



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Contribución al estudio sistemático del  
complejo *Didymium squamulosum* de algunas  
zonas de Latinoamérica

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Samuel Nolasco Garduño

Director: Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Contribución al estudio sistemático del  
complejo *Didymium squamulosum* de algunas  
zonas de Latinoamérica

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Samuel Nolasco Garduño**

Comité Tutorial

Dr. Arturo Estrada Torres  
Dra. Alba Mónica Montiel González  
Dra. Margarita Villegas Ríos

## **Hoja de financiamiento**

Este trabajo se realizó con el apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante una beca, cuya clave es 592675. Parte del proyecto se ejecutó en el Laboratorio de Biodiversidad bajo la dirección del Dr. Arturo Estrada Torres y en Laboratorio de Biología Molecular bajo la asesoría de la Dra. Alba Mónica Montiel González. Ambos laboratorios pertenecientes al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El material procedente de Chile y Argentina utilizado en este estudio comprende al proyecto: Myxobiota Neotropical V. Estudio biosistemático de Myxomycetes de las zonas áridas de los Andes tropicales de Perú. Clave: CGL2014-52584-P. Responsable: Dr. Carlos Lado Rodríguez, Real Jardín Botánico de Madrid. Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad de España. Vigencia: 2015-2017.

El material de Tehuacán proviene del proyecto: Myxomycetes de la Reserva de Biósfera Tehuacán-Cuicatlán”. Clave JF062. CONABIO. Vigencia 2012-2015.

El material de Yucatán y parte de los reactivos que se usaron pertenecen al proyecto: Estudio de la diversidad y las interacciones bióticas para la conservación y restauración de la vegetación de la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Yucatán. Redes Temáticas de Colaboración Académica del PRODEP. Clave PROMEP/103.5/12/2117. PROMEP-SEP. Vigencia 2012-2018.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03).





**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 **Samuel Nolasco Garduño** 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: **“Contribución al estudio sistemático del complejo *Didymium squamulosum* en algunas zonas de Latinoamérica”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.


ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., ENERO 23 DE 2018

  
\_\_\_\_\_  
DR. ARTURO ESTRADA TORRES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARGARITA VILLEGAS RÍOS

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ

  
\_\_\_\_\_  
M.C. LAURA VERÓNICA HERNÁNDEZ CUEVAS



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



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)

## **Agradecimientos**

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por otorgarme la oportunidad de pertenecer a su matrícula de estudiantes y ayudarme a crecer académicamente mediante los cursos que ofrece.

Al apoyo concedido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con su programa de becas nacionales que permitió el desarrollo de este proyecto y a su vez, mi formación profesional. La clave de beca otorgada es 592675.

A los miembros del comité: Al Dr. Arturo Estrada Torres, Dra. Alba Mónica Montiel González y Dra. Margarita Villegas. Gracias por el tiempo, apoyo, empeño y esfuerzo dedicado al desarrollo y evaluación del proyecto durante todas sus etapas, pues cada una de las observaciones, consejos, correcciones, críticas y revisiones fueron cruciales para guiar por buen camino este estudio. De igual forma, quiero agradecer infinitamente por la confianza y amistad que me brindaron.

## **Agradecimientos personales**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y hermanos, pues son una de las principales fuentes de amor e inspiración que alimentan y motivan mi vida. Gracias por todos los consejos, palabras y apoyo que he recibido de ustedes. Soy consciente del sacrificio y esfuerzo y que han invertido en mí, dándome una de las armas más poderosas que existe en el mundo: la educación. Sinceramente, espero algún día poder retribuir y compensar todo lo que han hecho por mí, pues cualquier logro que pueda conseguir a lo largo de mi vida, es gracias a ustedes. Jamás lo olvidaré. Con amor, su hijo.

De la misma forma agradezco al resto de mi familia, pues son un pilar elemental en mi vida. Gracias por las vivencias, experiencias y consejos que compartieron conmigo. Me encuentro en deuda con ustedes, pues esto también es fruto del cariño que me han dado.

A mis compañeras de laboratorio Anahí, Rut y Diana. Estoy agradecido por el conocimiento, técnicas y métodos que compartieron conmigo, por la ayuda en la resolución de problemas y por la instrucción brindada sin condiciones. De ustedes he aprendido mucho, prometo aplicar todos los trucos y magias que me enseñaron. Ah y Diana, ya no me des golpes en la espalda porque me duele ☹.

A mis amigos y compañeros de generación por todas las cosas que vivimos juntos. Ustedes no solo comprenden un círculo de personas a las que estimo, sino que forman parte de mi capital humano, al que algún día sin duda, recurriré por consejo, ayuda, opciones, puntos de vista, y claro, muchas cervezas.

***“Generalmente, cuando más sabes acerca de una cosa, menos miedo le tienes... y más peligroso te vuelves”***



**Dedicado a:**

**Mi familia...**

*Ustedes son mi mejor ejemplo, ustedes siempre me enseñan, siempre me guían, me motivan, me ilustran, me muestran... Ustedes son los verdaderos maestros.*

## Resumen

Los Myxomycetes son un grupo de organismos unicelulares, eucariotas, holótrofos, aerobios estrictos que carecen de pared celular. Son predominantemente terrestres y pueden encontrarse en cualquier lugar en donde haya plantas o restos de ellas. La identificación de este grupo se basa principalmente en sus características morfológicas, las cuales, son escasas y dificultan esta labor. Esto conlleva a que no se puedan reconocer de manera certera a las entidades que conforman complejos de especies con morfología muy parecida.

Sin embargo, los análisis filogenéticos realizados con secuencias génicas ayudan a esclarecer las relaciones entre los organismos y a dar una mejor aproximación en la delimitación de las especies. Por ende, se realizó un estudio sistemático de las especies del complejo *Didymium squamulosum* presentes en algunas zonas de Argentina, Chile, México y Perú debido a que presentan características morfológicas similares y a su vez altamente variables que las hace difíciles de identificar y separar.

Se utilizó una región parcial del gen 18S que codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas, de 37 ejemplares pertenecientes a este complejo, para elaborar análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud e Inferencias Bayesianas y correlacionarlos con la información morfológica, ecológica y biogeográfica de dichos ejemplares.

Los resultados mostraron que existen al menos 13 linajes diferentes dentro del material estudiado. Contrario a lo supuesto para la mayoría de los Myxomycetes en el sentido de una distribución cosmopolita, cada linaje presenta una distribución restringida acorde con la procedencia de los ejemplares. Por otra parte, fue evidente que la forma de la esporoteca es congruente en la diferenciación de algunos linajes dentro del complejo.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>11</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>12</b>
• <b>Obejtivos específicos</b> .....	<b>12</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>13</b>
<b>Selección de especímenes para la obtención de secuencias</b> .....	<b>13</b>
• <b>Selección de especímenes</b> .....	<b>13</b>
<b>Caracterización morfológica</b> .....	<b>15</b>
<b>Caracterización molecular</b> .....	<b>16</b>
• <b>Extracción del ADN genómico</b> .....	<b>16</b>
• <b>Amplificación del ADN mediante PCR</b> .....	<b>16</b>
• <b>Control de amplificaciones</b> .....	<b>18</b>
• <b>Purificación de ADN</b> .....	<b>19</b>
<b>Análisis filogenéticos</b> .....	<b>20</b>
• <b>Ensamble de secuencias</b> .....	<b>22</b>
• <b>Ensamble pareado de secuencias con Trim</b> .....	<b>22</b>
• <b>Alineamiento múltiple de secuencias</b> .....	<b>22</b>
• <b>Modelo de evolución molecular</b> .....	<b>23</b>
• <b>Análisis filogenético de máxima verosimilitud</b> .....	<b>23</b>
• <b>Análisis filogenético de inferencias bayesianas</b> .....	<b>23</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>23</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>42</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>45</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>45</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>45</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>48</b>

## **Introducción**

Los Myxomycetes (Mixogástridos o mohos mucilaginosos) son un grupo de organismos unicelulares, eucariotas, holótrofos, aerobios estrictos y sin pared celular. Su ciclo de vida comprende dos fases tróficas (alimentación) muy diferentes (Stephenson y cols. 2011): la primera es una fase ameboide uninucleada con o sin flagelo, dependiendo de la cantidad de agua del medio (estado que puede ser reversible) y la segunda es una estructura multinucleada llamada plasmodio (Martin y cols. 1983). Su fuente principal de alimento son las bacterias, pero también pueden fagocitar levaduras, algas, cianobacterias, hifas y esporas de hongos.

