ446103>, *L. lignyotus* <UDB000390>, *L. fallax var. concolor* <JQ446104>). Se eligió a *Plinthogalus* como grupo externo ya que como uno de los tres subgéneros de *Lactarius* ayuda a probar bien las relaciones de los otros dos subgéneros, donde se debate la posición de *Croceini* dentro de los subgéneros *Russularia* y *Lactarius*, representar la mayor variación posible encontrada en ambos grupos nos ayudará a definir la posición de *Croceini*, basándonos en observaciones que realizaron Wisitrassameewong y cols. (2015).

6.1.2 Criterios para la delimitar las especies

Se utilizó el criterio de integración por congruencia para delimitar las especies, ya que se basa en la congruencia que tienen los distintos métodos moleculares entre sí, generando de esta manera hipótesis más robustas (Carstens y cols. 2013).

Se realizó una matriz de la región ITS solo con los especímenes pertenecientes a *Croceini* (tabla 3). Se utilizó jModelTest v. 2.1.10 para obtener el modelo evolutivo con el criterio de información de Akaike (AIC) = TIM1ef+G y el criterio de información Bayesiano (BIC) = K80+G. A priori se observaron las distancias genéticas (Neighbor Joining (NJ)) basándose en el umbral de distancia promedio >2% del código de barras como diferentes especies putativas (Kõljalg y cols. 2020).

Los métodos utilizados fueron únicamente moleculares, utilizando los siguientes métodos:

- 1) Basados en distancias genéticas (Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)).
- 2) Basados en métodos de descubrimiento sin particiones a priori (Automatic Barcode Gap Discovery (GMYC)).
- 3) Basados en árboles filogenéticos bajo el criterio de monofilia (Maximum Likelihood (ML), Bayesian Inference (BI), Poisson Tree Processes (PTP)).

Como criterio preliminar el análisis de distancia genética (p) con NJ se realizó en el programa MEGA X v. 10.2.6 (Kumar y cols, 2018), para lo cual se utilizó un número de réplicas de Bootstrap de 10,000, tipo de sustitución = nucleótido, con el modelo Kimura de 2 parámetros, incluyendo d: Transiciones + Transversiones, las tasas entre sitios con Distribución Gama (G) y el tratamiento de datos faltantes con eliminación por pares.

El método ABGD detecta brechas en el “barcode”, pudiéndolo asimilar como diferencias (variación) dentro de la población, estimando el umbral entre la variación intra e interspecífica. Aunque es uno de los métodos más eficientes, tiende a dividir en exceso, ya que utiliza una partición recursiva con un rango de divergencia intraespecífica previa y ancho de brecha relativa, generando de esta manera agrupaciones que son hipótesis de especies (Rannala y Yang 2020). Este análisis se realizó con el alineamiento previamente realizado en MAFFT utilizando la versión en línea de ABGD (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>) con las opciones predeterminadas: Pmin=0.001. Pmax0.1, Pasos=10, X (ancho de espacio relativo) =1.5, Nb bins=20 y usando matrices de distancia K2P no corregidas; se utilizaron particiones recursivas e iniciales.

El método GMYC utiliza un enfoque de probabilidad para identificar el límite entre el proceso de Yule y la coalescencia intraespecífica, asumiendo que los tiempos de coalescencia o

longitudes de ramas se dividen en intraespecíficos e interespecíficos (Rannala y Yang 2020, Luo 2018). Para este análisis fue necesario usar un árbol ultramétrico, el cual se obtuvo utilizando el programa BEAST v1.10.4. El alineamiento fue ingresado en BEAUTI, aplicando un reloj relajado (uncorrelated relaxed clock) Lognormal. El programa se corrió 20,000,000 generaciones, para obtener un archivo “.xml” que posteriormente se procesó en BEAST. La convergencia de las cadenas de Markov se evaluaron con TRACER 1.6 hasta que el Burn-In fue el deseado. Se obtuvieron ocho árboles que fueron unidos con LogCombiner v1.10.4.. El árbol resultante, se analizó con TreeAnnotator v1.10.4 para así obtener el árbol ultramétrico. Posteriormente se corrieron los scripts adecuados en el programa R mediante el paquete Splits.

El método PTP requiere una estimación del árbol filogenético con longitudes de rama de la cantidad de cambio genético, por lo que se procesa con dos árboles diferentes, uno obtenido por MV y otro por IB, lo que ayuda a identificar los puntos de transición entre los eventos de ramificación inter e intraespecíficos (Rannala y Yang 2020, Luo y cols. 2018). Este método utiliza árboles calibrados por sustitución (no ultramétricos). El árbol para tal finalidad fue obtenido con el programa raxmlGUI 2.0 (<https://species.h-its.org/>), con las opciones predeterminadas: árbol enraizado, generaciones MCMC = 100 000, Thinning= 100, Burn-in= 0.1, Seed= 123.

Una vez obtenidos los resultados de cada análisis sobre la imagen del árbol ML se colocaron los rectángulos que representan a cada una de las especies de acuerdo a cada uno de los análisis, posteriormente se observó las que coincidían entre la mayoría de los análisis y se colorearon para identificar a las que se tomaron en cuenta como una especie.

6.2 Análisis filogenéticos

Se realizaron dos tipos de análisis filogenéticos, uno de Máxima Verosimilitud (MV) con el programa IQTree (Posada y Buckley, 2004) y otro de Inferencia Bayesiana (IB) con el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003).

El análisis de MV se realizó utilizando el ultrafast (-bb) con 1000, con un modelo TVM+F+R4 obtenido con la selección automática del mismo programa. El de IB se realizó en Mr. Bayes con 20 millones de generaciones, con un modelo K80, para obtener los valores de

soporte de ramas. Se utilizó el programa Tracer (Rambaut y cols. 2018) para observar los valores de Tamaño Efectivo de la Muestra (ESS) y determinar si el análisis de IB alcanzó la convergencia, aceptándose únicamente al ser alcanzado.

Se empleó el árbol de MV para representar la filogenia de las especies estudiadas ya que es el más resuelto y se editó con el programa FigTree (Rambaut y Drummond 2018). Para los análisis se consideraron como valores significativos $>80\%$ Bootstrap y $>.95$ Probabilidades Posteriores (PP).

7 RESULTADOS

7.1 Análisis filogenético

Los dos métodos utilizados, MV e IB de la región de ITS, generaron árboles con topologías muy similares (Figura 4 y Figura 5), con poca variación en los clados formados y en los valores de soportes de ramas. En ambos árboles se observan agrupados los especímenes en tres grandes clados que representan los tres subgéneros de *Lactarius*: *L. subg. Russularia*, *L. subg. Lactarius* y *L. subg. Plinthogalus*. Tanto *Plinthogalus* como *Lactarius* tienen muy buen soporte de rama, en comparación con *Russularia*, que en ambos análisis (ML e IB) presenta un soporte de rama bajo (40 de Bootstrap / 0.6 de PP).

En la Figura 4 se puede observar que el subgénero *Russularia* se agrupa con el subgénero *Lactarius* con un soporte de rama robusto de 100% de Bootstrap y 1 de PP y el clado hermano de ambos es el subgénero *Plinthogalus*.

Dentro del subgénero *Russularia* los clados internos presentan buen soporte de rama, pero observamos que en ambos árboles (ML e IB) la sección *Olentes* aparece como una sección polifilética dentro del subgénero *Russularia*. Así como la sección Pseudo-Aurantiaci se encuentra dentro del subgénero *Russularia* en el árbol de ML, mientras que en el árbol IB se encuentra como grupo hermano de los subgéneros *Russularia* y *Lactarius* (Figura 5). Adicionalmente este último está menos resuelto al interior del subgénero *Russularia*, aunque recupera los mismos grupos (*Olentes*, *Russularia* y las secuencias de *Lactarius helvus* y *L. brachycystidiatus*) que los obtenidos por el análisis de MV (Figura.4), por lo que preferimos basarnos en este último para los siguientes análisis.

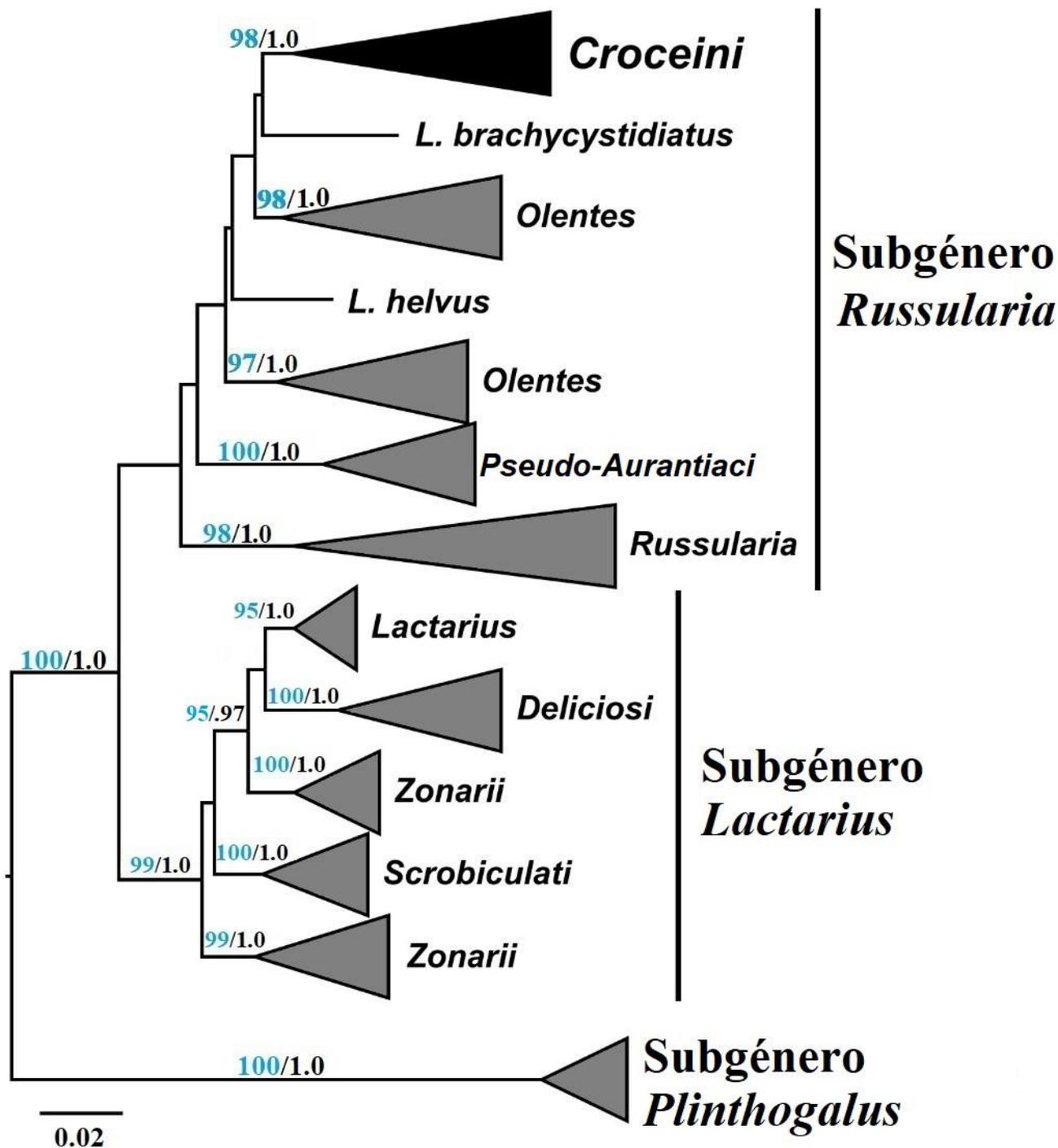


Figura 4. Árbol de Máxima Verosimilitud en donde se resumen los principales clados formados para el género *Lactarius* con un breve desglose de los taxones formados dentro de cada subgénero y la ubicación de la subsección *Croceini*. Los números sobre las ramas representan los valores de soporte de Bootstrap y PP respectivamente (valores Bootstrap > 80% y PP >.95).

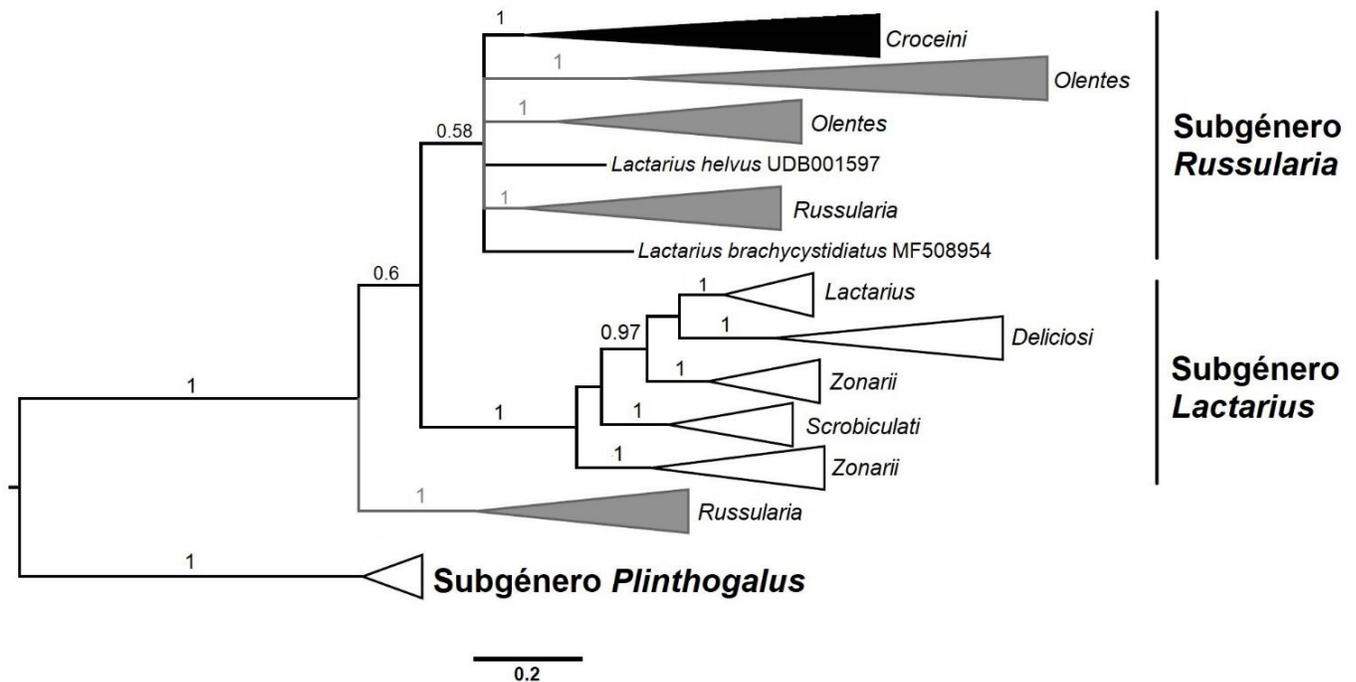


Figura 5 Árbol de Inferencia Bayesiana en donde se resumen los principales clados formados para el género *Lactarius* con un breve desglose de los taxones formados dentro de cada subgénero y la ubicación de la subsección *Croceini*, en color negro. Los números sobre las ramas representan los valores de soporte de probabilidades posteriores, los soportes de ramas presentan los valores de probabilidades posteriores (valores significativos >.95).

