



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Sistemática de las especies pertenecientes al género *Lactarius* sección *Deliciosi*
con látex de color anaranjado en México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Mario Ulises Díaz Juárez

Director

M. en C. Alejandro Kong Luz

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Sistemática de las especies pertenecientes al género *Lactarius* sección *Deliciosi*
con látex de color anaranjado en México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Nombre del Alumno

Mario Ulises Díaz Juárez

Comité Tutorial

M. en C. Alejandro Kong Luz

Dr. Roberto Garibay Orijel

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2019

La descripción de los ejemplares se realizó en el laboratorio de diversidad y sistemática del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB).

Se recibió apoyo del proyecto “Diversidad Biológica y Cultural de Hongos y Mixomicetos en el Estado de Tlaxcala” con clave: UATLX-CA229, para la realización de los análisis filogenéticos.

Las técnicas de microscopia de barrido electrónico y el procesamiento de las muestras para obtener secuencias de ADN se realizaron en el Instituto de Biología (IB), con el apoyo de los técnicos M. en C. María Berenit Mendoza Garfias y Dra. Noemi Matias Ferrer.

Se obtuvieron ejemplares provenientes de los herbarios de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FCME), del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU), del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria (ITCV) y del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (TLXM).

Se conto con beca de maestria de CONACYT con número de CVU: 709731. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Mario Ulises Díaz Juárez** realiza para la obtención del grado de Maestro 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: **“Sistemática de las especies pertenecientes al género *Lactarius* sección *Deliciosi* con látex de color anaranjado en México”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 27 DE 2018



DR. ANDRÉS RAMÍREZ PONCE



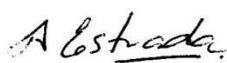
DR. ALEJANDRO VALDEZ MONDRAGÓN



DRA. YENDI EBENEZER NAVARRO NOYA



M.C. ALEJANDRO KONG LUZ



DR. ARTURO ESTRADA TORRES



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado del CTBC, UAT por el apoyo brindado de parte de los profesores que me impartieron clase, así como por las instalaciones y equipo prestados para realizar las actividades requeridas para concluir el proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico que recibí durante los dos años de maestría con número de CVU: 709731.

A mi director el Dr. Alejandro Kong Luz por su paciencia y calidad de persona que me ayudaron a mantener mi optimismo durante toda la maestría. Así como por su asesoría y enseñanzas durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. Muchas gracias Doc por transmitirme su pasión por el estudio de los hongos.

A los miembros de mi comité tutorial ya que sus aportaciones y sugerencias fueron de mucha ayuda para mejorar la calidad y presentación de mi proyecto, de antemano muchas gracias Dr. Arturo Estrada Torres, Dr. Roberto Garibay Origel, Dr. Joaquin Cifuentes Blanco y Dr. Martin Alejandro Serrano Meneses.

A los doctores, Alejandro Valdez Mondragon, Yendi Ebenezer Navarro Noya y Andres Ramirez Ponce por la revisión de mi tesis para el examen cerrado, así como por su posterior participación en mi examen abierto. Muchas gracias

A mis familiares y amigos que creyeron en mí y me apoyaron de diversas formas durante esta etapa de mi vida. Gracias a todos!!

"Si tienes todo bajo control, entonces no te estás moviendo lo suficientemente rápido".

Mario Andretti

RESUMEN

Lactarius deliciosus y *L. salmonicolor* son dos de las especies de hongos silvestres comestibles más citadas en México. Pertenecen a la sección *Deliciosi* debido a que exudan látex de color anaranjado y se asocian con árboles de la familia Pinaceae. Estudios recientes confirman que la distribución de estas dos especies se encuentra restringida a Europa y el uso de estos dos nombres en Norteamérica es erróneo. Por lo tanto, las especies mexicanas identificadas bajo estos dos nombres no corresponden con dichas especies y es necesario aclarar su identidad taxonómica y establecer sus relaciones filogenéticas. Se secuenciaron los espaciadores internos transcritos (ITS) y el gen 5.8s del ADN ribosomal nuclear para realizar los análisis filogenéticos mediante máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. La descripción morfológica se basó en el estudio macro y microscópico de los ejemplares estudiados. Los análisis filogenéticos mostraron que los ejemplares identificados como *L. deliciosus* de México se ubican dentro de un clado con bajo soporte que incluye además ejemplares de Estados Unidos y Canadá. Este clado norteamericano no se encuentra estrechamente relacionado con *L. deliciosus* de Europa. Con base en la morfología se reconocieron tres morfotipos asociados con *Pinus*, uno de los Altos de Chiapas, uno de la Sierra Madre Occidental y otro del Eje Volcánico Transmexicano. Los caracteres morfológicos que mostraron variación en los ejemplares fueron las láminas, esporas, macrocistidios y pseudocistidios. Los análisis filogenéticos mostraron que la especie identificada como *Lactarius salmonicolor* de México, no corresponde con dicha especie y el taxa más relacionado es *L. aestivus* del oeste de Estados Unidos. Difiere de esta última principalmente en la abundancia de los macrocistidios, tamaño del basidioma y su distribución. Las especies de látex anaranjado identificadas como *L. deliciosus* con distribución en Norteamérica y asociadas con *Pinus* están estrechamente relacionadas y es posible que representen especies nuevas, sin embargo, la región de los ITS no es un carácter útil para delimitar los taxones en este grupo. El hongo mexicano que exuda látex anaranjado, que crece asociado con *Abies religiosa* y que comúnmente es determinado como *L. salmonicolor*, presenta diferencias morfológicas, genéticas y biogeográficas con respecto a *L. salmonicolor* de Europa, razón por la cual la consideramos como una especie nueva.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Subgénero <i>Lactarius</i>	2
1.2 Sección <i>Deliciosi</i>	3
1.3 Caracteres morfológicos de importancia taxonómica en la sección <i>Deliciosi</i>	3
1.4 Características ecológicas de la sección <i>Deliciosi</i>	8
1.5 Posición taxonómica de las especies americanas de la sección <i>Deliciosi</i>	8
1.6 Complejo <i>Lactarius deliciosus</i> en México.....	10
1.7 Evidencia molecular para resolver complejos de especies crípticas.....	11
1.8 Taxonomía integrativa, para delimitar taxones fúngicos a nivel de especie	14
2. ANTECEDENTES.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Ejemplares examinados.....	27
6.2 Caracteres morfo-anatómicos.....	27
6.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	29
6.4 Ensamble y edición de secuencias.....	32

6.5 Secuencias de bases de datos.....	32
6.6 Alineamiento.....	33
6.7 Selección de modelo evolutivo.....	33
6.8 Analisis filogenéticos.....	33
6.8.1 Edición de árboles y figuras.....	34
6.9 Análisis de distancia genética.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Análisis BLAST.....	35
7.2 Distancia genética.....	36
7.3 Análisis filogenéticos.....	37
7.4 Taxonomía.....	42
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES GENERALES.....	72
10. PERSPECTIVAS.....	74
11. REFERENCIAS.....	75
12. ANEXOS.....	85
12.1 Tablas.....	85
12.2 Figuras.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Corte de una lámina y estructuras microscópicas.....	7
Fig. 2. Organización del ADN ribosomal nuclear.	13
Fig 3. Estados donde se ha citado a <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex</i>	19
Fig 4. Estados donde se ha citado a <i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex</i>	20
Figura 5. Criterio de información de AKAIKE.....	96
Figura 6. Criterio de Información Bayesiana.....	96
Figura 7. Resultados de ESS en Tracer.....	96
Figura 8. Árbol filogenético de la sección <i>Deliciosi</i>	39
Figura 9. Detalles del clado <i>Lactarius deliciosus sensu</i> Hesler y Smith	40
Figura 10. Detalles del clado <i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex</i>	41
Figura 11. Fotos de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> de Chiapas.....	44
Figura 12. Microscopía de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> de Chiapas.....	45
Figura 13. Fotos de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> de Chihuahua.....	47
Figura 14. Fotos de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> de Chihuahua	48
Figura 15. Microscopia de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> de Chihuahua.....	49
Figura 16. Fotos de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> del centro de México.....	51
Figura 17. Microscopia de <i>Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.</i> del centro de México...	52
Figura 18. <i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex</i>	56
Figura 19. Estructuras microscópicas de <i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex</i>	57
Figura 20. Enchilado de oyamel, <i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex</i>	97

Figura 21. Mapa de la distribución de los ejemplares descritos por Hesler y Smith (1979)	62
Figura 22. <i>Lactarius deliciosus</i> var. <i>salmonicolor</i> , recolectado por Heim.....	98
Figura 23. <i>Lactarius miniatosporus</i> recolectado en las Lagunas de Montebello Chiapas....	69
Figura 24. <i>Lactarius salmoneus</i> recolectado en las Lagunas de Montebello Chiapas.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis BLAST de las secuencias ITS de ejemplares mexicanos.....	35
Tabla 2. Lista de secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos.....	85
Tabla 3. Material estudiado de la sección <i>Deliciosi</i> de México.....	92
Tabla 4. Caracteres macroscópicos para delimitar a <i>L. salmonicolor sensu auct. Mex</i>	94
Tabla 5. Caracteres microscópicos para delimitar a <i>L. salmonicolor sensu auct. Mex</i>	94
Tabla 6. Material estudiado bajo microscopía electrónica de barrido.....	95
Tabla 7. Concentraciones utilizadas para electroforesis dependiendo del tamaño del gel....	31
Tabla 8. Análisis de distancias genéticas (<i>p</i>) de las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5.8S.....	37

1. INTRODUCCIÓN

El género *Lactarius* (Pers.) 1797 pertenece a la familia Russulaceae Lotsy 1907, un grupo de hongos Basidiomycota de amplia distribución, que se asocian a las raíces de varias plantas, para formar la ectomicorriza, una simbiosis mutualista muy extendida en diversos bosques fríos, templados y en algunos tropicales (Taylor y Alexander 2005). Además, las especies de la familia Russulaceae presentan en su estructura reproductiva o basidioma la trama heterómera, que es una combinación de típicas hifas filamentosas con células globosas que se conocen como esferocistos, esta organización celular le confiere una consistencia quebradiza a diferencia de la mayoría de hongos agaricoides que tienen una consistencia fibrosa (Miller y cols. 2006). También presentan esporas con ornamentación amiloide y cistidios en el himenio, dichos cistidios son grandes en la familia Russulaceae y se conocen como macrocistidios (De Crop y cols. 2017). Dentro de Russulaceae se reconocen otros tres géneros: *Lactifluus* (Pers.) Roussel 1810, *Multifurca* Buyck y V. Hofstetter 2008 y *Russula* (Pers.) 1796. Morfológicamente *Lactarius* se distingue porque sus especies exudan un líquido, llamado látex, al romper cualquier parte de su basidioma, la superficie del sombrero o píleo presenta una capa viscosa o pegajosa, y a menudo presenta un patrón de coloración en forma de círculos concéntricos, alternando claros y oscuros, llamadas zonaciones. Además, se distribuye por lo general en bosques templados y fríos. El género *Lactifluus* también exuda látex, pero en mayor cantidad que *Lactarius*, además, la superficie del píleo es seca y aterciopelada, no presenta zonaciones y su distribución es más tropical. *Multifurca* es el género que presenta menos especies, las cuales pueden o no exudar látex, pero se distingue de *Lactarius* porque sus láminas presentan un patrón de bifurcaciones consecutivas. Por su parte, *Russula* no exuda látex y presenta una mayor cantidad de esferocistos en su cuerpo reproductivo con respecto a *Lactarius* (Buyck y cols. 2008, De Crop y cols. 2017).

Se conocen aproximadamente 420 especies de *Lactarius* a nivel mundial (Rinaldi y cols. 2008). Las especies del género presentan numerosos nombres populares tales como *enchilado* u *hongo azul*, que se les da en las diferentes regiones donde crecen, y el uso varía según éstas, pasando desde la alimentación, con una presencia importante en toda la gastronomía tradicional, al uso medicinal, y también se encuentran presentes en numerosos aspectos de la literatura oral

popular (Verde y cols. 2015). La forma del basidioma a menudo es agaricoide, con píleo, láminas y pie o estípite central, sin embargo, existen algunas formas pleurotoides, es decir con el estípite lateral y reducido, otras secotioides, sin láminas bien definidas y fusionadas, o gasteroides, de forma globosa, que anteriormente eran clasificadas bajo los géneros *Pleurogala* (Redhead y Norvell 1993), *Arcangeliella* (Cavara 1900) y *Zelleromyces* (Singer y A.H. Sm. 1960), respectivamente (Miller y cols. 2002, Verbeken y cols. 2014).

En el género *Lactarius* se reconocen tres subgéneros: *Lactarius* (anteriormente llamado *Piperites*), *Russularia* (Fr. ex Burl.) Kauffman 1908 y *Plinthogali* (Burl.). La división infragenérica de *Lactarius* se ha corroborado a nivel de subgénero con base en datos moleculares, con excepción de un pequeño grupo de hongos angiocárpicos (que presentan velo). La mayoría de las especies en estos tres subgéneros son gimnocárpicas (sin velo), sin embargo existen especies con hábitos angiocárpicos en los tres subgéneros, dichas especies evolucionaron de forma independiente en estos tres grupos (Verbeken y cols. 2014).

1.1 Subgénero *Lactarius*

La especie tipo del subgénero es *Lactarius torminosus* (Schaeff. Pers. 1797). Las especies clasificadas dentro de este subgénero con frecuencia son de clima templado y morfológicamente se caracterizan por presentar píleo viscido, glutinoso o seco, a menudo zonado, nunca rugoso, granuloso o velutinoso, a veces tomentoso o pubescente en el margen, el estípite a menudo es escrobiculado y el sabor con frecuencia es picante, amargo o desagradable (Verde y cols. 2015). El subgénero *Lactarius* ha sido dividido en seis secciones taxonómicas, esto con base en características como el color del basidioma, del látex, la abundancia de macrocistidios y la distribución geográfica (Porras 2014). Las secciones reconocidas hasta el momento son: *Lactarius* (= *Torminosi*), *Deliciosi* (Fr.) Redeuilh, Verbeken y Walley 2001, *Zonarii* (Quel.) Bon 1980, *Scrobiculati* Hesler y A.H. Sm. 1979, *Colorati* (Bat.) Hesler y A. H. Smith 1979 y *Uvidi* (Konrad) Bon 1979.

1.2 Sección *Deliciosi*

En la mayoría de las especies del género *Lactarius* el látex es blanco, pero en algunas especies es de color anaranjado, rojo o azul. Las especies que presentan estos últimos colores se han clasificado taxonómicamente en la sección *Deliciosi* (= *Dapetes*), en donde se incluyen a *L. deliciosus* (L. Gray 1821), *L. sanguifluus* (Paulet Fr. 1838), y *L. indigo* (Schwein. Fr. 1838), con látex de color anaranjado, rojo y azul, respectivamente (Heilmann-Clausen y cols. 1998). Sin embargo, recientemente se incluyeron en la sección *Deliciosi* a *L. porninsis* (Rolland, Bull. 1889), y *L. splendens* (Hesler y A.H. Sm. 1979), estas dos especies exudan látex de color blanco. El número total de nombres publicados en *Lactarius* sección *Deliciosi* asciende a 80, 41 de Europa, 21 de América y 18 de Asia, y actualmente se aceptan 46 taxones (39 especies y 7 variedades) (Nuytinck 2005, Nuytinck y cols. 2007, Nuytinck y Ammirati 2014: Nuytinck y cols. 2015: Wang y cols. 2016: Nuytinck y cols. 2017). Prácticamente, todas las especies de la sección *Deliciosi* son comestibles y varias especies son comercializadas en fresco, en seco o enlatadas (Nuytinck 2005).

1.3 Caracteres morfológicos de importancia taxonómica en el género *Lactarius* sección *Deliciosi*.

Basidioma - En la sección *Deliciosi*, el basidioma generalmente se mancha de color verde al madurar, la mayoría son de tipo agaricoide pero también hay gasteroides como *Lactarius rubriviridis* (Desjardin, H.M. Saylor y Thiers 2003). La coloración es un carácter importante que debe ser evaluado en fresco, porque una vez que los ejemplares son secados por el proceso de herborización pierden muchas de sus características.

Píleo - A diferencia del género *Russula*, las especies de *Lactarius* generalmente no exhiben colores como rojo brillante, amarillo o rosado en la superficie del píleo, más bien presentan tonos cafés (Verbeken 1997). El color del píleo es un carácter importante a nivel de especie ya que a menudo da información en divisiones infragenéricas. En la sección *Deliciosi* el píleo presenta colores llamativos como anaranjado, rojo o azul, y a menudo es viscoso o glabro, sin embargo estos últimos caracteres dependen en gran medida de las condiciones ambientales. Con

respecto a las zonaciones, hay variación, ya que en algunos ejemplares son muy evidentes y en otros están prácticamente ausentes. Cuando las especies son jóvenes a menudo presentan borde glabro a ligeramente tomentoso y a veces presentan margen no estriado o estriado por transparencia cuando adultos. Existen algunos taxones que presentan variación en el color del píleo dependiendo de la edad, como es el caso de *L. chelidonium* (Peck 1872), citado para Estados Unidos y México, el cual presenta un píleo anaranjado con tonos azules cuando es joven, variación que también se ha observado en las especies europeas *L. quieticolor* (Romagn. 1958), y *L. hemicyaneus* (Romagn 1958) (Heilmann y cols. 2000).

Estípite - El estípite tiene una forma cilíndrica y es ligeramente atenuado en la base, el color es semejante al del píleo (anaranjado, azul, o rojo), aunque a veces es pálido y su superficie generalmente es viscosa o seca. En la unión del estípite con el píleo se presentan tonos blancos. La presencia o ausencia de escrobículas ha sido un carácter utilizado con frecuencia para la identificación de las especies dentro de la sección (Nuytinck 2005). Las escrobículas han mostrado ser muy variables en las especies americanas de la sección *Deliciosi*, por lo tanto deben ser analizadas con cuidado, ya que las condiciones ambientales tienen un efecto importante sobre este carácter.

Láminas - El color de las láminas normalmente es del color del látex, sólo que un poco más pálido. Esta coloración es causada por la presencia de numerosas hifas laticíferas a lo largo de la trama, dando a la lámina estas coloraciones tan llamativas (Nuytinck y cols. 2005). La distancia entre las láminas es una característica importante para diferenciar ciertas especies, pueden ser distantes, juntas, o muy juntas, aunque la distinción entre juntas y muy juntas es arbitraria.

Látex - El látex, a diferencia del género *Lactifluus* no es tan abundante en *Lactarius*, sin embargo siempre se observa muy bien al ser exudado. El látex en la sección *Deliciosi* generalmente es de color anaranjado, rojo o azul, sin embargo, recientemente se incluyeron dos especies de látex blanco (*L. porninsis* y *L. splendens*). El color brillante del látex es causado por la presencia de sesquiterpenos de azuleno e hidroazuleno (Nuytinck y cols. 2005). En algunas especies cambia de color al entrar en contacto con el aire, debido a una reacción enzimática, característica importante para separar a las especies de esta sección. El sabor del látex es

importante para separar las especies, el sabor puede ser dulce, amargo, picante o prácticamente no exhibir sabor.

Esporas - Las características de las esporas son importantes para delimitar las especies de esta sección. El intervalo de tamaño es de aproximadamente 6 a 7 μm de ancho y alcanzan hasta 12 μm de largo. Este carácter presenta variación en especies relacionadas, tal es el caso de *L. indigo* var. *diminutivus* con esporas relativamente pequeñas (7.0–8.2 \times 5.5–6.4 μm), mientras que en *L. indigo* var. *indigo* son más grandes (7.0–9.2 \times 5.3–6.8 μm). Los miembros de la sección *Deliciosi* presentan esporas con ornamentación amiloide, es decir, que se tiñe de color morado o azul con reactivo de Melzer. El patrón de ornamentación consiste en crestas de diferente grosor formando un subretículo o retículo incompleto, en algunas especies el retículo se encuentra más definido que en otras, también presentan algunos elementos aislados o dentro del retículo, llamadas verrugas. Hay especies que presentan una ornamentación más densa, y generalmente el retículo se encuentra bien definido, como en *L. barrowsii* (Hesler y A.H. Sm. 1979), *L. rubriviridis* y *L. cyanopus* (Basso 1979). La altura de la ornamentación comúnmente va de los 0.3 a 1.0 μm (Nuytinck y cols. 2005).

Basidios - Los basidios no han sido considerados de importancia taxonómica, ya que en general no presentan mucha variación. Las características que son evaluadas en los basidios son: la forma, el tamaño y el contenido. La forma de los basidios es generalmente claviforme y el tamaño va de los 40 a 60 μm (Figura 1) (Nuytinck y cols. 2005). El contenido del basidio es variable, puesto que algunas especies presentan gotas de aceite y se observa una textura rugosa también llamada contenido granuloso.

Cistidios - Los cistidios en la sección *Deliciosi* han sido un carácter que recientemente ha ayudado a delimitar las especies con base en morfología, principalmente los cistidios verdaderos o macrocistidios, que dependiendo de su posición en la lámina se dividen en pleurocistidios y queilocistidios. También presentan pseudocistidios o falsos cistidios.

Pseudocistidios - Estas estructuras son prolongaciones de las hifas laticíferas que no presentan un septo basal, y en algunos casos sobresalen del himenio, en las especies que no

sobresalen del himenio son difíciles de observar, ya que el ápice a menudo es hialino (Figura 1) (Nuytinck 2005). Es importante tomar en cuenta la abundancia y cuanto sobresale del himenio.

Macrocistidios - Los verdaderos cistidios, a diferencia de los pseudocistidios, no están conectados a las hifas laticíferas y presentan un septo basal, presentan un ápice capitado o moniliforme y a veces tienen contenido granuloso, se clasifican en pleurocistidios y queilocistidios dependiendo su ubicación en la lámina (Figura1) (Verbeken 1997: Nuytinck 2005).

Pleurocistidios: Se encuentran ubicados a los lados de la lámina y generalmente son más grandes que los queilocistidios. La presencia y abundancia es importante para separar a las especies (Figura 1).

Queilocistidios: Estas células se ubican en el borde de la lámina mezclados con las células marginales, son muy parecidos a los pleurocistidios pero más pequeños y al parecer es un carácter muy variable en esta sección (Figura 1).

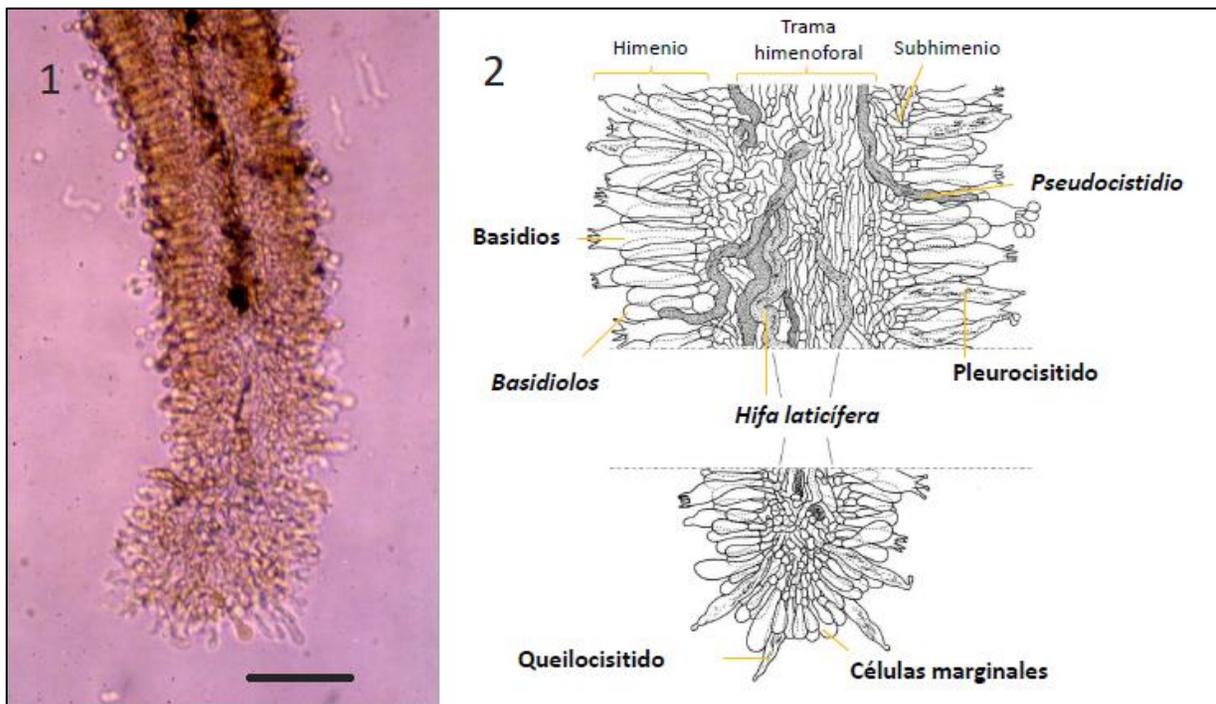


Figura 1. 1) Corte de una lámina donde se observa la orilla o el borde y la parte media (barra de escala = 100 μ m). 2) Partes principales de la lámina así como las células presentes.

De manera general estos caracteres se consideran de importancia taxonómica (Kong 1995), es por eso que no se describen las características de otras estructuras como el contexto, las células marginales, basidiolos y forma de las esporas. Los caracteres a nivel macroscópico que presentan mayor variación son: el color, forma, y tamaño del píleo; así como el tamaño y presencia o ausencia de escrobículas en el estípite; y el color del látex, el cambio y tiempo de cambio de color del látex en el contexto (Nuytinck y cols. 2007). Los caracteres microscópicos con mayor variación son: el tamaño, patrón de ornamentación y altura de la ornamentación de las esporas; así como el tamaño, forma y abundancia de macrocistidios. Estos caracteres tanto macro como micro han servido para delimitar algunas especies descritas recientemente (Nuytinck y cols. 2006).