La meiosis toma lugar durante la maduración de las esporas, que germinan y producen la siguiente generación de células ameboides uninucleadas. Mientras en los estados tróficos, las amebas pueden dividirse por fisión binaria para aumentar su población y vivir indefinidamente (Stephenson y cols. 2011). El plasmodio, al fragmentarse (por eventos azarosos en el ecosistema), puede dar origen a plasmodios independientes y cuando se presentan las condiciones favorables (temperatura, humedad, incidencia de luz, cantidad de alimento, entre otras) da lugar a la estructura reproductora o cuerpo fructífero. Esta estructura produce las esporas que darán comienzo al ciclo de vida. Son estas particularidades por las cuales han sido clasificados como plantas, animales, hongos y protozoarios (Ing 1994), pero actualmente han sido ubicados en el súper grupo Amoebozoa (Baldauf 2008).

Estos organismos son predominantemente terrestres y pueden encontrarse en cualquier lugar del planeta donde haya plantas o restos de las mismas. Los datos sobre la distribución de los Myxomycetes se ha basado en el registro de los cuerpos fructíferos, lo que sugiere que la información esté incompleta debido a que podría haber organismos que no formen cuerpos fructíferos y se dispersen en hábitats donde no han sido encontrados como los marinos o acuáticos (Stephenson y cols. 2011). Esto significaría una falta de conocimiento acerca de la biodiversidad, ecología, evolución, distribución y biología de este grupo.

La clasificación e identificación de estos organismos de manera tradicional se basa casi exclusivamente en sus características morfológicas y ultraestructurales (Fiore-Donno y cols. 2008), las cuales, comparados con otros grupos como animales y plantas, son muy escasas. Esto ha causado múltiples problemas en la circunscripción de algunas especies y ha imposibilitado reconocer de manera certera el número de entidades que conforman complejos

de especies estrechamente relacionados, aunando también a que sus caracteres frecuentemente presentan variación que se sobrepone entre especies diferentes. Estas complicaciones con el reconocimiento de las especies generan dificultades en el campo de la biología y ciencia afines.

Los principales problemas están que al tratar de censar la biodiversidad de un sitio en particular, los números obtenidos para la riqueza de las especies no se acercan a su valor real. Esto imposibilita la tarea de detectar taxa desconocidos para la ciencia o que no se conozca el número ni las especies que pudieran estar en peligro de extinción ni que se puedan implementar los programas adecuados para su conservación. De igual forma, se entorpece y dificulta la explotación adecuada y sustentable de los recursos que ofrece un ecosistema, desde el punto de vista biotecnológico, médico, químico o económico, entre otros.

Un par de herramientas potencialmente útiles para esclarecer esta problemática son la biología molecular y la sistemática. Al usar datos moleculares de secuencias génicas de diversos marcadores moleculares se obtiene información valiosa en la reconstrucción de filogenias, que al conjuntarse con los antecedentes morfológicos, de cultivo, ecológicos y/o biogeográficos, permite realizar estudios más robustos sobre las relaciones entre los organismos. Dentro de los marcadores moleculares más utilizados están los genes ribosomales, debido a que son unidades altamente conservadas y presentan una baja tasa de sustitución, lo que los hace útiles en la inferencia de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Hillis y cols. 1991).

Los análisis filogenéticos puede realizarse con distintos tipos de datos, principalmente morfológicos y moleculares. El hecho de utilizar cualquiera de estos datos, presenta sus propias ventajas y desventajas. Usar caracteres morfológicos permite un muestreo taxonómico más minucioso, el costo del proceso es barato y se puede usar material almacenado durante décadas, además de reanalizar los caracteres cuantas veces se necesite (Rentería 2007). Su principal desventaja es que en ocasiones, la selección de caracteres utilizados para el análisis es potencialmente arbitraria los cuales además son difíciles de homolgar (Hillis y Wiens, 2000), y raramente se cuenta con más de 100 caracteres, como por ejemplo, en animales y plantas (Sanderson y Donoghue, 1989). Esto sin mencionar que los taxónomos expertos deben “descubrir y delimitar” los más importantes para determinados

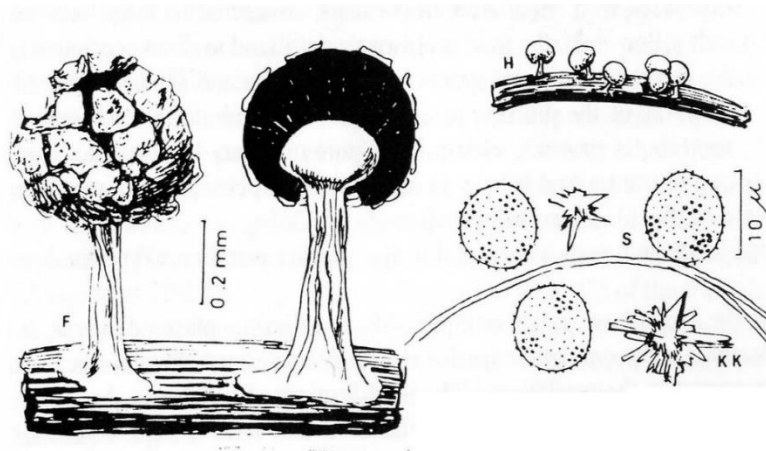
grupos. Los caracteres moleculares permiten analizar linajes con divergencia temprana, se cuenta con cientos o miles de caracteres informativos y su selección es más objetiva, además de trabajar directamente con la base genética de la variación (Hillis y Wiens, 2000). Entre sus mayores deficiencias está el hecho de que los análisis no siempre son detallados (debido a la inmensa cantidad de información que se maneja), los análisis suelen ser relativamente costosos debido a los reactivos y equipo sofisticado que se requiere, y en la mayoría de las veces, se necesita material relativamente fresco (Rentería 2007). Adicionalmente, es posible asumir que la misma base en la misma posición en dos secuencias sea una homología, pero esto no siempre es así.

De manera general, el uso de ambos tipos de datos de manera conjunta ofrece mayor dinamismo en los análisis, provee de argumentos robustos para la interpretación de las inferencias filogenéticas, genera hipótesis mejor sustentadas y ofrece una gama más amplia de explicaciones a las respuestas planteadas. Cabe mencionar que aunque ambos tipos de información presenten particularidades, desempeñan un papel crucial en el estudio de los organismos, puesto que hoy en día, las especies se describen e identifican con ayuda de ambos tipos de datos (Rentería 2007).