Dentro del subgénero *Russularia* encontramos representado un clado conformado por las especies pertenecientes al subgénero *Croceini*. Observamos que una secuencia reconocida como *Lactarius brachycystidiatus* y la sección *Olentes* fueron los más cercanos a *Croceini*, en el árbol ML, sin embargo, no tienen buen soporte de ramas.

Como se puede observar en la Figura 6, el clado *Croceini* está conformado por 10 clados. El primer clado se encuentra bien soportado con un valor de Bootstrap de 99% y PP de 1 y está constituido únicamente por secuencias europeas, teniendo así una distribución paleártica. En dicho clado se encuentra la secuencia de referencia de *Lactarius chrysorrhoeus*. La relación del clado 1 con los clados 2 y 3+4 no está resultando. El clado 2 está bien soportado (100% Bootstrap y 1 PP) y se constituye con secuencias provenientes de Norteamérica, específicamente de Estados Unidos y Canadá, por lo que su distribución es neártica.

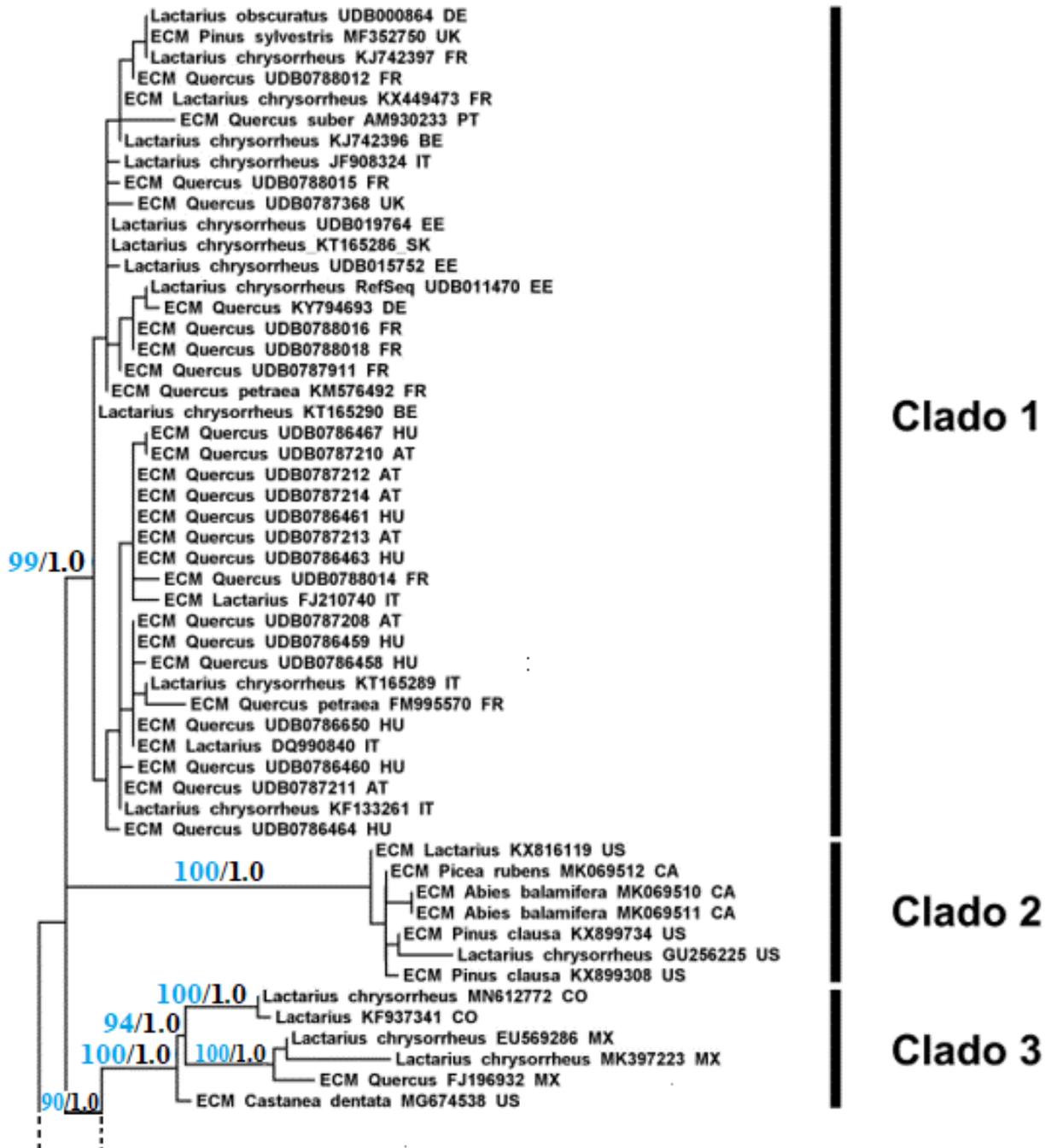
El clado 3 también tiene buen soporte de rama (100% de Bootstrap y 1 de PP) y está constituido por secuencias que provienen de México, Colombia y Estados Unidos, por lo que abarca dos regiones biogeográficas, la neártica y la neotropical. Está conformado además por dos clados bien definidos, uno con secuencias provenientes de Colombia y otro por secuencias de México. Ambos tienen buen soporte (100% de Bootstrap y 1 de PP), y su grupo hermano lo constituye la secuencia proveniente de Estados Unidos (ECM *Castanea dentata* MG674538).

El clado 4, clado hermano del clado 3, se encuentra en la zona paleártica ya que está conformado por secuencias provenientes de Asia (China y Corea). Este clado tiene un buen soporte de rama (100% de Bootstrap y 1 de PP).

El clado 5 se encuentra conformado por secuencias provenientes de Estados Unidos, es grupo hermano del clado 1+2+3+4, y tiene muy buen soporte de rama (100% de Bootstrap y 1 de PP). Las relaciones entre este clado, el clado 6 y una secuencia identificada como *L. colorascens* no están resueltas.

El clado 6 se encuentra conformado por dos sub-clados, uno con secuencias de Norteamérica (Canadá, Estados Unidos y México), por lo que se encuentra en la región biogeográfica Neártica, y otro más constituido por secuencias de Asia (Corea, Japón, India y Taiwán), pertenecientes a la región biogeográfica Indomalaya u oriental. El clado 6 se encuentra bien soportado solo por 99% de Bootstrap y es el grupo hermano del clado 7. Este último se encuentra conformado por secuencias provenientes de Estados Unidos por lo que tiene una distribución neártica, el clado tiene un soporte de 100% de Bootstrap y 1 de PP.

El clado 8 se posiciona como clado hermano del clado 6+7 y está conformado por especies provenientes de Asia (Corea y Japón), por lo que su distribución es paleártica. Su soporte, 100% de Bootstrap y .99 de PP. Finalmente, el clado 9 se posiciona como grupo hermano del resto de *Croceini* conformado por 2 secuencias, una proveniente de España y otra de China, por lo que su distribución es paleártica y tiene un soporte de 100% de Bootstrap y 1 de PP.



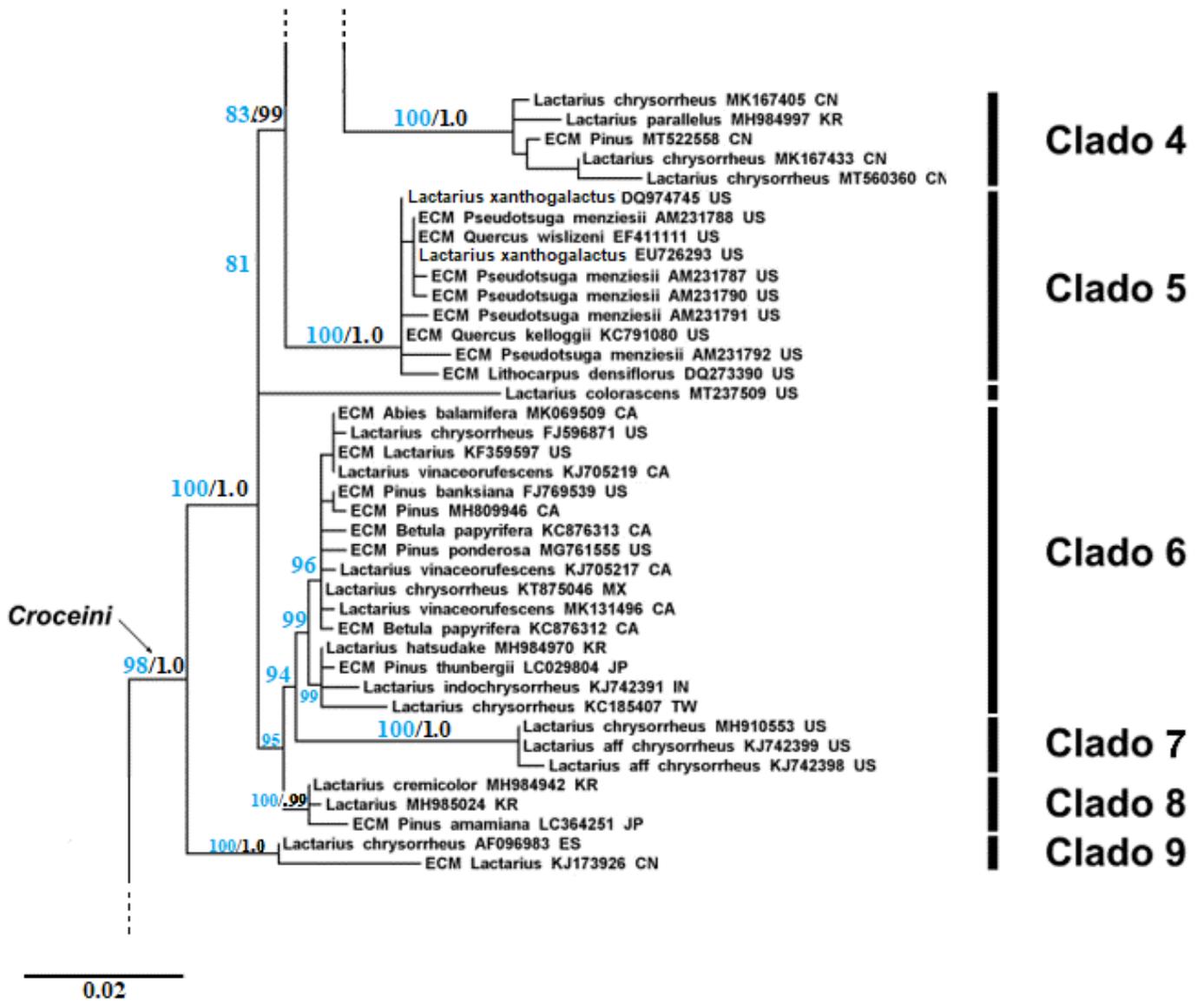


Figura 6. Árbol MV a partir de la región ITS, muestra con mejor detalle la subsección *Croceini*. Los soportes de ramas presentan los valores de Bootstrap (azul), y probabilidades posteriores (negro). A la derecha se observan los principales clados en los que se puede dividir el árbol de acuerdo a su soporte de rama. Árbol completo en Anexo 4.

7.2 Análisis de distancias genéticas (p)

Los análisis de distancias genéticas (p) con la región ITS mostraron 10 agrupamientos como se muestra en la Figura 7. La tabla que muestra los valores de las distancias genéticas entre los grupos y el árbol de distancias genéticas desglosado se encuentran en el Apéndice 2 y Apéndice 3, respectivamente.

Los grupos más robustos (99%) del Bootstrap corresponden al grupo 6 compuesto por especímenes que se encuentran en Asia en la región Oriental, y a los grupos 4 y 9 compuestos por especímenes que se encuentran en la zona Neártica; seguidos por los grupos 5 y 10 que presentan un 98% de Bootstrap, compuestos por especies provenientes del neártico y paleártico (España y China), respectivamente, por lo que podemos observar que son afines a climas fríos y su distribución se encuentra principalmente en el hemisferio norte. El grupo 2, compuesto por especies provenientes de la zona neotropical, más específicamente de Colombia, tiene un soporte de 81% de Bootstrap. Los grupos que presentan un valor menos significativo son 1, 7, 3 y 8, con valores de 77%, 71%, 67% y 40% respectivamente.