Debido a la escasa variación en los caracteres macroscópicos, existe diversidad de especies crípticas, el estado de muchos taxones es dudoso y se citan muchas variedades en la literatura,

además, hay especies que son similares y es fácil confundirlas en campo cuando sus distribuciones se sobreponen (Nuytinck y Verbeken 2003; Wang y cols. 2015).

1.4 Características ecológicas de la sección *Deliciosi*.

Los miembros del género *Lactarius* sección *Deliciosi* forman ectomicorrizas con hospederos que pertenecen a las familias Pinaceae Spreng. ex F.Rudolphi 1830 (comúnmente con *Pinus* (L.) 1753, pero también con *Abies* (Mill.) 1754, *Picea* (A. Dietr.) 1824, *Larix* (Mill.) 1754, *Tsuga* (Endlicher) Carrière 1855 y *Pseudotsuga* (Carr.) 1867) o Fagaceae (*Quercus* (L.) 1753 y *Castanopsis* (D. Don) Spach 1841). Por consecuencia su distribución se limita en gran parte al hemisferio norte, aunque algunas especies han sido introducidas en el hemisferio sur (Nuytinck 2005). También se ha documentado una alta especificidad hacia su hospedero a nivel de género, en las especies europeas. *Lactarius salmonicolor* se asocia exclusivamente con *Abies*, *L. deterrimus* (Gröger 1968) y *L. fennoscandicus* (Verbeken y Vesterh. 1998), con *Picea*, *L. pominsis* con *Larix* y todas las demás especies europeas están asociados con *Pinus*, la asociación a diferentes géneros de especies vegetales es considerado un carácter ecológico importante para separar especies muy relacionadas. Sin embargo, esta especificidad, además de datos ecológicos y de distribución, no está bien documentada para las especies del continente americano (Nuytinck 2005).

En Norteamérica existen especies asociadas con *Quercus*, *Abies*, *Larix*, *Picea* y *Pinus*, siendo más numerosas las asociadas con *Pinus*. Debido a que la mayoría de los bosques de coníferas de Norteamérica son mixtos, en algunas especies es difícil asignar el hospedero, además algunas especies están asociadas a más de un hospedero, como *Lactarius indigo* que se ha reportado asociado a *Pinus* y *Quercus* (Nuytinck y cols. 2007).

1.5 Posición taxonómica de las especies americanas de la sección *Deliciosi*.

Los representantes de la sección *Deliciosi* en Norteamérica son claramente diferentes a las especies europeas y asiáticas, además, al parecer la riqueza de especies es mayor (Nuytinck y

cols. 2007). Para el año 2007 se habían confirmado 11 especies exclusivas de Norteamérica, *Lactarius barrowsii*, *L. indigo*, *L. miniatosporus* (Montoya y Bandala 2004), *L. paradoxus* (Beardslee y Burl. 1940), *L. pseudodeliciosus* (Beardslee y Burl. 1940), *L. rubrilacteus* (Hesler y A.H. Sm. 1979), *L. rubriviridis*, *L. salmoneus* (R. Heim Leclair, 1950), *L. subpurpureus* (Peck, 1878), *L. aurantiosordidus* (Nuytinck y S.L. Miller, 2006) y *L. thyinos* (A.H. Sm. 1960) (Nuytinck y cols. 2007). Recientemente se describieron para la sección *Deliciosi* a *L. aestivus* y se reubicó a *L. splendens* dentro de esta sección, ya que dicha especie fue clasificada anteriormente por Hesler y Smith dentro del subgénero *Russularia* sección *Russularia*, por lo tanto el número total de especies aceptadas con base en morfología y datos moleculares para Norteamérica son 13 (Nuytinck y cols. 2014, Nuytinck y cols. 2017). *Lactarius chelidonium* y su variedad *chelidonioides* del este de Estados Unidos son aceptadas por muchos taxónomos, sin embargo, presentan problemas taxonómicos, ya que sólo hay dos ejemplares de los cuales se tiene secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque morfológicamente parecen ser diferentes a otras especies de látex anaranjado, como las variedades de *L. deliciosus* citadas para Estados Unidos (Nuytinck y cols. 2006, Nuytinck y cols. 2007). Por otro lado las especies norteamericanas de látex anaranjado citadas para Estados Unidos, asociadas con *Pinus* y nombradas provisionalmente como *L. deliciosus* o variedades de *L. deliciosus*, también presentan problemas taxonómicos ya que forman un complejo de especies crípticas, es decir, se han clasificado bajo el mismo nombre (*L. deliciosus*) a dos o más especies debido a que morfológicamente son indistinguibles y generalmente sólo son separables por datos moleculares (Bickford y cols. 2006).

Algunas especies europeas que han sido citadas para Norteamérica son *L. deliciosus* y *L. deterrimus* en Estados Unidos, ambas de látex anaranjado (Hesler y Smith 1979). Es importante mencionar que con base en análisis filogenéticos recientes, las especies de la sección *Deliciosi* citadas para Estados Unidos con nombres europeos, forman un clado separado y son especies diferentes de las europeas, sin embargo, el análisis no resuelve cuantas especies de látex anaranjado se distribuyen en Estados Unidos, debido a esto, no se han propuesto nombres nuevos (Nuytinck y cols. 2006).

Para México se han registrado a las especies norteamericanas *L. indigo*, *L. subpurpureus*, *L. salmoneus* var. *curtisii*, *L. barrowsii* y *L. chelidonium* var. *chelidoniodes*. También para México se han citado las especies europeas *L. deliciosus* y su variedad *olivaceosordidus*, *L. salmonicolor*, *L. deterrimus* y *L. sanguifluus* (Kong 1995).

1.6 Complejo *Lactarius deliciosus* en México

Como se mencionó anteriormente, para México se han reportado las especies de látex anaranjado *Lactarius deliciosus* y *L. deterrimus*, de los bosques de *Pinus*. La variedad típica de *L. deliciosus* se describe en la literatura como una especie de tamaño mediano a grande, con píleo de color anaranjado claro a anaranjado rojizo, con zonaciones de color más oscuro, que se mancha de color verde al madurar o al maltrato, látex sin cambio de color y con el estípite escrobiculado (Kong 1995). Es poco probable que la colección citada como *L. deterrimus* para México corresponda con dicha especie, debido a que fue citada de un bosque de *Pinus*, lo cual no concuerda con el material europeo, ya que esta especie se distingue por crecer asociada con árboles del género *Picea* (Nuytinck y Verbeken 2007). Lo mismo sucede con las variedades de Estados Unidos *Lactarius deliciosus* var. *deterrimus* y *piceus*, citadas de bosques de *Picea*, la mayoría de los micólogos consideran a estas variedades como sinónimos taxonómicos (Kong 1995).

Con base en los estudios realizados en Estados Unidos, las especies europeas de la sección *Deliciosi* no se distribuyen en América, por lo tanto, las especies mexicanas también son potencialmente especies nuevas para la ciencia (Nuytinck y cols. 2007). Se ha observado variación morfológica en las colecciones identificadas como *Lactarius deliciosus* provenientes de diferentes estados de la República Mexicana, por lo que es probable que exista más de una especie de látex anaranjado en México asociada con *Pinus*. Las especies de látex anaranjado son muy difíciles de separar en campo, ya que son muy parecidas morfológicamente y por lo tanto, el número total de hongos con látex de color anaranjado pertenecientes a la sección *Deliciosi* en México no se conoce con exactitud (Kong 1995).

En México también se ha citado de los bosques de *Abies* a *Lactarius salmonicolor* (R. Heim y Leclair, 1953), una especie descrita para Europa. Los ejemplares mexicanos identificados bajo este nombre europeo, son similares en muchos caracteres morfológicos a la especie europea, además de que crecen asociadas con árboles del género *Abies*, no obstante, presentan diferencias en caracteres microscópicos, por lo tanto lo más probable es que también sea una especie aún no descrita.

Tanto *L. deliciosus* como *L. salmonicolor sensu auctores mexicanos* son consideradas comestibles y conocidos en la región central como “enchilado de ocote” y enchilado de oyamel”, respectivamente (Guzmán 1977, Boa 2005). Debido a que son parte de la dieta de muchas comunidades que viven cerca de los bosques y a su carácter ectomicorrízico, son de las especies del género *Lactarius* más citadas en la literatura sobre hongos comestibles en México (Robles y cols. 2007, Pacheco-Cobos y col. 2015, Franco-Maass y col. 2016, entre otros).

1.7 Evidencia molecular como una herramienta para resolver complejos de especies crípticas

Aunque la biología molecular no es la panacea, en trabajos de sistemática filogenética, este enfoque ha sido de mucha ayuda para abordar problemas que no se podrían resolver con base en la morfología (Hillis y Dixon 1991). Con la implementación de métodos moleculares para la identificación de hongos y microorganismos en general, se han podido estudiar y ampliar el número de especies, lo que provee información valiosa para áreas como biodiversidad y ecología, ya que los hongos juegan un papel crítico en el funcionamiento de los ecosistemas, especialmente cuando forman asociaciones como son las micorrizas o los líquenes (Geml y cols. 2009). Dichos trabajos se basan en el estudio de las moléculas del ADN y ácido ribonucleico (ARN) para obtener secuencias, que a su vez se obtienen mediante las técnicas de extracción de ADN, electroforesis, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación (Rentaria 2007).

Con el proyecto de Código de Barras para la Vida (The Barcode of Life Data System. www.barcodinglife.org) se trató de generar un marcador molecular para identificar a nivel de

especie a todos los organismos, siendo el gen que codifica para la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa (COI) el marcador más eficiente en animales, por lo tanto es considerado el código de barras para animales (Yeates y cols. 2011). Dicho gen ha sido útil en algunos grupos de hongos como el género *Penicillium* (Link, 1809), en el cual los cebadores son efectivos y presenta variación a nivel de especie, pero en la mayoría de los grupos de hongos no ha funcionado, ya que es una región difícil de amplificar y además presenta muchos intrones (Schoch y cols. 2012).

Para el reino Fungi se han propuesto una gran variedad de marcadores moleculares, algunas de las regiones de ADN utilizadas en hongos han sido los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), la subunidad pequeña del ribosoma (SSU), la subunidad grande del ADN ribosomal (LSU) y la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB2) (Schoch y cols. 2011). Sin embargo, el marcador molecular más utilizado es el de las regiones ITS, ya que ha sido muy eficiente como una evidencia para explicar parte de la historia evolutiva de los hongos (Mahmoud y Zaher, 2015). Las regiones ITS son consideradas el código de barras para el reino Fungi, ya que son regiones muy variables, razón por la cual en la mayoría de los grupos la identificación de los ejemplares es a nivel de especie, además desde el punto de vista operativo estas regiones son fáciles de amplificar, ya que se encuentran repetidas en el genoma, de ahí que sean sumamente utilizadas tanto en estudios ecológicos como taxonómicos (Olivares y cols. 2008, Kõljalg y cols. 2013). Las regiones ITS en eucariotas, se encuentran ubicadas en el ADN genómico nuclear, dicho ADN se encuentra en tándems repetidos a lo largo del genoma, en cuyo arreglo las regiones ITS1 e ITS2 se encuentran separando los genes 18S, 5.8S y 28S. Localizado antes del gen 18S se encuentra el espaciador transcrito externo (ETS) y antes del ETS se encuentra el espaciador no transcrito (NTS), también llamado espaciador intergénico, dicho espaciador contiene elementos repetidos que sirven como potenciadores durante la transcripción (Figura 2) (Hillis y Dixon 1991).

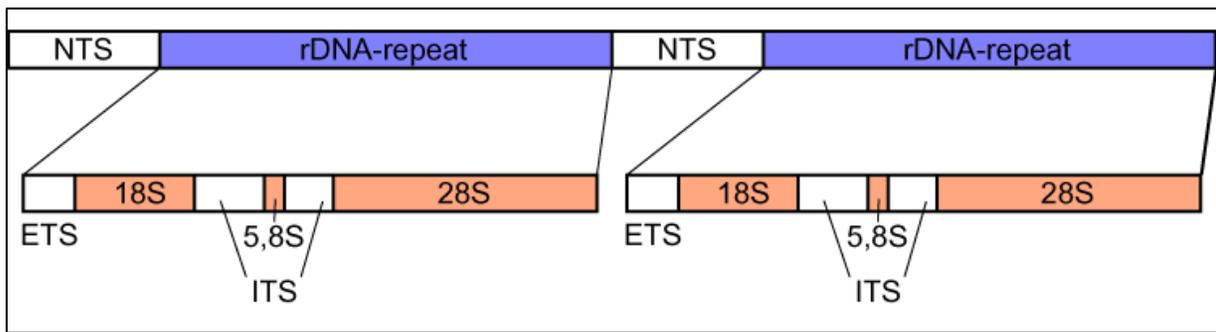


Figura 2. Organización del ADN ribosomal nuclear eucariótico.

Sin embargo, aun con las herramientas moleculares, llevar a cabo una correcta identificación de las especies aun representa un problema en el Reino Fungi, debido a la gran diversidad que presenta este grupo, además de la ausencia de secuencias de referencia fiables. A pesar de que hasta el año 2012 la comunidad científica generó 300,000 secuencias de las regiones ITS, sólo la mitad de ellas son aceptadas a nivel de especie, de las cuales sólo se pueden reconocer 20,000 especies, ya que hay muchas secuencias repetidas de una misma especie (Kõljalg y cols. 2013).

En algunos géneros como *Cantharellus* (Juss., Gen. Pl. 1789), *Tulasnella* (J. Schröt. 1888), *Boletus* (Gray, 1821) y *Amanita* (Pers. 1794), las regiones ITS no presentan suficiente variación para delimitar las especies, además no resuelven las relaciones filogenéticas, debido a que se han implementado otros marcadores como la RPB2, la cual presenta mayor variación interespecífica que las regiones ITS, o el factor de traslación y elongación (TEF1) que es considerado por varios autores como un código de barras adicional a las regiones ITS para hongos (Schoch y cols. 2012, Ramírez y cols. 2015, Nilsson y cols. 2008, Stielow y cols. 2015). Sin embargo en la familia Russulaceae donde se encuentra el género *Lactarius*, las regiones ITS han servido muy bien para delimitar las especies y establecer en gran medida las relaciones filogenéticas, ya que presentan suficiente variación interespecífica y aun es aceptado como un marcador molecular efectivo en trabajos de sistemática filogenética (Nuytinck y cols. 2007).

1.8 Taxonomía integrativa, para delimitar taxones fúngicos a nivel de especie

La taxonomía es central para explorar y entender la biodiversidad, esta ciencia se encarga de caracterizar, clasificar y nombrar taxones. Se puede dividir en taxonomía alfa para categoría de especie, y taxonomía beta que se ocupa de categorías superiores (Schlick-Steiner y cols. 2010). La taxonomía alfa es muy importante en biología debido a que las especies son las unidades básicas en múltiples campos de estudio, y tanto delimitar como nombrar nuevas especies es fundamental para describir la biodiversidad, además de la única forma de asegurar que los científicos hablen acerca de la misma entidad (Pante y cols 2014). Debido a la crisis de diversidad por la pérdida acelerada de especies estos estudios se han incrementado, ya que nombrar y listar nuevos taxones ayuda a los programas de conservación a tomar en cuenta especies en peligro de extinción antes de que se pierdan (Schlick-Steiner y cols. 2010). Sin embargo, proponer nuevas especies, así como los caracteres y metodologías utilizadas para dicho fin, son a menudo arbitrarias, es por eso que en un esfuerzo para reducir la inherente subjetividad para nombrar nuevas especies, recientemente se están utilizando criterios de taxonomía integrativa para delimitar las especies (Fujita y cols. 2012).

La taxonomía integrativa fue formalmente introducida en el año 2005 con la finalidad de delimitar taxones utilizando diferentes tipos de información y metodologías, lo cual provocó un debate acerca del tipo de caracteres y criterios usados para delimitar especies, la mayoría de los taxónomos están de acuerdo en que la forma más eficiente de obtener hipótesis de especies robustas es mediante la evaluación de diferentes tipos de evidencia (DeSalle y cols. 2005, Pante y cols. 2014). Para algunos autores como Will en 2005 la taxonomía integrativa debe dar prioridad a los caracteres morfológicos porque presentan mayor complejidad y presumiblemente un origen multigénico. Se han realizado intentos por concatenar caracteres morfológicos y moleculares, así como delimitar las especies con una matriz de genes concatenados. Sin embargo la forma más utilizada para delimitar las especies es mapear caracteres de diferentes tipos, como ecológicos, de distribución, bioquímicos pero principalmente morfológicos en un árbol generado por uno o más marcadores moleculares (Yeates y cols. 2011).

En el Reino Fungi recientemente se han descrito muchas especies nuevas con base en criterios de taxonomía integrativa, lo cual incluye resolver complejos de especies, esto como

consecuencia de la gran diversidad críptica que presenta este reino. Algunos complejos de especies que se han resuelto recientemente con base en taxonomía integrativa son: el complejo *Cantharellus cibarius* (Fr. 1821), donde se describieron tres especies nuevas, *Cantharellus lewisii* (Buyck y V. Hofstetter, 2011), *C. altipes* (Buyck y V. Hofstetter, 2011), y *C. tenuithrix* (Buyck y V. Hofstetter, 2011), además se confirma que *Cantharellus cibarius* se distribuye exclusivamente en Europa (Buyck y Hoffstetter, 2011).

Así mismo, se ha observado diversidad críptica en el complejo *Tricholoma scalpturatum* (Fr. 1872), en este grupo la especiación ocurrió en simpatria, con base en datos moleculares se confirmaron 3 especies diferentes a *T. scalpturatum*: *Tricholoma inocybeoides* (A. Pearson 1938), *T. argyraceum* (Bull. Gillet, 1874) y *T. cingulatum* (Almfelt, Jacobasch, 1890), dichas especies sobrelapan su distribución y al parecer *T. inocybeoides* es un taxón que se originó por hibridación de los ancestros de *T. scalpturatum* y *T. argyraceum*, por lo tanto también es la especie más reciente (Jargeat y cols. 2010).

El complejo *Helvella lacunosa* (Afzel. 1783) en Norteamérica también mostró diversidad críptica y nombres mal aplicados, ya que esta especie solo es europea y se identificaron dos especies nuevas para Norteamérica nombradas como *H. vespertina* (N.H. Nguyen y Vellinga, 2013) y *H. dryophila* (N.H. Nguyen y Vellinga, 2013) (Nguyen y cols. 2013).

Buyck y cols. (2008) demostraron que los géneros *Russula* y *Lactarius* eran parafiléticos, esta naturaleza parafilética fue exhibida por la sección de *L. gerardii*, ya que este grupo no pertenece al subgénero *Plinthogali*, por lo que hoy en día se reubicó en el género *Lactifluus* como *Lf.* sección *Gerardii* (Stubbe y cols. 2010, De Crop y cols. 2017). Particularmente en el género *Lactifluus*, se resolvió el complejo *Lf. gerardii* (Peck, 1821), donde se recuperaron 18 especies distinguibles con base en morfología, razón por la cual este grupo fue elevado a sección (*Lactifluus* sección *Gerardii*), dicha sección está compuesta por las especies *Lf. gerardii*, *Lf. atrovelutinus* (J.Z. Ying, X.H. Wang, 2012), *Lf. bicolor* (Masseé Verbeken, 2012), *Lf. ochrogalactus* (Hashiya, X.H. Wang 2012), *Lf. petersenii* (Hesler y A.H. Sm. Stubbe, 2012) *Lf. reticulatovenosus* (Verbeken y E. Horak. Verbeken, 2012), *Lf. sepiaceus* (McNabb, Stubbe, 2012), *Lf. subgerardii* (Hesler y A.H. Sm. Stubbe, 2012), *Lf. wirrabara* (Grgur. Stubbe 2012), y el pleurotoide *Lf. uyedae* (Singer. Verbeken, 2012).

Los caracteres morfológicos en combinación con características ecológicas, como la asociación con diferentes especies vegetales, ha ayudado a diferenciar a las especies similares en apariencia de la sección *Deliciosi*, tal es el caso de las especies europeas *L. vinosus* (Quél. Bat, 1908) y *L. sanguifluus* que anteriormente se creía que eran la misma especie o se citaba a *L. vinosus* como una variedad de *L. sanguifluus* (Nuytinck y Verbeken 2003). Sin embargo, a pesar de ser uno de los grupos de hongos más citados en la literatura debido a que son comestibles, las especies de látex anaranjado americanas presentan problemas taxonómicos y de nomenclatura.

Con base en análisis filogenéticos recientes utilizando caracteres moleculares se ha demostrado que *L. deliciosus* únicamente se distribuye en Eurasia y el nombre ha sido mal aplicado para las especies asociadas con *Pinus* en América (Nuytinck y cols. 2007).

De igual forma sucede con *L. salmonicolor*, una especie exclusiva de Europa y en asociación con *Abies* (Nuytick y cols. 2007), pero que ha sido reportada con frecuencia para los bosques de *Abies* en el centro de México (Guzmán 1977). Seguramente las especies que se desarrollan en nuestro país son diferentes a las europeas y de ahí la importancia de aclarar la identidad taxonómica de las especies con látex de color anaranjado, del complejo de especies *L. deliciosus*, que crecen en México.

En hongos la clasificación basada en morfología presenta muchos errores, debido a esto muchos grupos son artificiales y hoy en día muchos micólogos se están enfocando en corregir el estado taxonómico de la mayoría de los grupos.

2. ANTECEDENTES

A lo largo del tiempo se han usado diferentes nombres en la literatura para identificar taxonómicamente a los hongos del género *Lactarius* que exudan látex de color anaranjado, rojo o azul. El primero que estableció un nombre para agrupar a estos hongos fue Fries en 1821, el nombre que utilizó fue *Agaricus* sección *Deliciosi* y sección *Limacini*, él mismo en 1838

menciona *Agaricus* “tribu” *Dapetes* (Nuytinck 2005). Burlingham (1908) reconoce *Lactarius* sección *Dapetes*, pero además menciona *Lactarius* “grupo” *Deliciosae*, para referirse a los *Lactarius* que exudan látex de colores. Posteriormente en Norteamérica, Hesler y Smith (1960) usan erróneamente *Lactarius* sección *Lactarius*, basándose en que ellos consideraban a *Lactarius deliciosus* como la especie tipo del subgénero *Piperites* (Nuytinck 2005). En 1979 Hesler y Smith ubican la sección *Lactarius* a nivel de subgénero no obstante Redeulh en 2001 rectifica el nombre a *Lactarius* sección *Deliciosi* (Nuytinck y cols. 2005), en consecuencia algunos nombres que se habían utilizado anteriormente para referirse a la sección *Deliciosi* tales como *Limacini*, *Dapetes* o *Lactarius* son inválidos. A pesar de que en trabajos recientes los autores aun utilizan el nombre *Dapetes* para referirse a la sección *Deliciosi* (Verde y cols. 2015), el nombre correcto es *Lactarius* sección *Deliciosi* (Nuytinck y cols. 2005).

Hesler y Smith en 1979 publicaron su libro *North American species of Lactarius*, donde se incluyen las descripciones taxonómicas de las especies del género *Lactarius* conocidas hasta ese año. Dichos autores definen morfológicamente a la sección *Lactarius* –refiriéndose a lo que hoy en día es la sección *Deliciosi*- como hongos con látex color amarillo, anaranjado, rojo, café vinoso, púrpura o azul cuando es exudado, y algunas veces cambiando de color a verde, con el píleo y el estípite seco, presentando manchas verdes en muchos taxones cuando son dañados.

La especie *Lactarius deliciosus* fue descrita para Europa por Gray en 1821, es el nombre más antiguo y más utilizado de todas las especies que se incluyen dentro de la sección *Deliciosi* y ha sido aplicado a los hongos con látex de color anaranjado que crecen en asociación con *Pinus* (Nuytinck 2005). Hesler y Smith (1979) describieron cinco variedades de esta especie para Norteamérica: *L. deliciosus* var. *areolatus*, var. *deliciosus*, var. *derrimus*, var. *olivaceosordidus* y var. *piceus*.

Estas variedades se distinguen por presentar diferencias en el tamaño de las esporas, presencia o ausencia de macrocistidios, cambio de color del látex en el contexto y asociación con *Pinus* o *Picea*. El uso de numerosas variedades en este grupo de especies de látex anaranjado que se distribuyen en Estados Unidos refleja la incertidumbre que existe para diferenciar a estos taxones morfológicamente.

La especie *Lactarius salmonicolor* fue descrita originalmente de Francia por Heim y Leclair en el año 1950 con el nombre de *L. salmoneus*, posteriormente Heim en 1953 le cambió el nombre a *L. salmonicolor* debido a que ya existía una especie en Norteamérica descrita por Peck llamada *L. salmoneus* (Kong 1995).

Lactarius deliciosus y *L. salmonicolor* han sido reportadas para México: Entre 1929 y 1931, Gandara fue quien citó por primera vez una especie del género *Lactarius* (*Lactarius deliciosus*) para México (Kong. 1995). Por su parte Heim en 1953 reportó a *L. salmonicolor* de los bosques de *Abies religiosa* (HBK) Cham. et Schl. del Estado de México.