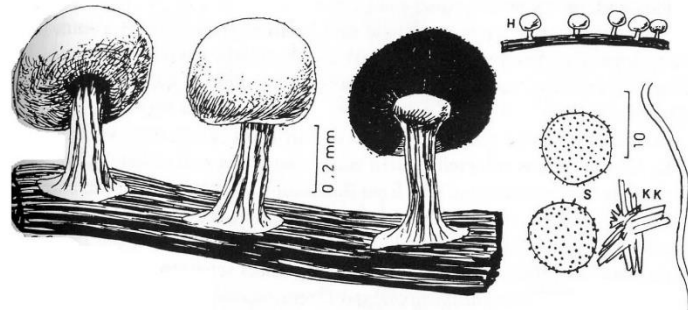
### **Antecedentes**

*Didymium squamulosum* (Alb. & Schw.) Fries pertenece a la familia Didymiaceae del orden Physarales (Myxomycetes). Fue descrita de Alemania y actualmente es reconocida por Martin y Alexopoulos (1969) como una especie cosmopolita. Las descripciones sobre esta especie mencionan que es altamente variable (Figuras 1-3) (Nannenga-Bremekamp 1991, Poulain y cols. 2011) y no existe un consenso claro sobre su variación morfológica (ElHage 2000). Ésta se presenta básicamente en todos los caracteres tomados en cuenta para la descripción de las especies (Anexo 1). Los esporocarpos pueden ser estipitados, sésiles o plasmodiocárpicos, con una altura entre 1.2 y 1.5 mm. La esporoteca presenta formas discoides, globosas y hemisféricas, de color blanco a gris pálido, con un diámetro de 0.3 hasta 1.2 mm, y exhiben una umbilicación por debajo de la misma. Las esporas en masa muestran colores oscuros, mientras que en luz transmitida son de color café violáceo, marrón o violeta, su ornamentación puede ser verrucosa, espinulosa, con o sin grupos de verrugas, e incluso

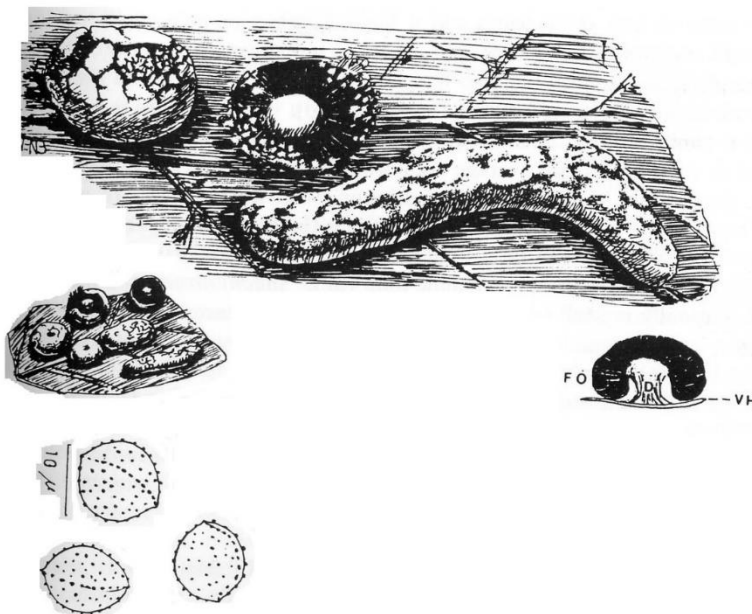
puede presentar “líneas” en la superficie. El tamaño oscila entre los 7 y 13  $\mu\text{m}$ . El capilicio puede ser delgado o grueso, incoloro u oscuro, simple o ramificado. El estípite suele estar presente o ausente, su ornamentación es lisa o rugosa, su coloración va del blanco al ocráceo, pasando por el anaranjado y su tamaño generalmente ocupa dos tercios de la altura total del esporocarpio. El peridio presenta placas, cuya forma típica es parecida a un embudo, pero, también pueden ser lisas o irregulares. El hipotalo muestra una forma discoide, y posee coloraciones blancas, marrones, violáceas e incluso puede ser incoloro. Las formas de la columela pueden ser discoides o hemisféricas, ocupando un cuarto del diámetro de la esporoteca y sus coloraciones son claras (blancas o marrón claro). Finalmente, el plasmodio suele ser del tipo faneroplasmodio y ostenta un color amarillo, blanco, marrón e incluso, puede ser transparente. Del mismo modo, se le ha asignado una distribución cosmopolita, por lo cual se encuentra en una gran variedad de ambientes y sustratos en todo el planeta (Martin y Alexopoulos 1969, Nannenga-Bremekamp 1991, Nebuert y cols. 1995, Poulain y cols. 2011).



**Figura 1.** Variación morfológica de *Didymium squamulosum* (Tomado de Nannenga-Bremekamp 1991)



**Figura 2.** Variación morfológica de *Didymium squamulosum* (Tomado de Nannenga-Bremekamp 1991)



**Figura 3.** Variación morfológica de *Didymium squamulosum* (Tomado de Nannenga-Bremekamp 1991)

Esta variación morfológica ha provocado que autores como Martin y Alexopoulos (1969) consideren 20 especies como sinónimos taxonómicos de *D. squamulosum*, al igual que Lado



(2005-2018) quien considera un total de 23 (Tabla 1). Esta especie es particularmente abundante en zonas áridas y semiáridas en donde se han encontrado morfotipos atípicos pero que muestran formas intermedias difíciles de separar de las formas típicas (Lado y cols. 2012). Adicionalmente se han descrito 10 especies (ElHage 2000) (Tabla 2) con un parecido morfológico en extremo similar a esta especie, aunque algunas de ellas se han recolectado raramente y otras sólo se conocen de la localidad tipo.

<b>Tabla 1. Sinónimos de <i>Didymium squamulosum</i>.</b>	
<b>Martin y Alexopoulous (1969)</b>	<b>Lado (2005-2018)</b>
<i>Diderma squamulosum</i> Alb. & Schwein.	<i>Didymium squamulosum</i> Alb. & Schwein.
<i>Didymium effusum</i> Link.	<i>Didymium effusum</i> Link.
<i>Licea stipitata</i> DC. in Lamarck & de Candolle.	<i>Licea stipitata</i> DC. in Lamarck & de Candolle.
<i>Tubulina pedicellata</i> Poir. in Lamarck.	<i>Tubulina pedicellata</i> Poir., in Lamarck.
<i>Didymium costatum</i> Fr.	<i>Didymium costatum</i> Fr.
<i>Didymium herbarum</i> Fr.	<i>Didymium effusum</i> Fr.
<i>Physarum liceoides</i> Duby.	<i>Didymium herbarum</i> Fr.
<i>Didymium praecox</i> de Bary in Rabenhorst.	<i>Physarum liceoides</i> Duby.
<i>Didymium radiatum</i> Berk. & M. A.	<i>Didymium filamentosum</i> Wallr.
<i>Didymium neglectum</i> Berk. & Broome.	<i>Didymium praecox</i> de Bary in Rabenhorst.
<i>Didymium fuckelianum</i> Rostaf.	<i>Didymium radiatum</i> Berk. & M. A.
<i>Didymium discoideum</i> Rostaf.	<i>Didymium neglectum</i> Berk. & Broome.
<i>Chondrioderma cookei</i> Rostaf.	<i>Didymium fuckelianum</i> Rostaf.
<i>Didymium angulatum</i> Peck.	<i>Didymium discoideum</i> Rostaf.
<i>Didymium affine</i> Raunk.	<i>Chondrioderma cookei</i> Rostaf.
<i>Didymium bonianum</i> Pat.	<i>Didymium angulatum</i> Peck.
<i>Didymium effusum</i> var. <i>maculatum</i> L. F. C̃elak.	<i>Didymium affine</i> Raunk.
<i>Didymium squamulosum</i> var. <i>rufipes</i> L. F. C̃elak.	<i>Didymium bonianum</i> Pat.

<i>Didymium squamulosum</i> var. <i>claviforme</i> Sturgis.	<i>Didymium squamulosum</i> var. <i>virgineum</i> Masee.
<i>Didymium annulatum</i> T. Macbr.	<i>Didymium effusum</i> var. <i>maculatum</i> L. F. C̃elak.
	<i>Didymium squamulosum</i> var. <i>rufipes</i> L. F. C̃elak.
	<i>Didymium squamulosum</i> var. <i>claviforme</i> Sturgis.
	<i>Didymium annulatum</i> T. Macbr.