El grupo 1, que es en donde se encuentra la secuencia de referencia de *Lactarius chrysorrheus* (Apéndice 3), constituyen secuencias provenientes principalmente de Europa y se agrupa de manera indefinida con el grupo 2+3+4+5+6, presentando distancias (p) genéticas de 2.4%, 2.6%, 3.2% 2.3% y 3.3% con cada uno respectivamente y con el grupo 7+8+9+10, presentando distancias (p) genéticas de 1.7%, 1.9%, 3.7% y 3.3% con cada uno respectivamente.

El grupo 2 se encuentra constituido por secuencias de origen principalmente colombiano y una secuencia estadounidense, se agrupa con el 3 con un soporte de 31% de Bootstrap y con una distancia (p) genética del 2.4%. El grupo 3, se haya constituido por secuencias de origen mexicano. En ambas agrupaciones se encuentran secuencias identificadas como *Lactarius chrysorrheus* y constituyen un grupo con la secuencia identificada como *Lactarius colorascens* (Figura 7), con un Bootstrap del 21%.

El grupo 4 tiene la mayoría de las secuencias que lo integran sin identificar, solo una está identificada como *Lactarius chrysorrheus*. Este grupo se encuentra relacionado con el grupo 2 + 3 con un soporte de Bootstrap del 7% y con distancias (p) génicas de: 4.4% y 4.8% respectivamente.

En el grupo 5, al igual que la anterior, no se reconoce alguna especie en particular, ya que todas las secuencias fueron obtenidas de raíces (micorriza <ECM>), por lo que los autores de dichas secuencias no identificaron las secuencias. El grupo 5 se asocia con el grupo: 2+3+4 con un valor de Bootstrap de 2% y con distancias (*p*) genéticas de: 3.9%, 4.1% y 3.8%, respectivamente.

El grupo 6, al que pertenecen tres secuencias identificadas como *Lactarius chrysorrheus* y una como *L. parallelus* provenientes de China y Corea del Sur respectivamente, se asocia con la agrupación: 2+3+4+5, con un valor de Bootstrap muy bajo 17 % y presenta distancias (*p*) genéticas de: 3.7%, 3.9%, 5.5% y 4.4%, respectivamente, con cada grupo.

El grupo 7 se encuentra constituido por secuencias asiáticas provenientes de Corea y Japón, de las cuales una está identificada como *Lactarius cremicolor*. Este grupo es cercano al grupo 8+9 con un soporte de Bootstrap de 64% con los cuales presenta distancias (*p*) genéticas de 0.8% y 2.5%, respectivamente.

El grupo 8 presenta un soporte de Bootstrap muy bajo (40%) e incluye tres secuencias identificadas como *L. chrysorrheus*, tres como *Lactarius vinaceorufescens*, una como *L. indochrysorrheus*, una como *L. hatsudake* y ocho sin identificar (Apéndice 3). Dichas secuencias provienen de países americanos y asiáticos. Este grupo se agrupa con el grupo 9 con un soporte de Bootstrap de 53% y una distancia (*p*) genética de 2.3%. Este último se encuentra constituido por secuencias que se identificaron como *Lactarius chrysorrheus* provenientes de Estados Unidos.

El grupo 10 está conformado únicamente por 2 secuencias, una proveniente de España y la otra de China. La secuencia proveniente de España está identificada como *Lactarius chrysorrheus*. Este grupo es cercano al grupo 7+8+9 con un soporte de Bootstrap de 49% y presenta distancias (*p*) genéticas de: 3.3%, 3.5% y 5.1%, respectivamente.

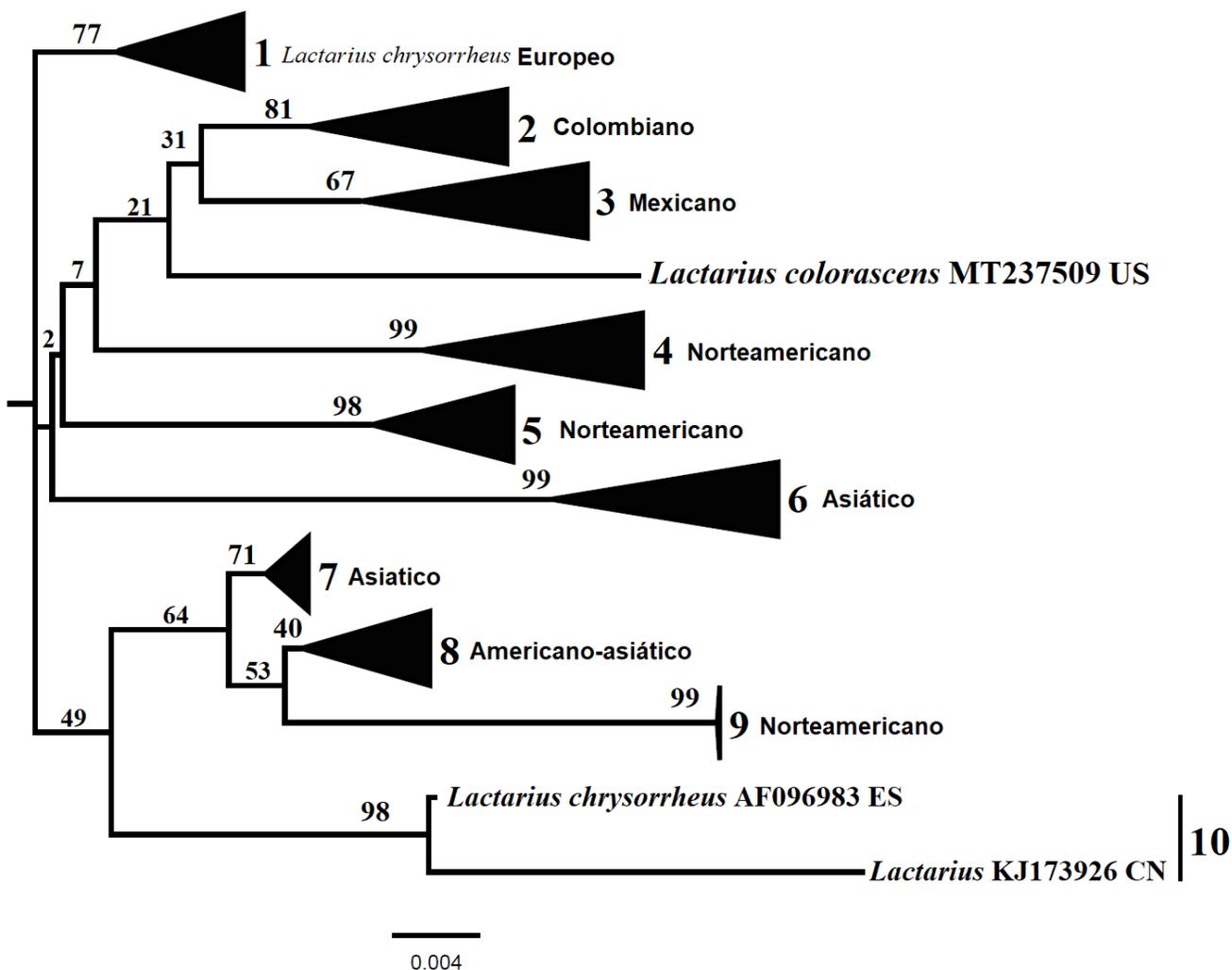


Figura 7 Árbol de distancias genéticas colapsado de la región ITS, se muestran los principales grupos obtenidos en el análisis. Números sobre las ramas indican valores de soporte de Bootstrap. Los números del lado derecho representan los clados obtenidos con su respectiva ubicación a grandes rasgos.

7.3 Delimitación de especies con métodos moleculares

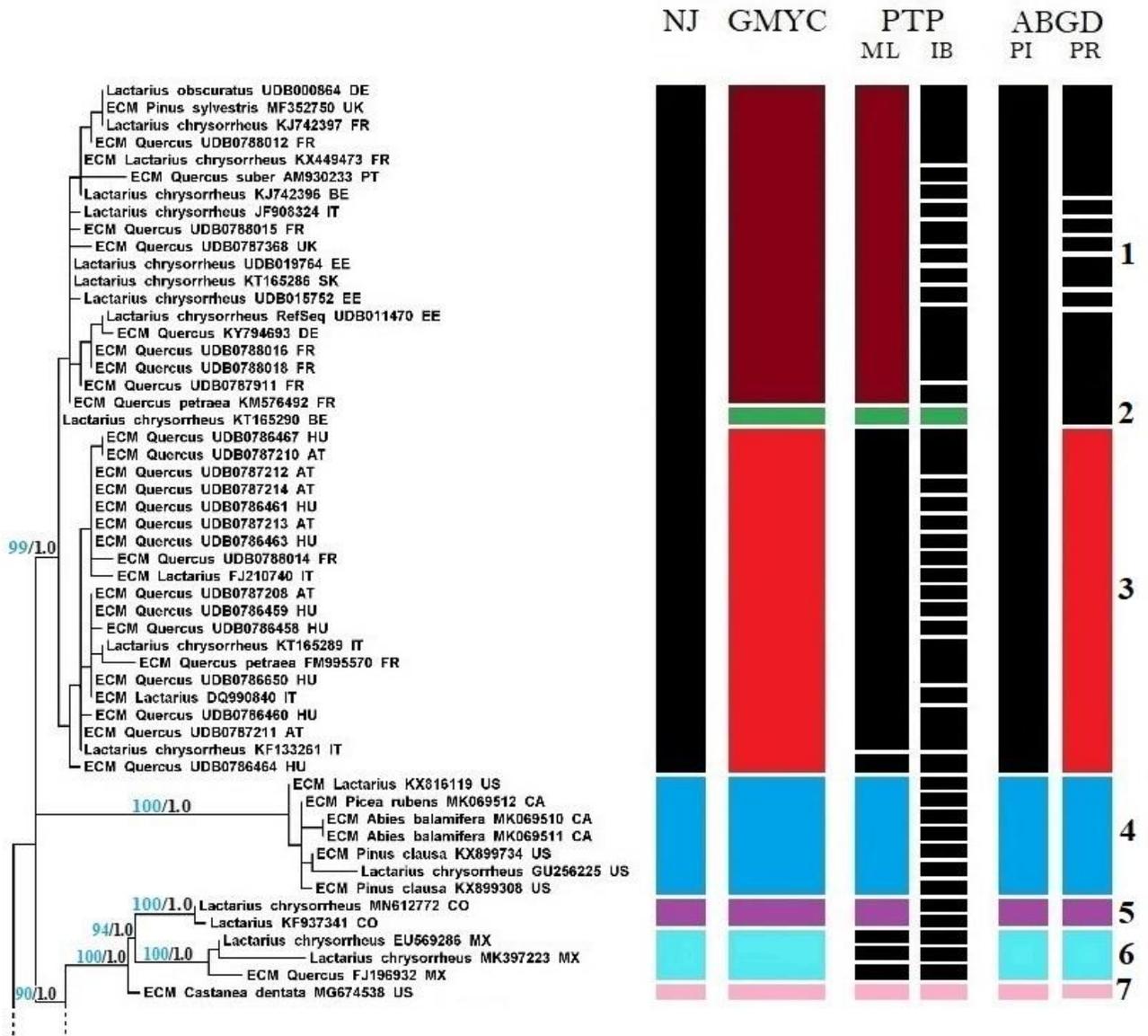
Se delimitaron entre 13 y 65 especies, dependiendo del método utilizado, el método que delimitó menos especies fue ABGD con PI, mientras que el método que más dividió especies es PTP con IB, consiguiendo dividir 65 especies, compartiendo solo 8 con los demás métodos, el método que menos dividió fue el de distancias (p) genéticas por NJ, dividió 12 (si se toman en

cuenta las 2 secuencias que no se agrupan bien con las demás) compartiendo 9 con los demás métodos, de manera muy similar al resultado de ABGD con PI (Figura 8).

Solo 3 especies fueron delimitadas por todos los métodos de delimitación (Figura 8, especies:7, 10 y 12), las 3 con distribución en América. Las primeras dos se encuentran conformadas por una sola secuencia, la constituida por la secuencia nombrada para esta investigación como ECM_Castanea_dentata_MG674538_US, observada en la Figura 8 con las barras de color rosa claro, y la denominada: Lactarius_colorascens_MT237509_US, representada por las barras de color verde claro. La última especie delimitada por todos los métodos es la representada por barras de color rosa, se encuentra constituida por tres secuencias con clave: MH910553, KJ742399 y KJ742398, provenientes de Estados Unidos.

Se tuvo conflicto al decidir cuantas especies se encontraban en el clado 9 (Figura 6), ya que sus secuencias, provenientes de Corea y Japón, fueron delimitadas de manera similar por 2 métodos cada una, GMYC y ABGD con PI indican que son una sola especie, mientras que PTP con ML e IB indican que son dos especies (Fig. 8), se decidió que esas 3 secuencias pertenecen a una sola especie, por su cercanía geográfica, porque coincidían con los resultados de NJ y finalmente porque dos análisis que ocupen recursos diferentes la delimitan. Por lo que se obtuvieron 15 especies en total.

Adicionalmente, se observaron los hospederos con los cuales se encontraban asociados, se observó a la familia Fagaceae predominante en los taxones, siendo el género *Quercus* el más asociado a diferentes especies. La mayoría de las especies se asociaron a una sola familia de plantas, la especie 1 y 9 se asociaron a 2 familias diferentes: *Pinaceae* y *Fagaceae* y la especie 11 se asoció con: *Fagaceae* y *Betulaceae*.