Recientemente se han citado *Lactarius deliciosus*, *L. salmonicolor* y otros ejemplares que exudan látex color anaranjado como *L. deterrimus* y *L. chelidonium* de diferentes estados de país. Garibay-Orijel y cols. (2006) citan a *Lactarius deliciosus* y *L. deliciosus* var. *deterrimus* del estado de Oaxaca. Otros estados en los que se ha reportado la presencia de *L. deliciosus* son Chihuahua (Quiñones y cols. 2014), Durango (Díaz y cols. 2005), Jalisco (Herrera y cols. 2002), Hidalgo (Hernández y cols. 2007), Guanajuato (Doniz y cols. 2010), Estado de México (Martínez y cols. 2007), Puebla (Pellicer y cols. 2002), Michoacán (Chávez y cols. 2009), Veracruz (Córdoba y cols. 2014), Chiapas (Robles y cols. 2005) y Tlaxcala (Montoya y cols. 2004) (Figura 3).

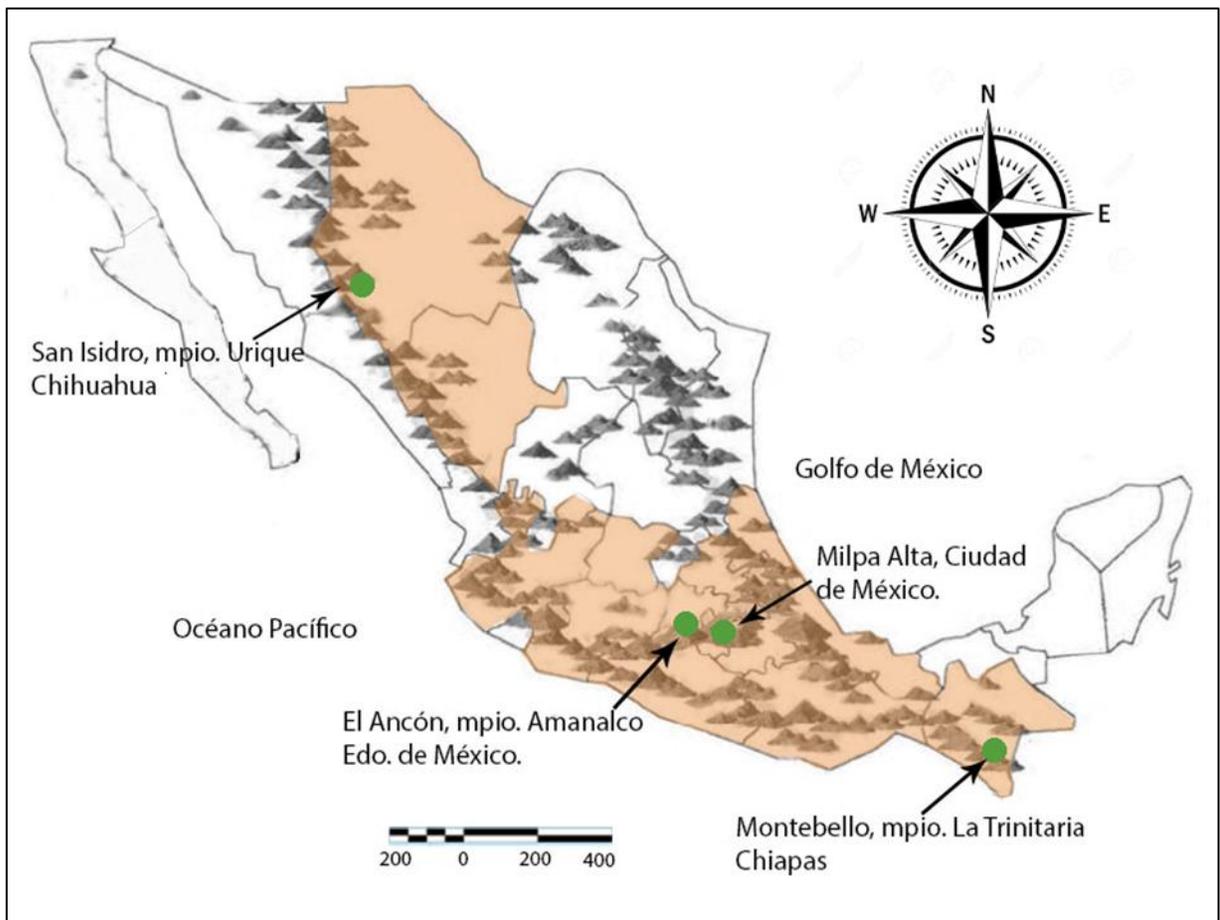


Figura 3. Estados coloreados en anaranjado (Chih, Dgo, Jal, Mich, Gto, Hgo, Mex, Gro, Oax, Cd. Mx., Tlax, Pue, Mor, Ver y Chis) representan estados de donde se ha citado a la especie *Lactarius deliciosus*. Puntos verdes representan localidades de donde se obtuvieron ejemplares identificados como *L. deliciosus*.

Lactarius salmonicolor ha sido reportada de algunos estados, tales como el Estado de México (Burrola y cols. 2013), Michoacán (Sánchez 1980), Puebla (Pellicer y cols. 2002), Chihuahua (Barraza 2014), Veracruz (Flores 2016), Tlaxcala (Montoya y cols. 2004) y Chiapas (Chanona y cols. 2006) (Figura 4). En México, tanto *L. deliciosus* como *L. salmonicolor sensu auctores mexicanos* son consideradas comestibles y conocidos en la región central como “enchilado de ocote” y enchilado de oyamel”, respectivamente (Guzmán 1977, Boa 2005).



Fig 4. Estados coloreados de anaranjado (Chih, Mich, Gto, Hgo, Mex, Gro, Oax, Cd. Mx., Tlax, Pue, Mor, Ver y Chis) representan estados de donde se ha citado la especie *Lactarius salmonicolor*. Puntos verdes representan localidades de donde se obtuvieron ejemplares identificados como *L. salmonicolor*.

Las especies europeas de látex rojo, *L. sanguifluus* y *L. vinosus* también presentan problemas taxonómicos. Algunos autores consideraban a *L. vinosus* como una variedad de *L. sanguifluus*. Nuytinck y cols. (2003) realizaron un estudio para clarificar el estado taxonómico de estas dos especies, utilizando las regiones ITS para establecer una filogenia que explicara las relaciones evolutivas y también llevaron a cabo una extensiva descripción morfológica. Los análisis filogenéticos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud (ML) revelaron que estas dos especies forman dos clados diferentes. La hipótesis de que estas dos especies son diferentes

fue apoyada por diferencias morfológicas, ya que en *L. vinosus* la superficie del píleo es un poco más pálida y la ornamentación es más densa.

Nuytinck (2006) publicó un estudio taxonómico con las descripciones de las especies de *Lactarius* sección *Deliciosi* que se distribuyen en Norteamérica, sin embargo, con el material que estudiaron del complejo de variedades *L. deliciosus* (variedad *deterrimus*, var. *olivaceosordidus*, var. *piceus* y var. *areolatus*) descritas por Hesler y Smith, no fue posible delimitar las especies desde un punto de vista morfológico, ya que *L. deliciosus* var. *areolatus* es el único taxón que presenta esporas claramente más grandes. Los análisis filogenéticos utilizando secuencias de ADN (Árbol no reportado) indicaron que las especies *L. deliciosus* y *L. deterrimus* sólo se distribuyen en Europa y Asia, por lo que sugieren que el nombre está mal aplicado en América, además de que la resolución de los análisis moleculares no es suficiente para separar este complejo de especies, ya que sólo una colección identificada como *L. deliciosus* var. *olivaceosordidus* se separa convincentemente de las demás. También mencionan que el nombre *L. deliciosus* var. *piceus* es un nombre inválido ya que es sinónimo taxonómico de *L. deterrimus*. Los caracteres morfológicos que proponen en este estudio para delimitar las especies del complejo *L. deliciosus* son la presencia y abundancia de pleuromacrocistidios, color del píleo y el cambio de color del látex en el contexto. Sólo una colección de Washington perteneciente al complejo *L. deliciosus* mostró estrecha relación con las especies *L. porninsis* y *L. rubrilacteus*.

Nuytinck y Verbeken (2007) estudiaron la filogenia del género *Lactarius* sección *Deliciosi* en Europa, con un enfoque molecular y caracteres morfológicos. Utilizaron las regiones ITS, un fragmento del gen que codifica para la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GDP) y la técnica polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), confirmando que la sección *Deliciosi* es un grupo monofilético dentro del subgénero *Lactarius*. De las 47 especies que se han publicado en Europa sólo nueve son reconocidas por la mayoría de autores, de las cuales cinco son de látex anaranjado, *Lactarius deliciosus*, *L. salmonicolor*, *L. deterrimus*, *L. quieticolor*, *L. fennoscandicus*. *L. hemicyaneus* también es una especie de látex anaranjado que a menudo es citada en Europa. En los estudios morfológicos se mostró que *L. hemicyaneus* es muy parecida a *L. quieticolor*, y sólo se pueden separar

morfológicamente por la presencia de látex color azul en el contexto del píleo en *L. hemicyaneus*, sin embargo el látex azul en la pileipellis de esta especie es variable, ya que en algunos ejemplares no se presenta y ha sido observado en mayor proporción en ejemplares jóvenes. Los análisis filogenéticos y la técnica AFLP fueron congruentes en la delimitación de las especies de látex anaranjado *L. deterrimus* y *L. fennoscandicus*, en cuanto a las descripciones morfológicas también presentan diferencias. Por otro lado los análisis filogenéticos mostraron que *L. porninsis* una especie de látex blanco que comúnmente se incluía en la sección *Zonarii*, sorprendentemente apareció en la sección *Deliciosi*. El color, aspecto del píleo y la asociación con árboles de coníferas indican que *L. porninsis* es un miembro de la sección *Deliciosi*. También mencionan que con base en los análisis filogenéticos, las propuestas de Basso (1999a) y Bon (1980) de separar la sección *Deliciosi* en las subsecciones *Deliciosini* (especies de látex anaranjado) y *Sanguifluini* (especies de látex rojo), no son soportadas, ya que *L. semisanguifluus* un ejemplar de látex rojo aparece en la sección *Deliciosini*.

Nuytinck y cols. (2007) realizaron una filogenia mundial de la sección *Deliciosi* utilizando las regiones ITS y un fragmento del gen que codifica para la GDP. En este trabajo se seleccionaron ejemplares de herbario provenientes de instituciones de varias regiones del mundo, con la finalidad de extraer ADN y obtener secuencias, además, se descargaron secuencias de GenBank para realizar los análisis filogenéticos. Se realizaron 3 análisis filogenéticos, de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (IB). La topología del árbol de máxima verosimilitud corresponde con el consenso estricto de máxima parsimonia y con el 50% del árbol consenso de inferencia bayesiana. El análisis bayesiano mostró que la sección *Deliciosi* forma un grupo monofilético y además incluye a *L. porninsis*. Los análisis mostraron incongruencias en los clados donde se agruparon las variedades de *L. deliciosus* de Norteamérica y en el análisis de MP se agruparon con *L. rubrilacteus* de Estados Unidos y con *L. porninsis* de Europa. En el análisis de máxima verosimilitud, las variedades que forman el complejo *L. deliciosus* en Norteamérica se agruparon en un clado independiente a los *L. deliciosus* de Europa, por lo que desde el punto de vista genético la especie europea *L. deliciosus* no se distribuye en Norteamérica, llegando así a la conclusión de que las variedades descritas para Estados Unidos son taxones no descritos. Con respecto a los ejemplares de Europa

y Asia, los análisis filogenéticos mostraron que están relacionados. Sin embargo, los *Lactarius* de látex anaranjado europeos están más relacionados con los *Lactarius* de látex rojo de Asia que con otras especies europeas de látex anaranjado como *L. salmonicolor* o *L. quieticolor*. Los ejemplares de látex rojo de Norteamérica formaron clados independientes y no están estrechamente relacionados, ya que aparecen relacionados con otros miembros de la sección *Deliciosi* con distribución en Norteamérica. *L. porninsis* se agrupó con *L. rubrilacteus*, un hongo de látex rojo de Estados Unidos, en tanto *L. salmonicolor* de Europa se relacionó con *L. thyinos*, una especie de látex anaranjado que se distribuye en Norteamérica. Se puede concluir que existen especies estrechamente relacionadas de Europa y América, pero definitivamente las especies europeas no se distribuyen en Norteamérica. También se puede afirmar que en muchos de los taxones, el color del látex no refleja las relaciones filogenéticas (Nuytinck y cols. 2007

Nuytinck y cols. (2014) propusieron una nueva especie del género *Lactarius* que se distribuye en el oeste de Estados Unidos con látex color anaranjado y que se asocia con *Abies*, muy similar morfológicamente a *L. salmonicolor* de Europa. Los análisis filogenéticos con base en secuencias de ADN revelaron que esta nueva especie, llamada *L. aestivus*, está más relacionada con *L. rubriviridis* y *L. barrowsii* ambos de látex rojo que con los *Lactarius* de látex anaranjado que se distribuyen en Norteamérica, además esta especie se diferencia de las especies de látex anaranjado debido a que es la única especie estadounidense que se asocia con árboles del género *Abies*, por lo que en este estudio el látex tampoco representa las relaciones en gran parte de los taxones incluidos en el análisis.

Wang y cols. (2015) realizaron una filogenia utilizando las regiones ITS y el gen que codifica para la GDP. En este estudio describieron una nueva especie a la cual nombraron *L. vividus* (X.H. Wang, 2015) que exuda látex anaranjado, comestible y ampliamente distribuida en centro y sur de China, la cual crece en asociación con al menos tres especies del género *Pinus*. Esta especie a menudo es identificada erróneamente como *L. hatsudake* (Nobuj. Tanaka, 1890), *L. akahatsu* (Nobuj. Tanaka 1890) o *L. deliciosus*, ya sea por su parecido morfológico o porque sus áreas de distribución se sobrelapan debido a que estas cuatro especies se asocian con árboles del género *Pinus*. Morfológicamente, *L. vividus* se puede separar de las demás especies de látex anaranjado asociadas con bosques de *Pinus* que se distribuyen en China porque presenta láminas

más gruesas con una separación distante o subdistante entre ellas, y una ornamentación más densa con crestas más gruesas. Los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana no pudieron resolver las relaciones evolutivas de *L. vividus* con otras especies similares morfológicamente, pero si soportan el hecho de que es una especie diferente, además de que las ramas principales donde se ubica *L. vividus* sugieren una alta divergencia genética con respecto a las otras especies. Para este estudio, tanto las regiones ITS como el gen GDP fueron buenos marcadores moleculares, ya que tuvieron buena resolución a nivel de especie.

Recientemente, Wang (2016) describió tres especies nuevas de las regiones alpinas y subalpinas del centro y sureste de China, mismas que recibieron el nombre de *Lactarius abieticola* (X.H. Wang, 2016), *L. pseudohatsudake* (X.H. Wang, 2016), y *L. hengduanensis* (X.H. Wang, 2016). *Lactarius abieticola* crece en asociación con *Abies*, esta especie se puede separar de *L. salmonicolor* y *L. laeticolor* porque es más pequeño y presenta tonos blancos en el margen del píleo. *Lactarius hengduanensis* es parecido a *L. deterrimus* y además ambas especies se asocian con *Picea*, sin embargo, la coloración más viva del látex en el píleo, láminas más pálidas, y esporas con ornamentación más reticulada ayudan a diferenciarla. *Lactarius pseudohatsudake* se puede separar de *L. hatsudake* debido a que se asocia con *Picea* y presentan laminas juntas, en tanto *L. hatsudake* se asocia con *Pinus* y tiene láminas más separadas. Para separar las especies molecularmente amplificaron las regiones ITS, posteriormente realizaron un análisis de distancia genética mediante Neighbor Joining, donde los valores de bootstrap fueron relativamente altos (>70).

Wisitrassameewong y cols. (2016) realizaron un estudio del género *Lactarius* subgénero *Russularia* donde describen seis especies nuevas con datos tanto morfológicos como moleculares. Los análisis filogenéticos los hicieron utilizando dos genes concatenados, las regiones ITS y el gen que codifica para la ARN polimerasa 2, con la intención de inferir las relaciones de las especies en los clados finales y también la historia evolutiva en los clados basales. También estimaron el tiempo de origen y diversificación utilizando los fósiles, *Archaeomarasmius* (Hibbett, D. Grimaldi y Donoghue, 1997) y *Quatsinoporites cranhamii* (S.Y. Sm., Currah y Stockey, 2004). Los caracteres morfológicos que ayudaron a delimitar las especies fueron el color del látex, cambio de color del látex, ornamentación de las esporas,

presencia o ausencia de verdaderos cistidios y estructura de la pileipellis. Los análisis filogenéticos indicaron que en este subgénero existen especies europeas que se distribuyen en Norteamérica, como *Lactarius rufus* (Scop. Fr. 1838), *L. helvus* (Fr. 1838) y el caso de *L. subdulcis* (Pers. Grayque, 1821) se distribuye en Estados Unidos e Irán.

Recientemente Nuytinck y cols. (2017) reubicaron a *Lactarius splendens*, una especie de látex blanco de Canadá, que sorprendentemente aparece dentro de la sección *Deliciosi*. Originalmente esta especie fue descrita por Hesler y Smith (1979) asociada con *Larix*. *L. splendens* es la segunda especie de látex blanco descrita para la sección *Deliciosi*, en este trabajo utilizaron las regiones ITS para sus análisis, y aunque no resuelve las relaciones filogenéticas con las especies aparentemente más relacionadas (*L. porninsis* de látex blanco y *L. rubrilacteus* de látex rojo), es irrefutable que esta especie pertenece a la sección *Deliciosi*, y sugieren que es necesario realizar un análisis multilocus para resolver las relaciones filogenéticas de estas tres especies.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las especies mexicanas identificadas como *Lactarius deliciosus* y *L. salmonicolor* al parecer no corresponden con dichas especies, es necesario determinar taxonómicamente su identidad y establecer sus relaciones filogenéticas con respecto a la sección *Deliciosi*, debido a que son de las especies más citadas en la literatura mexicana, ya sea por su importancia como especies comestibles o por su importancia ecológica por su carácter ectomicorrizógeno.

4. HIPÓTESIS

Si las especies europeas pertenecientes a *Lactarius* sección *Deliciosi* que exudan látex anaranjado no se distribuyen en Norteamérica, entonces las especies mexicanas que exudan látex anaranjado y que se han identificado como *L. deliciosus* y *L. salmonicolor* representan taxa descritos de Norteamérica o nuevos para la ciencia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar una revisión sistemática de las especies de *Lactarius* sección *Deliciosi* con látex de color anaranjado que crecen en los bosques de *Abies* y *Pinus* en México

5.2 Objetivos específicos

- 1) Describir morfológicamente las especies de *Lactarius* con látex de color anaranjado que se distribuyen en México.
- 2) Conocer las relaciones filogenéticas con base en caracteres moleculares (regiones ITS1, ITS2 y el gen 5.8S) de las especies de *Lactarius* con látex de color anaranjado.
- 3) Delimitar a las especies del género *Lactarius* con látex de color anaranjado mediante taxonomía integrativa (evidencia morfológica y evidencia molecular).

6. METODOLOGÍA

6.1 Ejemplares examinados

Se estudiaron materiales representativos de ejemplares identificados como *Lactarius deliciosus*, *L. salmonicolor* u otras especies con látex de color anaranjado. El número total de ejemplares estudiados fue de 45 (Tabla 3), dichos ejemplares se encontraron depositados en los herbarios de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FCME), del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU), del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria (ITCV) y del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (TLXM). Se eligieron 37 materiales de herbario con buenos datos (Tabla 3), tratando que estuvieran representadas las principales provincias biogeográficas de México donde predominan los bosques de pino-encino: Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transmexicano, Sierra Madre del Sur, Sierras y Altos de Chiapas (Morrone 2005). Además, se recolectó material fresco (8 ejemplares), principalmente del Eje Volcánico Transmexicano (Tabla 3). En las Figuras 3 y 4 se muestran las regiones que se tienen representadas para este trabajo

6.2 Caracteres morfo-anatómicos

La descripción de los caracteres macroscópicos, como son el píleo, láminas, estípites, trama y látex, se basó en los ejemplares recolectados en fresco y en la compilación de las descripciones adjuntas a los materiales de herbario. Se utilizaron tablas de colores para la descripción de los colores (Kornerup y Wanscher 1978). El estudio microscópico se llevó a cabo en material seco y algunas veces con material fresco, se realizaron mediciones y tinciones específicas para obtener las dimensiones en micras (μ), de la forma y otras características particulares de las estructuras de importancia taxonómica, como son las esporas, basidios, cistidios, pellis y trama, siguiendo los lineamientos específicos para el género (Hesler y Smith 1979, Heilmann-Clausen y cols. 1998).

Las esporas se estudiaron mediante el uso del reactivo de Melzer (solución compuesta de hidrato de cloral, yoduro de potasio y yodo), para observar la tinción de amiloidía en la ornamentación. Las preparaciones se realizaron con cubreobjetos y portaobjetos depositando una gota de reactivo sobre la muestra y posteriormente cubriéndola (Kong 1995). El tamaño de las esporas se obtuvo al medir al menos 30 basidiosporas de cada ejemplar, provenientes tanto de preparaciones de fragmentos de la lámina como de esporada. Las esporas fueron medidas en posición lateral, sin incluir la ornamentación y las medidas fueron dadas como (MIN) $[Ava - 2 \times SDa] - Ava - Avb - [Avb + 2 \times SDb]$ (MAX), donde Ava= el valor mínimo de la media en las recolecciones medidas, Avb= el valor mayor de la media en las recolecciones medidas, SDa/b= la desviación estándar del valor mayor y menor respectivamente en los ejemplares medidos. MIN representa el valor mínimo medido y MAX el valor máximo medido, estos valores sólo se incluyen cuando exceden los valores de $[Ava - 2 \times SDa]$ o $[Avb + 2 \times SDb]$, respectivamente. Los valores de Q se obtuvieron de la división del largo entre el ancho y se reportaron como MINQ - Qa - Qb - MAXQ donde Qa/b representan la media mínima y máxima del cociente de los ejemplares medidos, respectivamente. MINQ y MAXQ son el valor mínimo y máximo de los cocientes obtenidos en los especímenes estudiados (Nuytinck y cols. 2006). La forma de las esporas se expresa con base en el cociente largo sobre ancho (Q) propuesto por Pegler y Young (1981): globosas, $Q=1.0-1.05$; subglobosas, $Q=1.06-1.20$; ovoides u ovoboides, $Q=1.21-1.30$; cortamente elípticas, $Q=1.31-1.50$; elípticas, $Q=$ mayor de 1.50 (Kong 1995). Los valores de tamaño y forma de las esporas se reportaron en μ .

Debido a que la altura y el patrón de ornamentación de las esporas es un carácter muy importante en el grupo, se realizó la técnica de microscopia electrónica de barrido, para así poder describir el patrón de ornamentación, así como observar la altura de la misma. El microscopio electrónico que se utilizó fue un HITACHI modelo SU1510 que está ubicado en el Instituto de Biología de la UNAM. El secado a punto crítico fue de la marca EMITECH modelo K850 y el metalizador de la muestra es de la marca QUORUM modelo Q150 ES. Las muestras se cubrieron con 20 micras de oro, durante 2 minutos y se repitió el procedimiento.

Los ejemplares que se examinaron con microscopia electrónica de barrido se muestran en la Tabla 6. Todos los materiales estudiados bajo el microscopio estaban identificados como

Lactarius deliciosus. También se realizó microscopía de barrido en los ejemplares identificados como *L. salmonicolor*. Las demás estructuras microscópicas como basidios, cistidios, pseudocistidios, estipitipellis, pileipellis y células marginales se estudiaron en KOH 10% (p/v) o en agua y los valores se reportaron en μ . Se midieron 30 células de cada tipo. En basidios y cistidios se midió el largo y el ancho. El largo de los basidios no incluye la longitud de los esterigmas. En pseudocistidios sólo el ancho y que tanto sobresalieron de la capa de basidiolos. A las hifas de la pellis y estipitipellis sólo se les midió el ancho y se describió sólo si es un ixocutis (gelatinizado) o un cutis (no gelatinizado). En el caso de las células marginales sólo se les midió el largo.

Con el estudio de los caracteres macroscópicos y microscópicos, se buscaron las diferencias más relevantes para delimitar las especies desde el punto de vista morfológico y se elaboraron las descripciones taxonómicas de cada especie reconocida. De igual forma, con las diferencias observadas, se elaborarán las claves taxonómicas para la identificación de las especies.

6.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

La extracción se realizó con el kit REDEExtract-N-Amp Plant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Este kit ofrece una solución de extracción novedosa que elimina la necesidad de congelar los tejidos con nitrógeno líquido, ruptura mecánica, extracción orgánica, purificación de ADN en columna o precipitación con alcohol. Se puso un fragmento pequeño de tejido del esporoma (aproximadamente 2mm de tejido del contexto) en 20 μ l de solución ES. Posteriormente, para la lisis se puso la muestra en el termociclador con el siguiente programa: 65 °C por 10 min, seguido de 10 min a 95 °C, y 4 °C para terminar. Finalmente las muestras se diluyeron en 20 μ l de solución DS y se dejaron incubar por 30 min para después guardarlas a 4 °C.

La amplificación de las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5.8s (Garde y Bruns 1993) se realizó con el kit de TaqTM DNA Polimerasa (Invitrogen) así como una mezcla utilizando la enzima Ruby taq. Dichas regiones son el marcador genético utilizado en estudios recientes sobre

la filogenia del grupo (Nuytinck y cols. 2007) y además se consideran el código de barras para hongos. El PCR se realizó con los cebadores ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') + ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS4+ITS1F para todas las muestras. Se utilizó como control positivo el champiñón (*Agaricus bisporus*), por lo tanto los cálculos se hicieron tomando en cuenta el número de muestras más el control positivo y negativo.