<b>Tabla 2. Especies morfológicamente similares a <i>Didymium squamulosum</i></b>
<b>ElHage (2000)</b>
<i>Didymium applanatum</i> Nann.-Bremek.
<i>Didymium clavodecus</i> K. D. Whitney
<i>Didymium chryso sporum</i> T. N. Lakh. & K. G. Mukerji
<i>Didymium delhianum</i> T.N. Lakh. & K.G. Mukerji
<i>Didymium floccoides</i> Nann.-Bremek. & Y. Yamam.
<i>Didymium marineri</i> G. Moreno, Illana & Heykoop
<i>Didymium muscorum</i> T.N. Lakh. & K.G. Mukerji
<i>Didymium nigrisporum</i> Nann.-Bremek., K.G. Mukerji & Pasricha
<i>Didymium projectile</i> T.N. Lakh. & K.G. Mukerji
<i>Didymium simlense</i> T.N. Lakh. & K.G. Mukerji

Entre las especies más parecidas a *D. squamulosum* se encuentran *Didymium applanatum* y *Didymium nigrisporum*. *D. applanatum* fue descrita de un ambiente arenoso, en South Flevo-Polder, Países Bajos, y en algún momento ha sido considerada como una variación de *D. squamulosum* por Lado (2005-2018), aunque actualmente, es reconocida como una especie válida por el mismo autor. La morfología de esta especie comprende esporocarpos estipitados, de aproximadamente 1.2 mm de altura, con un estípite estriado de color blanco u ocráceo pálido, de 0.3 a 1.0 mm de alto. La esporoteca es de forma aplanada, con un diámetro

aproximado de 1.0 mm, de color gris pálido y muestra un ombligo alrededor de la parte basal, rodeando al estípite (umbilicación). El peridio es membranoso, estriado, engrosado en la base, blanquecino, y en ocasiones, con una grieta circuncil. Las esporas en masa exhiben color café oscuro, mientras en luz transmitida se observan ligeramente lilas, son verrucosas, con grupos de verrugas densas y su tamaño oscila entre los 8 y 11  $\mu\text{m}$ . Los filamentos que conforman el capilicio son incoloros, ramificados y en ocasiones, pueden soportar bultos oscuros. La columela no está presente en esta especie. Las diferencias que se presentan con *D. squamulosum* son la carencia de una columela y la forma aplanada de la esporoteca (Nannenga-Bremekamp 1991, Poulain y cols. 2011). En tanto *D. nigrisporum* fue descrita de un bosque ubicado en Madhya Pradesh, en la India. Su morfología, de igual forma que en el caso anterior, recuerda a *D. squamulosum*, pues posee esporocarpos estipitados, cuyos estípites tienen un tamaño de 0.3 a 0.4 mm, son de color blanco u ocráceo pálido, presentan cristales de limo y se encuentran “enterrados” por la esporoteca. Ésta tiene forma depresa o hemisférica, de hasta 0.9 mm de diámetro, de color blanco. El peridio es membranoso, cubierto con cristales de limo y presenta escamas en la parte superior. Las esporas son subglobosas, ligeramente angulares, de color negro en masa, café muy oscuro en luz transmitida, de 11 a 12.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y su ornamentación se compone de verrugas. El capilicio es color ocráceo, delgado, ramificado dicotómicamente y formando una red laxa larga. La columela es subglobosa, o depresa, llena de cristales de limo (Nannenga-Bremekamp 1991). La principal diferencia que tiene esta especie con *D. squamulosum* es que posee esporas angulares y demasiado oscuras, por lo cual ha sido considerada una especie distinta. Recientemente ha sido encontrada en abundancia en zonas áridas de Perú (Lado y cols. 2016) y México (Estrada-Torres 2015), en donde algunos ejemplares son difíciles de separar de *D. squamulosum*. Hasta ese momento, esta especie solo se conocía de la localidad tipo.

Se han realizado estudios donde se muestra evidencia de que las variaciones fenotípicas consideradas para *Didymium squamulosum* no son en realidad variaciones interespecíficas, sino que se trata de un complejo de especies crípticas. Elhage y cols. (2000) realizaron un estudio con 33 especímenes de *D. squamulosum* de tres partes del mundo aisladas geográficamente. Ellos analizaron los sistemas reproductivos, la incompatibilidad plasmodial, la morfología y los patrones de isoenzimas. De acuerdo con los dos primeros

análisis, obtuvieron 27 especímenes no heterotálicos (probablemente apomípticos) y seis heterotálicos que correspondieron con tres especies biológicas. En el dendograma realizado para la similitud entre isoenzimas encontraron dos grupos diferenciados, uno de ellos incluye las tres especies biológicas más algunos aislados no heterotálicos. Al comparar con el dendograma obtenido a partir de datos morfológicos, no se observó una correlación entre los grupos obtenidos. Con la información recabada, los autores concluyeron que *D. squamulosum* es un complejo de especies crípticas difíciles de separar a través de sus patrones morfológicos o de isoenzimas.

Desde el punto de vista molecular, Stephenson y Winsett (2008) utilizaron los espaciadores de transcritos internos 1 y 2 (ITS) más el gen 5.8S que codifica para la subunidad grande de los ribosomas de 14 especímenes de *D. squamulosum* procedentes de ocho localidades de distintas partes del mundo. Ellos realizaron análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud para definir si se trataban de diferentes especies. Los resultados mostraron dos clados con un alto índice de soporte. A pesar de concluir que *D. squamulosum* es un complejo de especies crípticas, no pudieron definir si las variaciones morfológicas son una expresión del alto grado de variabilidad que presentaron las regiones genéticas utilizadas o si son evidencia fenotípica de una diferenciación genética a nivel específico.

Estudios con otras especies de Myxomycetes han mostrado la utilidad de las secuencias moleculares en el reconocimiento de especies crípticas, aportando datos para facilitar la delimitación de las especies. Así, Fiore-Donno y cols. (2010) efectuaron un estudio sobre el género *Hyperamoeba*. Utilizaron una región parcial del gen 18S y más de 50 secuencias de los órdenes Echinosteliales, Stemonitales y Physarales. Los resultados de los análisis filogenéticos mostraron que este género es polifilético, pues sus secuencias se agruparon en diferentes clados de los órdenes Physarales y Stemonitales, principalmente. De igual forma, las secuencias de especies del género *Didymium* se ubicaron en diferentes clados, por lo que se menciona que este género también es polifilético. En este estudio además se realizó un análisis de similitud y se incluyeron secuencias de *D. squamulosum*. Éstas se agruparon en diferentes sub-clados dentro del clado “*Didymium*” 1. Los autores mencionan que esta especie es altamente variable, común y con una distribución amplia, por lo que el grupo en realidad está compuesto por un complejo de especies crípticas.

Fiore-Donno y cols. (2011) ocuparon la región ITS 1, el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) y el gen que codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas (18S) para conocer la posición filogenética de dos especies morfológicamente similares: *Lamproderma columbinum* (Pers.) Rostaf. y *Lamproderma puncticulatum* Härk. Emplearon 93 especímenes de 12 localidades de una pequeña región en Alemania. Los análisis filogenéticos mostraron dos clados soportados, uno para *L. columbinum* y otro para *L. puncticulatum*. Se concluyó que estas especies son entidades claramente diferenciadas genéticamente. En *L. puncticulatum* la divergencia genética entre linajes fue relativamente baja, mientras que para *L. columbinum* se observó una alta divergencia genética, lo que sugirió que esta morfoespecie representa un complejo de especies crípticas distribuidas en un área geográfica relativamente pequeña.

En el trabajo realizado por Aguilar y cols. (2013) se hizo la comparación entre secuencias del gen 18S de 125 ejemplares de *Badhamia melanospora* Speg., obtenidos de 91 localidades distintas a nivel mundial. Los autores observaron que existen al menos dos grupos de ejemplares genética y morfológicamente distintos cuyos patrones de distribución, aunque se sobrepone en una pequeña área, están claramente definidos biogeográficamente. El primer grupo corresponde principalmente con los especímenes procedentes de Norteamérica y el otro con los de Sudamérica. Los autores concluyeron que *B. melanospora* está conformada por al menos dos especies con distribución diferente. Cabe mencionar que el muestreo intensivo y el marcador molecular utilizado resultaron de suma utilidad para la provisión de información útil en la circunscripción de las especies.

Feng y cols. (2016) realizaron un estudio sobre la morfoespecie *Meriderma atrosporum* la cual recolectaron de cinco regiones montañosas europeas. Utilizaron una región parcial del gen 18S y el EF-1 $\alpha$  de 81 especímenes para realizar diversos análisis moleculares y sistemáticos. Los resultados mostraron que *M. atrosporum* está conformada por al menos siete especies biológicas. También se demostró que el aislamiento reproductivo entre éstas aún no es completo.