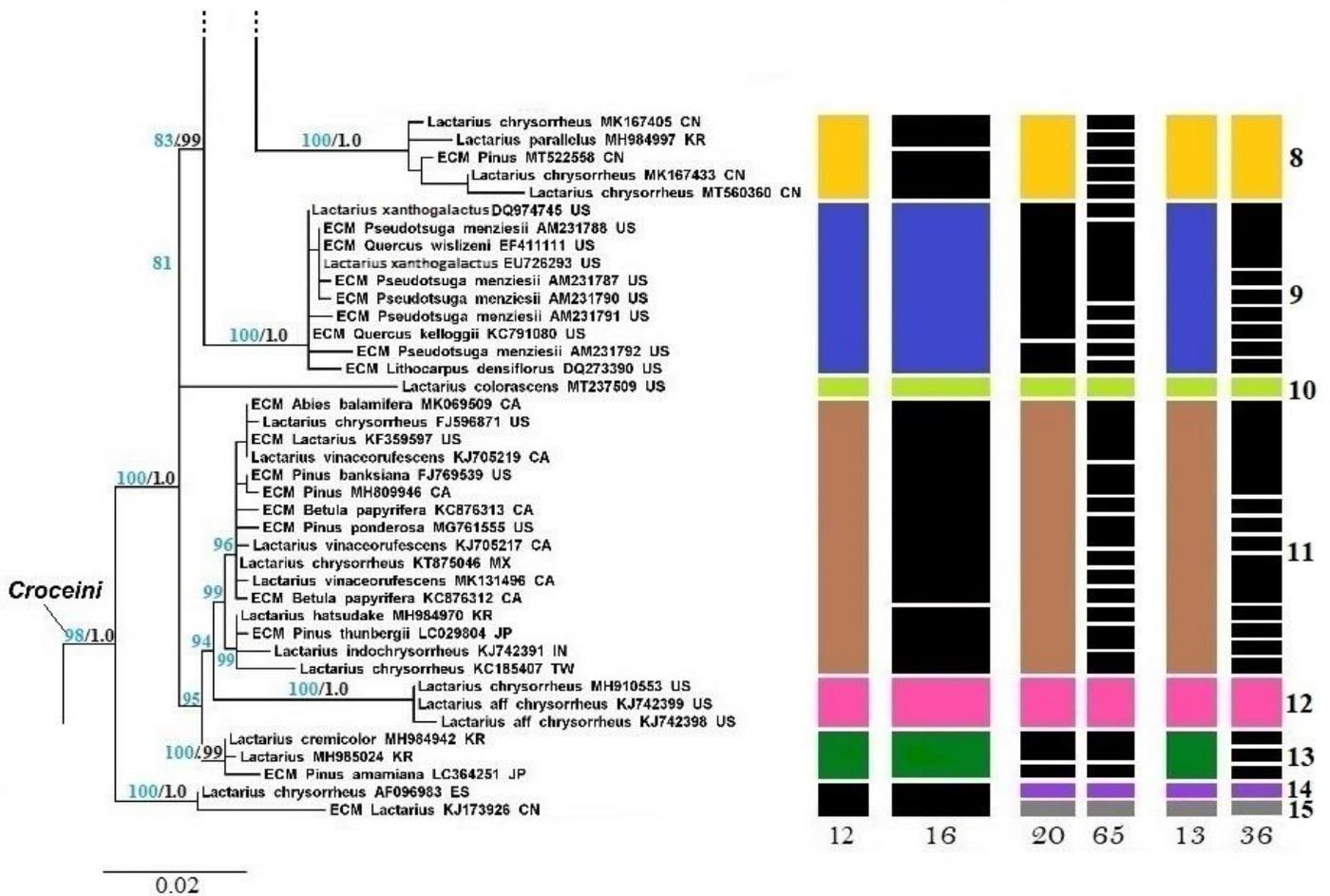


Figura 8. Árbol de ML a partir de la región ITS, los soportes de ramas presentan los valores de Bootstrap (azul), y probabilidades posteriores (negro). Se representan los distintos métodos de delimitación de especies: GMYC, PTP y ABGD, los dos últimos con sus variantes, las cuales son: Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) para PTP; Particiones Iniciales (PI) y Particiones Recursivas (PR) para ABGD. Números bajo las columnas representan el número de especies encontradas en cada análisis. Colores en las barras corresponden a las especies que delimitaron de manera similar, las cuales se enumeran a la derecha del diagrama. Árbol completo en Anexo 5.

8 DISCUSIÓN

8.1 Análisis Filogenético

En la taxonomía tradicional, la subsección *Croceini* se ha clasificado dentro del subgénero *Piperites* (actualmente subgénero *Lactarius*) por Hesler y Smith (1979) y Heilmann-Clausen y cols. (1998) e incluye al grupo de *L. chrysorrheus*, el cual se ha clasificado dentro del subgénero *Piperites*, tanto por Hesler y Smith (1979) como por Heilmann-Clausen y cols. (1996). El subgénero *Piperites* corresponde actualmente con el subgénero *Lactarius* y dentro de este subgénero la subsección *Croceini* se ha relacionado principalmente con la subsección *Scrobiculati* debido al color del látex, blanco al principio, cambiando a amarillo al contacto con el aire. Sin embargo, Hesler y Smith en 1979 notaron que dichos caracteres no son tan contundentes y sugirieron que no existe una línea clara entre la subsección *Croceini* comparada con la subsección *Pseudo-Aurantiaci* en *Russularia*.

En el análisis filogenético realizado tanto por MV como por IB podemos observar cómo se agrupan las subsecciones dentro de los 3 subgéneros. La subsección *Croceini* se ubicó dentro del subgénero *Russularia*. Las especies de *Croceini* comparten características como: zonación y el látex que amarillea rápidamente son características que encajan dentro de la clasificación en *L. subg. Lactarius*, como lo hicieron Hesler & Smith (1979) y Heilmann-Clausen et al. (1998). Las características que comparten con el subgénero *Russularia* son el basidiocarpo seco y el píleo lampiño (Wisitrassameewong y cols. 2016)

Podemos observar que en el árbol de IB no se observa resuelto, en el árbol ML aunque se encuentra visualmente resuelto no tiene buen soporte de ramas entre las secciones. En este último *Croceini* se encuentra como grupo hermano de *Lactarius brachycystidiatus* coincidiendo con los resultados de Lee y cols. (2019) y estos dos como hermanos de una parte de la sección *Olentes* (Figura 4).

L. brachycystidiatus es una especie descrita de China que fue tentativamente ubicada en la sección *Colorati* por sus características morfológicas: píleo seco, de color pardo rojizo, a veces escamoso y látex acuoso sin cambios de color (Wang 2017). *Lactarius brachycystidiatus* y las especies que pertenecen a la sección *Croceini* tienen caracteres comunes como un píleo zonado, seco y lampiño, además del basidiocarpo seco, encajando así con el concepto morfológico de *L.*

subg. Russularia. La comparación de la secuencia de su ITS con la de *L. chrysorrheus* a través de Blast mostró una similitud del 95%, de modo que tentativamente podría considerarse como una especie de *Croceini*.

Como observaron Das y cols. (2015), Wisitrassameewong y cols. (2016) y Lee y cols. (2019), *Croceini* no se relaciona en nuestro análisis con ningún grupo en particular del subgénero *Russularia*, y las especies que utilizan como representantes de *Croceini* son *Lactarius chrysorrheus* y *L. vinaceorufescens*.

Morfológicamente, las especies pertenecientes a *Russularia* son visualmente más esbeltas, ya que el estípite es, en proporción con el píleo, más delgado y el látex no tiende a cambiar de color. *Lactarius*, por su parte, tiene un estípite usualmente más corto y grueso, además de que el cambio de color del látex es clave para este subgénero. En *Croceini*, las especies son un tanto delgadas pero el látex si cambia de color a amarillo al exponerse unos minutos al aire.

Tanto el color del látex y el cambio de color del látex cuando se expone al aire son caracteres importantes para definir grupos infragenéricos de *Lactarius*, especialmente en *Lactarius subg. Lactarius* (Hesler y Smith 1979. Heilmann-Clausen et al. 1998). *Lactarius subg. Russularia* muestra muy poca variabilidad en esta característica, ya que mayoritariamente no existe el cambio de color del látex (Hesler y Smith 1979) y muchas especies poseen látex transparente a blanco acuoso que no cambia, o en algunos casos, el único cambio que se puede observar es a un color amarillento (pálido a amarillo brillante o color azufre). El látex fuertemente amarillento es una característica diagnóstica para el grupo de *Lactarius chrysorrheus* (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998). Wisitrassameewong y cols. (2016) afirman que el látex que se vuelve amarillo aparentemente tiene múltiples orígenes por lo que, contiene poca información filogenética, adicionalmente el látex acuoso no parece dar información taxonómica a nivel de sección.

8.2 Delimitación de especies

En total se recuperaron 15 especies, coincidiendo de manera muy estrecha con el número de especies reportadas para la subsección *Croceini* (16 especies), de las cuales, la mayoría habían sido descritas en Norte América. Sin embargo, de acuerdo con la información dada en las bases

de las matrices de caracteres moleculares obtenidas y la delimitación de especies, podemos observar que *Croceini* tiene un patrón de distribución principalmente septentrional encontrándose tanto en el Neártico y Paleártico (Figura 9), asociándose principalmente con tres familias de hospederos: *Fagaceae*, *Pinaceae* y *Betulaceae* (Figura 10).

Las 3 especies agrupadas en el clado 1 se distribuyen en Europa, compartiendo distribución en varios países. Podemos correlacionar a la especie 1 con *Lactarius chrysorrheus* ya que en ella se encuentra la secuencia de referencia, además de coincidir con la especie original que fue descrita en Europa asociada con fagáceas. Sin embargo, de Europa se conoce solo una especie que es *Lactarius chrysorrheus* y nuestros resultados delimitaron 3 especies, por lo que existe una subestimación de la diversidad de ese continente.

En los hongos ectomicorrizógenos se considera que existe una fidelidad alta a su hospedero, incluyendo al subgénero *Lactarius* (Hutchison 1999), sin embargo estudios actuales afirman que el grado de especificidad varía entre los hongos, a los russuláceos se les ha llegado a considerar más generalistas (Looney y cols. 2018), en nuestro estudio podemos observar que esta especie (especie 1) que se asocia a la familia *Fagaceae* y *Pinaceae*, ocurre lo mismo al menos con otras 2 más (especie 9 y especie 11) que se asocian con hospederos de diferentes familias (Figura 10), coincidiendo con lo mostrado por Wisitrassameewong y cols. (2016) en varias especies del subgénero *Russularia*.

Del clado 4 la especie 5 sobresale ya que además de estar presente en el hemisferio austral, en Colombia, que es una zona tropical, se encuentra asociada a *Pseudomonotes* (Da Marcela y cols. 2014) este es endémico del Amazonas en Colombia, pertenece a la familia *Dipterocarpaceae*, donde pudo haber ocurrido un salto de hospedero por solapamiento de hábitat con *Quercus*, que es, hasta donde se tiene conocimiento, el límite de la distribución de las fagáceas en América (Rodríguez-Correa y cols. 2015, Wu y cols. 2000).

La especie 6 solo se encuentra en México, así que podría corresponder con la única especie descrita en México para *Croceini*, que es *Lactarius lacteolutescens*, sin embargo, no es posible corroborarlo ya que no se tiene registro genético de esa especie.

De este clado, también podemos observar que la mayoría se distribuyen en América, salvo la especie 8, que procede de Asia, esta especie se encuentra como más cercana filogenéticamente a las especies 5, 6 y 7. Se ha reportado antes la relación biogeográfica existente para los

macrohongos de Norteamérica y Asia (Mueller y cols. 2001, Wu y cols. 2000). Llamado “anfi-Pacífico” que observamos también en la especie 11 (Figura 8).

La especie 9 contiene a dos secuencias identificadas como *Lactarius xanthogalactus*, se observa que se asocia a las familias Pinaceae y Fagaceae, esta especie fue descrita y mayormente observada en el oeste de Estados Unidos, en California en bosque de *Quercus* (Peck 1907). Sin embargo, Hesler y Smith (1979) argumentaron que no se trata de una especie diferente y que es *L. vinaceorufescens* ya que comparten características similares y fueron recolectados en California, argumentaron que se ha reportado en algunos especímenes de *L. vinaceorufescens* el cambio de color a amarillo en el látex, e incluso puede ser confundido con *L. chrysorrheus*, por lo que decidieron no incluirla en su clasificación. Sin embargo, en nuestro análisis si aparecen como especies diferentes.

La secuencia nombrada *Lactarius_colorascens_MT237509_US* forma un taxón propio nombrado en este trabajo como especie 10, misma que fue delimitada por todos los métodos utilizados. Se encuentra en Estados Unidos. Es muy probable que esta secuencia/especie corresponda con *Lactarius colorascens* descrita para la subsección *Croceini*, ya que se encuentran en una ubicación geográfica cercana, fue descrita con material de Michigan, New York y Tennessee y la secuencia procede de North Carolina, no se especifica su hospedero en ambos casos.

La especie 11 es particularmente interesante, ya que los dos subclados que lo componen incluye secuencias de *L. vinaceorufescens* y *L. indochrysorrheus*, respectivamente, representando dos regiones biogeográficas distintas, se encuentra en países de América del Norte (USA, Canadá y México) y de Asia (Japón, India, Corea y Taiwán) (Figura 9). Podemos observar que geográficamente se encuentran en regiones biogeográficas diferentes, *L. vinaceorufescens* se encuentra en el neártico mientras que *L. indochrysorrheus* se encuentra en el indomalayo, separados el océano pacífico.

De acuerdo con la información de las secuencias, se asocia principalmente con Pináceas y Betuláceas (Tabla 6 y Figura 10). Este patrón de distribución se denomina “anfi-Pacífico”, y es un patrón biogeográfico que se ha descrito en diversos grupos de plantas (Yang y cols. 2017), por lo que muchos linajes de hongos ectomicorizógenos podrían haber migrado con sus plantas hospederas a través de la región de Beringia desde finales del Cretácico (84ma) (Halling y cols.

2008, Wen y cols. 2016). Este patrón se ha observado previamente en *Russulaceae*, en los géneros *Lactifluus* y *Multifurca* (Wang y cols. 2018).