Estequiometria de la reacción utilizando la enzima Ruby taq

Reactivos	Volumen 1x (por cada muestra)
H2O	7.6 µl
ITS1F (50 µM)	0.2 µl
ITS4 (50 µM)	0.2 µl
RubyTaq	10 µl
ADN	1-2 µl
Total	20 µl

Estequiometria de la reacción con el kit TaqTM DNA Polimerasa (Invitrogen)

Reactivos	Volumen 1x
H2O	16.57 µl
Buffer 10x	2.5 µl
dNTPs (2 µM)	2.5 µl
MgCl2 (50 µM)	0.75 µl
ITS1F (50 µM)	0.25 µl

ITS4 (50 μ M)	0.25 μ l
Taq	0.18 μ l
ADN	1-2 μ l
Total	25 μ l

Programa del termociclador

95 °C durante 1 min, seguido de 35-40 ciclos de 95 °C -1 min, 51 °C-1 min, 72 °C-1 min, y al final una extensión final de 72 °C por 8 min. Los productos de PCR fueron refrigerados a 4 °C. Este programa se utilizó para todos los genes.

Para los cebadores ITS1F-ITS4 temperatura de alineamiento fue de 54 °C.

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa para corroborar la presencia de ADN, los reactivos que se utilizaron fueron buffer TBE (1x), agarosa al 1% y fueron teñidos con Redgel a una concentración de 1%.

El gel de electroforesis se corrió a 90 volts durante 50 minutos.

Gel	Buffer TBE 1x	Agarosa	Redgel
Grande	200 ml	2 g	2 ml
Mediano	100 ml	1 g	1 ml
Chico	50 ml	0.5 g	0.5 ml

Tabla 7. Concentraciones utilizadas para electroforesis dependiendo del tamaño del gel.

Los productos de PCR que resultaron positivos se purificaron con ExoSAP-IT® (Affimetirx), utilizando la siguiente mezcla:

1 μ l de H₂O + 1 μ l de ExoSAP-IT® (Affimetirx) + 3.5 μ l de amplicón (producto de PCR).

Una vez purificados se enviaron a secuenciar por ambos lados con los mismos cebadores ITS1F-ITS4 con que se realizó la PCR pero a una concentración de 10 μ M cada uno. Los amplicones purificados se enviaron a secuenciar al laboratorio de Secuenciación genómica de la Salud y de la Biodiversidad, Instituto de Biología, UNAM, Ciudad Universitaria, mediante secuenciación Sanger (Sanger y cols. 1977).

6.4 Ensamble y edición de secuencias

Las muestras que tuvieron una buena secuenciación (>50% de calidad), se editaron en el formato correspondiente (ab1), con el programa Geneious versión 8 (Kearse y cols. 2012), cortando los extremos (contigs) y revisando base por base que correspondan la secuencia “forward” y la secuencia “reverse”, para confirmar la calidad de las secuencias. Finalmente las secuencias se revisaron con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para descartar contaminación y conocer cuáles son las secuencias más parecidas a los taxa *Lactarius deliciosus* sensu. Auct de México y *L. salmonicolor* sensu. Auct de México. Las secuencias se exportaron en formato FASTA.

6.5 Secuencias de bases de datos

Las secuencias adicionales que se utilizaron en este trabajo son de las regiones de ADN nuclear (ADNn) ITS1, 5.8s, ITS2, dichas secuencias fueron descargadas de GenBank (Benson y cols. 2004) en formato FASTA y de la base de datos UNITE (Kõljalg y cols. 2013). Además se buscó que las secuencias incluidas en los análisis hayan sido utilizadas en otros trabajos relacionados que estén publicados, debido a esto la búsqueda se realizó con el número de acceso y nombre de las especies de interés. En el análisis también se incluyeron secuencias previamente obtenidas de ejemplares de México identificados como *L. deliciosus* de Chihuahua, Chiapas y Tlaxcala y *L. salmonicolor* del Distrito Federal, Estado de México y Tlaxcala. Las secuencias utilizadas en los análisis se muestran en la Tabla 2.

6.6 Alineamiento

El alineamiento se realizó en el programa Mafft versión 7 en línea, activando la opción “permitir símbolos inusuales” y utilizando la estrategia E-INS-i, recomendada para menos de 200 secuencias con dominios conservados (Kato y Standley 2013). Posteriormente el alineamiento se corrigió manualmente utilizando el programa SeaView versión 4 (Gouy y cols. 2010). Una vez alineado se evaluó la calidad de las secuencias y se eliminaron las secuencias idénticas utilizando el programa Alter versión 1 (González-Peña y cols. 2010). El tamaño de la matriz fue de 172 terminales y 732 caracteres moleculares. Finalmente el alineamiento se guardó en formato FASTA.

6.7 Selección de modelo evolutivo

Se utilizó el programa jModelTest versión 2.1.7 (Darriba y cols. 2012), para seleccionar el modelo evolutivo que mejor se acople al alineamiento. Posteriormente se utilizó el Criterio de Información de Akaike (AIC) para seleccionar el mejor modelo evolutivo para el análisis de máxima verosimilitud y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) para el análisis de inferencia bayesiana (Darriba y cols. 2012).

6.8 Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis preliminares con el programa SeaView para evaluar la calidad de las secuencias incluidas en el alineamiento.

El análisis de máxima verosimilitud se realizó con el programa PhyML versión 3 (Guindon y cols. 2010), utilizando un árbol inicial basado en parsimonia. Los soportes de rama de bootstrap (BS) fueron calculados con 1000 réplicas, utilizando el modelo generado por jModelTest para AIC: TIM2ef+I+G, incluyendo los valores de distribución gamma, tasa de sustitución de bases, proporción de sitios invariables y calificación de verosimilitud (Figura 5).

El análisis de inferencia bayesiana se realizó con el programa MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003), con 10 millones de generaciones y el remuestreo se hizo cada 1000 generaciones. El valor burn-in fue de 10% y el modelo evolutivo utilizado fue el resultante de jModelTest para BIC: TIM2ef+I+G, también se incluyeron los valores de distribución gamma, tasa de sustitución de bases, proporción de sitios invariables y verosimilitud (Figura 6). Después del análisis IB se utilizó el programa Tracer versión 1 (Rambaut y cols. 2018) para corroborar que las generaciones fueron suficientes, observando que los valores del Tamaño Efectivo de la Muestra (ESS) fuera mayor a 200 (Figura 7).

Se consideraron clados bien soportados cuando el valor de bootstrap fue $> 80\%$ y la probabilidad posterior > 0.95 . Cuando el valor de soporte de ramas fue menor a dichos valores en uno de los dos análisis se consideró como un clado de soporte medio y cuando en ambos análisis el valor fue menor se consideró bajo.

6.8.1 Edición de árboles y figuras

Los árboles se editaron con el programa FigTree versión 1 para ordenar los nodos (Rambaut y Drummond 2018) y con programas como Paint (©Microsoft Windows), KolourPaint (<https://www.kde.org/applications/graphics/kolourpaint/>) y Adobe Photoshop CC versión 20.0.1 (Knoll y cols. 1988) para mejorar la presentación. Los mapas y las figuras se editaron con el programa Adobe Photoshop CC versión 20.0.1.

6.9 Análisis de distancia genética

Se realizó un análisis de distancia genética en el programa MEGA versión 10.0.5 (Tamura 1993) los taxones incluidos en el análisis fueron *Lactarius deliciosus*, las variedades identificadas como *L. deliciosus* de Estados Unidos, *L. deliciosus sensu auct. Mex.* (Chihuahua, Chiapas y centro de México), *L. salmoneus*, *L. deterrimus*, *L. aurantiosordidus*, *L. hengduanensis*, *L. salmonicolor*, *L. salmonicolor sensu auct. Mex.*, *L. aestivus*, *L. abieticola* y *L. lignyotus*. El método de estimación fue bootstrap con 1000 replicas y el modelo evolutivo

que se utilizó fue Kimura 2. El valor de distribución gamma fue de 0.60 que se obtuvo previamente con el programa jModelTest versión 2.1.7. Una vez que se obtuvo la matriz de distancia se exportó en una hoja de Excel. El soporte de ramas utilizado fue bootstrap.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis BLAST

Con el análisis Blast se observó que las secuencias de los taxa *Lactarius deliciosus* sensu. Auct de México son muy parecidas a las variedades de *Lactarius deliciosus* de Estados Unidos presentando un 99% de similitud (Tabla 1). Con respecto a las secuencias identificadas como *L. salmonicolor* sensu. Auct de México, la especie Norteamericana *L. aestivus* fue la más parecida con un 96% (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las secuencias ITS de ejemplares mexicanos con secuencias depositadas en GenBank mediante BLAST.

Secuencia ITS de ejemplar procedente de Lagunas de Montebello, Chiapas				
Taxón	Origen	Cobertura	Identidad	GenBank
<i>L. deliciosus</i> var. <i>deterrimus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685051
<i>L. deliciosus</i> var. <i>deterrimus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685050
<i>L. deliciosus</i> var. <i>olivaceosordidus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685058
<i>L. deliciosus</i> var. <i>deterrimus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685052
<i>L. deliciosus</i>	Estados Unidos	100%	99%	KJ769673

Secuencia ITS de ejemplar procedente de la Sierra Tarahumara, Chihuahua				
Taxón	Origen	Cobertura	Identidad	GenBank
<i>L. deliciosus</i> var. <i>olivaceosordidus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685058
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detririmus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685052
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detririmus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685051
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detririmus</i>	Estados Unidos	100%	99%	EF685050
<i>L. deliciosus</i>	Estados Unidos	100%	99%	KJ769673
Secuencia ITS de ejemplar procedente de La Malinche, Tlaxcala (“<i>L. salmonicolor</i>”)				
Taxón	Origen	Cobertura	Identidad	GenBank
<i>L. aestivus</i>	Estados Unidos	98%	96%	KJ769667
<i>L. aestivus</i>	Estados Unidos	98%	96%	KJ769668
<i>L. sanguifluus</i>	Montenegro	97%	96%	JQ685723
<i>L. sanguifluus</i>	España	97%	96%	FJ858746
<i>L. sanguifluus</i>	Francia	97%	96%	AF249289

7.2 Distancia genética

Las secuencias identificadas como *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* de la zona centro, Chihuahua y Chiapas presentaron menos del 1% de diferencia con respecto a las variedades de *L. deliciosus* descritas para USA. La especie europea *L. deliciosus* presenta entre el 2 y 2.5% de diferencia con respecto a las especies mexicanas y de USA (Tabla7).

La especie *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* presentó una diferencia genética de 3.1 hasta 4.3% en su secuencia con respecto a las demás especies incluidas en el análisis. La especie más parecida fue *L. aestivus* con un 2.9% de diferencia genética (Tabla 8).

Con base en nuestro análisis las especies de la sección *Deliciosi* se comienzan a separar genéticamente con base en distancias a partir del 1.5% de diferencia genética.

	L. d USA	L. d Ctro	L. d CHH	L. d CHP	L. salm	L. d EU	L. det EU	L. aurant	L. hengd	L. sal MX	L. aesti	L. vividus	L. abieti	L. sal EU
L. deliciosus USA														
L. deliciosus Centro	0.008													
L. deliciosus Chihuahua	0.007	0.003												
L. deliciosus Chiapas	0.010	0.005	0.004											
L. salmoneus	0.012	0.008	0.007	0.009										
L. deliciosus EU	0.025	0.021	0.020	0.024	0.029									
L. deterrimus EU	0.028	0.029	0.028	0.032	0.032	0.038								
L. aurantiosordidus	0.020	0.020	0.019	0.022	0.023	0.029	0.009							
L. hengduanensis	0.019	0.018	0.017	0.020	0.021	0.025	0.011	0.002						
L. salmonicolor sensu auct MX	0.034	0.031	0.028	0.032	0.037	0.043	0.038	0.034	0.031					
L. aestivus	0.040	0.037	0.035	0.038	0.044	0.052	0.045	0.042	0.038	0.029				
L. vividus	0.044	0.039	0.034	0.037	0.040	0.047	0.048	0.042	0.035	0.051	0.081			
L. abieticola	0.026	0.022	0.021	0.025	0.028	0.029	0.030	0.021	0.018	0.031	0.039	0.027		
L. salmonicolor EU	0.030	0.027	0.025	0.028	0.033	0.038	0.039	0.030	0.024	0.037	0.047	0.039	0.018	
L. lignyotus	0.147	0.142	0.141	0.144	0.148	0.168	0.142	0.138	0.137	0.159	0.160	0.149	0.150	0.148

Números en rojo indican los valores menores al 1%

Números en negro indican valores mayores al 2%

Tabla 8. Análisis de distancias genéticas (*p*) de las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5.8S.

7.3 Análisis filogenéticos

Las regiones ITS1, ITS2 y la subunidad 5.8s del ADN ribosomal nuclear utilizados en este trabajo, incluyeron 15 bases de la parte final de la subunidad pequeña 18s, y otras 15 del inicio de la subunidad grande 28s. El tamaño del alineamiento final (AF) fue de 733 pares de bases y se analizó todo bajo el mismo modelo evolutivo. Se obtuvieron un total de 36 secuencias de México, más otras 136 secuencias que fueron descargadas de GenBank y UNITE, incluyendo en el AF un total de 172 secuencias. Dieciocho fueron utilizadas como grupos externos: Sección *Lactarius* =Torminosi - *Lactarius* aff. *wenquanensis*, *L. pseudodelicatus* y *L. torminosus*, para probar la monofilia de la sección. Sección *Uvidi* - *L. aspideoides*, *L. flavopalustris* y *L. uvidus*.

Sección Zonarii - *L. psammicola* y dos secuencias de *L. haugiae*. Sección Scrobiculati - *L. scrobiculatus*, *L. alnicola* y *L. mexicanus*. Subgénero Russularia - *L. aurantiacus*, *L. obscuratus* y *L. subdulcis*. Subgénero Plinthogalus - *L. fuliginosus*, *L. fumosibrunneus* y *L. lignyotus* (Tabla 2).

Los árboles resultado de los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana presentaron correspondencia con la topología de los grupos formados (Figura 8). En ambos análisis se obtuvieron dos clados con buen soporte, el de *L. paradoxus* - *L. miniatusopurs* y el de *L. quieticolor*, *L. hatsudake* y *L. horakii* (clado 1 y 2 en la Figura 7) y la principal diferencia se observó en la formación de otros tres clados más inclusivos solo en el análisis de IB: clado de *Lactarius vinosus* - *L. sanguifluus* - *L. cyanopus*, clado de *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* - *L. aestivus* - *L. barrowsii* - *L. rubroviridis* y el clado de *Lactarius salmonicolor* - *L. thynos* (clados 3, 4 y 5 de la Figura 8).

Utilizando un total de 18 secuencias como grupos externos (Tabla 2), la sección *Deliciosi* se recupera como un clado pero con bajo soporte en ambos análisis (Figura 8). Dentro de este linaje se formaron 23 clados bien soportados en el análisis de ML (bootstrap > 80%) y 19 clados en el análisis de IB (probabilidades posteriores > 0.95). Las dos secuencias de *L. salmoneus* de Estados Unidos se recuperaron como especies diferentes y los materiales mexicanos se agruparon junto el taxón etiquetado como *L. salmoneus* 2. La mayoría de estos linajes están representados por una sola especie: *L. salmoneus* 1, *L. deliciosus sensu stricto*, *L. akahatsu*, *L. semisanguifluus*, *L. indigo*, *L. deterrimus*, *L. fennoscandicus*, *L. chelidonium*, *L. pseudohatsudake*, *L. subpurpureus*, *L. subindigo*, *L. salmoneus* 2, *L. vividus* y *L. laeticolor* (Figura 8).

Árbol de Máxima Verosimilitud

Árbol de Inferencia Bayesiana

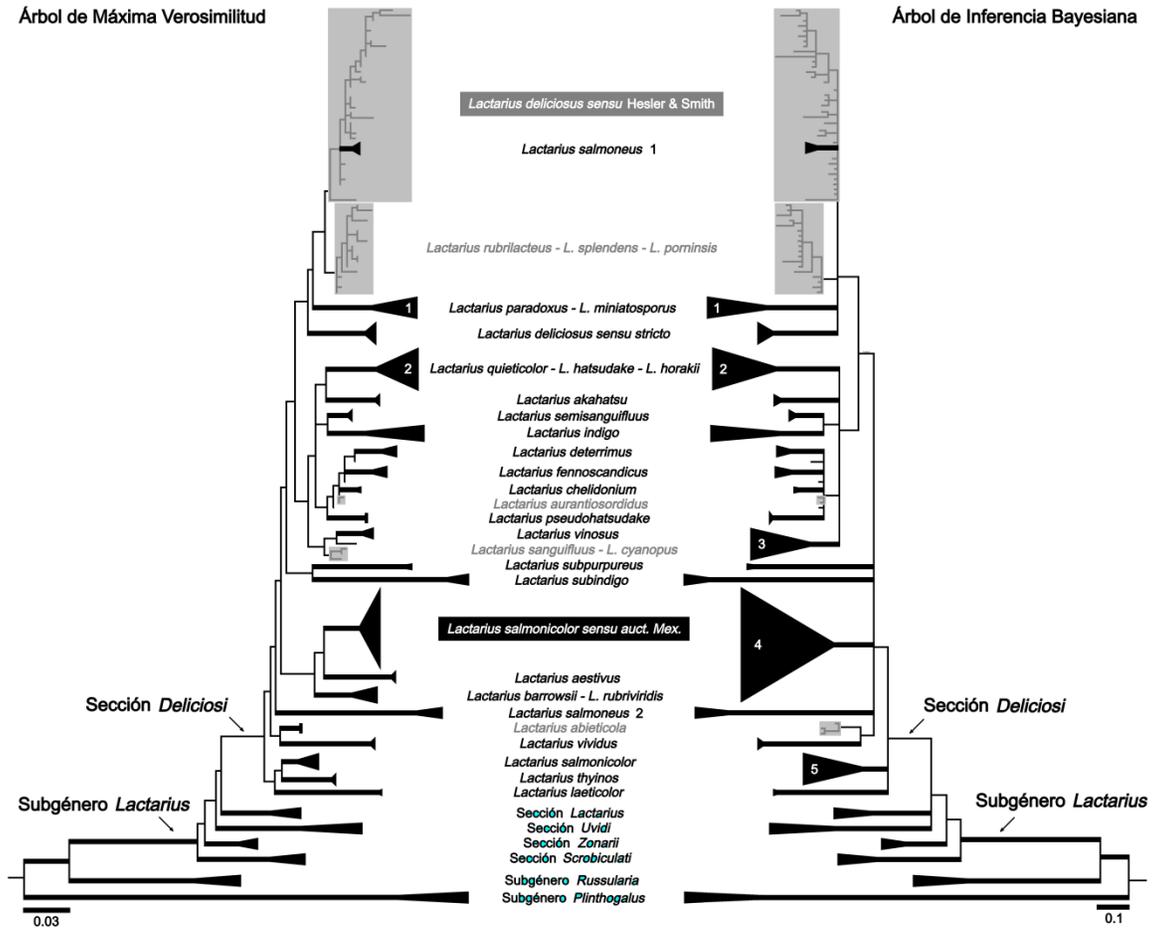


Figura 8. Árboles resultantes del análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Las ramas terminales en forma de triángulos de color negro representan los clados con soporte de ramas mayor a 80% de bootstrap y 0.95 de probabilidad posterior. Las terminales en rectángulos de color gris representan clados con soporte de ramas menor a 80% de bootstrap y 0.95 de probabilidad posterior. Las secuencias del material de México se ubican en el clado de *Lactarius deliciosus sensu* Hesler y Smith (parte superior de los árboles, ver Fig. 9 para mayor detalle) y *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* (clado 4 del árbol de IB, ver Fig. 10 para mayor detalle). Ver texto para mayor detalle.

En los análisis realizados, todas las secuencias de Norteamérica determinadas como *Lactarius deliciosus* y sus distintas variedades descritas por Hesler y Smith (1979) se agruparon

en un clado de bajo soporte, junto con las de México (*Lactarius deliciosus sensu* Hesler y Smith en la Figura 8). Tres secuencias dentro de este clado presentaron buen soporte y fueron designadas como *L. salmoneus* 1 (Tabla 2, Figura 9).

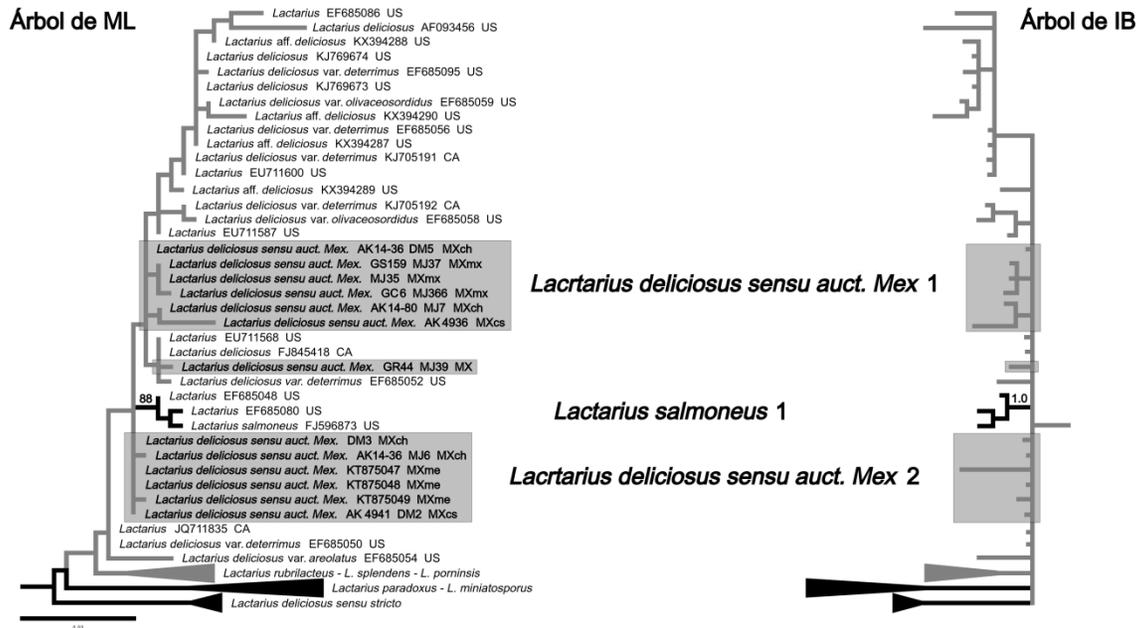


Figura 9. Detalles del clado *Lactarius deliciosus sensu* Hesler y Smith resultado del análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Las secuencias del material mexicano se ubican en los rectángulos grises con los nombres en negritas. La mayoría de éstas se agruparon en dos subclados separados por *Lactarius salmoneus* 1. Las terminales en negro representan clados con soporte de ramas mayor a 80% de bootstrap y 0.95 de probabilidad posterior. Las terminales en gris presentan valores bajos de soporte de ramas.

Las secuencias procedentes de México aparecen como el grupo hermano de la mayoría de los materiales de Estados Unidos y Canadá y gran parte se recuperaron en dos subclados designados como *L. deliciosus sensu auct. Mex. 1* y *L. deliciosus sensu auct. Mex. 2* (Figura 9). Ambos subclados se mantienen tanto en el análisis de ML como en el de IB y los materiales de Chihuahua, Distrito Federal, Estado de México, Tlaxcala y Chiapas aparecen mezclados en los dos subclados (Figura 9). Las 13 secuencias de Estados Unidos que se agruparon en el clado de *L. deliciosus sensu* Hesler y Smith, presentan una transición de timina a citosina en la posición

172 de nuestro alineamiento, una transversión de guanina a timina en la posición 179 y una transición de timina a citosina en la posición 257 con respecto a las secuencias de México, en el análisis de distancia genética no presentaron una diferencia mayor al 1% en su secuencia (Figura 22).

Lactarius rubrilacteus, *L. splendens* y *L. porninsis* se agruparon en un clado igualmente de bajo soporte y en ambos análisis se recuperan como grupo hermano de *L. deliciosus* de Norteamérica (*sensu* Hesler y Smith, Figura 8 y 9).

Las secuencias identificadas como *Lactarius salmonicolor* de México (*Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.*) (Figura 8), se recuperaron en un clado bien soportado y no relacionado con *L. salmonicolor* de Europa (*sensu stricto*). La especie más relacionada con *L. salmonicolor sensu auct. Mex.* en ambos análisis fue *L. aestivus* (Figura 10).

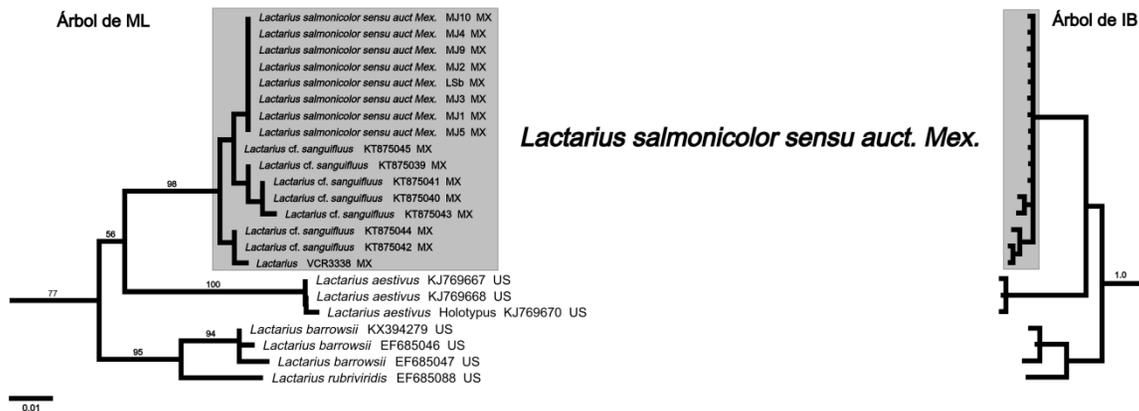


Figura 10. Detalles del clado *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.*, resultado del análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Las secuencias del material mexicano se ubican en los rectángulos grises con los nombres en negritas. Las terminales en negro representan clados con soporte de ramas mayor a 80% de bootstrap y 0.95 de probabilidad posterior.