Del mismo modo, Dagamac y cols. (2017) desarrollaron análisis filogeográficos sobre la morfoespecie *Hemitrichia serpula*, la cual también tiene una distribución cosmopolita y presenta una morfología variable. Se utilizaron regiones parciales de los genes 18S y del EF-

1α de 135 especímenes de distintas partes del planeta, donde se incluyeron tres variedades de la especie. Los resultados revelaron 40 ribotipos agrupados en tres clados. Dos de estos clados incluyeron casi únicamente especímenes de la variedad *serpula*, lo cual indica un complejo de especies crípticas, mientras que el tercer clado fue conformado por especímenes de la variedad *parviverrucospora*, lo que muestra que se trata de una especie biológica diferente. La variedad *tubiglabra* resultó tener un ribotipo idéntico a los de la variedad *serpula*, lo que demuestra que tal variedad no debería tener validez taxonómica.

Lo anterior es prueba de la utilidad de marcadores moleculares en la detección de especies crípticas, las cuales serían difíciles de reconocer utilizando sólo datos morfológicos. La adición de nuevos datos no sólo ayuda en la circunscripción de las especies, sino que disipan y generan nuevas dudas en áreas como la biología, evolución, ecología, biogeografía y sistemática de los organismos.

### **Justificación**

Este estudio generará información que permitirá conocer la variación genética de una secuencia parcial del gen 18S de los ejemplares identificados como *Didymium squamulosum* y algunas morfoespecies afines distribuidas en diferentes zonas de Latinoamérica. Lo anterior contribuirá a determinar si dichos ejemplares corresponden con una sola especie o si están conformadas por un complejo de especies. Se obtendrán datos que ayudarán a delimitar de forma más precisa a las especies dentro del complejo a través de las características morfológicas y ecológicas que se correlacionen con los datos moleculares. La obtención de secuencias génicas permitirá hacer futuras investigaciones con las mismas, en los campos de la sistemática de Myxomycetes realizando diferentes ensayos filogenéticos. Del mismo modo, se generan datos e información tangible (secuencias génicas) disponible para múltiples áreas como la taxonomía, biología molecular, análisis basados en la “minería de datos”, biología, ecología y biogeografía entre otros.

## **Preguntas de investigación**

¿Cuál es la variación genética de una secuencia parcial de la región 18S en las especies del complejo *Didymium squamulosum* presentes en la zona de estudio?

¿Corresponde dicha variación con las especies reconocidas en el complejo *Didymium squamulosum* en las zonas estudiadas?

¿Cuáles son las características morfológicas que permiten definir dichas entidades?

¿Son *Didymium applanatum* y *Didymium nigrisporum* entidades diferentes a *Didymium squamulosum*?

## **Objetivo**

Realizar un estudio sistemático de las especies del complejo *Didymium squamulosum* presentes en algunas zonas de Argentina, Chile, México y Perú.

### **• Obejtivos específicos**

- Conocer la variación morfológica de las especies del complejo *Didymium squamulosum*.
- Determinar la variación genética de la región 18S de las especies del complejo *Didymium squamulosum* presentes en las zonas de estudio.
- Establecer las relaciones filogenéticas de los especímenes estudiados.
- Contrastar los árboles filogenéticos obtenidos con la información morfológica, ecológica y biogeográfica de los especímenes estudiados.

## **Metodología**

La metodología se dividió en tres partes. La revisión morfológica, la obtención de secuencias génicas y los análisis filogenéticos basados en caracteres moleculares. Se realizó una integración de la información filogenética con la morfológica de los ejemplares incluidos en los análisis.

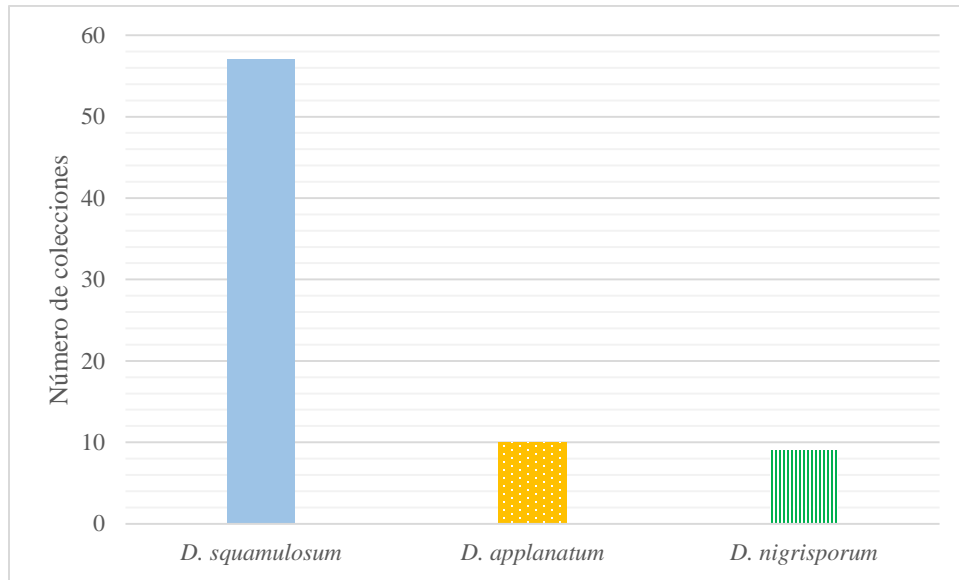
### **Selección de especímenes para la obtención de secuencias**

- **Selección de especímenes**

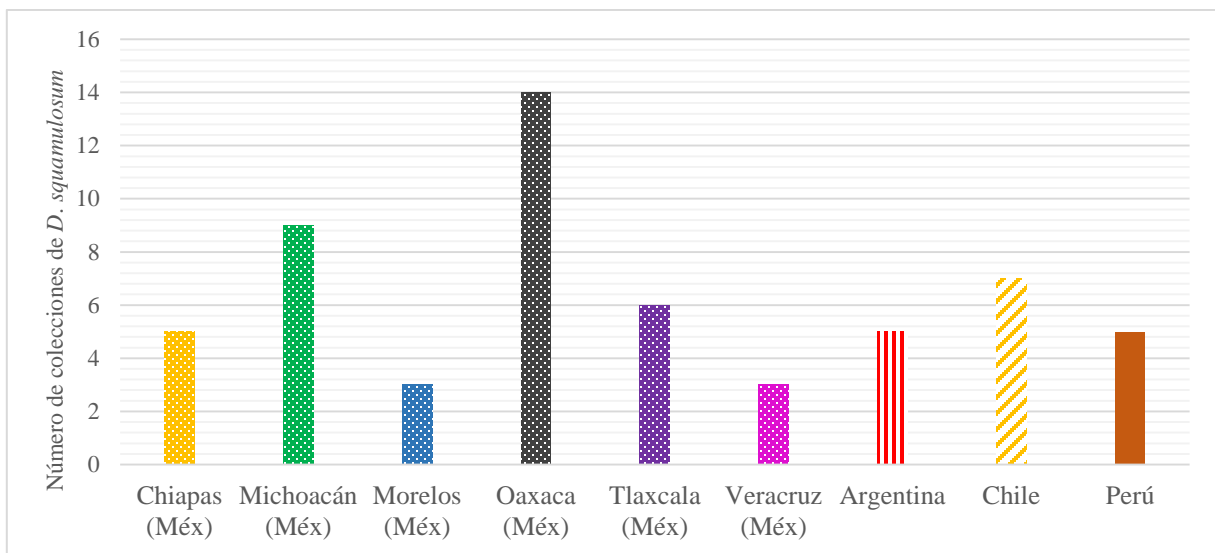
Se utilizó material depositado en el Herbario TLXM proveniente de diferentes ecosistemas de Argentina, Chile, México y Perú, principalmente. Se seleccionaron 76 colecciones para realizar la descripción morfológica y 37 para la extracción de ADN. Se tomó en cuenta la cantidad de esporocarpos contenidos en cada colección, así como la integridad y el estado de preservación en el que se encontrasen.