En términos generales morfológicamente ambas especies son muy parecidas, sin embargo, si existen diferencias macro y microscópicas entre ambas especies (Tabla 5). En la descripción realizada por Das y cols. (2015) de *Lactarius indo-chryso-r-rheus* indica que esta se asemeja a *L. chryso-r-rheus* y *L. vinaceo-r-rufescens*, con las cuales comparte características como: zonación, colores de sombrero similares y látex que se tiñe rápidamente de azufre a amarillo verdoso. Hesler y Smith (1979) mencionan que se considera que *L. vinaceo-r-rufescens* es más cercano a *L. colorascens*, pero de acuerdo a los análisis de delimitación vemos que posiblemente *L. vinaceo-r-rufescens* y *L. indo-chryso-r-rheus* son una sola especie y de no serlo son especies filogenéticamente muy cercanas y ambas muy cercanas a la especie 12. Pero, como se ha discutido en el párrafo anterior este tipo de distribución se produjo al menos hace 84ma y la biota, en especial la microbiota se han diferenciado mucho lo que hace más complicado considerarlas como una sola especie.

Tabla 5 Diferencias entre *Lactarius vinaceo-r-rufescens* y *Lactarius indo-chryso-r-rheus*, obtenido de las descripciones de Hesler y Smith (1979) y Das y cols. (2015) respectivamente

	<i>Lactarius vinaceo-r-rufescens</i>	<i>Lactarius indo-chryso-r-rheus</i>
Píleo	4-12 cm de diámetro	2.5-7 cm de diámetro
	Color rosa pálido a vináceo, ennegrece con la edad.	Color naranja pardusco, rosado beige a salmón, color canela con la edad.
	Poco pubescente a glabro, viscoso	Superficie suave a grasienta o viscosa
	Pileipellis con una delgada ixocutis de hifas gelatinosas de unos 2 µm	Pileipellis con ixocutis, ≤170 µm, con una capa gelatinosa que en su mayoría se extiende 10–15 µm
Látex	Blanco, pronto brillante "amarillo estroncio".	Abundante, blanco, cambiando rápidamente a amarillo verdoso.
Himenio	Láminas subdecurrentes, estrechas, se bifurcan con bastante frecuencia cerca del estípite	Láminas subdecurrentes, apiñadas (18 22/cm)

	Color "beige vináceo pálido", pronto manchadas, teñidas de rosa, finalmente de un marrón rojizo.	Color amarillo pálido con el tiempo, manchadas de rosa, finalmente de marrón a marrón rojizo.
	Tamaño de basidio 28-33×8-10 μm	Tamaño de basidio 30-44 × 9-13 μm
	Pleuromacrocistidios 32-70 × 7,5-11 μm	Pleuromacrocistidios 40-68 (80) × 9-13 μm
	Queilocistidios 32-44 × 6-10 μm	Queilocistidios 35-55 × 8-9 μm
Esporas	Estampado de esporas color blanco opaco a amarillento	Estampado de esporas crema pálido
	Tamaño 6.5-8(9) × 6-7 μm	Tamaño 6.4-7.4-8.5×5.6-6.2-6.9 μm
	Placa suprahilar no amiloide	Placa suprahilar amiloide
Estípite	Tamaño 40-70 × 10-25 mm	Tamaño 45-65 × 6-8.5 mm
Hábitat	Gregario bajo <i>Pinus</i>	Gregario bajo <i>Picea</i> y <i>Abies</i>
	Material de Estados Unidos	Material del norte de India

La especie 12 se encuentra únicamente en Estados Unidos, delimitada como una sola por todos los análisis. No se tiene información de con que familia de árboles se asocia. La especie 13 se encuentra tanto en Corea como Japón, la secuencia encontrada en Japón se reporta asociada con *Pinus*. Ya que las poblaciones se encuentran separadas por el mar de Japón, es posible que sea una especie que se esté diversificando. Las especies 14 y 15 se encuentran en España y China respectivamente, pero se encuentran formando un solo clado bien soportado (100% de Bootstrap y 1 de PP), probablemente son especies recién diversificadas ya que tanto NJ como GMYC las consideran como una sola.

El patrón de distribución de las especies (Figura 9) se explica con la distribución de sus hospederos (Figura 10), las gimnospermas (Pináceas) y angiospermas (Fagáceas y Betuláceas) principalmente han migrado de Asia a América, siendo las gimnospermas las dominantes en latitudes septentrionales (Wang y Ran 2014, Raven y Axelrod 1974, Halling y cols. 2008). La ubicación de las especies en un mapa nos ayudó a darle un contexto geográfico a gran escala, que nos puede dar indicios de que estas mismas se pueden delimitar biogeográficamente.

De manera similar, Halling y cols. (2008) al realizar un estudio de *Boletales* (Fungi) observaron que varias especies ectomicorrízicas obligadas de *Boletales*, tienen también una distribución anfi-pacífica, por lo que plantea tres hipótesis de dispersión, entre ellas una migración por un puente terrestre. Sin embargo, las explicaciones dadas no son aún concluyentes. Puntualizando que el entendimiento de los patrones de distribución de sus plantas asociadas es fundamental para comprender la distribución biogeográfica de estos hongos.

De Asia hay cuatro especies descritas (incluyendo las dos coreanas), con lo que estaría subestimada la diversidad del grupo en ese continente, al igual que en Europa donde solo se contemplaba una y de acuerdo a nuestros resultados son cuatro. En Norteamérica, por el contrario, la biodiversidad del grupo podría estar sobrestimada, ya que tan solo de Estados Unidos se han descrito 11 especies y nuestros resultados delimitan 6, pero en México se tiene descrita una especie (*Lactarius lacteolutescens*), pero de acuerdo a nuestros resultados hay otra especie en este territorio que se comparte con Estados Unidos y Canadá. Adicionalmente, se evidencia la distribución del grupo en Sudamérica, con un taxón posiblemente endémico de esa región.

De ser Norteamérica en especial la zona más septentrional (Estados Unidos-Canadá) donde se encuentren la mayoría de las especies de *Croceini* podría considerarse como un centro de diversificación, de no ser así, se podrían sinonimizar aquellas entidades que son molecularmente lo mismo.

Podemos observar un problema de falta de representación de secuencias en las bases de datos, es decir, es necesario obtener secuencias de los tipos o, al menos, tener más secuencias de referencia de ejemplares representativos de las localidades tipo. También existe la necesidad de ampliar el muestreo de secuencias hacia zonas geográficas poco exploradas como lo es la zona austral en hongos, ya que de acuerdo a nuestro trabajo al menos existe una especie de *Croceini* en Colombia y de acuerdo con la literatura una más en Papúa Nueva Guinea.

También se observa la importancia de la depuración de las bases de datos ya que varias de secuencias que se encuentran dentro del clado *Croceini* están identificadas con nombres de especies que no pertenecen realmente a este grupo como: *L. hatsudake*, *L. cremicolor*, *L. parallellus* y *L. obscuratus* o se quedan identificadas como micorrizas de su hospedero.

Tabla 6 Ubicación y hospederos de las especies. De izquierda a derecha se encuentra la identificación de la especie, el color con el que es representada en la delimitación de especies y para su ubicación en el mapa (Figura 8), así como la planta a la que se encuentra asociada (hospedero).

Especie	Color	Ubicación	Hospedero
1		Europa 1	Fagaceae, Pinaceae.
2		Bélgica ¹	Sin información.
3		Europa ¹	Fagaceae
4		Estados Unidos y Canadá ²	Pinaceae
5		Colombia ²	Sin información.
6		México ²	Fagaceae
7		Estados Unidos ²	Fagaceae
8		China y Corea ³	Pinaceae
9		Estados Unidos ²	Fagácea y Pinaceae
10		Estados Unidos ²	Sin información.
11		Canadá, Estados Unidos, México, Corea, Japón, India y Taiwán ²³	Pinaceae y betulaceae
12		Estados Unidos ²	Sin información
13		Corea y Japón ³	Pinaceae
14		España ¹	Sin información
15		China ³	Sin información

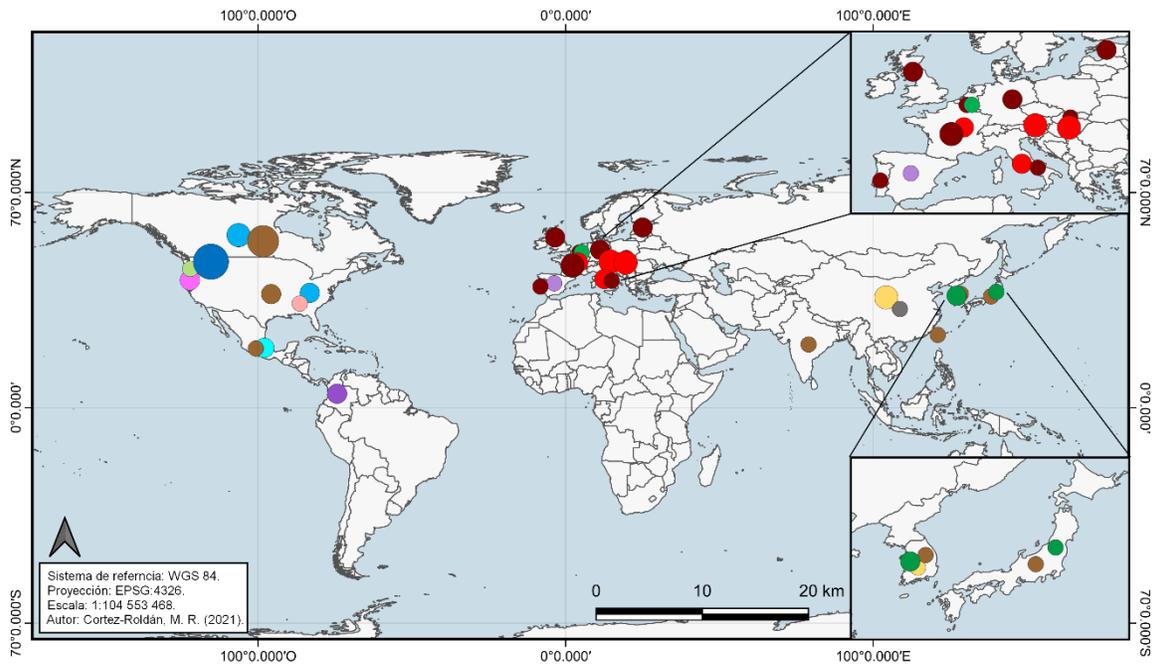


Figura 9 Distribución de las especies de *Croceini* de acuerdo con la información obtenida de las secuencias (a nivel de país), los puntos representan a las secuencias de color a la especie a la que pertenecen (de acuerdo a Figura 7), el tamaño de los puntos es de acuerdo con el número de secuencias de esa especie que tiene cierto país. Mapa realizado por la M. en C. Mayra Rocío Cortez Roldán.

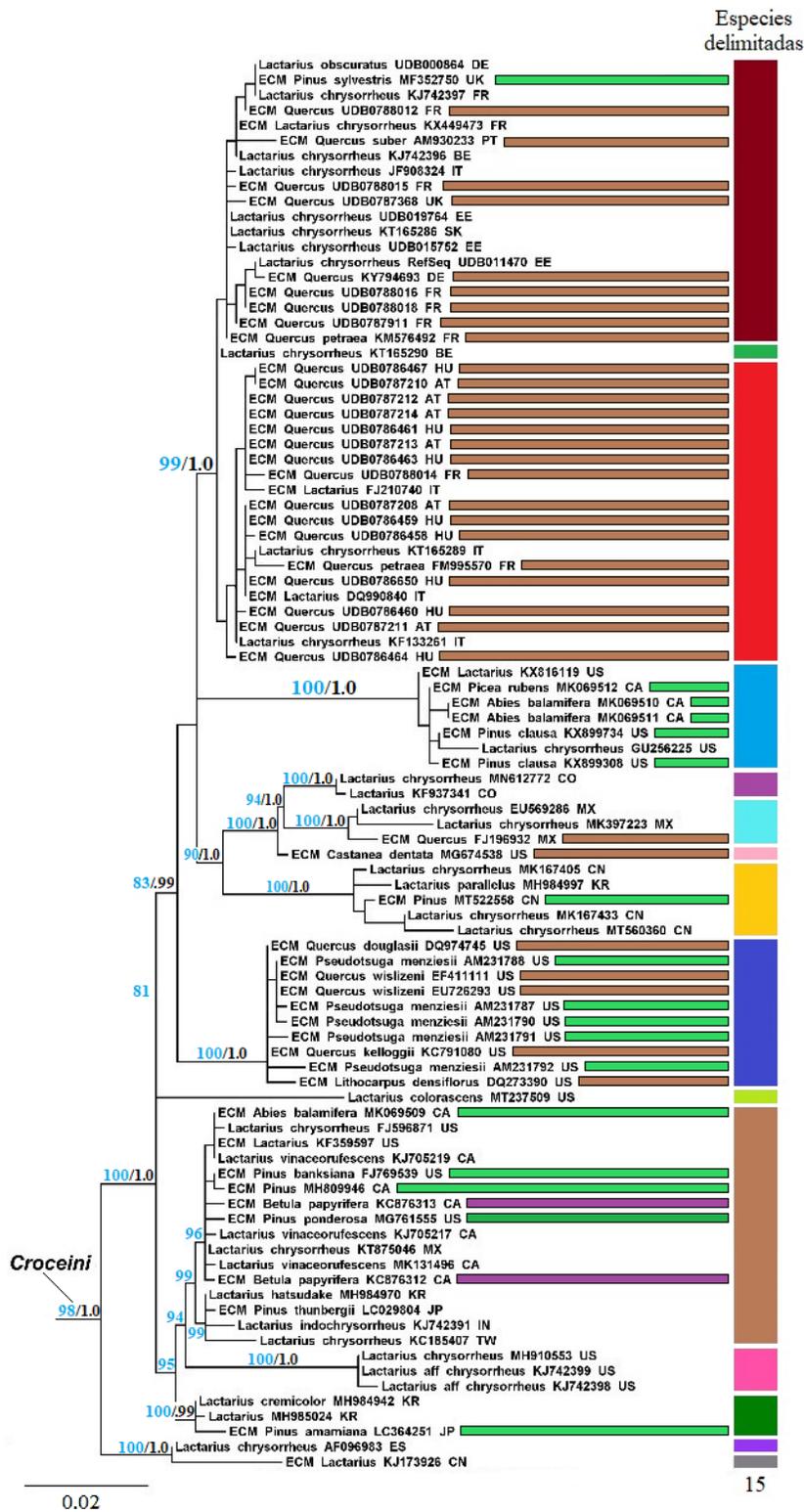


Figura 10 Asociación de las secuencias con su hospedero, de color verde pináceas, color café fagáceas y morado betuláceas.