7.4 Taxonomía

En la Tabla 3 se muestran los ejemplares estudiados de la sección *Deliciosi* de México y su procedencia. Se reconocen cuatro taxones bien diferenciados con base en la morfología: uno asociado con *Abies religiosa*, que a menudo se determina como *Lactarius salmonicolor* en México, y tres taxones que son nombrados *Lactarius deliciosus* o alguna de sus variedades (Hesler y Smith 1979) y que crecen en asociación con *Pinus* en las montañas del país.

Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.

Material de los Altos de Chiapas

Figuras 11 y 12

Basidioma de tamaño mediano, rara vez un poco grande, solitario o gregario, disperso, sobre el suelo, herbáceas o bajo la hojarasca, en bosques, rara vez asociado con madera muy húmeda en lugares abiertos, perturbados, siempre asociado con pino. *Píleo* de 50-80 (-100) mm de diámetro, convexo con el margen incurvado y el centro subumbilicado a ligeramente depresso cuando joven, convexo, convexo plano, umbilicado a más o menos infundibuliforme, con el margen decurvado a levantado al madurar, glabro, rara vez pruinoso de muy joven, más o menos ondulado, a veces estriado por transparencia al madurar; superficie seca o húmeda a ligeramente viscosa; zonado, a veces ligeramente zonado al madurar o azonado al exponerse al sol, de color anaranjado a anaranjado pálido o anaranjado rojizo en las zonaciones más oscuras. *Trama* de 4-6 mm de ancho, de color blanquecino anaranjado, del mismo color que el píleo bajo la pellis, se mancha por el látex de color anaranjado intenso, no cambia o ligeramente más rojizo con el tiempo; olor típico, sabor ligero o un poco acre. *Láminas* adheridas a subdecurrentes, distantes (28-39 láminas en un píleo completo), poco bifurcadas cerca del estípite, con numerosas lamélulas, estrechas o un poco anchas 3-6 mm, de color anaranjado, se manchan de color anaranjado por el látex; borde entero, concolor o ligeramente más pálido que el resto de la lámina. *Látex* de color anaranjado (N00 A00 M50-60). *Estípite* de 30-50 x 12-20 mm, cilíndrico o atenuado en la parte inferior a subventricoso; superficie seca o húmeda a poco viscosa, no o rara vez escrobiculado, de color anaranjado, ligeramente pruinoso y pálido en el ápice junto a las láminas y más pálido en la base, se mancha ligeramente por el látex o al maltrato; hueco,

corteza compacta, quebradiza, de color blanquecino en la cavidad, anaranjado por el látex en la parte más externa.

Esporas de 7.3-7.92-8.6 x (5.3) 5.4-5.90 μm , ovoides [Q = (1.24) 1.25-1.34), ornamentación compuesta principalmente por crestas de espesor medio y delgadas, con verrugas aisladas, formando un retículo incompleto, con elementos hasta de 1.3 μm de altura. Basidios de 21-24.0-26 x 4.5-5.5 μm . Macroscistidios ausentes. Pseudocistidios de 3.0-4.5 μm de ancho, sobresalen de la capa de basidiolos. Células marginales de 14-20.9-26 x 3.0-7.0 μm , poco diferenciadas.

Hábitat: Bosque mesófilo de montaña, dominado por *Pinus oocarpa*.

Material estudiado: Laguna de Montebello, Parque Nacional Lagunas de Montebello, Municipio La Trinitaria, Chiapas, México, A. Kong 4941; A. Kong 4569; A. Kong 1936; A. Kong 7190; A. Kong 4936; A. Kong 2457 (TLXM).

Discusión: el material de los Altos de Chiapas se distingue fácilmente de las especies con látex de color anaranjado que se distribuyen en México y crecen asociadas con *Pinus* debido a que presenta láminas separadas o distantes. El resto de los taxones que crecen en pino y son de látex anaranjado poseen láminas juntas a muy juntas. No existen reportes de ejemplares con láminas separadas en el Eje Volcánico Transmexicano. Su distribución se limita al sur de México, posiblemente desde la Sierra Madre del Sur, hasta las montañas del norte de Centroamérica en donde se presenta *Pinus*. Los caracteres microscópicos que distinguen al material estudiado son la altura de ornamentación en las esporas y la ausencia de macroscistidios en las láminas. Esto nos permite delimitar a este taxón del resto del material identificado como *L. deliciosus* del centro y norte de México (Distrito Federal, Estado de México, Tlaxcala y Chihuahua).



Figura 11. *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* recolectado en Chiapas. A) Grupo de basidiomas en donde se observa que el píleo presenta zonaciones no tan marcadas, láminas distantes y estípites no escrobiculados. B) Detalle de las láminas. C) Zonaciones, láminas distantes y estípites no escrobiculados.

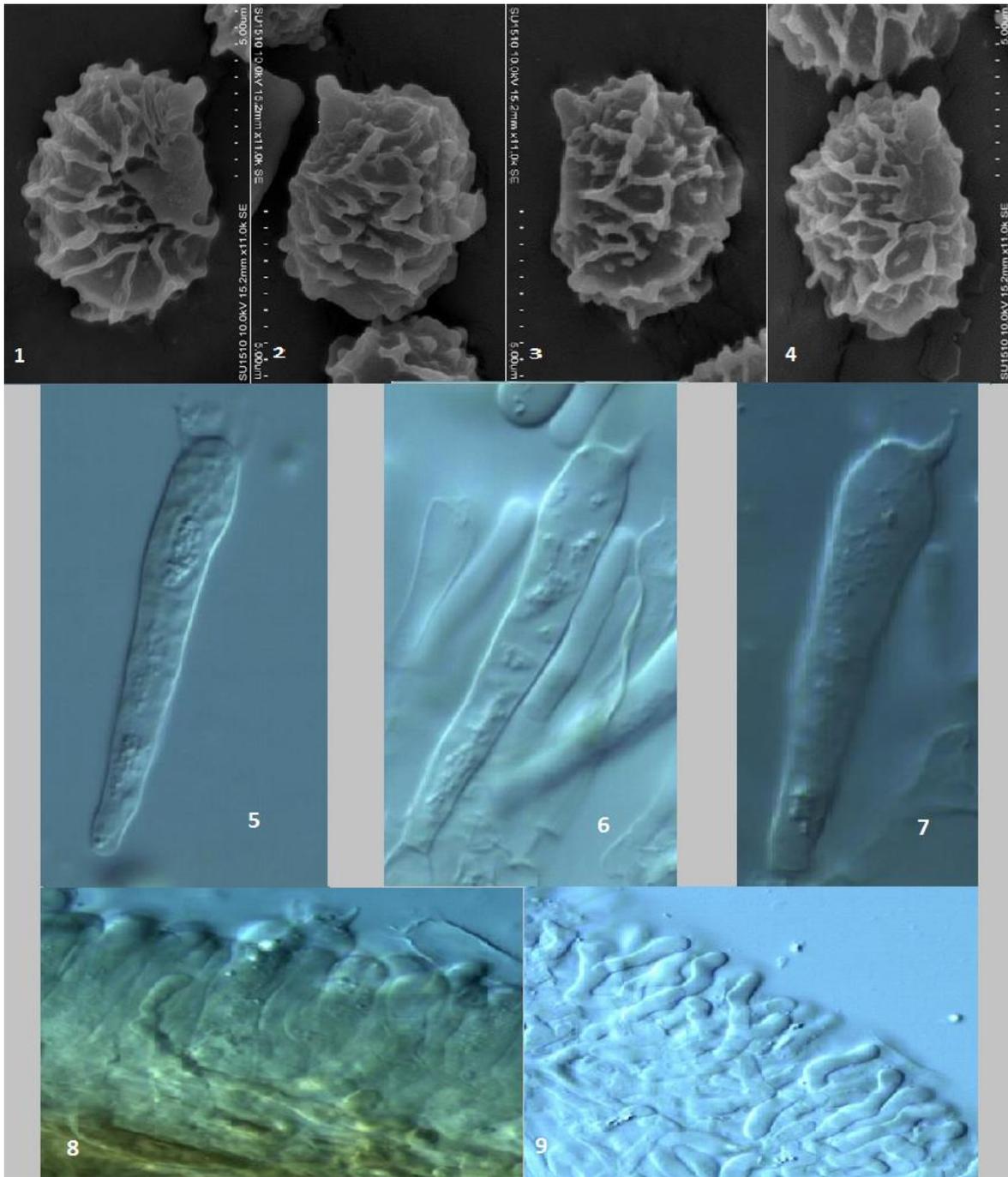


Figura 12. *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.*, Chiapas (1,4) Basidiosporas. (5,7) Basidios. (8) Pseudocistidios. (9) Células marginales.

Material de la Sierra Madre Occidental

Figuras 13, 14 y 15

Basidioma de tamaño mediano, solitario a gregario, disperso, sobre el suelo, entre hojarasca y herbáceas. *Píleo* de 55-75 (-80) mm de diámetro, convexo depresso a subinfundibuliforme, margen arqueado a incurvado a levantado, agudo, no estriado, a veces lobulado a ondulado, superficie húmeda a subviscida, ligeramente brillante a opaco; zonado, más evidente hacia el margen, centro de color café (8B4-7A3), zonaciones ligeramente más oscuras del margen, de color café claro (7E7-8E7) y partes claras (7B4). *Láminas* adheridas a subdecurrentes, juntas a muy juntas, poco bifurcadas junto al estípote, con numerosas lamélulas, algo estrechas 2-5 mm, de color anaranjado 6A5-7A4-5, borde entero concolor. Látex amarillo anaranjado. . Estípote de 17-25-55 x 8-11 mm, atenuado hacia la base, más o menos cilíndrico-ventricoso, superficie seca a húmeda, de color naranja rojizo (7-8CD56), pálidos (6-8A3). Hacia la base hueco

Esporas de (6.4) 6.7-7.36-8.0 (8.1) x (4.5) 4.9-5.50-a ovoides [Q= 1.44-1.33-de espesor medio con algunas crestas delgadas y algunas verrugas aisladas, formando un retículo incompleto, formando mallas. Basidios de 35-44.71-59.8 x 6.5-9.0-Macrocistidios presentes de 18.2-33.4-45.0 x 2.2-5.8--3.6-22.0-33.3-41.5 x 7.1-8.8--4.8-de un ixocutis Estipitipellis, hifas de 2.1-3.6 μ de ancho.

Hábitat: Bosque de *Pinus*, *Pinus-Quercus*.

Material estudiado: San Isidro, camino Bahuichivo-Urique, municipio Urique, Chihuahua, México, A. Kong 1436; A. Kong 1480 (TLXM).

Observaciones: Los ejemplares de Chihuahua, se separan morfológicamente por la presencia de abundantes pleuro- y queilomacroscistidios, sin embargo, estos caracteres han sido descritos para las variedades de *L. deliciosus* descritas de Estados Unidos por lo que no podemos asegurar que sea una especie no descrita para la ciencia. Las variedades de *L. deliciosus* descritas para Estados Unidos crecen asociadas con *Picea*, por lo que es muy probable que ninguna de estas especies del oeste de Estados Unidos (California, Oregón, Idaho, Washington) sea la misma que la de Chihuahua, ya que está reportada de un bosque de *Pinus-Quercus*.



Figura 13. *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* Sierra Madre Occidental, Chihuahua, San Juanito, Noritari, en bosque de *Pinus*.



Figura 14. *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* Sierra Madre Occidental, Chihuahua, Sierra Tarahumara, Urique, camino Cerocahui a Urique, en bosque de *Pinus*.

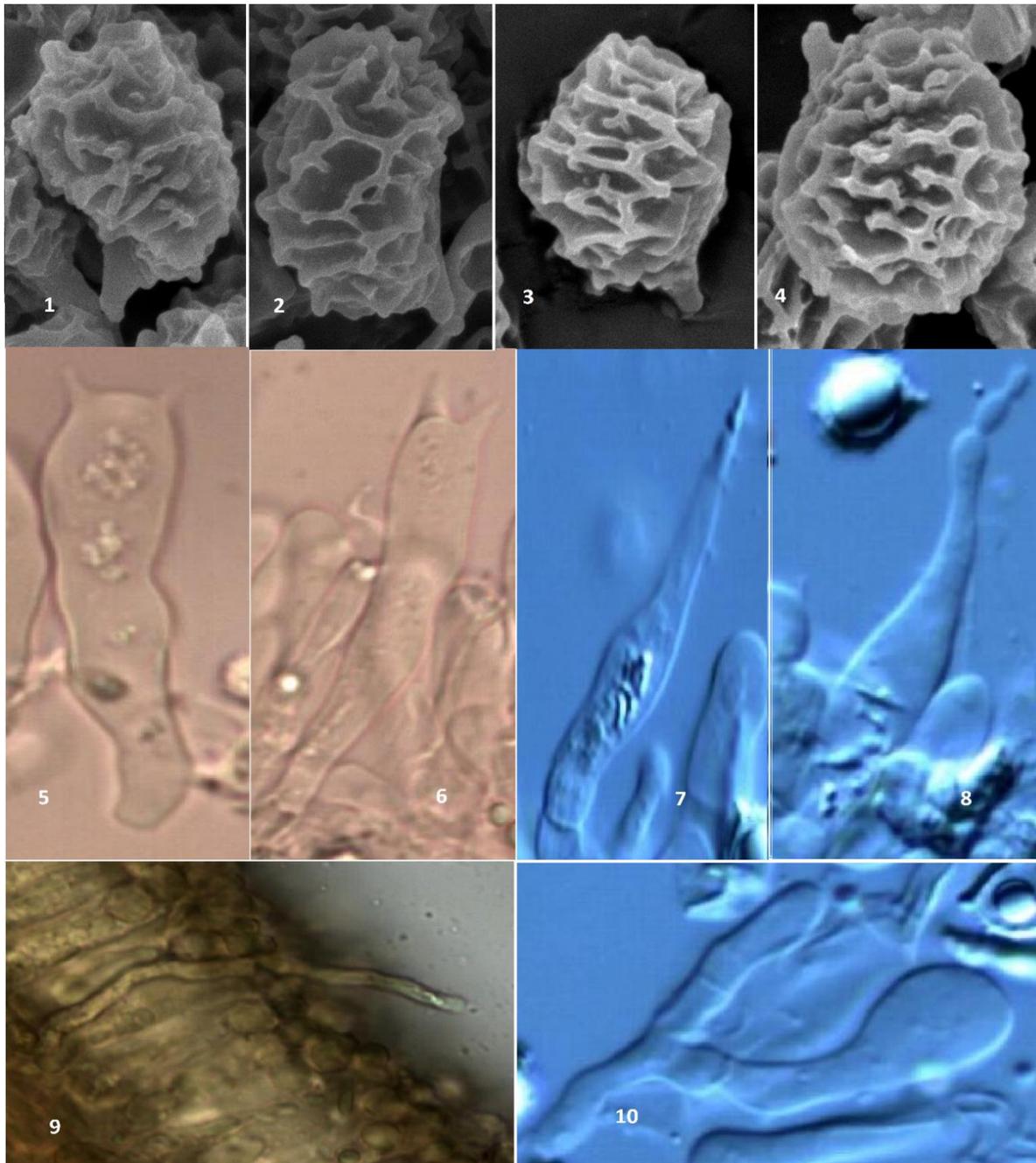


Figura 15. Caracteres microscópicos de *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* recolectado en Chihuahua. 1-4) Basidiosporas. 5-6) Basidios. 7-8) Macrocistidios. 9) Pseudocistidios. 10) Células marginales.

Basidioma mediano, solitario a gregario. *Píleo* de 35-95 mm de diámetro, convexo a plano con el centro umbilicado o deprimido, a menudo infundibuliforme, margen glabro, no estriado, agudo, de color anaranjado pálido (5A2-3, 6A3), anaranjado claro (5A4, 6A4-5), anaranjado (6A6), anaranjado rojizo (7A3-5, 8A6), anaranjado grisáceo (6B5-6, 7B5), anaranjado pardusco (5C4, 6-7C5) al madurar se tiñe de color verde con el maltrato. *Látex* de color anaranjado o anaranjado rojizo al ser exudado, cambia o mancha la trama de color rojizo o pardo rojizo después de los 10 minutos. *Láminas* adheridas a decurrentes, juntas a muy juntas, a veces bifurcadas cerca del estípite y junto al píleo con numerosas lamélulas. *Estípite* de 15-60 x 8-25 mm, cilíndrico o atenuando en la parte inferior; superficie seca, opaca; glabro, liso o ligeramente ruguloso longitudinalmente, no escrobiculado, finamente pruinoso en el ápice; de color anaranjado; hueco.

Esporas de 7.3-8.3-9.3 (-10.1) x 5.5-6.3-7.1 (-7.2) μm , de obovoides a cortamente elípticas, a veces subglobosas [Q=1.18-1.33-1.47], con ornamentación de 0.3-0.9 μm de altura, con verrugas y pequeñas crestas formando un retículo parcial; placa supra-apendicular hialina o no amiloide. *Basidios* de 37-44-52 x 7.7-9.5-11.5 (-12.9) μm . *Pleuromacrocistidios* de 42-67-75 x 4.3-6.6-7.8 μm , escasos, algunas veces no se observan. *Pileipellis* en forma de un ixocutis, con hifas de 3.2-4.6-5.3 mm de ancho. *Estipitipellis* en forma de un cutis, con hifas de 2.8-4.2-5.9 μm de ancho.

Hábitat: Bosque de *Pinus*, bosque mixto de coníferas dominado por *Pinus*.

Material estudiado: A. Kong 2216, A. Kong 2208, A. Kong 2220, A. Kong 464, A. Kong 1992 (TLXM), A. Ruiz AR09811, C. Estrada HC-PNNT-024, A. Ruiz AR09560, García Cruz 2016-06, Guzmán Ramírez, 2016-44, Sigfrido Sierra 2016-73 (FCME).

Discusión: Estos ejemplares identificados como *L. deliciosus* son similares al material de Chihuahua a nivel macroscópico, presentan láminas juntas o muy juntas, a nivel microscópico se observó una menor abundancia de cistidios con respecto al material de Chihuahua, razón por la cual no tuvimos problema para separarlo, además se observa que las esporas presentan crestas más delgadas en las fotos de microscopía de barrido.



Figura 16. *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* en un bosque de *Pinus* del Eje Volcánico Transmexicano, Tlaxcala, Sierra de Tlaxco. A) Esporoma en sección en donde se observan las láminas muy juntas, el estípote corto y no escrobiculado, el látex escaso. B) Píleo con zonaciones distintivas claras y oscuras, de color anaranjado rojizo, con algunos tonos verdosos.

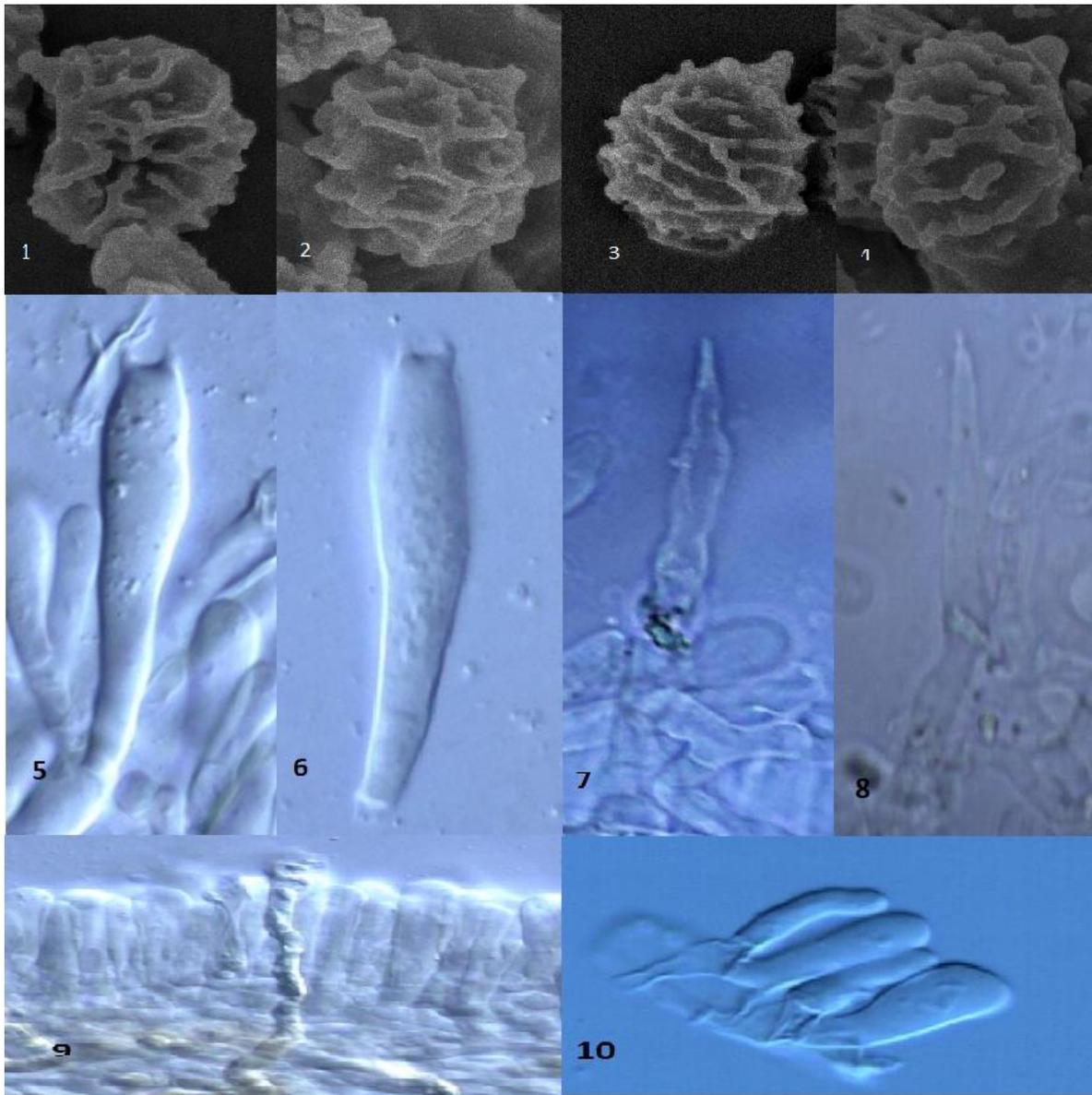


Figura 17. Estructuras microscópicas de *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* recolectados en el centro de México. 1-4) Basidiosporas. 5-6) Basidios. 7-8) Macrocistidios. 9) Pseudocistidios. 10) Células marginales.

Basidioma de tamaño mediano a grande, solitario a gregario. *Píleo* de (60-) 70-120 (-150) mm de diámetro, convexo con el centro deprimido a umbilicado de joven, convexo plano o en ocasiones más o menos infundibuliforme al madurar; margen enrollado o incurvado de joven, decurvado o arqueado, a veces levantado y ondulado o lobulado al madurar, agudo, no estriado, glabro o ligeramente pruinoso en los ejemplares inmaduros, a veces estriado por transparencia cuando muy maduro o al maltrato; superficie brillante, viscosa o ligeramente pegajosa, un poco rugulosa radialmente, zonado; de color anaranjado (5A3, 5B5, 6-8A4, 6-7A5, 6A6) con tonos de color más pálido, crema (4A3) a rosa o a veces grisáceo en el centro, con zonaciones oscuras de color anaranjado pardusco (8DEF8) y zonaciones claras de color crema a rojizo claro (7BC5), rara vez con tonos de color verde al madurar, al maltrato o cuando es muy viejo. *Trama* de 4-12 mm de ancho; de color blanco o blanquecino amarillento, con tonos similares al píleo bajo la pellis y con una línea de color anaranjado sobre las láminas por el látex; olor ligeramente aromático, dulce y agradable, sabor fúngico y algo distintivo. *Látex* de color anaranjado o anaranjado rojizo (7AB8), no cambia de color al contacto con el aire. *Láminas* adheridas a decurrentes, subdistantes o juntas, con numerosas lamélulas, bifurcadas cerca del estípite; estrechas, de 3 a 8 mm de ancho; de color crema anaranjado o anaranjado (6A4-7, 7A6), se manchan de color anaranjado brillantes al maltrato por el látex; borde entero, ligeramente más pálido que el resto de la lámina; con sabor distintivo pero no picante. *Estípite* de (45-) 50-80 (-120) x (12-) 15-25 (-35) mm, cilíndrico, obclavado o ligeramente atenuado en la parte inferior; superficie opaca o brillante, seca a húmeda o viscosa, pruinosa en el ápice, a menudo escrobiculado; de color anaranjado (7B4-5), anaranjado rojizo en algunas áreas y en las escrobículas (7B7-8) o con tonos de color más pálido; hueco, blanquecino en el interior, concolor a la superficie en la corteza.