De las 76 colecciones utilizadas para la descripción morfológica, 57 estaban determinados como *D. squamulosum*, 10 como *D. applanatum* y nueve como *D. nigrisporum* (Figura 4). De las colecciones determinadas como *D. squamulosum*, cinco pertenecen al estado de Chiapas, nueve a Michoacán, tres a Veracruz, tres son de Morelos, seis de Tlaxcala, 14 de Oaxaca, cinco provienen de Argentina, cinco de Perú y siete de Chile (Figura 5). Seis de las nueve colecciones definidas como *D. nigrisporum* provienen del estado de Oaxaca y las restantes de Chile. Todos los ejemplares determinados como *D. applanatum* corresponden con el estado de Yucatán (Figura 6).

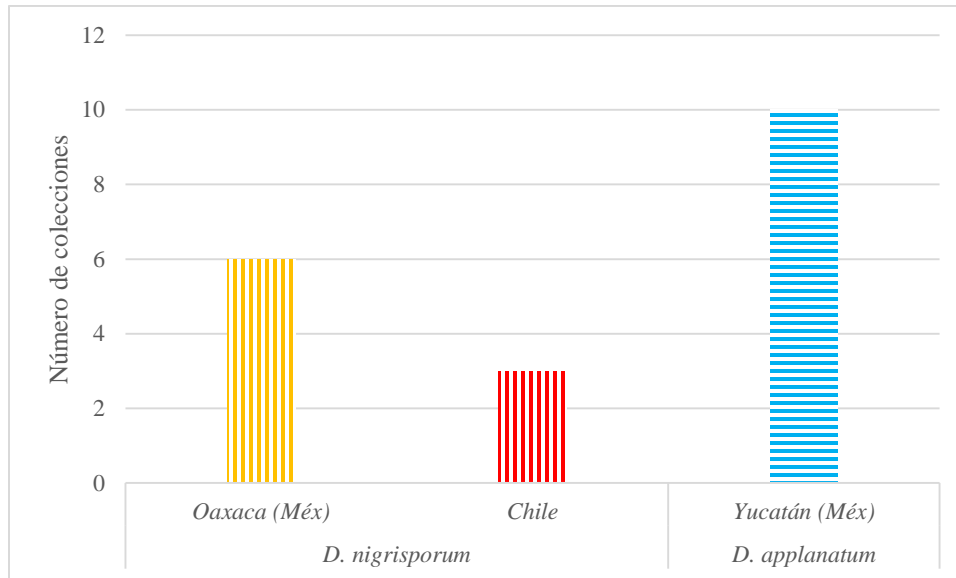




**Figura 4.** Distribución de colecciones dentro del complejo *Didymium squamulosum*.



**Figura 5.** Distribución de colecciones determinadas como *Didymium squamulosum*.



**Figura 6.** Distribución de colecciones de *Didymium nigrisporum* y *Didymium applanatum*.

### Caracterización morfológica

Las observaciones macromorfológicas se realizaron con la ayuda de un estéreo-microscopio marca Olympus SZX7 y para las microestructuras se utilizó un microscopio marca Zeiss modelo Axioskop 2 Plus con contraste interferencial de Nomarski. Para la observación y medición de las microestructuras se elaboraron preparaciones semipermanentes con medio de Hoyer. Se colocaron uno o dos esporocarpos de una colección sobre un portaobjetos y se agregaron unas gotas de alcohol al 96% para una mejor diseminación de las esporas concentradas en la esporoteca. Una vez que se evaporó el alcohol, se colocó una gota del medio de Hoyer y se cubrió con un cubreobjetos. Estas preparaciones se secaron sobre una plancha térmica marca Slides Wermer modelo XH-2001, a 40°C durante tres días.

Con respecto a las mediciones de las macro y microestructuras, se tomaron alrededor de tres a cinco fotografías de diferentes esporocarpos y esporas, con la finalidad de tener una mejor aproximación de la variación presente en cada colección. Esto se hizo con un sistema de digitalización de imágenes compuesto por una cámara digital Olympus DP10 y otra Infinity 1, controlado por una computadora a través del software Image Pro-plus versión 4.5.

Los caracteres de los cuales se tomaron fotografías para realizar diversas medidas (Anexo 1) fueron el hipotalo, el estípite, el peridio, la columela, el capilicio, las esporas y la esporoteca.

También se obtuvieron datos sobre la coloración, las formas y la ornamentación de estas estructuras.

### **Caracterización molecular**

La extracción y amplificación de secuencias génicas fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- **Extracción del ADN genómico**

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción Power Soil DNA de MoBio®. Para esto, se colocaron entre cinco y siete esporocarpos (dependiendo de cada colección) en un tubo provisto por el fabricante y se siguió con el protocolo sin modificación alguna.

- **Amplificación de una región parcial del gen 18S mediante PCR**

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en dos termocicladores, uno estándar de punto final marca Bio-Rad modelo My Cycler y otro de gradiente de la misma marca modelo T100 con la finalidad de probar diferentes temperaturas en un solo ensayo. En tubos Eppendorf de 0.2 µl se colocó la mezcla de reacción en el siguiente orden: 5 µl de solución buffer de la enzima Taq Pol 10X, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Cloruro de magnesio), 1 µl de cada primer o iniciador (“Forward” y “Reverse”), 1 µl de DNTP’s 2mM (Desoxinucleótidos trifosfatos), 32.5 µl de H<sub>2</sub>O LN (agua libre de nucleasas), 5 µl de ADN total y 0.5 µl de la enzima Taq DNA Pol. (1.25U). Cada tubo debió tener un volumen final de 50 µl (Tabla 3).

Se elaboró una “Master mix” cuando el número de reacciones realizadas fue superior a cinco. Esto consistió en colocar en un tubo Eppendorf de 1.0 µl las cantidades necesarias de acuerdo con el número de reacciones hechas de todos los reactivos antes mencionados, con excepción del ADN total y la enzima Taq Pol, vortear el tubo unos segundos y repartir el contenido en los tubos Eppendorf de 0.2 µl. Finalmente se agregó 5 µl de ADN total y 0.5 µl de la enzima Taq Pol en cada tubo.

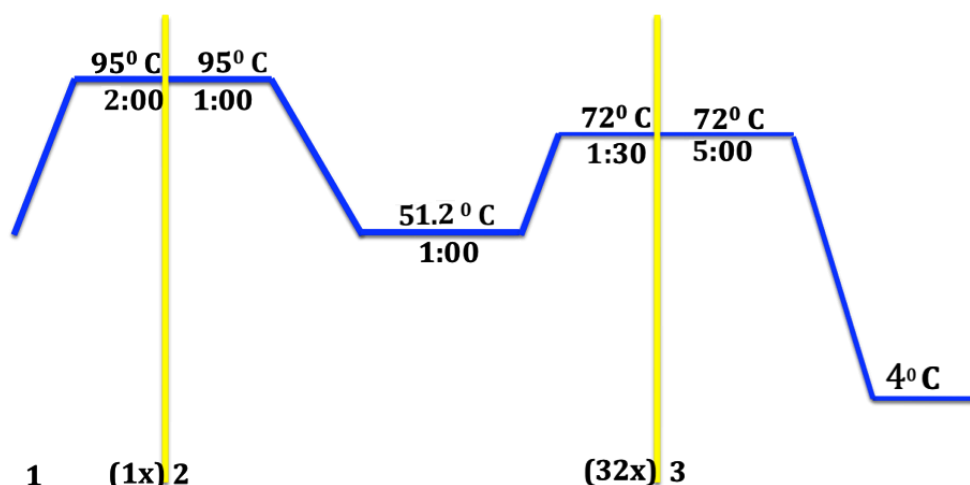
Se manejaron dos temperaturas óptimas para la PCR, una de 51.2 °C y otra de 54.2 °C, siendo más efectiva la primera. Con base en éstas, se realizaron las PCR para cada muestra utilizando

una de las dos temperaturas. Los parámetros de los ciclos realizados son los siguientes (Figura 7):

- 1) 1 ciclo a 95 °C x 2 min.
- 2) 35 ciclos a 95 °C x 1 min, 51.2 °C ó 54.2 °C x 1 min y 72 °C x 1 min 30 s.
- 3) 1 ciclo a 72 °C x 5 min.