9 CONCLUSIONES

1. La subsección *Croceini* se encuentra dentro del subgénero *Russularia*, pero es necesaria más información no solamente molecular para tener claras sus relaciones y donde se ubica dentro es esta.
2. En el presente trabajo se reconocen 15 spp., en el clado *Croceini*, algunas de las cuales posiblemente corresponden a las especies descritas, por lo que potencialmente podrían existir una o dos especies nuevas para este grupo, sin embargo, es necesario más información, morfológica, ecológica y biogeográfica.
3. En cuanto a los hospederos, se observa que varias especies de *Lactarius* perteneciente al grupo *Croceini* se asocian con hospederos pertenecientes a diferentes géneros o familias de plantas.
4. La distribución mostrada nos puede indicar que hacen falta más muestreo no solo en los países en los que se encuentran las secuencias, para conocer la ecología, patrones de distribución, tendencias evolutivas, centros de diversificación, en esta subsección y también del subgénero.

10. PERSPECTIVAS

Podemos afirmar que *Croceini* pertenece al subgénero *Russularia*, sin embargo, es necesario un mayor acervo de datos para que se resuelva filogenéticamente y realizar posteriormente una clasificación conforme a sus relaciones de parentesco.

Es necesario realizar una revisión taxonómica del subgénero *Croceini* utilizando un enfoque integrador para determinar mejor las especies que lo forman ya que actualmente no existe un trabajo así, posiblemente por su distribución.

Es necesario recolectar ejemplares frescos de las especies pertenecientes a *Croceini*, para tener datos morfológicos más recientes de cada especie y conocer mejor su variación morfológica, así como poder obtener datos moleculares de cada especie.

Posiblemente sea necesario buscar o utilizar otro gen o genes que permitan una mejor resolución filogenética a nivel de subgénero y para la delimitación de las especies.

Finalmente se recomienda un mayor muestro en los países donde han sido reportadas y aledaños, para evitar la sub y sobrestimación que observamos en el presente trabajo, mejorando así el conocimiento de la diversidad de *Croceini* y el subgénero *Russularia* a nivel global.

10 REFERENCIAS

- Adamčík, S., Looney, B., Caboň, M., Jančovičová, S., Adamčíková, K., Avis, P. G., ... y Buyck, B. (2019). The quest for a globally comprehensible *Russula* language. *Fungal Diversity*, 99(1), 369-449.
- Aguilera, M., y Silva, J. F. (1997). Especies y biodiversidad. *Interciencia*, 22(6): 299-306.
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85: 76-81.
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*: 541-566.
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina M y Rincon E. (1995). Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62.
- Alonso-Aguilar LE, Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Garibay-Orijel R. (2014). The cultural significance of wild mushrooms in San Mateo Huexoyucan, Tlaxcala, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 27.
- Aris-Brosou, S. (2007). Dating phylogenies with hybrid local molecular clocks. *PLoS One*, 2(9), e879.
- Barge EG, Cripps CL (2016) New reports, phylogenetic analysis, and a key to *Lactarius* Pers. in the Greater Yellowstone Ecosystem informed by molecular data. *Myckeys* 15:1–58
- Bello-Cervantes, E., Correa-Metrio, A., Montoya, A., Trejo, I., y Cifuentes, J. (2019). Variation of ethnomycological knowledge in a community from Central Mexico. *Journal of Fungal Diversity*, 1(1), 6-26.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D36-42.

- Boegue K., del Val E. (2011). Bichos vemos relaciones no sabemos. Diversidad e importancia de las interacciones bióticas. Ciencias No.102. pp 5-11.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., y Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture (Vol. 32, p. 374). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Bruns, T. D., Bidartondo, M. I., y Taylor, D. L. (2002). Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us?. Integrative and comparative biology, 42(2), 352-359.
- Buyck, B., y Horak, E. (1999). New taxa of pleurotoid Russulaceae. Mycologia, 91(3): 532-537.
- Buyck B, Hofstetter V, Eberhardt U, Verbeken A, Kauff F (2008) Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricompactae*. Fungal Diversity 28:15–40
- Buyck, B., Hofstetter, V., Verbeken, A., y Walley, R. (2010). Proposals to conserve or reject names. 1919 Proposal to conserve *Lactarius* nom. cons. Basidiomycota with a conserved type. Tax, 59(1), 295-296.
- Buyck, B., Zoller, S., y Hofstetter, V. (2018). Walking the thin line... ten years later: the dilemma of above-versus below-ground features to support phylogenies in the Russulaceae (Basidiomycota). Fungal Diversity, 89(1), 267-292.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., y Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. Molecular ecology, 22(17), 4369-4383.
- Da Marcela Vasco-Palacios, A., López-Quintero, C., Franco-Molano, A. E., y Boekhout, T. (2014). *Austroboletus amazonicus* sp. nov. and *Fistulinella campinaranae* var. *scrobiculata*, two commonly occurring boletes from a forest dominated by *Pseudomonotes tropenbosii* (Dipterocarpaceae) in Colombian Amazonia. Mycologia, 106(5): 1004-1014.

- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Das, K., Verbeken, A., y Nuytinck, J. (2015). Morphology and phylogeny of four new *Lactarius* species from Himalayan India. *Mycotaxon*, 130(1), 105-130.
- De Crop, E. (2016). Global phylogeny and evolutionary history of the genus *Lactifluus* (Doctoral dissertation, Ghent University).
- De Crop, E., Nuytinck, J., Van de Putte, K., K., Hackel, J., Stubbe, D., Hyde, K. D., Roy, M., Halling, R. E., Moreau, P. A., Eberhardt, U., y Verbeken, A. (2017). A multi-gene phylogeny of *Lactifluus* (Basidiomycota, Russulales) translated into a new infrageneric classification of the genus. *Persoonia*, 38, 58–80.
- De Crop, E., Delgat, L., Nuytinck, J., Halling, R. E., & Verbeken, A. (2021). A short story of nearly everything in *Lactifluus* (Russulaceae). *Fungal systematics and evolution*, 7(1): 133-164.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6): 879-886.
- De Luna, E., y Mishler, B. D. (1996). El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. *Botanical Sciences*, (59), 131-146.
- DeSalle, R., Egan, M. G., y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1905–1916.
- Dissanayake, A. J., Bhunjun, C. S., Maharachchikumbura, S. S. N., y Liu, J. K. (2020). Applied aspects of methods to infer phylogenetic relationships amongst fungi. *Mycosphere*, 11(1), 2652-2676.
- Fernández, F. (2003). La Simbiosis micorrízica arbuscular. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.). *El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura*

- sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA. p. 13-48. ISBN: 959-7023-24-5.
- Flores, R., Honrubia, M., y Díaz, G. (2008). Caracterización de cepas de *Lactarius* sección Deliciosi de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. Revista mexicana de micología, 26, 51-55.
- Galindo-Flores G., Castillo-Guevara C., Campos-López A., Lara C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tormentosus* en *Pinus montesumae*. Botanical Sciences 93 (4): 855-863.
- Guzmán, G., (1998a). Inventorying the fungi of Mexico. Biodiversity and Conservation 7: 369-384.
- Guzmán, G., (1998b.) Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). In: Halffer, G. (ed.), La diversidad biológica de Iberoamérica II. Acta Zoológica Mexicana, nueva serie vol. especial, CYTED e Instituto de Ecología, Xalapa. pp. 111-175.
- Guzmán, G. (2008). Analysis of the studies on the macromycetes of Mexico. Revista mexicana de micología, 28(spe), 7-15.
- Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E. (1993). Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Plant Physiology 101:513-522
- Halling, R. E., Osmundson, T. W., y Neves, M. A. (2008). Pacific boletes: implications for biogeographic relationships. mycological research, 112(4), 437-447.
- Hawksworth, D. L., Crous, P. W., Redhead, S. A., Reynolds, D. R., Samson, R. A., Seifert, K. A., ... & Zhang, N. (2011). The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. IMA fungus, 2(1), 105-111.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., y deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313-322.

- Heilmann-Clausen J, Verbeken A y Vesterholt J. (1998). The genus *Lactarius*. Fungi of Northern Europe Vol. 2. The Danish Mycological Society.
- Henkel TW, Aime MC, Miller SL. (2000). Systematics of pleurotoid Russulaceae from Guyana and Japan, with notes on their ectomycorrhizal status. *Mycologia* 92, 6: 1119–1132.
- Heredia-Acuña, C., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., Ferrera-Cerrato, R., y Almaraz-Suarez, J. J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92(3), 321-333.
- Hesler LR y Smith AH. (1979). North American species of *Lactarius*. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Hipsley, C. A., y Müller, J. (2014). Beyond fossil calibrations: realities of molecular clock practices in evolutionary biology. *Frontiers in genetics*, 5, 138.
- Hibbett, D. S. (2007). After the gold rush, or before the flood? Evolutionary morphology of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes) in the early 21st century. *Mycological Research* in press.
- Hibbett DS, Binder M (2002) Evolution of complex fruiting-body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 269 (1504):1963-1969.
- Hibbett, D. S., Blackwell, M., James, T. Y., Spatafora, J. W., Taylor, J. W., y Vilgalys, R. (2018). Phylogenetic taxon definitions for Fungi, Dikarya, Ascomycota and Basidiomycota. *IMA fungus*, 9(2), 291-298.
- Hibbett, D. S., R. H. Nilsson, M. Snyder, M. Fonseca, J. Costanzo, and M. Shonfeld. (2005). Automated Phylogenetic Taxonomy: An Example in the Homobasidiomycetes (Mushroom-Forming Fungi). *Systematic Biology* 54: 660-668.
- Hipsley, C. A., y Müller, J. (2014). Beyond fossil calibrations: realities of molecular clock practices in evolutionary biology. *Frontiers in genetics*, 5, 138.

- Ho, S. Y., y Duchêne, S. (2014). Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular ecology*, 23(24), 5947-5965.
- Hutchison L. J. (1999). *Lactarius*. En *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile* (269-286). New York: Springer.
- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Palme JB, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Duenas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Metheny B, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Poldmaa K, Saag L, Saar I, Schubler A, Scott JA, Senes C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271e5277.
- Le, H. T., Nuytinck, J., Verbeken, A., Lumyong, S., & Desjardin, D. E. (2007). *Lactarius* in Northern Thailand: 1. *Lactarius* subgenus *Piperites*. *Fungal Diversity*, 24(1): 173-224.
- Lee, H., Wisitrassameewong, K., Park, M. S., Verbeken, A., Eimes, J., y Lim, Y. W. (2019). Taxonomic revision of the genus *Lactarius* (*Russulales*, *Basidiomycota*) in Korea. *Fungal Diversity*, 95(1), 275-335.
- Looney BP, Ryberg M, Hampe F, Sanchez-Garcia M, Matheny PB. (2016). Into and out of the tropics: global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 25 (2):630-647.
- Matute, D. R., y Sepúlveda, V. E. (2019). Fungal species boundaries in the genomics era. *Fungal Genetics and Biology*, 131, 103249.
- Miller SL, McClean TM, Walker JF, et al. (2001). A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. *Mycologia* 93, 2: 344–354.
- Morrone, J. J. (2013). *Sistemática: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

- Montoya, L., y Bandala, V. M. (2005). Revision of *Lactarius* from Mexico. Additional new records. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 18(4), 471-483.
- Jordano P., Vázquez D., Bascompte J. (2009). Redes complejas de interacciones mutualistas planta-animal. En *Ecología y evolución de interacciones planta-animal* (17-41). Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., Scott, T. B., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. E., Telleria, M. T., Weiss, M., Larsson, K. H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A y Jermin LS. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14:587–589.
- Katoh K y Standley D. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, y Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Kirk, P. M., P. F. Canon, D. W. Minter y J. A. Stalpers (eds.). (2008). *Ainsworth y Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10 ed. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford. 784.
- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor A, Bahram M, Bates S, Bruns T, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD,

- Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Pöldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Carolina Senés C, Matthew E. Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Michael Wei y Larsson KH. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology* 22: (21) 5271–5277.
- Kong A, Montoya A, Estrada-Torres A. (2005). Hongos macroscópicos. *In: Fernández J y López-Domínguez JC (comps.). Biodiversidad del Parque Nacional Malinche.* Coordinación General de Ecología, Gobierno del Estado de Tlaxcala. 47-72.
- Kornerup A y Wanscher JH. (1978). *Methuen Handbook of Colour.* Methuen London.
- Larsson E, Larsson KH. (2003). Phylogenetic relationships of russuloid basidiomycetes with emphasis on aphyllorphorean taxa. *Mycologia.* 95(6):1037-65.
- Le, H. T., Stubbe, D., Verbeken, A., Nuytinck, J., Lumyong, S., y Desjardin, D. E. (2007). *Lactarius* in Northern Thailand: 2. *Lactarius* subgenus *Plinthogali*. *Fungal Diversity*, 27(1): 61-94.
- Leonardi, M., Comandini, O., Sanjust, E., & Rinaldi, A. C. (2021). Conservation Status of Milkcaps (Basidiomycota, Russulales, Russulaceae), with Notes on Poorly Known Species. *Sustainability*, 13(18): 10365.
- Looney BP, Meidl P, Piatek MJ, Miettinen O, Martin FM, Matheny PB, Labbé JL. (2018). Russulaceae: a new genomic database to study ecosystem function and evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi with their tree associated. *New Phytologist* 218(1): 54-65.
- Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y., y Zhu, C. D. (2018). Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*, 67(5): 830-846.
- Martínez-López, O. (2015). La taxonomía integral y su importancia para la conservación. *Cienc. Conserv*, 6: 54-64.