Esporas de (7.8-) 8.6-9.6 (-10.6) x (5.3) 6.2-7.8 (-8.2) μm , obovoides a ampliamente elípticas [Q= 1.21-1.38-1.44 (-1.58)], con ornamentación amiloide, de 0.4-1.0 (-1.2) μm de altura, presentando un patrón de un retículo incompleto, formado por crestas finas y gruesas, con algunas verrugas aisladas; placa supra-apendicular hialina o no amiloide. *Basidios* de (44-) 55-75(-80) x (7.3-) 9.0-10.5 (-12.5) μm , claviformes, con cuatro esterigmas de 4-9 μm de largo;

hialinos en KOH, a veces con contenido granuloso. *Pleuromacrocistidios* de (30-) 40-60 (-70) x 4.5-7.5 μm , fusiformes, subcilíndrico o subulados, mucronados o con algunas constricciones subapicales; contenido granuloso o en forma de pequeños cristales, de color pardo amarillento claro y refringentes en KOH, embebidos o proyectándose hasta 20 μm más allá de los basidiolos, a veces no observados. *Queilomacrocistidios* muy escasos o no observados y cuando están presentes más pequeños que los pleuromacrocistidios. *Pseudocistidios* de 3.2-5.9 (6.3) μm de ancho, embebidos o proyectándose hasta 21 μm sobre la capa de basidiolos. *Células marginales* de 11-36 x 3.6-9.5 μm . *Subhimenio* filamentoso a celular. *Trama laminar* con abundantes hifas laticíferas de (3.1) 3.6-11.0 (-13.5) μm de ancho, con contenidos de color pardo amarillento claro y refringentes en KOH; hifas conectivas de (2.1-) 2.9-8.8 (-13.5) μm ; esferocitos escasos, presentes hasta la mitad proximal de la trama. *Pileipellis* con hifas de 2.0-5.3 μm de ancho, dispuestas horizontalmente en forma de un ixocutis. *Estipitipellis* con hifas de 2.2-6.7 μm de ancho, en forma de un cutis o un ixocutis.

Hábitat. En bosque de *Abies* del Eje Volcánico Transmexicano y Sierra Madre del Sur, ya sean puros o mixtos con *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Arbutus* o *Salix*. En asociación con *A. religiosa* y *A. hickelii*, entre los 3000-3500 m snm.

Material estudiado. ESTADO DE MÉXICO: A. Espinoza HC-PNNT-122, A. Martínez HC-PNNT-046, C. Burrola CB0813, C. Burrola CB08304, A. Martínez HC-PNNT-274, C. Burrola 08422 y A. Ruiz AR09527 (MEXU). OAXACA: Alrededores de Piedra Ventana, camino de San Isidro Llano Grande a San Pedro Cajonos, Municipio de Santa María Yavesia, *Ramírez-Cruz* 3338; Santa Martha Latuvi, *J. García* 19301 (ITCV); Cerro Fierros, bosque de oyameles, 3200 m altitud, Agosto 5, 1956, *R. Heim* 4440 (MEXU). TLAXCALA: Piedra Canteada, Municipio de Nanacamilpa, Julio 19, 2016, *M. Díaz* 1, *M. Díaz* 2, *M. Díaz* 3, *M. Díaz* 4, *M. Díaz* 5 (TLXM); Cañada Grande, Parque Nacional La Malinche, Municipio de Ixtenco-Huamantla, *A. Kong* 2040, *A. Kong* 1846, *A. Kong* 500, *A. Kong* 258, *F. Hernández* 55, *A. Kong* 1406, *A. Kong* 1409, *A. Montoya* 2016 (TLXM).

Observaciones. Los ejemplares identificados como *L. salmonicolor* de Oaxaca y Tlaxcala son muy similares morfológicamente. El tamaño y forma de las esporas no presenta

diferencias importantes y solo varían ligeramente en la altura de la ornamentación. En ambos, los pleurocistidios y queilocistidios están ausentes o son escasos y cuando se observaron, el tamaño es muy similar. Debido a que no se encontraron diferencias consistentes en las estructuras de importancia taxonómica se agruparon dentro de la misma especie. En este taxón también se incluyeron ejemplares identificados previamente como *L. cf. sanguifluus* provenientes del Estado de México que fueron revisados y mostraron una morfología similar en las estructuras microscópicas a los ejemplares de Oaxaca y Tlaxcala. Los ejemplares de Tlaxcala y Estado de México crecen asociados con *Abies religiosa* cuya distribución se da a lo largo del Eje Volcánico Transmexicano principalmente, y los ejemplares de Oaxaca con *Abies hikelii* que se distribuye en la Sierra Madre del Sur.



Figura 18. *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* desarrollándose en asociación con *Abies religiosa* en las montañas del centro de México. Detalle de las láminas abajo.

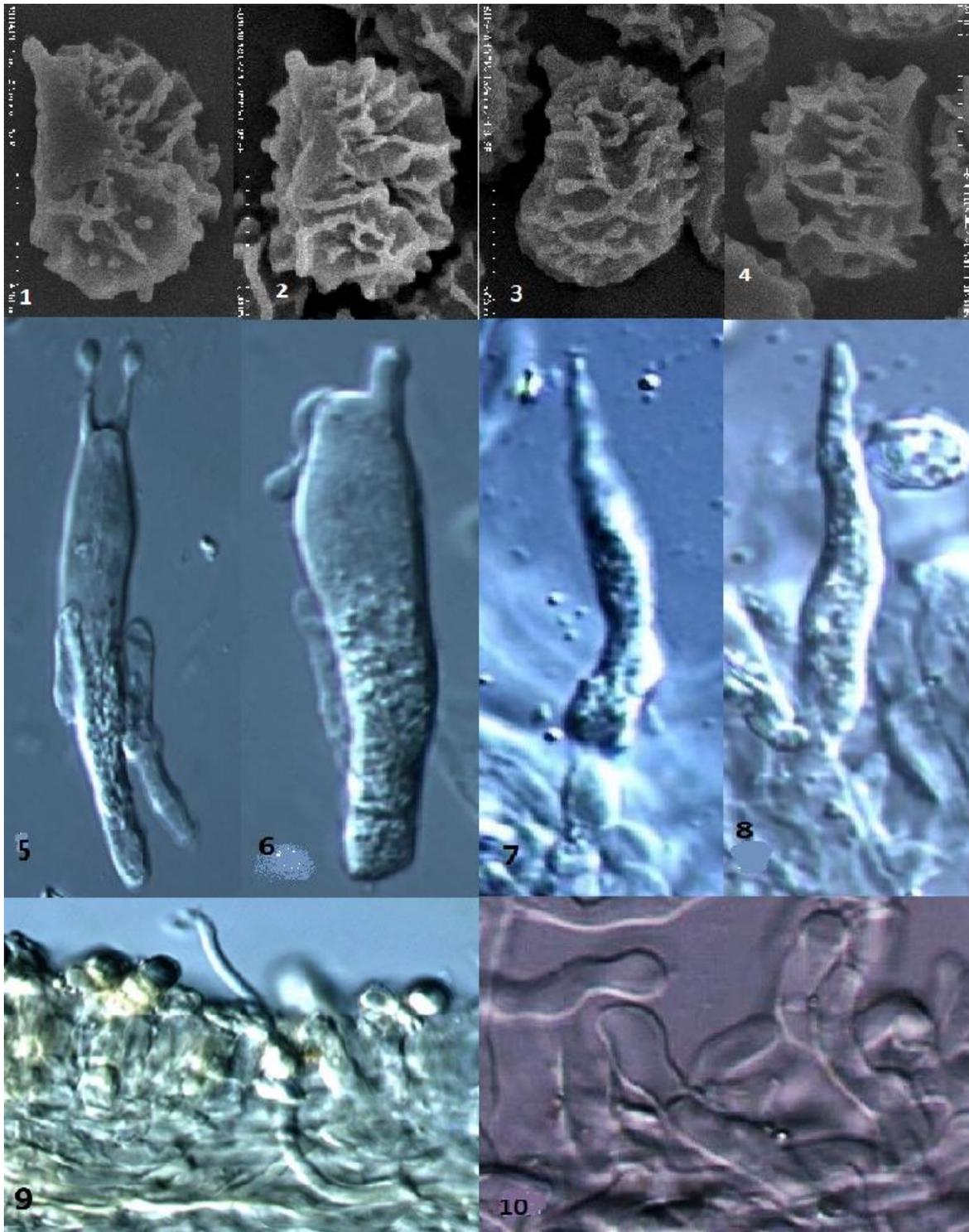


Figura 19. Estructuras microscópicas de *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* recolectados en el centro de México. 1-4) Basidiosporas. 5-6) Basidios. 7-8) Macrocistidios. 9) Pseudocistidios. 10) Células marginales.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo con Nuytinck y cols. (2006), el complejo de *Lactarius deliciosus* en Norteamérica, formado por las variedades descritas por Hesler y Smith (1979) de Estados Unidos - var. *detrerrimus*, var. *olivaceosordidus*, var. *areolatus* y var. *deliciosus* - representan especies nuevas. Además, desde el punto de visto morfológico señalaron que no necesariamente las especies que presentan mayor similitud están relacionadas filogenéticamente y que las especies más parecidas a los ejemplares de Norteamérica son *L. deliciosus* y *L. detrerrimus* de Europa. En nuestros análisis, el grupo que apareció relacionado filogenéticamente con el linaje norteamericano de *L. deliciosus* fue el de *L. rubrilacteus* - *L. splendens* - *L. porninsis*. (con látex rojo y blanco) y el de *L. paradoxus* - *L. miniatosporus* (látex rojo). Existen casos de especies que son muy similares dentro de la sección *Deliciosi* con látex de igual color como *Lactarius indigo* y *L. subindigo*, dos especies con látex de color azul, pero que no se encuentran relacionadas filogenéticamente o especies de diferente color estrechamente relacionadas como *L. quieticolor* y *L. hatsudake*, de látex anaranjado y rojo respectivamente (Nuytinck y cols. 2007).

Por lo anterior, no sorprende que en nuestro estudio las especies mexicanas de látex anaranjado no correspondan con las especies europeas como *L. deliciosus*, *L. salmonicolor* ni *L. detrerrimus*, a pesar de que presentan una morfología similar. Además, las especies mexicanas podrían representar varios taxones. Esta diversidad críptica así como la no conespecificidad entre las especies europeas y americanas, se ha reportado también para otros grupos de hongos, como los complejos de *Amanita caesarea*, *Tricholoma matsutake*, *T. sculpturatum*, *Hebeloma crustilunifforme*, *Hericiium erinaceus* entre muchos otros, evidenciando el hecho de que muchas de las especies norteamericanas son taxones nuevos para la ciencia (Ramírez y cols. 2015, Trudell y cols. 2017).

En nuestros análisis filogenéticos las secuencias de los taxones identificados como *L. deliciosus* y que crecen en asociadas con *Pinus*, tanto de Estados Unidos como de México se recuperaron en un mismo clado pero con bajo soporte. Esto probablemente se debe a que las regiones de los ITS no presentan suficiente variación en este grupo para permitir una diferenciación clara entre las secuencias analizadas. Este patrón también se observó en los árboles presentados por Nuytinck y cols. (2007), en donde incluyeron secuencias de Estados

Unidos. Por lo tanto este es un clado conformado con elementos en posible proceso de especiación.

No sorprende que las ramas del clado *L. deliciosus* de Norteamérica no tengan buen soporte, ya que la mayoría de las secuencias que integran este clado solo presentan tres sustituciones en la región de los ITS, cantidad insuficiente para separarlas genéticamente. El análisis de distancias genéticas mostro que la similitud entre estas secuencias es menor al 1%, y se ha reportado que para el género *Lactarius* las especies se separan a partir del 1.5% de similitud (Tabla 8) (He y cols. 2011). Además, en trabajos con otros grupos utilizando las regiones ITS las ramas tienen buen soporte cuando presentan una mayor cantidad de cambios, y en algunos grupos donde los ITS presentan mayor variación, llegan a presentar hasta 23 cambios representando el 3.6% de divergencia en la secuencia (Loizides y cols. 2016). Aunque es difícil estimar los tiempos de divergencia sin un registro fósil, con base en los resultados podemos asumir que los taxones identificadas como *L. deliciosus* de Norteamérica divergieron recientemente, ya que la baja variación genética sugiere un proceso de diversificación reciente, mientras que mayor variación sugiere una separación más antigua (Jargeat y cols. 2010). La exploración de otros marcadores moleculares o genes como caracteres filogenéticos podrían esclarecer la situación en este grupo.

Aunque las secuencias de *Lactarius deliciosus* de Estados Unidos y de México se mantienen como un clado con bajo soporte tanto en el análisis de ML como en el de IB, es posible asumir que se encuentran relacionados, sin embargo las secuencias de los morfotipos mexicanos, reconocidos en el presente estudio, aparecen mezclados en ambos análisis (Figura 9).

Lactarius deliciosus sensu auct. Mex. - Chiapas

El morfotipo de Chiapas identificado como *L. deliciosus* se separa fácilmente de los ejemplares de Chihuahua y centro de México, ya que sus láminas son distantes, a diferencia de las demás especies de látex anaranjado de México, ya que en estas especies las láminas son juntas a muy juntas. Esta diferencia en las láminas representa demasiada variación con respecto a lo observado en la sección *Deliciosi* para una especie, debido a esto queda claro que el marcador molecular no tiene suficiente variación. Además de la distancia de las láminas, los ejemplares de Chiapas presentan diferencias microscópicas notorias como son la altura de la ornamentación en las esporas (Figura 12) y la abundancia de macrocistidios (escasos o ausentes). La distancia de las láminas y la ornamentación de las esporas fueron utilizadas como evidencia morfológica para proponer la nueva especie de Asia, *L. vividus*, anteriormente identificada como *L. deliciosus*, y por el patrón de ornamentación en las esporas se propuso a *L. hengduanensis* como nueva especie nueva asociada con *Picea*, y debido a la ornamentación más densa en *L. sanguifluus* se confirmó que *L. vinosus* es una especie diferente y no una variedad de *L. sanguifluus* (Nuytinck y cols. 2005; Wang y cols. 2015; Wang 2016). De las descripciones que hay para Estados Unidos y México de *L. deliciosus* y sus variedades, ninguna de ellas menciona láminas distantes ni ausencia de cistidios (Hesler y Smith 1979; Kong 1995).

Ya que en la sección *Deliciosi* la especificidad con respecto al hospedero es a nivel de género y todas estas especies crecen asociadas a árboles del género *Pinus*, esto supondría que no se podrían separar por este carácter ecológico, sin embargo las condiciones en las que crecen los ejemplares de Chiapas son muy diferentes a las de Chihuahua y Centro de México, principalmente por la humedad y la temperatura, razón por la cual su distribución se limita al sur de la República Mexicana y probablemente siga hasta Nicaragua donde aún hay bosques de *Pinus* (Perry, 1991). Por lo tanto, con base en datos morfológicos y ecológicos seguramente la especie identificada como *L. deliciosus* de Chiapas es un taxon nuevo para la ciencia, sin embargo debido a que el marcador molecular no presenta suficiente variación no es posible delimitar la especie con base en criterios de taxonomía integrativa, ni establecer sus relaciones filogenéticas. No pudimos observar un patrón de transiciones o transversiones en el alineamiento, comparando las secuencias de Chiapas con el material de Chihuahua, centro de

México y las secuencias de Estados Unidos y presenta valores menores al 1% de similitud (Tabla 8).

Un caso similar al del material de Chiapas sucede con *L. splendens* una especie de látex blanco con distribución en Canadá, donde los análisis filogenéticos de ML e IB utilizando las regiones ITS no resuelve los clados debido a que las ramas tienen poco soporte y la topología es variable. Aparentemente está relacionada con *L. porninsis* de látex blanco y *L. rubrilacteus* de látex rojo, sin embargo la diferencia morfológica con *L. rubrilacteus* y el hecho de que *L. porninsis* es europeo ayudó a poder delimitar esta especie asociada con árboles del género *Larix* (Nuytinck y cols. 2017).

Lactarius deliciosus sensu auct. Mex. - Chihuahua

Los ejemplares identificados como *L. deliciosus* de Chihuahua no se pueden diferenciar de los demás ejemplares de México genéticamente, pero morfológicamente se pueden separar por la presencia de pleurocistidios y queilocistidios abundantes. La abundancia y la forma de los verdaderos cistidios han servido en otros grupos para delimitar especies que no presentan diferencias notorias en los caracteres macroscópicos, como el complejo *Laccaria amethystina*, donde las especies pertenecientes a este complejo presentaron variación interespecífica en este carácter. Particularmente en el género *Lactarius* subgénero *Russularia* han sido muy útiles para separar especies (Vincenot y cols. 2017; Wisitrassameewong y cols. 2016).

La mayoría de las variedades descritas por Hesler y Smith (1979) se distribuyen en el Oeste de Estados Unidos y crecen asociadas al género *Picea* (Figura 21). La presencia de cistidios es una característica que se encuentra presente en la mayoría de las variedades descritas por Hesler y Smith, con excepción de la variedad *areolatus*. La variedad *deliciosus* presenta macrocistidios escasos, sin embargo, la descripción está incompleta, al parecer en esta variedad incluyen a los ejemplares que crecen asociados con *Pinus* en Estados Unidos (Hesler y Smith 1979). Debido a la cercanía con Estados Unidos, es difícil definir si la especie identificada como *L. deliciosus* de Chihuahua es un taxón descrito anteriormente para Estados Unidos, ya que por su ubicación es posible que se distribuya en el sur de Estados Unidos. En la figura 21 se muestra

la ubicación de las especies de látex anaranjado descritas para Estados Unidos (*L. thynos*, *L. aurantiosordidus* y *L. chelidonium*) además de los ejemplares tipo de las variedades de *L. deliciosus* descritas por Hesler y Smith.

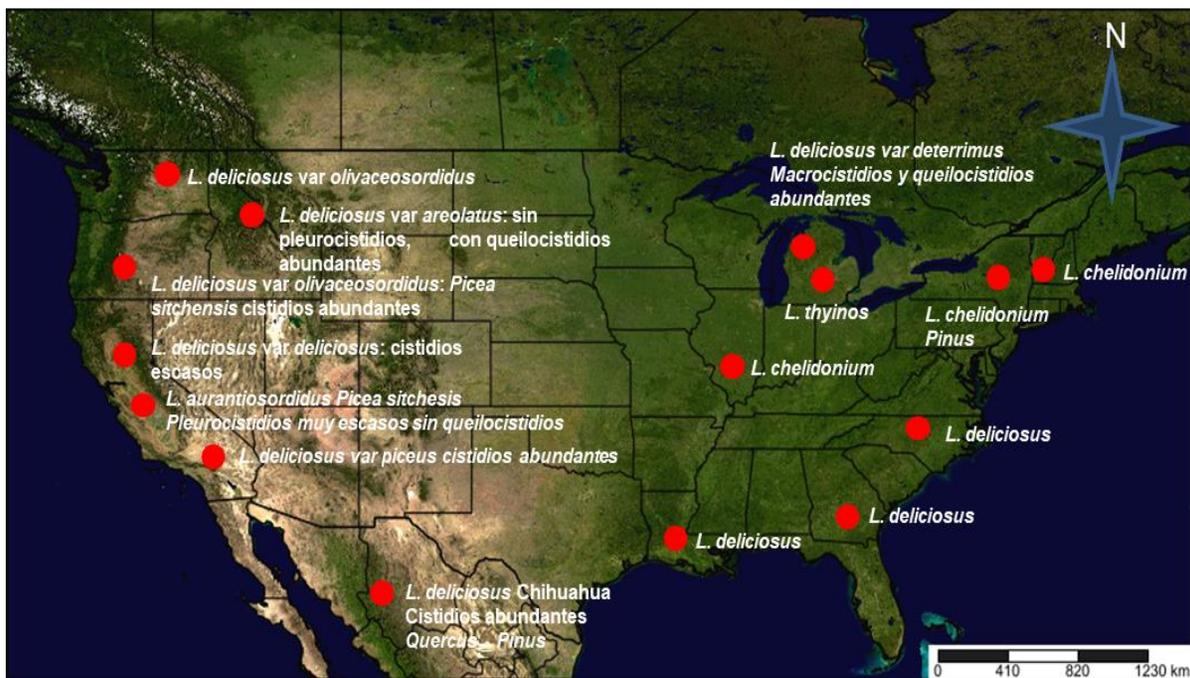


Figura 21. Mapa de la distribución de los ejemplares descritos por Hesler y Smith (1979) como variedades de *Lactarius deliciosus* y otros *Deliciosi* del complejo en Estados Unidos.

Basándonos en las descripciones, la especie *L. deliciosus* de Chihuahua no presenta correspondencia morfológica con ninguna de ellas, además, la mayoría de las variedades descritas por Hesler y Smith son del noroeste de Estados Unidos y crecen asociadas con *Picea*. Sólo la variedad *L. deliciosus* var. *piceus* y *L. aurantiosordidus* se distribuyen en el suroeste de Estados Unidos, sin embargo esta variedad crece asociada con *Picea* por lo que al parecer no concuerda con el material de Chihuahua asociado con *Pinus*. Con respecto a *L. aurantiosordidus* también crece asociada con *Picea* y presenta cistidios escasos, por lo que tampoco parece ser la misma especie de Chihuahua. Con respecto a las variedades descritas de bosque de *Pinus* para

Estados Unidos (variedad *areolatus* y var. *deliciosus*), éstas no corresponden morfológicamente con el material de Chihuahua.

En nuestros análisis filogenéticos la especie *L. thynos* descrita para EU se separa de las especies mexicanas de látex anaranjado y está relacionada con *L. salmonicolor* de Europa (Nuytinck y cols. 2007). La especie *L. chelidonium* de Estados Unidos es la que presenta un mayor parecido ecológico y morfológico con respecto a *L. deliciosus* de Chihuahua, ya que crece asociada con *Pinus* y presenta cistidios abundantes y tonos azules, un carácter que también presentan los ejemplares de Chihuahua, sin embargo este carácter debe ser tratado con mucho cuidado, ya que en la especie europea de látex anaranjado *L. hemicyaneus* es un carácter muy variable y a menudo se presenta sólo en ejemplares jóvenes (Nuytinck y Verbeken 2007). Además, estas especies mostraron diferencias en el tamaño de las esporas ya que las esporas de *L. chelidonium* son más grandes, a la vez que *L. chelidonium* fue reportada originalmente del noreste de EU y Canadá, por lo que basándonos en la distancia geográfica creemos que es difícil que dicha especie corresponda con el material de Chihuahua. Es probable que las especies y variedades citadas para Estados Unidos se distribuyan en los bosques de *Pinus* y *Picea* de México, principalmente las de California, además son taxones que probablemente están relacionadas con el material de Chihuahua, pero no necesariamente representen la misma especie, ya que la sección *Deliciosi* presenta una alta diversidad críptica. Recientemente se han reportado para China cuatro especies muy parecidas morfológicamente (*L. deliciousus*, *L. hatsudake*, *L. akahatsu* y *L. vividus*) que comúnmente son confundidas en campo ya que su distribución se sobrelapa, debido a que las cuatro crecen asociadas con árboles del género *Pinus* (Wang y cols. 2015). Por lo tanto, si el taxón identificado provisionalmente como *L. deliciosus* de Chihuahua ha sido recolectado y descrito para Estados Unidos, ha sido nombrada como una variedad de *L. deliciosus* por lo que su estado taxonómico aún no se puede resolver debido a la falta de resolución en los marcadores moleculares.

***L. deliciosus sensu auct. Mex.* - Centro de México**

Los ejemplares que se distribuyen en el centro de México (Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México) son muy parecidos a nivel macroscópico a los ejemplares de Chihuahua, pero se pueden separar fácilmente por la abundancia de macrocistidios, ya que los ejemplares del centro de México presentan tanto pleuro como queilocistidios escasos. Además, con fotos de microscopia de barrido, se pudo observar que los ejemplares de Chihuahua presentan un patrón más definido de las crestas y en general presentan crestas más gruesas. Morfológicamente la variación en los cistidios y la ornamentación de las esporas sería suficiente para separar a estas dos especies ya que otros taxones como las especies europeas *L. sanguifluus* y *L. vinosus* fueron separadas sólo por la densidad en la ornamentación de las esporas (Nuytinck y Verbeken, 2003), por lo que creemos que los ejemplares del centro de México se pueden considerar un taxón diferente basándonos solo en la morfología. Sin embargo, es necesario utilizar un marcador molecular más variable, para separar a estos dos taxones ya que es posible que su distribución se sobrelape, por lo que también es importante obtener más ejemplares, especialmente de la zona de transición entre la Sierra Madre Occidental y el Eje Volcánico Transmexicano.

Biogeografía de las especies pertenecientes al género *Lactarius* sección *Deliciosi* con látex anaranjado en México

Como se mencionó anteriormente, los miembros de la sección *Deliciosi* crecen en asociación con árboles de las familias Pinaceae y Fagaceae, presentando especificidad a nivel de género, debido a esto su distribución está fuertemente influenciada por los cambios en la distribución y ocurrencia de los árboles hospederos (Nuytinck y cols. 2005). Los taxones mexicanos de látex anaranjado que se estudiaron, crecen asociados con árboles del género *Pinus* en las zonas montañosas de la Sierra Madre Occidental, Eje Volcánico Transmexicano y Los Altos de Chiapas. En estas regiones existe una gran diversidad de especies del género *Pinus* (Aguirre y Duivenvoorden 2010). Se tienen evidencias de que los ancestros de las especies actuales del género *Pinus* llegaron al territorio mexicano en el Cretácico superior a través de la Sierra Madre Occidental y en el Terciario medio a través de la Sierra Madre Oriental (Sánchez González 2008). Estos taxones seguramente también arribaron con diversas especies de hongos asociadas a sus raíces. En México los cambios climáticos locales, propiciados por la topografía de las grandes cadenas montañosas que forman la Zona de Transición Mexicana propiciaron la rápida diversificación de pinos y seguramente también de sus hongos asociados (Mastretta y cols. 2015).