<b>Fuente</b>	<b>Cantidad (µl)</b>
<b>Buffer Taq Pol KCl<sub>2</sub> 10X</b>	5.0
<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	4.0
<b>Primer F</b>	1.0
<b>Primer R</b>	1.0
<b>DNTP's 2mM</b>	1.0
<b>H<sub>2</sub>O LN</b>	32.5
<b>ADN Total</b>	5.0
<b>Taq Pol (1.25 U)</b>	0.5
<b>Vol. Total</b>	50

**Tabla 3.** Reactivos y cantidades para la PCR para Myxomycetes.



**Figura 7:** Ciclo de la PCR usado en este estudio para la amplificación de ADN de Myxomycetes .

Los primers o iniciadores (Tabla 4) utilizados en este trabajo fueron propuestos por Fiore-Donno y cols. (2008).

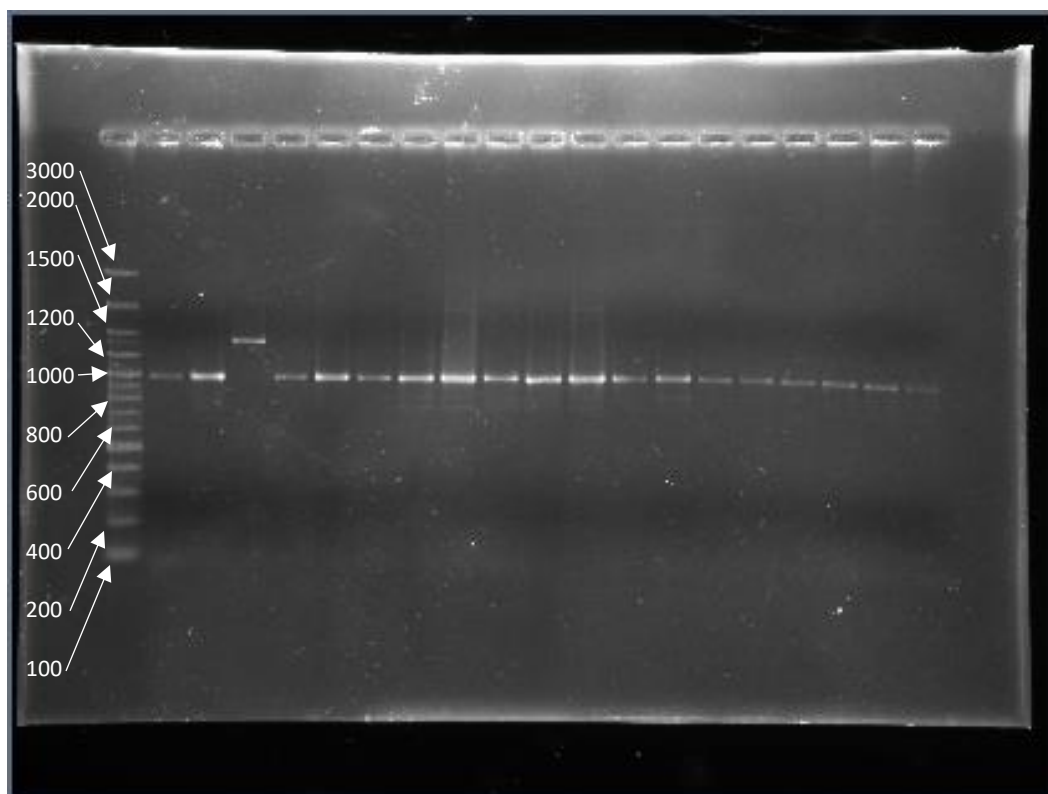
Primer	Secuencia	PB	% CG	Tm
MIX F	GACCTATCAACTAGTAASGGACAT	24	41.7	57.9°C
MIX R	GAGAAAAGTCTYTCAGCTTTCATA	24	34.8	57.5°C

**Tabla 4.** Primers utilizados en este estudio.

- **Control de amplificaciones**

Después de cada PCR se elaboró un gel de agarosa al 0.8% para verificar si se obtuvo el amplicón de interés, en este caso, una región parcial del gen que codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas (18S SSU rDNA). Para comprobar esto, se colocó dentro de un pozo del gel el marcador de peso molecular 100 pb Plus para comparar los tamaños de los amplicones obtenidos con dicho marcador (Figura 8). Se utilizaron controles positivos (muestras de ADN de algunas colecciones ya amplificadas) y negativos para saber, en dado caso de que no se obtuviera ningún amplicón, si existía algún error al elaborar la PCR, durante la extracción de ADN o si era necesario modificar algún parámetro, como la temperatura.

Estos geles se corrieron en cámaras de electroforesis marca Bio-Rad durante 75 min a 75 volts. Para teñir los geles, se sumergieron en Br-Et durante 30 min. Posteriormente se revelaron y fotografiaron con ayuda de un fotodocumentador marca Bio-Rad y del software de digitalización y edición de imágenes Quantity One.



**Figura 8.** Marcador de peso molecular utilizado para verificar el tamaño (en número de pares de bases) de los productos de la PCR.

- **Purificación de ADN**

Para eliminar cualquier residuo de compuestos que no sea ADN, además de concentrar y mejorar la calidad de los fragmentos de ADN obtenidos, cada muestra se purificó con el kit de purificación Wizard Promega® con ayuda del protocolo provisto por el fabricante. Las purificaciones se realizaron a partir de los productos de PCR si no se veía algún indicio de contaminación en las fotografías (ej: bandas dobles o triples ) o a partir de un gel de agarosa al 0.8% si había evidencia de contaminación. Todas las muestras se purificaron a partir de dos o tres réplicas, es decir, que se usaron dos o tres productos de PCR de la misma muestra

con las mismas condiciones para obtener un tubo de purificación. Las muestras purificadas se enviaron al Laboratorio Divisional de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, para su secuenciación en un secuenciador automático ABI-Prism 3100 Avante (Applied Biosystems).

### Análisis filogenéticos

Se realizaron dos análisis filogenéticos, el primero basado en el método de Máxima Verosimilitud con el programa PhyML v.3.1 (Guindon y Gascuel, 2003). El segundo con Inferencias Bayesianas con el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se utilizaron secuencias pertenecientes a 37 colecciones previamente determinadas como alguna de las tres especies que conforman complejo *D. squamulosum*, entre las que figuran *D. applanatum* y *D. nigrisporum* (Tabla 5). Para tales análisis se utilizaron como grupos externos secuencias de las especies *Lamproderma sauteri* Rostaf., *Lepidoderma carestianum* (Rabenh.) Rostaf. y *Lamproderma ovoideum* Meyl. También se incluyeron 33 secuencias previamente usadas por Fiore-Donno y cols. (2010). Se eliminaron los intrones de estas secuencias, así como las regiones de genes que no eran las mismas que en este estudio. Estas secuencias fueron recortadas y alineadas con las que fueron generadas mediante este trabajo. Todas estas secuencias fueron descargadas de la plataforma GenBank-NCBI.