- Miller SL, McClean TM, Walker JF, et al. (2001). A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. *Mycologia* 93, 2: 344–354.
- Miller SL, Larsson E, Larsson KH, Verbeken A, Nuytinck J (2006) Perspectives in the new Russulales. *Mycologia* 98 (6): 960–970
- Monedero-García C. (2011). El Género *Russula* en la Península Iberica. España: CEME.
- Montoya L, Ovrebo C, Corrales A, Garibay-Orijel R, Bandala VM, Angeles-Argais R, Kong A. (2018). Revisión taxonomica del popular hongo azul: *Lactarius indigo*. Simposio: Diversidad morfológica y genética, XII Congreso Nacional de Micología. Xalapa, Veracruz.
- Morris MH, Pérez-Pérez MA, Smith ME y Bledsoe C. (2008). Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza* 18: 375-383.
- Mueller, G. M., Wu, Q. X., Huang, Y. Q., Guo, S. Y., Aldana-Gomez, R., y Vilgalys, R. (2001). Assessing biogeographic relationships between North American and Chinese macrofungi. *Journal of biogeography*, 28(2): 271-281.
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32: 268-274.
- Niveiro, N., Popoff, O. F., y Albertó, E. O. (2009). Hongos comestibles silvestres: presencia de especies exóticas de *Suillus* (*Boletales*, *Basidiomycota*) y *Lactarius* (*Russulales*, *Basidiomycota*) asociadas a los cultivos de *Pinus Elliottii* del Nordeste Argentino. *Bonplandia*, 18(1): 65-71.
- Oros-Ortega, I., Andrade-Torres, A., Lara-Pérez, L. A., Guzmán-Olmos, R. F., Casanova-Lugo, F., Sáenz-Carbonell, L. A., y Córdova-Lara, I. (2017). Ectomycorrhizal ecology, biotechnology and taxonomy for the conservation and use of *Abies religiosa* in temperate areas of Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 23(3).

- Pegler, D. N., & Young, T. W. K. (1979). The gasteroid Russulales. *Transactions of the British mycological Society*, 72(3), 353-388.
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5): 239-247.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD y Vogler AP. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–609.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S y Achaz G. (2012). ABGD, Automatic BarcodeGap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864–1877.
- Quezada, M. L., Rodas-Duarte, R., y Marroquín-Tintí, A. A. (2016). Contribución al conocimiento de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz y Petén, Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 3(2), 115-126.
- Rambaut A y Drummond AJ. (2018). FigTree v1.4. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G y Suchard MA. (2018). Tracer v1.7. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Rannala, B., & Yang, Z. (2020). Species delimitation. In C. Scornavacca, F. Delsuc, & N. Galtier (Eds.), *Phylogenetics in the Genomic Era*. 5.5:1–5.5:18
- Ratnasingham S. y Hebert PDN. (2007). Bold: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*.
- Raven, P. H., y Axelrod, D. I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3), 539-673.
- Redhead SA, Norvell LL. (1993). Notes on *Bondarzewia*, *Heterobasidion* and *Pleurogala*. *Mycotaxon* 48: 371–380.

- Rodríguez-Alcántara O, Figueroa-García D, Herrera-Fonseca MJ. (2018). Catálogo de los hongos del Volcán de Tequila, Municipio de Tequila, Jalisco, México. *Polibotánica* 45: 15-33.
- Rodríguez-Correa, H., Oyama, K., MacGregor-Fors, I., y González-Rodríguez, A. (2015). How are oaks distributed in the Neotropics? A perspective from species turnover, areas of endemism, and climatic niches. *International Journal of Plant Sciences*, 176(3), 222-231.
- Romagnesi H. (1948). Les problèmes et les méthodes de la systématique des champignons supérieurs . *Bulletin de la Société Mycologique de France* 64, 1-2: 53–100.
- Romagnesi H. (1967). *Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord*. Bordas, Paris.
- Ronquist F y Huelsenbeck JP. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572-1574.
- Rosenblad, M. A., Martín, M. P., Tedersoo, L., Ryberg, M., Larsson, E., Wurzbacher, C., ... y Nilsson, R. H. (2016). Detection of signal recognition particle (SRP) RNAs in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) of three lineages of ectomycorrhizal fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota).
- Sáez, A. G. (2009). Genes y especies. *Ecosistemas*, 18(1): 3-9.
- Sato, H., Ohta, R., y Murakami, N. (2020). Molecular prospecting for cryptic species of the *Hypholoma fasciculare* complex: toward the effective and practical delimitation of cryptic macrofungal species. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Sarnari M (2005) *Monografía illustrate de genere Russula in Europa. Tomo Secondo*. AMB, Centro Studi Micologici, Trento
- Schoch, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., Meyer, W., Nilsson, R. H., Hughes, K., Miller, A. N., Kirk, P. M., Abarenkov, K., Aime, M. C., Ariyawansa, H. A., Bidartondo, M., Boekhout, T., Buyck, B., Cai, Q., Chen, J., Crespo, A., ... Federhen, S. (2014). Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and

- molecular data for Fungi. Database: the journal of biological databases and curation, 2014, bau061. Southwestern China. *Mycosystema* 36(11): 1463-1482.
- Stubbe, D., Nuytinck, J., & Verbeken, A. (2010). Critical assessment of the *Lactarius gerardii* species complex (*Russulales*). *Fungal biology*, 114(2-3): 271-283.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Ryberg, M., Otsing, E., Kõljalg, U., y Abarenkov, K. (2014). Global biogeography of the ectomycorrhizal/sebacina lineage (Fungi, Sebaciniales) as revealed from comparative phylogenetic analyses. *Molecular Ecology*, 23(16): 4168-4183.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... y Smith, M. E. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213).
- Tedersoo, L., y Nara, K. (2010). General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 351-354.
- Triantafyllou, M., Polemis, E., Gonou-Zagou, Z., Dimou, D. M., Delivorias, P., y Zervakis, G. I. (2015). Taxonomic relationships among non-macrocytidiata taxa of *Lactarius subg. Russularia* from Europe with special reference to species from Greece. *Mycological Progress*, 14(9): 1-12.
- Varga, T., Krizsán, K., Földi, C., Dima, B., Sánchez-García, M., Sánchez-Ramírez, S., ... & Nagy, L. G. (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nature ecology & evolution*, 3(4): 668-678.
- Větrovský T., Morais D., Kohout P., Lepinay C., Algora Gallardo C., Awokunle Hollá S., Doreen Bahnmann B., Bílohnědá K., Brabcová V., D'Alò F., Human Z.R., Jomura M., Kolařík M., Kvasničková J., Lladó S., López-Mondéjar R., Martinović T., Mašínová T., Meszárošová L., Michalčíková L., Michalová T., Mundra S., Navrátilová D., Odriozola I., Piché-Choquette S., Štursová M., Švec K., Tláskal V., Urbanová M., Vlk L., Voříšková J., Žifčáková L., Baldrian P. (2020). GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Scientific Data*, 7(1): 1-14.
- Verbeken A. (1998b). Studies in tropical African *Lactarius* species. 6. A synopsis of the subgenus *Lactariopsis* (Henn.) R. Heim emend. *Mycotaxon* 66: 387–418.

- Verbeken, A., y Nuytinck, J. (2013). Not every milkcap is a *Lactarius*. *Scripta Botanica Belgica*, 51: 162-168.
- Verbeken, A., Stubbe, D., Van de Putte, K., Eberhardt, U., y Nuytinck, J. (2014). Tales of the unexpected: angiocarpous representatives of the Russulaceae in tropical South East Asia. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32, 13.
- Villarruel Ordaz, J. L., Canseco Zorrilla, E., y Cifuentes, J. (2015). Diversidad fúngica en el municipio de San Gabriel Mixtepec, región Costa de Oaxaca, México. *Revista mexicana de micología*, 41: 55-63.
- Wang, X. H. (2017). Seven new species of *Lactarius* subg. *Lactarius* (*Russulaceae*) from southwestern China. *Mycosystema*, 36(11): 1463-1482.
- Wang, X. H., Halling, R. E., Hofstetter, V., Lebel, T., y Buyck, B. (2018). Phylogeny, biogeography and taxonomic re-assessment of *Multifurca* (*Russulaceae*, *Russulales*) using three-locus data. *PloS one*, 13(11).
- Wang, X. Q., y Ran, J.-H. (2014). Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75: 24–40.
- Wen, J., Nie, Z. L., y Ickert-Bond, S. M. (2016). Intercontinental disjunctions between eastern Asia and western North America in vascular plants highlight the biogeographic importance of the Bering land bridge from late Cretaceous to Neogene. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(5): 469-490.
- Willis, K. J. (ed.). (2018). *State of the World's Fungi*. Report. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Wisitrassameewong K, Looney BP, Le HT, De Crop E, Das K, Van de Putte K, Eberhardt U, Jiayu G, Stubbe D, Hyde KD, Verbeken A, Nuytinck J. (2016). *Lactarius* subgenus *Russularia* (Basidiomycota, Russulales): novel Asian species, worldwide phylogeny and evolutionary relationships, *Fungal Biology*. 120(12): 1554-1581.

- Wisitrassameewong, K., Nuytinck, J., Le, H. T., De Crop, E., Hampe, F., Hyde, K. D., & Verbeken, A. (2015). *Lactarius* subgenus *Russularia* Russulaceae in South-East Asia: 3. New diversity in Thailand and Vietnam. *Phytotax*, 207(3): 215-241.
- Wu, Q. X., Mueller, G. M., Lutzoni, F. M., Huang, Y. Q., y Guo, S. Y. (2000). Phylogenetic and biogeographic relationships of eastern Asian and eastern North American disjunct *Suillus* species (Fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 17(1): 37-47.
- Yang M-Q, Li D-Z, Wen J, Yi T-S (2017) Phylogeny and biogeography of the amphi-Pacific genus *Aphananthe*. *PLoS ONE* 12(2).
- Zamorano de Haro P. (2009). La flora y fauna silvestres en México y su regulación. *Procuraduría agraria. Estudios Agrarios*, 159-167.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P y Stamatakis A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29: 2869–2876.
- Zuluaga, C., Buriticá, P., y Marín, M. (2011). Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28S. *Revista de Biología Tropical*, 59(2): 517-540.

11 ANEXOS

Apéndice 1 Lista de especies completa

Subsección Croceini (Burl.) Sing.			
	Nombre de la secuencia	# de Acceso	Procedencia
1	ECM_Quercus	UDB0786458	Hungría
2	ECM_Quercus	UDB0786459	Hungría
3	ECM_Quercus	UDB0787208	Austria
4	Lactarius_chrysorrheus	KT165289	Italia
5	ECM_Quercus_petraea	FM995570	Francia
6	ECM_Quercus	UDB0786650	Hungría
7	ECM_Quercus	UDB0787211	Austria
8	ECM_Quercus	UDB0786460	Hungría
9	Lactarius_chrysorrheus	KF133261	Italia
10	ECM_Quercus	UDB0786461	Hungría
11	ECM_Lactarius	FJ210740	Italia
12	ECM_Quercus	UDB0787214	Austria
13	ECM_Quercus	UDB0787213	Austria
14	ECM_Lactarius	DQ990840	Italia
15	ECM_Quercus	UDB0787212	Austria
16	ECM_Quercus	UDB0786467	Hungría
17	ECM_Quercus	UDB0786463	Hungría
18	ECM_Quercus	UDB0788014	Francia
19	ECM_Quercus	UDB0786464	Hungría
20	ECM_Quercus	UDB0787210	Austria
21	Lactarius_chrysorrheus_RefSeq	UDB011470	Estonia
22	ECM_Quercus	KY794693	Alemania
23	ECM_Quercus	UDB0788016	Francia
24	ECM_Quercus	UDB0788018	Francia
25	ECM_Quercus	UDB0787911	Francia
26	Lactarius_chrysorrheus	UDB015752	Estonia
27	Lactarius_chrysorrheus	JF908324	Italia
28	Lactarius_chrysorrheus	KT165286	Eslovaquia
29	ECM_Quercus	UDB0788015	Francia
30	Lactarius_chrysorrheus	UDB019764	Estonia
31	ECM_Quercus	UDB0787368	Reino Unido
32	Lactarius_chrysorrheus	KJ742396	Bélgica
33	Lactarius_chrysorrheus	KJ742397	Francia
34	Lactarius_obscuratus	UDB000864	Alemania
35	ECM_Pinus_sylvestris	MF352750	Reino Unido
36	ECM_Quercus	UDB0788012	Francia