La Zona de Transición Mexicana comprende las principales montañas del país: Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transmexicano, Sierra Madre del Sur y los Altos de Chiapas. Con excepción de ésta última, el resto de las montañas de México se incluyen dentro de la región Neártica y los Altos de Chiapas en la región Neotropical (Morrone 2005, 2015). Los morfotipos reconocidos para los ejemplares de látex anaranjado y asociados con *Pinus* presentan una correlación morfológica con las regiones Neártica y Neotropical. Los ejemplares estudiados con láminas juntas o muy juntas y con macrocistidios relativamente abundantes se presentan en las montañas de la región Neártica (Sierra Madre Occidental y Eje

Volcánico Transmexicano), mientras que los ejemplares con láminas separadas o distantes y con muy pocos macrocistidios o casi ausentes se encuentran en la región Neotropical (Altos de Chiapas). Es posible que el Istmo de Tehuantepec haya funcionado como un elemento vicariante para la diferenciación del morfotipo de Chiapas, aunque no se descarta la posibilidad de encontrarse en la Sierra Madre del Sur. Con respecto a los morfotipos de Chihuahua y centro de México, ambos son muy similares y se separan por la coloración y abundancia de zonaciones en el píleo, la abundancia de macrocistidios y la ornamentación de las esporas. Estas diferencias posiblemente se deba a que desde el punto de vista histórico el Eje Volcánico Transmexicano es un sistema de volcanes relativamente más reciente que la Sierra Madre Occidental (Ferrari y cols. 2005, Ferrusquía-Villafranca 2007, Velasco de León y cols. 2007) y por lo tanto, es probable que en el material estudiado del centro de México se encuentre en un proceso de aislamiento y especiación diferencial con respecto al de Chihuahua, por las condiciones particulares del Eje Volcánico Transmexicano (Cantellanos de Rosas 2007, Hernández y Carrasco 2007, García Calderón y cols. 2007).

Perspectiva a futuro en el complejo de especies *Lactarius deliciosus* en México

Debido a que se reconocieron tres morfotipos que se han identificado como *Lactarius deliciosus* en México, es importante conocer mejor las condiciones bióticas y abióticas en las que se desarrolla cada uno de ellos, ya que pudiera ser posible también reconocerlas por sus características ecológicas. Además, la utilización de marcadores moleculares que sean más variables que la región del ITS nos podría ayudar a delimitar mejor a este complejo con base en criterios de taxonomía integrativa y a conocer mejor sus relaciones filogenéticas (Stielow y cols. 2015).

Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.

Lactarius salmonicolor fue reportado por primera vez para México en 1953 por Heim, de los bosques de *Abies* (Figura 22), sin embargo, se ha sugerido que es necesario comparar a detalle los ejemplares mexicanos nombrados como *L. salmonicolor* con la especie europea y de igual forma con *L. thynos* que también es muy parecido (Kong 1994, Nuytinck y cols. 2006).

Los ejemplares mexicanos se pueden separar de *L. salmonicolor* de Europa por caracteres macro y micro mostrados en la Tabla 4 y 5. En nuestros análisis filogenéticos de ML e IB, las secuencias de ejemplares mexicanos identificados como *L. salmonicolor* no están estrechamente relacionados con *L. salmonicolor* de Europa y aparecen relacionadas con las de *L. aestivus* de Estados Unidos (Figura 8 y 10).

En el alineamiento se puede observar un patrón en las secuencias identificadas como *L. salmonicolor* de México, con 4 inserciones de adenina, una timina y 3 adeninas, al inicio de la región ITS1. Además en el análisis de distancia genética presento un porcentaje de diferencia de casi el 3% con respecto a *L. aestivus* (Tabla 8), razón por la cual estas dos especies se pueden delimitar fácilmente. Debido a la variación en las secuencias del material mexicano, la topología del árbol es variable, pero basándonos en la morfología estamos hablando de una sola especie, esta variación en las secuencias se podría deber a la calidad de la secuenciación. *Lactarius aestivus*, la especie más relacionada con *L. salmonicolor* de México, también presenta un patrón de inserciones de adenina al inicio del ITS1, así como *L. barrowsii* de látex rojo y *L. rubriviridis*

la única especie de este género con hábitos hipogeos y de látex rojo. Estas tres especies aparecen relacionadas con *L. salmonicolor* de México en un clado con buen soporte. No sorprende que *Lactarius aestivus* y *L. rubriviridis* sean las especies más relacionadas con *L. salmonicolor* de México, ya que las tres especies se encuentran asociados con árboles del género *Abies* y se ha reportado que es característica ecológica muy importante para delimitar los taxones y entender la evolución de este grupo (Nuytinck y cols. 2007). El hospedero al cual están asociadas las especies de la sección *Deliciosi* es muy importante ya que tiene relación con algunos clados en los análisis filogenéticos, tal es el caso de las especies asociadas con el género *Picea* (*L. deterimus*, *L. fennoscandicus*, *L. aurantiosordidus* y *L. hengduanensis*), que aparecen filogenéticamente relacionadas en los análisis. También se observa esto en *L. porninsis* y *L. splendens*, dos especies de látex blanco asociadas con árboles del género *Larix* y que están estrechamente relacionadas en la filogenia utilizando las regiones ITS y GDP (Nuytinck y cols. 2017).

Basándonos en morfología, la especie *L. salmonicolor* de México se puede separar de *L. aestivus* porque presenta pleurocistidios escasos y queilocistidios escasos o no observados, a diferencia de *L. aestivus* que presenta pleuro y queilocistidios abundantes, el esporoma de *L. aestivus* es más pequeño, y la altura de la ornamentación es notablemente más alta en *L. salmonicolor* de México (hasta 1.2 μ), en comparación con *L. aestivus* donde está reportada como no mayor a 0.5 μ . Las fotos utilizando la técnica de microscopía de barrido electrónico ayudaron a confirmar las diferencias en la altura de la ornamentación. Es necesario un mayor muestreo de las especies *L. aestivus* y *L. salmonicolor sensu auct. Mex.*, ya que las dos crecen asociadas con *Abies* y se desconoce si su distribución se sobrelapa. Se obtuvo una secuencia de Oaxaca, de material identificado como *L. salmonicolor* de México y en los análisis filogenéticos se confirmó que es la misma especie que el material del centro de México, sólo que está asociada con *Abies hickelii* y en cuanto a la morfología, presenta las características de los ejemplares que se distribuyen en el Eje Volcánico Transmexicano.

Material extra con secuencia

Se incluyeron en los análisis dos secuencias obtenidas de los ejemplares identificados como *Lactarius miniatosporus* de las Lagunas de Montebello, Chiapas (Figura 23). Esta especie fue descrita por Montoya y Bandala (2004), para el estado de Veracruz. Ambas se agruparon en un clado bien soportado con la secuencia del ejemplar tipo de *L. miniatosporus* de México y éstas con una secuencia estadounidense de *L. paradoxus*. Es fácil separar a *L. paradoxus* de *L. miniatosporus* porque el primero presenta coloraciones azules muy llamativas en el píleo y estípites, además morfológicamente las esporas de *L. miniatosporus* son más pequeñas (Nuytinck y cols. 2006).



Figura 23. *Lactarius miniatosporus* recolectado en las Lagunas de Montebello, Altos de Chiapas, México.

Dos secuencias obtenidas recientemente de los ejemplares identificados como *Lactarius salmoneus* de Chiapas (Figura 24) se agrupan con una secuencia de Estados Unidos designada en el presente estudio como *L. salmoneus* 2, en un clado bien soportado (Figura 8). Se incluyó otra secuencia como *L. salmoneus* 1 de Estados Unidos y ésta se agrupó con otras dos formando un clado bien soportado dentro del complejo de *L. deliciosus* de Norteamérica (Figura 8 y 9). Esto indica que el nombre de *L. salmoneus* se ha aplicado a más de una especie en Estados Unidos.



Figura 24. *Lactarius salmoneus* de la región de Lagunas de Montebello, Altos de Chiapas, México.

Las regiones ITS mostraron alta efectividad para separar a la especie *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.* ya que en los análisis filogenéticos tuvo buen soporte tanto de BS como de PP. Al parecer, en Norteamérica las regiones ITS sólo son efectivas en las especies

de látex anaranjado asociadas con bosque de *Abies*, como fue el caso *L. aestivus* descrita por Nuytinck y Ammirati (2014). En el caso de las especies mexicanas de látex anaranjado de la sección *Deliciosi* asociadas con bosque de *Pinus*, las regiones ITS no mostraron buena resolución, lo que podría ser debido a que los árboles del género *Pinus* en México se diversificaron recientemente (Gernandt y de la Rosa 2014) y los taxones de *Deliciosi* igualmente se encuentran en un proceso reciente de diversificación, como podrían ser los morfotipos reconocidos dentro de *Lactarius deliciosus sensu auct. Mex.* Que fueron reconocidas en el presente trabajo. Con respecto a los clados de *Deliciosi* menos diversificados, es necesario utilizar un gen o marcador molecular más conservado concatenado con las secuencias de las regiones ITS para inferir con más precisión las relaciones que se presentan entre las otras especies de la sección *Deliciosi*, un gen que posiblemente podría servir es el gen LSU o el RPB2 utilizado en el trabajo realizado por Wisitrassameewong y cols. (2016) para el subgénero *Russularia*, en donde se observaron topologías congruentes y bien soportadas entre las especies analizadas.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se reconocieron tres morfotipos del material mexicano de *Lactarius* sección *Deliciosi* que exudan látex anaranjado y crecen en asociación con *Pinus*. A menudo los tres morfotipos son determinados como *L. deliciosus*. Los análisis filogenéticos soportan la hipótesis de que estos morfotipos representan un linaje que se desarrolla desde las montañas de Chiapas y norte de Centroamérica, hasta los Estados Unidos y Canadá. La diferenciación morfológica observada en las montañas de México, puede representar un proceso de diversificación biológica que distingue a este linaje en esta región del planeta y que algunos taxones pudieran ser endémicos del país y otros propios de regiones más al norte en asociación con otras pináceas.

El material recolectado en las montañas de Chiapas, se distingue por presentar sus láminas más separadas. Esto es muy notorio al compararlo con el material del centro y norte de México. Además presenta esporas con ornamentación más alta y macrocistidios escasos o ausentes, que la hacen distintiva desde el punto de vista morfológico con respecto a los otros taxones con látex anaranjado. Es probable que represente una nueva especie, sin embargo, es necesario obtener mayor evidencia con otros marcadores moleculares para poder conocer mejor las relaciones dentro del linaje. Crece en los bosques mesófilos de la región de las Lagunas de Montebello, en asociación con *Pinus* en los Altos de Chiapas.

El material de Chihuahua se distingue por el color más pálido, crema anaranjado, con pocas zonaciones más marcadas hacia el margen y pocas en el centro del píleo. Sus láminas son juntas o muy juntas y crece en los bosques de *Pinus* de la Sierra Tarahumara en Chihuahua, Sierra Madre Occidental. Microscópicamente, sus esporas presentan una ornamentación más densa en relación con los demás taxa mexicanos de látex anaranjado. Además presenta cistidios abundantes, este carácter lo hace claramente distinto a los ejemplares del centro de México y Chiapas.

En los bosques de pino del centro de México se desarrolla un taxón de color anaranjado a anaranjado rojizo con zonaciones bien marcadas y láminas juntas o muy juntas. Es muy similar al material de Chihuahua, pero se distingue por tener las zonaciones más marcadas y su

coloración es ligeramente más oscura, anaranjado rojizo. Sus esporas tienen una ornamentación menos densa y los macrocistidios son escasos o ausentes.

De manera general el estípote en este linaje es corto y a menudo no presenta escrobículas. En Europa, *Lactarius deliciosus* con frecuencia sí las presenta. En América está adaptado a los bosques de *Pinus* y es muy probable que se encuentre en un proceso de diversificación como ha sucedido con los pinos en las montañas de México.

Los caracteres morfológicos importantes para separar los tres morfotipos fueron la frecuencia de las láminas, el tamaño y altura de la ornamentación de esporas, la abundancia de macrocistidios y la forma de los pseudocistidios.

Todas las especies de látex anaranjado identificadas como *L. deliciosus*, con distribución en Norteamérica y asociadas con *Pinus*, están estrechamente relacionadas, sin embargo, la región de los ITS no es un carácter útil para conocer bien las relaciones filogenéticas en este linaje. Su distribución a lo largo de diferentes bosques de pino, desde la región Ártica de Estados Unidos y Canadá al norte hasta la región Neotropical de México y norte de Centroamérica posiblemente ha favorecido su diversificación.

El hongo mexicano que exuda látex anaranjado y que crece en asociación con *Abies religiosa*, comúnmente se ha identificado como *L. salmonicolor*, sin embargo, presentan diferencias morfológicas, genéticas y biogeográficas con respecto a *L. salmonicolor* de Europa, razón por la cual la hemos considerado como una especie nueva para la ciencia. La filogenia del ITS relaciona al material mexicano con *Lactarius aestivus*, que también se asocia con *Abies* y se presenta en el oeste de Estados Unidos. Se pueden separar debido a que la especie mexicana presenta un color ligeramente más anaranjado rojizo, estípote ligeramente más largo y las esporas presentan ornamentación más alta, hasta de 1.2 μm .

10. PERSPECTIVAS

Se debe continuar con la búsqueda de otros genes o marcadores moleculares que permitan correlacionar esa variabilidad morfológica observada con lo molecular, ya que las regiones de los ITS no presentó suficiente resolución en el linaje de *Lactarius deliciosus* en Norteamérica, como fue observado en la morfología, con el reconocimiento de tres posibles taxones diferentes.

Se deben recolectar nuevos ejemplares y registrar detalladamente los datos de campo, morfológicos y ecológicos, para conferir robustez a las hipótesis acerca de la existencia de varios taxones con látex anaranjado, ya que son los caracteres visibles para la delimitación de especies en estos hongos.

Es necesario ampliar las zonas y esfuerzo de muestreo en otras partes de México, como la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre del Sur, para documentar a la posible variación y la distribución de los taxones reconocidos y definir el grado de endemismos que presenta este linaje en México.

11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Aguirre J, y Duivenvoorden J. 2005. Podemos proteger especies en riesgo en áreas protegidas? Un estudio de caso del género *Pinus* en México. *Rev. Mex. Biodiv* 76: 2
- Arteaga B, Moreno C. 2006. Los hongos comestibles silvestres de santa Catarina del monte, Estado de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 12(2): 125-131.
- Baum D, y Smith S. 2012. TREE THINKING An Introduction to Phylogenetic Biology
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J y Wheeler DL. 2004 GenBank: update. *Nucleic Acids Res.* 32: D23–D26.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Krista K. Ingram KK, y Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology y Evolution* 22: (3) 148-155
- Boa E. 2005. *Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población.* FAO.
- Buyck B, Hofstetter V, Eberhardt U, Verbeken A, y Kauff F. 2008. Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricompactae*. *Fungal Diversity* 28: 15-40.
- Buyck B, y Hofstetter V. 2011. The contribution of *tef-1* sequences to species delimitation in the *Cantharellus cibarius* complex in the southeastern USA. *Fungal Diversity.* 49: 35–46.
- Cantellano de Rosas E. 2007. Reconocimiento espacial de los paisajes. In: Luna, I, Morrone JJ y Espinosa D (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana.* Conabio, UNAM, México DF. Pp. 39-55.
- Chávez G, Gómez VM y Gómez M. 2009. Riqueza de macromicetos del parque nacional barranca del Cupatitzio, Michoacán, México. *Revista Ciencia Forestal en México* 34: 105.

- Córdova O, Medel R, Mata G, Castillo R y Vázquez J. 2014. Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *Madera y Bosques* 20: (1) 97-106.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- David S. Gernandt y Jorge A. Pérez-de la Rosa JA. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S126-S133
- De Crop E, Nuytinck J, Van de Putte K, Wisitrassameewong K, Hackel J, Stubbe D, Hyde KD, Roy M, Halling RE, Moreau A, Eberhardt U, 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 Luna E, Guerrero JA, Taracena T. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15: (3) 351-370.
- Díaz R, Marmolejo JG, Valenzuela R. 2005. Flora micológica de pino y pino y encino en Durango México. *Ciencia UANL* 1: 362–369.
- Doniz L, Cárdenas JF, Martínez VM, Acosta I. 2010. Estudio de hongos macromicetos en la estación las palomas de la cuenca de la esperanza, del estado de Guanajuato. *Revista Académica de Investigación*.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.
- Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X. 2007. Ecología molecular. Secretaría de medioambiente y recursos naturales.
- Ferrari L, Valencia-Moreno M y Bryan S. 2005. Magmatismo y tectónica en la Sierra Madre Occidental y su relación con la evolución de la margen occidental de Norteamérica. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LVII (3): 343-378.

- Ferrusquía-Villafranca, I. 2007. Ensayo sobre la caracterización y significación biológica. In: Luna, I, Morrone JJ y Espinosa D (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. Conabio, UNAM, México DF. Pp. 7-23.
- Franco-Maass S, Burrola-Aguilar C, Arana-Gabriel Y y García-Almaraz LA. 2016. A local knowledge-based approach to predict anthropic harvesting pressure zones of wild edible mushrooms as a tool for forest conservation in Central México. *Forest Policy and Economics* 73: 239-250.
- Fujita M, Leache´ A, Burbrink F, McGuire J, y Craig M. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27: (9) 480-488.
- García Calderon NE, Krasilnikov P, Valera Pérez MA y Torres Trejo E. Suelos. In: Luna, I, Morrone JJ y Espinosa D (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. Conabio, UNAM, México DF. Pp. 73-98.
- Garibay R, Cifuentes J, Estrada A y Caballero J. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, México. *Fungal Diversity* 21: 41-67.
- Geml J, Laur Sen AG, Timling I, MCFarland J, Booth MG, Lennon N, Nusbaum C y Taylor DL. 2009. Molecular phylogenetic biodiversity assessment of arctic and boreal ectomycorrhizal Lactarius Pers. (Russulales; Basidiomycota) in Alaska, based on soil and sporocarp DNA. *Molecular Ecology* 18: 2213–2227.
- Gil M, Anismova M. 2015. Methodologies for Phylogenetic Inference
- González P, Martínez D, Sánchez M, Aliphath M y Estrada A. 2002. *Rural management and marketing of wild edible mushrooms in México*. Proceed. IV International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products: 433-443, Cuernavaca, México.
- González-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fernández-Riverola F, Posada D. 2010. ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*. Web Server issue. ISSN: 0305-1048
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq321>

- Gouy M, Guindon S y Gascuel O. 2010. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307-21.
- Guzmán G. 1977. *Identificación de hongos comestibles, venenosos y alucinantes*. Limusa, México DF.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Heilmann-Clausen J, Verbeken A y Vesterholt J. 1998. *The genus Lactarius*. Fungi of Northern Europe Vol. 2. The Danish Mycological Society.
- Hernandez H. *Macromicetos de una región de Mineral del Chico, Hidalgo: una aproximación a la Etnomicología*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Hernández ME y Carrasco G. Rasgos climáticos más importantes. In: Luna, I, Morrone JJ y Espinosa D (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. Conabio, UNAM, México DF. Pp. 57-72.
- Herrera MJ, Guzmán L, Rodríguez O. 2002. Contribución al conocimiento de la micobiota de la región de San Sebastián del Oeste Jalisco México. *Acta Botánica Mexicana* 58: 19-50.
- Hesler LR y Smith AH. 1979. *North American species of Lactarius*. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Hillis D, y Dixon M. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: (4) 411-453.
- Jargeat P, Martos F, Carriconde F, Gryta H, Moreau PA y Gardes M. Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma sculpturatum* complex (Basidiomycota). *Molecular Ecology* 19: 5216–5230

- 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.
- 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, Põldmaa 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.
- Kornerup A y Wanscher JH. 1978. *Methuen Handbook of Colour*. Methuen London.
- 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: 61-94.
- Lee H, Park MS, Jung PE, Fong JJ, Oh SY, Verbeken A y Lim YW (2015). *Lactarius cucurbitoides* (Russulales, Basidiomycota), a new species from South Korea supported by molecular and morphological data. *Phytotaxa* 205 (3): 168–176.
- Mahmoud AG, y Zaher EHF. 2015. Why Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) has been Selected as the DNA Barcode for Fungi?. *Advancements in Genetic Engineering* 4: 2.

- Martínez A y Roldán IE. 2013. Macromycetes register at conservation and wildlife research center (CWRC) of San Cayetano, State of México. *Revista Digital del Departamento* 1 (1): 33-41.
- Miller SL, McClean TM, Walker JF y Buyck B. 2001. A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. *Mycologia* 93(2): 344-354.
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J y Caballero J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, México. *Fungal Diversity* 17: 115-143.
- Morrone J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76:2
- Morrone JJ. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76(2): 207-252.
- Nguyen N, Landeros F, Garibay R, Hansen K y Vellinga E. 2013. The *Helvella lacunosa* species complex in western North America: cryptic species, misapplied names and parasites. *Mycologia* 105: (5) 1275-1286.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, y Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193–201.
- Nuytinck J y Ammirati JF. 2014. A new species of *Lactarius* sect. *Deliciosi* (Russulales, Basidiomycota) from western North America. *Botany* 92(10): 767-774.
- Nuytinck J, Miller S y Verbeken A. 2006. A taxonomical treatment of the North and Central American species in *Lactarius* sect. *Deliciosi*. *Micotaxon*. Volume 96: 261-307.
- Nuytinck J, Verbeken A y Miller SL. 2007. Worldwide phylogeny of *Lactarius* section *Deliciosi* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 99(6): 820-832.

- Nuytinck J, Verbeken A, Saar I, Lambert H, Berube J, y Voitk A 2017. *Lactarius splendens*, a second species with white latex in *Lactarius* section *Deliciosi*.
- Nuytinck J, y Verbeken A. 2003. *Lactarius sanguifluus* versus *Lactarius vinosus* – molecular and morphological analyses. *Mycological Progress* 2(3): 227–234, August 2003
- Nuytinck J. 2005. *Lactarius* section *Deliciosi* (Russulales, Basidiomycota) and its ectomycorrhiza: a morphological and molecular approach. Tesis de Doctorado, Universidad de Gent, Bélgica.
- Olivares AR. 2008. Estudio de algunos hongos ectomicorrizogenos comestibles. Tesis de licenciatura
- Pacheco-Cobos L, Rosetti MF, Montoya A y Hudson R. 2015. Towards a traditional ecological knowledge-based monitoring scheme: a proposal for the case of edible mushrooms. *Biodiversity and Conservation* 24(5): 1253–1269.
- Pante E, Schoelinck C, y Puillandre N. 2014. From Integrative Taxonomy to Species Description: one Step Beyond. *Systematic Biology* 64: (1) 152–160.
- Porras CF, (2014). “Descripción microscópica de ejemplares del género *Lactarius* de las secciones *Uvidus* y *Zonarii* en guatemala”. Tesis de licenciatura.
- 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/>
- Ramirez S, Tulloss RE, Amalfi M, Y Moncalvo JM. 2015. Palaeotropical origins, boreotropical distribution and increased rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms (*Amanita* section *Caesareae*). *Journal of Biogeography* 42: 351–363.
- Ramsden JJ. 2009. *Bioinformatics. Genomics* 13: 1-16.

- Ratnasingham, S. y Hebert, P. D. N. 2007. The Barcode of Life Data System.
www.barcodinglife.org
- Reyes A, Martínez M, Hernández AI, Pastrana BR. 2008. Estudio del espacio interno transcrito nuclear para identificar hongos comestibles ectomicorrizógenos.
- Rinaldi AC, Comandini O y Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1-45.
- Robles L, Huerta G, Andrade R y Ángeles H. 2007. Conocimiento tradicional sobre los macromicetos en dos comunidades Tseltales de Oxchuc, Chiapas, México. *Etnobiología* 5: 21-35.
- Ronquist F y Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572-1574.
- Sánchez A. 2010. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 875 - 882, 2010
- Sánchez S, Tullos R, Guzman L, Cifuentes J, Valenzuela R, Estrada A, Ruan F, Díaz R, Hernandez N, Torres M, Leon H y Marc J. 2015. In and out of refugia: historical patterns of diversity and demography in the North American Caesar's mushroom species complex. *Molecular Ecology* 24, 5938–5956.
- Sanger F, Nicklen S, y Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463–5467.
- Schlick-Steiner B, Steiner F, Seifert B, Stauffer C, Christian E, y Crozier RH. 2009. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55:421–38.
- Schocha CL, Seifertb KA, Huhndorfc S, Robertd V, Spougea JL, Levesqueb CA, Chenb W, y Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: (16) 6241–6246.

- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Fourth edition, Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Stamatakis A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*30(9): 1312-1213.
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, Lomascolo A, Welti S, Lesage-Meessen L, Favel A, Al-Hatmi AMS,7,24, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W, Binder M, Vaas LAI, Vu D, Yurkov A, Begerow D, Roehl O, Guerreiro M, Fonseca A, Samerpitak K, Diepeningen AD, Dolatabadi S, Moreno LF, Casaregola S, Mallet S, Jacques N, Roscini L, Egidi E, Bizet C, Garcia-Hermoso D, Martín MP, Deng S, Groenewald JZ, Boekhout T, de Beer ZW, Barnes I, Duong TA, Wingfield MJ, de Hoog GS, Crous PW, Lewis CT, Hambleton S, Moussa TAA, Al-Zahrani HS, Almaghrabi OA, Louis-Seize G, Assabgui R, McCormick W, Omer G, Dukik K, Cardinali G, Eberhardt U, de Vries M, Robert V. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 35: 242–263.
- Stubbe D, Nuytinck J, Verbeken A. 2010. Critical assessment of the *Lactarius gerardii* species complex (Russulales). *Fungal Biology* 114(2–3): 271-283.
- Taylor AFS y Alexander I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19 (3): 102-112.
- Trudell S, Xu J, Saar I, Justo A, y Cifuentes J. 2017. North American matsutake: names clarified and a new species described. *Mycologia* 109: (3) 379-390.