37	ECM_Lactarius_chrysorrheus	KX449473	Francia
38	ECM_Quercus_suber	AM930233	Portugal
39	ECM_Quercus_petraea	KM576492	Francia
40	Lactarius_chrysorrheus	KT165290	Bélgica
41	ECM_Abies_balamifera	MK069510	Canadá
42	ECM_Abies_balamifera	MK069511	Canadá
43	ECM_Picea_rubens	MK069512	Canadá
44	ECM_Pinus_clausa	KX899308	USA
45	ECM_Pinus_clausa	KX899734	USA
46	Lactarius_chrysorrheus	GU256225	USA
47	ECM_Lactarius	KX816119	USA
48	Lactarius_chrysorrheus	EU569286	México
49	Lactarius_chrysorrheus	MK397223	México
50	ECM_Quercus	FJ196932	México
51	Lactarius_chrysorrheus	MN612772	Colombia
52	Lactarius	KF937341	Colombia
53	ECM_Castanea_dentata	MG674538	USA
54	Lactarius_chrysorrheus	MK167433	China
55	Lactarius_chrysorrheus	MT560360	China
56	ECM_Pinus	MT522558	China
57	Lactarius_chrysorrheus	MK167405	China
58	Lactarius_parallelus	MH984997	Corea del Sur
59	ECM_Abies_balamifera	MK069509	Canadá
60	ECM_Lactarius	KF359597	USA
61	Lactarius_chrysorrheus	FJ596871	USA
62	Lactarius_vinaceorufescens	KJ705219	Canadá
63	ECM_Pinus_banksiana	FJ769539	USA
64	ECM_Pinus	MH809946	Canadá
65	ECM_Betula_papyrifera	KC876312	Canadá
66	ECM_Pinus_ponderosa	MG761555	USA
67	Lactarius_vinaceorufescens	MK131496	Canadá
68	Lactarius_chrysorrheus	KT875046	México
69	ECM_Betula_papyrifera	KC876313	Canadá
70	Lactarius_vinaceorufescens	KJ705217	Canadá
71	ECM_Pinus_thunbergii	LC029804	Japón
72	Lactarius_indochrysorrheus	KJ742391	India
73	Lactarius_chrysorrheus	KC185407	Taiwán
74	Lactarius_hatsudake	MH984970	Corea del Sur
75	Lactarius_chrysorrheus	MH910553	USA
76	Lactarius_aff_chrysorrheus	KJ742398	USA
77	Lactarius_aff_chrysorrheus	KJ742399	USA

78	<i>Lactarius cremicolor</i>	MH984942	Corea del Sur
79	<i>Lactarius</i>	MH985024	Corea del Sur
80	ECM_ <i>Pinus amamiana</i>	LC364251	Japón
81	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	AF096983	España
82	ECM_ <i>Lactarius</i>	KJ173926	China
83	<i>Lactarius colorascens</i>	MT237509	USA
84	<i>Lactarius xanthogalactus</i>	EU726293	USA
85	ECM_ <i>Quercus wislizeni</i>	EF411111	USA
86	ECM_ <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AM231787	USA
87	ECM_ <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AM231790	USA
88	ECM_ <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AM231788	USA
89	ECM_ <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AM231791	USA
90	<i>Lactarius xanthogalactus</i>	DQ974745	USA
91	ECM_ <i>Lithocarpus densiflorus</i>	DQ273390	USA
92	ECM_ <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AM231792	USA
93	ECM_ <i>Quercus kelloggii</i>	KC791080	USA
94	<i>Lactarius brachycystidiatus</i> Holotype	MF508954	China
95	<i>Lactarius serifluus</i> RefSeq	UDB000867	Suecia
96	<i>Lactarius fragilis</i>	MN612773	Colombia
97	<i>Lactarius pseudofragilis</i> Holotype	MG589763	China
98	<i>Lactarius olivaceofuscus</i> Holotype	MK351928	China
99	<i>Lactarius camphoratus</i> RefSeq	UDB000326	Alemania
100	<i>Lactarius helvus</i> RefSeq	UDB001597	Reino Unido
101	<i>Lactarius fulvihirtipes</i> Holotype	MK253491	China
102	<i>Lactarius alpinihirtipes</i> Holotype	MG589784	China
103	<i>Lactarius aurantiobrunneus</i> Holotype	MK351924	China
104	<i>Lactarius furfuraceus</i> Holotype	MH447566	China
105	<i>Lactarius glabrigracilis</i> Holotype	KR025606	Tailandia
106	<i>Lactarius strigosipes</i>	JN859141	México
107	<i>Lactarius asiae-orientalis</i> Holotype	MK253479	China
108	<i>Lactarius orientaliquietus</i> Holotype	MH447589	China
109	<i>Lactarius quietus</i> RefSeq	UDB011494	Estonia
110	<i>Lactarius</i>	MN612778	Colombia
111	<i>Lactarius frustratus</i>	MK578698	USA
112	<i>Lactarius quietus</i> var <i>incanus</i>	MW899411	USA
113	<i>Lactarius cf. luteus</i>	EU819481	USA
114	<i>Lactarius</i>	MK351934	China
115	<i>Lactarius ambiguus</i> Holotype	MH447587	China
116	<i>Lactarius inconspicuus</i> Holotype	KR025584	Tailandia
117	<i>Lactarius conglutinatus</i> Holotype	MK253486	China
118	<i>Lactarius imperceptus</i> RefSeq	JQ272401	USA

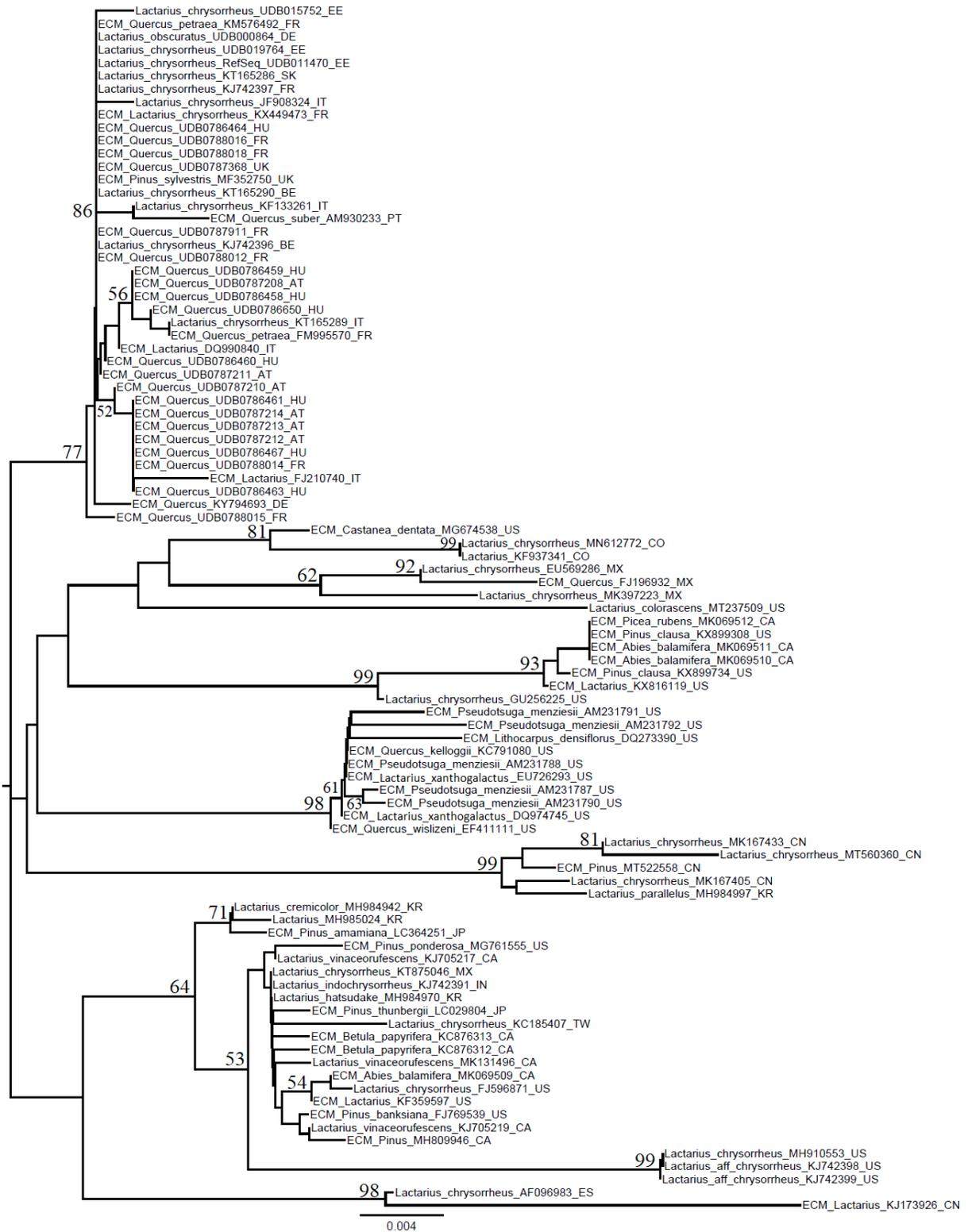
119	Lactarius_decipiens_RefSeq	KF432973	Italia
120	Lactarius_kesiyae_Holotype	KR025619	Vietnam
121	Lactarius_dombangensis_Holotype	KT165258	India
122	Lactarius_badiosanguineus_RefSeq	KF432983	Francia
123	Lactarius_lachungensis_Holotype	KT165283	India
124	Lactarius_atlanticus	JF908310	Italia
125	Lactarius_fulvissimus	KT165244	Bélgica
126	Lactarius_josserandii	MK105613	España
127	Lactarius_sphagneti_RefSeq	KF432975	Alemania
128	Lactarius_rubrocinctus_RefSeq	KF432977	Alemania
129	Lactarius_sikkimensis_Holotype	KT165252	India
130	Lactarius_atrii_Holotype	KT165241	India
131	Lactarius_hetpaticus_RefSeq	UDB000861	Bélgica
132	Lactarius_subdulcis_RefS	UDB000042	Dinamarca
133	Lactarius_lacunarum_RefSeq	KF432982	Alemania
134	Lactarius_flavigalactus_Holotype	KT165264	India
135	Lactarius_lanceolatus	KR090919	USA
136	Lactarius_luculentus	KR090920	USA
137	Lactarius_aurantiacus	KF432974	Eslovaquia
138	Lactarius_aurantionitidus_Holotype	KT165237	China
139	Lactarius_lapponicus	KX394291	Finlandia
140	Lactarius_substriatus	KR090969	USA
141	Lactarius_brunneohepaticus_RefSeq	HQ714702	Suiza
142	Lactarius_cyathuliformis_RefSeq	HQ714785	Francia
143	Lactarius_herreriae_Holotype	KJ874336	México
144	Lactarius_obscuratus_RefSeq	HQ714758	Francia
145	Lactarius_tabidus_RefSeq	EF493293	Suecia
146	Lactarius_rufus_RefSeq	EF493296	Suecia
147	Lactarius_ciliatus_Holotype	MH984935	Corea del Sur
148	Lactarius_subzonarius	MH985020	Corea del Sur
149	Lactarius_torminosus_RefS	UDB000375	Finlandia
150	Lactarius_pseudodelicatus	KX394295	USA
151	Lactarius_aff_wenquanensis	EF141537	Tailandia
152	Lactarius_crassus	KT968581	USA
153	Lactarius_semisanguifluus_RefSeq	UDB000320	Alemania
154	Lactarius_indigo	JN613159	México
155	Lactarius_pseudohatsudake_Holotype	KY174912	China
156	Lactarius_sanguifluus	AF249291	Francia
157	Lactarius_miniatosporus	EF685078	México
158	Lactarius_deliciosus_RefS	UDB002381	Reino Unido
159	Lactarius_dilutisalmoneus_Holotype	MF152847	China

160	Lactarius_yazooensis	MK564564	USA
161	Lactarius_zonarioides	MF152845	Suecia
162	Lactarius_intermedius_RefSeq	AF140256	Italia
163	Lactarius_mexicanus	MF040818	México
164	Lactarius_cinereoroseus	MH984937	Corea del Sur
165	Lactarius_ustulatus_Holotype	MH985026	Corea del Sur
166	Lactarius_alnicola	MH820031	México
167	Lactarius_scrobiculatus	AF140262	Alemania
168	Lactarius_tuomikoskii	EF493292	Suecia
169	Lactarius_citriolens	DQ422003	Suecia
170	Lactarius_cf_alnicola	MN190178	USA
171	Lactarius_aquizonatus_RefSeq	UDB000835	Suecia
172	Lactarius_auriolla	KF133257	Suecia
173	Lactarius_leonis	UDB0780250	Estonia
174	Lactarius_subbrevipes_Holotype	MF508935	China
175	Lactarius_pseudoscrobiculatus	MN134408	Italia
176	Lactarius_maculatipes	MH016946	USA
177	Lactarius_psammicola	MH211715	USA
178	Lactarius_zonarius	JF908280	Italia
179	Lactarius_yazooensis	MN704813	China
180	Lactarius_cremicolor	MZ157230	China
181	Lactarius_fallax	JQ446103	USA
182	Lactarius_lignyotus_RepS	UDB000390	Alemania
183	Lactarius_fallax_var_concolor	JQ446104	USA
184	Lactarius_lavandulus	EF560675	Tailandia
185	Lactarius_atromarginatus	UDB039619	Laos

Apéndice 2 Tabla de Distancias (p) genéticas de los grupos pertenecientes a *Croceini*

	Gp_1	Gp_4	Gp_3	Gp_2	Gp_6	Gp_8	Gp_9	Gp_7	Gp_10	Gp_5
Gp_1										
Gp_4	0.03208									
Gp_3	0.02695	0.04828								
Gp_2	0.02467	0.04433	0.02450							
Gp_6	0.03393	0.05583	0.03924	0.03743						
Gp_8	0.01966	0.04443	0.03946	0.03463	0.04058					
Gp_9	0.03718	0.06144	0.05452	0.04687	0.05937	0.02329				
Gp_7	0.01710	0.04178	0.03818	0.03299	0.03727	0.00838	0.02501			
Gp_10	0.03334	0.05903	0.05194	0.05021	0.05806	0.03530	0.05116	0.03351		
Gp_5	0.02328	0.03851	0.04168	0.03935	0.04437	0.02997	0.04193	0.02744	0.04822	

Apéndice 3 Árbol de distancias (*p*) desglosado



Apéndice 4 Árbol de ML con los clados delimitados.