- Velasco de León M, P, Arellano Gil J, Silva-Pineda A y Yussim Guarneros S. 2007. Aspectos geológicos y paleontológicos. In: Luna I, Morrone JJ y Espinosa D (eds). Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. Conabio, UNAM, México DF. Pp. 25-38.
- Verbeken A, Hampe F, Wissitrassameewong K, Hyde K, Eberhardt U y Nuytinck J (2014). A new angiocarpous *Lactarius* species from Thailand. *Phytotaxa* 181 (3): 163–170.
- 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* 32: 13 –24.
- Verbeken A. 1997. Biodiversity of the genus *Lactarius* pers. in tropical África. Tesis de doctorado
- Verde A, Fajardo J, Roldan R, Rivera D, Obón C, Blanco D, y Rodríguez C, (2015). Revisión sobre el conocimiento tradicional del género *Lactarius* (Russulaceae) en España. *Bol. Soc. Micol. Madrid.* 39: 265-286.
- Wang X. 2017. Three New Species of *Lactarius* Sect. *Deliciosi* from Subalpine-Alpine Regions of Central and Southwestern China. *Cryptogamie, Mycologie* 37(4):493-508.
- Wisitrassameewong K, Looney BP, Le HT, De Crop E, Das K, Van De Putte K, Eberhardt U, Jiayu G0, Stubbe D, Hyde KD, Verbeken A, Nuytinck J. 2016. *Lactarius* subgenus *Russularia* (Basidiomycota, Russulales): novel Asian species, worldwide phylogeny and evolutionary relationships.
- Wuang XH, Nuytinck J, Verbeken A. 2015. *Lactarius vividus* sp. nov. (Russulaceae, Russulales), a widely distributed edible mushroom in central and southern China. *Phytotaxa* 231 (1).
- Yeates, D, Seago A, Nelson L, Cameron S, Joseph L, y Trueman J. 2011. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. *Systematic Entomology* 36: 209–217.

12. ANEXOS

12. 1 Tablas

Tabla 2. Lista de secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos.

Especies	Colección	Procedencia	No de acceso a GenBank
<i>Lactarius aestivus</i>	JN 2008-032 (GENT) Tipo	USA (Washington)	KJ769670
<i>L. aestivus</i>	JFA 13112 (WTU)	USA (Washington)	KJ769667
<i>L. aestivus</i>	JFA 13128 (WTU)	USA (Washington)	KJ769668
<i>L. akahatsu</i>	Aimi T. 33157 (NBRC)	Japan (Tottori)	AB301609
<i>L. akahatsu</i>	X.H. Wang 2558 (KUN-HKAS)	China (Jilin)	KT163421
<i>L. akahatsu</i>	Seok S.J. ASIS24788	Rep. de Corea (Kyonggi-do)	KF692072
<i>L. deliciosus</i>	JFA 13368 (WTU)	USA (Washington)	KJ769673
<i>L. deliciosus</i> var. <i>olivaceosordidus</i>	JA 10762 (RMS)	USA (Washington)	EF685059
<i>Lactarius</i> sp.	SLM 9878 (RMS)	USA (Oregon)	EF685086
<i>Lactarius</i> aff. <i>deliciosus</i>	EB0047 (MONT)	USA (Colorado)	KX394290
<i>L. deliciosus</i> sensu Hesler and Smith 1979	JFA 13371 (WTU)	USA (Washington)	KJ769674
<i>L. deliciosus</i> var. <i>deterimus</i>	SLM 214-03 (RMS)	USA (California)	EF685095
<i>L. deliciosus</i> sensu Hesler and Smith 1979	JFA 13368 (WTU)	USA (Washington)	KJ769673
<i>L. deliciosus</i>	JFA 13368 (WTU)	USA (Washington)	KJ769673
<i>L. aff. deliciosus</i>	UAMH 5511 (UV)	España (Valencia)	AF093456
<i>L. deliciosus</i> var. <i>deterimus</i>	EB089-15 (MONT)	USA (Montana)	KX394288
<i>L. aff. deliciosus</i>	JRH 650 (RMS)	USA (Wyoming)	EF685056

<i>Lactarius</i> sp.			
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detrerrimus</i>	EB0063-14 (MONT) GAL17353	USA (Montana) USA (Alaska)	KX394287 EU711600
<i>L. aff. deliciosus</i>	2219-QFB-25920	Canada (Quebec)	KJ705191
<i>Lactarius</i> sp.			
<i>L. deliciosus</i> var. <i>olivaceosordidus</i>	EB107-15 (MONT)	USA (Montana)	KX394289
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detrerrimus</i>	GAL16885 PBM 2054 (RMS)	USA (Alaska) USA (Oregon)	EU711587 EF685058
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detrerrimus</i>	3718	Canada (Quebec)	KJ705192
<i>Lactarius</i> sp.			
<i>L. deliciosus</i>	JN 2003-041b (GENT)	USA (Wyoming)	EF685052
<i>Lactarius</i> sp.			
	GAL12636	USA (Alaska)	EU711568
<i>Lactarius</i> sp.	SMI210	Canada (Columbia britanica)	FJ845418
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detrerrimus</i>	SLM 9666 (RMS)	USA (North Carolina)	EF685080
<i>L. deliciosus</i> var. <i>areolatus</i>	GB 943 (VTMH 1057)	USA (Virginia)	EF685048
<i>L. deliciosus</i>	JN 2003-017 (GENT)	USA (Wyoming)	EF685050
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX			
	JW 381 (RMS)	USA (Colorado)	EF685054
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX			
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX	FFP144	Canada (Athabasca)	
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX	G. Ramirez	México (Ciudad de México)	JQ711835
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX		México (Chihuahua)	
<i>Lactarius</i> sp	AKL 1436 (TLXM)	México (Chiapas)	
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX	AKL 4936 (TLXM)	México (Chihuahua)	
	AKL 1480 (TLXM)		
<i>L. deliciosus</i> ss <i>auct</i> MX	G. Cruz 06	México (Ciudad de México)	

<i>L. deliciosus ss auct MX</i>	G. Sanchez 159	México (Ciudad de México)	
<i>L. deliciosus ss auct MX</i>	G. Ramirez 44	México (Chiapas)	
<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>	AKL 4941 (TLXM)	México (Chihuahua)	
<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>	AKL 1480 (TLXM)	México (Chihuahua)	
<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>	AKL 1437 (TLXM)	México (Ciudad de México)	
	C. Estrada HC-PNNT-024 (MEXU)	México (Ciudad de México)	KT875047
	C. Burrola AR09560 (MEXU)	México (Ciudad de México)	KT875048
	C. Burrola AR09811		KT875049
<i>L. quieticolor</i>	SLM 192-03 (RMS)	Suecia	EF685092
<i>L. quieticolor</i>	hue141	Alemania	UDB000321
<i>L. rubrilacteus</i>	JFA 13171 (WTU)	USA (California)	KJ769677
<i>L. rubrilacteus</i>	SLM 19-04 (RMS)	USA (California)	EF685085
<i>L. rubrilacteus</i>	AEF 1055 (MICH)	USA (Arizona)	EF685083
<i>L. splendens</i>	QFB-28541	Canada (Quebec)	KY513921
<i>L. splendens</i>	DAOM 740080	Canada (T. y Labrador)	KY513923
<i>L. splendens</i>	GENT AV2013-006	Canada (Quebec)	KY513924
<i>L. sanguifluus</i>	V.D.K.O. no number (BR)	Belgium	KJ769678
<i>L. sanguifluus</i>	S38	Francia (Cedex)	AF249291
<i>L. sanguifluus</i>	V. Liiv TU106141	Estonia (Saare maakond)	UDB015782
<i>L. subindigo</i>	MC 05-300 (GENT)	Nepal	KJ769679
<i>L. subindigo</i>	K259-99 (RMS)	India	EF685068
<i>L. subindigo</i>	M. Härkönen Kiina 114 (H, GENT)	China (Hunnan)	EF685073
<i>L. thynos</i>	Voitk 09-09-06 (priv. herb.)	Canada (Newfoundland)	KJ769680
	2713		

<i>L. thynos</i>	SLM 9648 (RMS)	Canada (Quebec)	KJ705196
<i>L. thynos</i>		USA (New York)	EF685102
<i>L. vinosus</i>	RM Dähncke 3138 (priv. herb.)	Spain (Canary Islands)	KJ769681
<i>L. vinosus</i>	AP y GH 230 (GENT)	Turquia (Samsun)	DQ922542
<i>L. vinosus</i>	B. Ruiz-Diez 51 (CCMA)	España (Madrid)	AY953420
<i>L. barrowsii</i>	NG 91878 (RMS)	USA (Idaho)	EF685047
<i>L. barrowsii</i>	AEF 1271 (MICH)	USA (Arizona)	EF685046
<i>L. barrowsii</i>	EB015-15 (MONT)	USA (Montana)	KX394279
<i>L. aurantiosordidus</i>	SLM 213-03 (RMS)	USA (California)	EF685094
<i>L. aurantiosordidus</i>	MBN0213_01	Canada (Quebec)	KC840610
<i>L. indigo</i>	SLM 9579 (RMS)	USA (West Virginia)	EF685067
<i>L. indigo</i>	Lamus139F	México (Estado de México)	JN613159
<i>L. indigo</i>	SLM 9579 (RMS)	USA	EF685067
<i>L. hatsudake</i>	38541 (HKAS)	China (Yunnan)	EF685063
<i>L. hatsudake</i>	BJ1-1	China (Yunnan)	KX527868
<i>L. hatsudake</i>	24414 (TMI)	Japon (Kagoshima)	EF141555
<i>L. chelidonium</i>	SLM 9649 (RMS)	USA (New York)	EF685049
<i>L. deliciosus</i>	39045 (HKAS)	China (Yunnan)	EF685053
<i>L. deliciosus</i>	JN2001-046 (GENT)	Eslovaquia	KF133272
<i>L. deliciosus</i>	2006-09-12-2	Reino Unido	UDB002381
<i>L. deliciosus</i>	PUN7031	India (Punjab)	KP115212
<i>L. deliciosus</i>	178	España (Barcelona)	DQ116888
<i>L. vividus</i>	GX2 (CSUFTD)	China (Guangxi)	JX852629
<i>L. vividus</i>	X.H. Wang 2987 (KUN-HKAS)	China (Shangdong)	KT163436
<i>L. vividus</i>	X.H. Wang 3039 (KUN-HKAS)	China (Hubei)	KT163433

<i>L. fennoscandicus</i>	AV 97-530 (GENT)	Suecia	DQ922510
<i>L. fennoscandicus</i>	OKM 17447 (RMS)	Finlandia	EF685061
<i>L. fennoscandicus</i>	V. Liiv TU106311	Estonia	UDB011462
<i>L. deterrimus</i>	J. Nuytinck 2000-002	Belgica (Namur)	DQ922523
<i>L. deterrimus</i>	U. Eberhardt lw104	Alemania (Tuebingen)	AF140266
<i>L. deterrimus</i>	TU106157	Estonia	UDB015788
<i>L. porninsis</i>	JN 2002-019 (GENT)	Italia	DQ922546
<i>L. porninsis</i>	GENT:JN2002-025	Italia (Trentino)	KY513926
<i>L. porninsis</i>	fo46805	Alemania	UDB000369
<i>L. salmonicolor</i>	JN 2001-123 (GENT)	Francia	DQ922549
<i>L. salmonicolor</i>	JN 2001-087 (GENT)	Belgica	DQ922548
<i>L. salmonicolor</i>	hue182	Alemanis	UDB000310
<i>L. semisanguifluus</i>	taxon:93012	Francia	AF249292
<i>L. semisanguifluus</i>	SLM 197-03 (RMS)	Suecia	EF685093
<i>L. semisanguifluus</i>	hue149	Alemania	UDB000320
<i>L. pseudodeliciosus</i>	D. Mitchell 02-2002 (RMS)	USA Florida	EF685082
<i>L. miniatosporus</i>	3830 (XAL)	México (Xalapa)	EF685078
<i>L. miniatosporus</i>	A. Montoya 1941 (TLXM2323)	México (Chiapas)	
<i>L. miniatosporus</i>	A. Ramirez (TLXM2323)	México (Chiapas)	
<i>L. paradoxus</i>	DM 1-02-2002 (RMS)	USA (Florida)	EF685081
<i>L. horakii</i>	9983 (ZT)	Indonesia (Java)	EF685070
<i>L. horakii</i>	TU110767	Malasia (Fraser hill)	UDB013364
<i>L. subpurpureus</i>	SLM 9572 (RMS)	USA (Virginia)	EF685100
<i>L. subpurpureus</i>	JHR 574 (RMS)	USA (Virginia)	EF685099
<i>L. salmoneus</i>	BK 14-00 (RMS)	USA (Mississippi)	EF685090
<i>L. salmoneus</i>	CMG 144 (TLXM)	México (Chiapas)	
<i>L. salmoneus</i>	CMG 145 (TLXM)	México (Chiapas)	

<i>L. rubriviridis</i>	DED 7312 (SFSU) TYPUS	USA (California)	EF685088
<i>L. abieticola</i>	KUN-HKAS 73508	China (Yunnan)	KY174936
<i>L. abieticola</i>	KUN-HKAS 61973	China (Yunnan)	KY174941
<i>L. abieticola</i>	KUN-HKAS 86038	China (Yunnan)	KY174950
<i>L. hengduanensis</i>	KUN-HKAS 62011	China (Yunnan)	KY174923
<i>L. pseudohatsudake</i>	KUN-HKAS 60404	China (Yunnan)	KY174912
<i>L. pseudohatsudake</i>	KUN-HKAS 68190	China (Yunnan)	KY174901
<i>L. pseudohatsudake</i>	KUN-HKAS 69426		KY174917
<i>L. laeticolor</i>	23149 (TMI)	Japon	EF685077
<i>L. laeticolor</i>	OKM21714 (RSM)	Japon (Tottori)	EF685091
<i>L. indigo var diminutivus</i>	MCA 811 (RMS)	USA (West Virginia)	EF685066
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	M. Díaz1 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	M. Díaz2 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	M. Díaz3 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	M. Díaz4 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	M. Díaz5 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	AKL 1406 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	AKL 1409 (TLXM)	México (Tlaxcala)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	V.Ramirez Cruz 3338	México (Oaxaca)	
<i>L. salmonicolor auct MX</i>	A. Montoya (TLXM)	México (Puebla)	
<i>L. cf. sanguifluus</i>	C. Burrola CB0813	México (Estado de México)	KT875043
<i>L. cf. sanguifluus</i>	C. Burrola CB08304	México (Estado de México)	KT875041
<i>L. cf. sanguifluus</i>	A. Espinoza HC- PNNT-122	México (Estado de México)	KT875039
<i>L. cf. sanguifluus</i>	N, D Anastacio HC- PNNT-274	México (Estado de México)	KT875040
<i>L. cf. sanguifluus</i>	N, D Anastacio HC- PNNT-046	México (Estado de México)	KT875045

<i>L. cf. sanguifluus</i>	A. Ruiz AR09527	México (Estado de México)	KT875044
<i>L. cf. sanguifluus</i>	C. Burrola CB08422		KT875042
<i>L. aff wenquanensis</i>	LTH143 (GENT)	Tailandia	EF141537
<i>L. pseudodelicatus</i>	CLC512 (MONT)	USA (Idaho)	KX394295
<i>L. torminosus</i>	JN11-086	Grecia	KR025613
<i>L. psammicola</i>	BPL869	USA (Tennessee)	KY848507
<i>L. haugiae</i>	LM4957	México	KT583640
<i>L. haugiae</i>		México (Ciudad de México)	
<i>L. aspideoides</i>	RL Shaffer 6957 (MICH)	USA (Michigan)	KR090893
<i>L. flavopalustris</i>	JV23334 (TURA)	Finlandia (Koillismaa)	KR090904
<i>L. uvidus</i>	GENT:Walley 2119	Suecia	KJ742416
<i>L. scrobiculatus</i>	732	Italia	JF908281
<i>L. alnicola</i>	EB0064-14 (MONT)	USA (Montana)	KX394276
<i>L. mexicanus</i>		México	
<i>L. auranticus</i>	hue179	Alemania	UDB000312
<i>L. obscuratus</i>	GC03090105	Francia	HQ714758
<i>L. subdulcis</i>	KW135	Belgica	KT165261
<i>L. fuliginosus</i>	hue161	Alemania	UDB000388
<i>L. fumosibrunneus</i>	EG10	México	JN797633
<i>L. lignyotus</i>	GENT:R. Walley 1272	Francia	JQ446112

Tabla 3. Material estudiado de la sección *Deliciosi* de México.

Ejemplares	Procedencia	Año	Especies
A. Kong 4941 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 4569 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Montoya 1936 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
7190 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 4936 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Montoya 105 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 2457 (TLXM)	Chiapas	2005	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 2216 (TLXM)	Tlaxcala	1991	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 2208 (TLXM)	Tlaxcala	1991	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 2220 (TLXM)	Tlaxcala	1991	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 464 (TLXM)	Tlaxcala	1987	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 1992 (TLXM)	Tlaxcala	1991	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 1436 (TLXM)	Chihuahua	2014	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
A. Kong 1480 (TLXM)	Chihuahua	2014	<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
G. Cruz 06	Ciudad de México		<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
G. Sanchez 159	Ciudad de México		<i>Lactarius sp.</i>
G. Ramirez 44	Ciudad de México		<i>L. deliciosus ss auct MX</i>
C. Estrada HC-PNNT-024 (MEXU)	Estado de México		<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>
C. Burrola AR09560 (MEXU)	Estado de México		<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>
C. Burrola AR09811	Estado de México		<i>L. deliciosus var. deterrimus</i>
A. Kong 2040 (TLXM)	Tlaxcala	1991	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
A. Kong 1846 (TLXM)	Tlaxcala	1990	<i>L. salmonicolor auct MX</i>

A. Kong 500 (TLXM)	Tlaxcala	1987	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
A. Kong 258 (TLXM)	Tlaxcala	1987	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
R. Heim 4440 (MEXU)	Oaxaca	1956	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
A. Kong <i>L. chelidonium</i>	Tlaxcala	1991	<i>L. chelidonium</i>
M. Díaz1 (TLXM)	Tlaxcala	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
M. Díaz2 (TLXM)	Tlaxcala	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
M. Díaz3 (TLXM)	Tlaxcala	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
M. Díaz4 (TLXM)	Tlaxcala	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
M. Díaz5 (TLXM)	Tlaxcala	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
V. Ramirez Cruz 3338	Oaxaca	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
J. Garcia no 19, 301	Oaxaca	2013	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
A. Montoya (TLXM)	Estado de México	2016	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
F. Hernandez 55	Tlaxcala	2009	<i>L. salmonicolor auct MX</i>
C. Burrola CB0813	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>
C. Burrola CB08304	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>
A. Espinoza HC-PNNT-122	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>
N, D Anastacio HC-PNNT-274	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>
N, D Anastacio HC-PNNT-046	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>
A. Ruiz AR09527	Estado de México	2009	<i>L. cf. sanguifluus</i>
C. Burrola CB08422	Estado de México	2008	<i>L. cf. sanguifluus</i>

Tabla 4. Principales caracteres macroscópicos para delimitar a *L. salmonicolor sensu auct. Mex.*

Especie	Pileo - diámetro	Estípite - longitud	Escrobículas	Látex - cambio de color
<i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.</i>	6-15 cm	4-10 cm	A veces presentes	No cambia
<i>Lactarius salmonicolor de Europa</i>	4-19 cm	2-7 cm	Presentes	Rojo vináceo después de 30 minutos
<i>Lactarius aestivus</i>	4-10 cm	3-6 cm	Presentes, a veces ausentes	Naranja oscuro después de una hora

Tabla 5. Caracteres microscópicos para delimitar a los ejemplares identificados como *L. salmonicolor sensu auct. Mex.*

Especie	Tamaño de esporas	Altura de la ornamentación	Pleurocistidios	Queilocistidios
<i>Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.</i>	7.8-9.4 μm de largo	Hasta 1.2 μ	Escasos	Ausentes
<i>Lactarius salmonicolor de Europa</i>	8.5-11.8 μm de largo	Hasta 0.5 μ	Abundantes	Abundantes
<i>Lactarius aestivus</i>	8.5-9.9 μm de largo	Hasta 0.5 μ	Abundantes	Abundantes

Tabla 6. Material estudiado bajo microscopía electrónica de barrido.

Taxón	Recolector	Número	Procedencia	Herbario
<i>L. deliciosus</i>	A. Kong	14-36, 14-37, 14-80	Chihuahua	TLXM
<i>L. deliciosus</i>	R. Garibay	CDMX1	Ciudad de México	MEXU
<i>L. deliciosus</i>	C. Estrada	HC-PNNTR-024	Estado de México	MEXU
<i>L. deliciosus</i>	A. Ruiz	AR09811	Estado de México	MEXU
<i>L. deliciosus</i>	A. Kong	4941	Chiapas	TLXM
<i>L. salmonicolor</i>	C. Burrola	0913	Estado de México	MEXU
<i>L. salmonicolor</i>	J. García	19301	Oaxaca	ITCV
<i>L. salmonicolor</i>	R. Heim	4440	Oaxaca	MEXU
<i>L. salmonicolor</i>	A. Kong	14-06	Tlaxcala	TLXM
<i>L. salmonicolor</i>	M. Díaz	1	Tlaxcala	TLXM

12.2 Figuras

```

-----
*                               *
*   AKAIKE INFORMATION CRITERION (AIC)   *
*                               *
-----
Model selected:
Model = TIM2ef+I+G
partition = 010232
-lnL = 5063.2099
K = 347
R(a) [AC] = 2.3077
R(b) [AG] = 8.4505
R(c) [AT] = 2.3077
R(d) [CG] = 1.0000
R(e) [CT] = 14.8385
R(f) [GT] = 1.0000
p-inv = 0.4120
gamma shape = 0.5950

```

Figura 5. Criterio de información de AKAIKE

```

-----
*                               *
*   BAYESIAN INFORMATION CRITERION (BIC)   *
*                               *
-----
Sample size: 732.0

Model selected:
Model = TIM2ef+I+G
partition = 010232
-lnL = 5063.2099
K = 347
R(a) [AC] = 2.3077
R(b) [AG] = 8.4505
R(c) [AT] = 2.3077
R(d) [CG] = 1.0000
R(e) [CT] = 14.8385
R(f) [GT] = 1.0000
p-inv = 0.4120
gamma shape = 0.5950

```

Figura 6. Resultados Criterio de Información Bayesiana

Statistic	Mean	ESS	...
LnL	-5547.4...	2216	R
TL	19.162	6297	R
pi(A)	0.218	7244	R
pi(C)	0.258	7584	R
pi(G)	0.236	7017	R
pi(T)	0.289	6311	R

Figura 7. Resultados de ESS en Tracer



Figura 20. Enchilado de oyamel, *Lactarius salmonicolor sensu auct. Mex.*, recolectado por hongueros de la ladera este del Volcán La Malinche, mezclado con un poco de mantecado (*Amanita aff. rubescens*) y algunas escobetas (*Ramaria* spp).

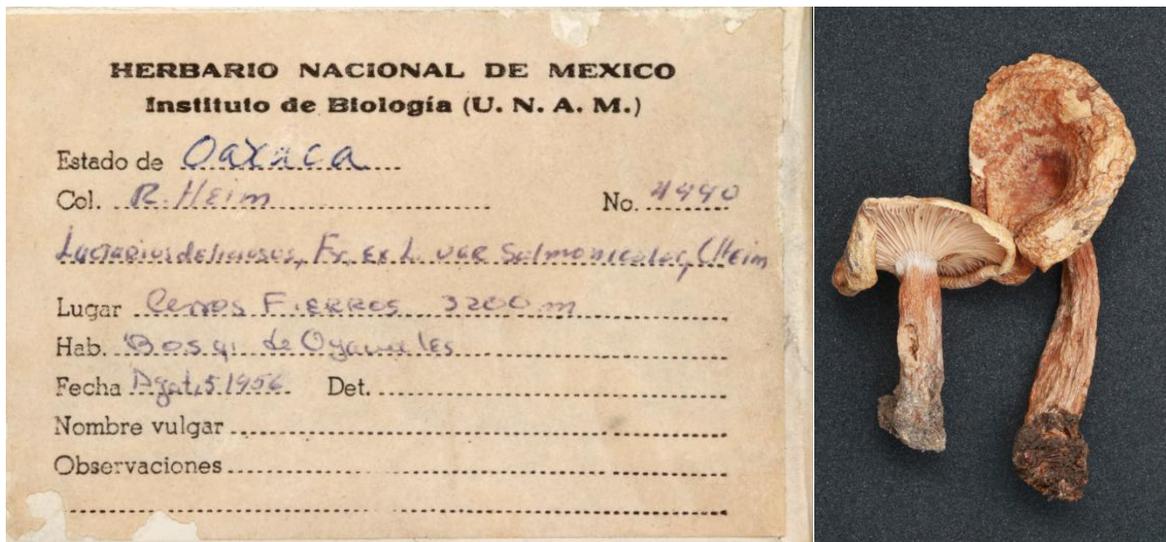


Figura 22. Material recolectado por Heim del estado de Oaxaca e identificado como *Lactarius deliciosus* var. *salmonicolor* (MEXU).