<b>Tabla 5. Datos de las colecciones del complejo <i>Didymium squamulosum</i>.</b>			
<b>Especie</b>	<b>Colección</b>	<b>Rótulo</b>	<b>Localidad</b>
<i>D. applanatum</i>	JEKF-06	D_applanatum_Yuc_06	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	JEKF-07	D_applanatum_Yuc_07	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	JEKF-014	D_applanatum_Yuc_14	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	JEKF-018	D_applanatum_Yuc_18	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	JEKF-019	D_applanatum_Yuc_19	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	JEKF-021	D_applanatum_Yuc_21	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	SNG-026	D_applanatum_Yuc_26	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	SNG-063	D_applanatum_Yuc_63	Yucatán
<i>D. applanatum</i>	SNG-058	D_applanatum_Yuc_58	Yucatán

<i>D. nigrisporum</i>	AET-13221	D_nigrisporum_Teh_13221	Tehuacán
<i>D. nigrisporum</i>	AET-13226	D_nigrisporum_Teh_13226	Tehuacán
<i>D. nigrisporum</i>	AET-13266	D_nigrisporum_Teh_13266	Tehuacán
<i>D. nigrisporum</i>	AET-13667	D_nigrisporum_Teh_13667	Tehuacán
<i>D. nigrisporum</i>	AET-13685	D_nigrisporum_Teh_13685	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-2296	D_squamulosum_Tlx_2296	Tlaxcala
<i>D. squamulosum</i>	AET-4155	D_squamulosum_Mor_4155	Morelos
<i>D. squamulosum</i>	AET-4157	D_squamulosum_Mor_4157	Morelos
<i>D. squamulosum</i>	AET-5307	D_squamulosum_Tlx_5307	Tlaxcala
<i>D. squamulosum</i>	AET-10417	D_squamulosum_Chia_10417	Chiapas
<i>D. squamulosum</i>	AET-12401	D_squamulosum_Teh_12401	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13182	D_squamulosum_Teh_13182	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13201	D_squamulosum_Teh_13201	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13202	D_squamulosum_AET_13202	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13267	D_squamulosum_PERU_13267	Perú
<i>D. squamulosum</i>	AET-13274	D_squamulosum_Teh_13274	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13439	D_squamulosum_Teh_13439	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13691	D_squamulosum_Teh_13691	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13688	D_squamulosum_Teh_13688	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13696	D_squamulosum_Teh_13696	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13699	D_squamulosum_Teh_13699	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	AET-13700	D_squamulosum_Teh_13700	Tehuacán
<i>D. squamulosum</i>	CL-23042	D_squamulosum_PERU_23042	Perú
<i>D. squamulosum</i>	AET-17873	D_squamulosum_CHILE_17873	Chile
<i>D. squamulosum</i>	CL-20272	D_squamulosum_ARG_20272	Argentina
<i>D. squamulosum</i>	CL-20271	D_squamulosum_ARG_20271	Argentina
<i>D. squamulosum</i>	CL-21781	D_squamulosum_PERU_21781	Perú



- **Ensamble de secuencias**

Las secuencias fueron recibidas en archivos digitales en formato “abi”. Para el ensamble de las secuencias forward y reverse de cada muestra se ocupó el programa bioinformático Geneious v.8.1.9 (Rozen y Skaletsky, 2000). Con este programa se obtuvo una secuencia consenso para cada par de secuencias, las cuales se utilizaron para ejecutar un análisis BLAST en la plataforma de GenBank-NCBI con el propósito de confirmar la identidad de los organismos, es decir, que coincidiera con el grupo de interés. En dado caso de que la identidad no pudiera ser confirmada, las secuencias no fueron utilizadas para análisis posteriores. Se realizó un ensamble pareado cuando solo se tenía un par de secuencias para una muestra, pero si había dos o tres pares de secuencias para una sola muestra (debido a que se hicieron réplicas), se realizó un ensamble múltiple de las secuencias consenso de cada par de secuencias. Esto permite una mejor resolución de la secuencia, alinear primero por pares y luego en múltiple, ya que si se hace un alineamiento múltiple sin realizar uno en pares, es probable que la resolución en la secuencia sea irregular y difícil de analizar.

- **Ensamble pareado de secuencias con Trim**

El algoritmo Trim disponible en el programa bioinformático antes mencionado, permite hacer un corte de los extremos de las secuencias antes o después de ensamblarlas, así se eliminan las partes de la secuencia con baja calidad y genera un alineamiento más eficaz. Esto conlleva a un aumento considerable de la calidad total de la secuencia pero se pierde tamaño dónde pudiera existir información valiosa.

Para evitar esto, se compararon ambos tipos de alineamientos, uno con las secuencias completas y el otro sin los extremos. Mediante una edición manual y con ayuda de los electroferogramas de las secuencias, se recuperó información de la secuencia descartada por el algoritmo Trim, aunque, inevitablemente se perdió parte de los extremos debido a la baja calidad de las secuencias en esas partes.

- **Alineamiento múltiple de secuencias**

Se elaboró un alineamiento final con el programa Sea View v. 4.6 (Gouy y cols. 2010) con el método híbrido “muscle” (combina el método progresivo e iterativo) y, de ser necesario, se editaron manualmente.

- **Modelo de evolución molecular**

Para la obtención del modelo de evolución molecular y determinar los parámetros óptimos para la reconstrucción filogenética de los organismos estudiados, se utilizó el programa JModeltest v.2.1.10 (Darriba y cols. 2012). Se aplicó el criterio de información de Akaike (AIC) para obtener el modelo evolutivo para ejecutar el análisis de máxima verosimilitud y el criterio de información bayesiano (BIC) para el análisis de inferencias bayesianas.

- **Análisis filogenético de Máxima Verosimilitud**

El análisis basado en el método de Máxima Verosimilitud se corrió en el programa utilizando el modelo evolutivo TIM3+G (Modelo transicional), cuya partición para ingresarlo en el programa es 012032. La frecuencia de bases nitrogenadas es la siguiente: A= 0.2530, C= 0.2333, G= 0.2893 y T= 0.2244. La relación de apareamientos entre las bases nitrogenadas arrojada por el programa es la siguiente: AC= 0.6006, AG= 2.0422, AT= 1.0000, CG= 0.6006, CT= 5.8704 y GT= 1.000. El valor obtenido para Gamma es de 0.3730. El análisis se realizó con 1000 remuestreos de Bootstrap. El árbol filogenético generado con dichas especificaciones se editó con el programa Figtree v.1.4.2. (Rambaut 2006-2014).

- **Análisis filogenético de Inferencias Bayesianas**

Para el análisis fundamentado en inferencias bayesianas, se aplicaron los valores obtenidos para dicho análisis. El modelo evolutivo sugerido fue GTR+G (General Time Reversible) con la partición 010020. La frecuencia de bases nitrogenadas que maneja este modelo es de 0.2500 para todas. La relación de apareamientos entre las bases nitrogenadas es la siguiente: AC= 1.0000, AG= 2.8870, AT= 1.0000, CG=1.0000, CT= 6.4871 y GT= 1.0000. El valor obtenido para Gamma es de 0.3790. Este análisis se corrió con 10,000,000 de iteraciones. El árbol consenso generado con estas especificaciones se editó con el programa Figtree v.1.4.2. Se evaluó la estadística asociada con los árboles muestreados en las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) con el programa Tracer v.1.6.0.

## **Resultados**

La morfología de las 76 colecciones analizadas está dentro de lo descrito para cada una de las especies del complejo, pero, aun así, los ejemplares determinados como *D. squamulosum* presentan una marcada variación. El carácter que presentó una mayor variabilidad es la forma

del peridio, pues existe todo un gradiente que va de un peridio completamente liso, sin líneas de dehiscencia, sin placas o costras, ni surcos que generen una superficie irregular o “arrugada”, hasta aquellos ejemplares que poseen un peridio completamente escamoso, con grandes placas de carbonato de calcio, con forma de embudo, provocando que la superficie del mismo sea irregular y fragmentada (Figuras 9-12).

Aunque la mayoría de las descripciones sobre *D. squamulosum* mencionan la posible ausencia de estípites, en todas las colecciones analizadas no se presentó tal condición, pues siempre estuvieron presentes. Éstos mostraron variación en cuanto al tamaño, yendo de 0.11 a 0.97 mm, mientras que la textura rugosa y estriada fue constante en todos los ejemplares, puesto que tampoco se observaron estípites lisos. La coloración generalmente es blanca pero también se observan ejemplares con estípites ocráceos (Figuras 13-15). Las esporas también muestran una morfología variada. La ornamentación está compuesta por verrugas, en algunos casos se observan grupos de verrugas y líneas o pliegues sobre la superficie de la espora, mientras la coloración de éstas va del marrón claro al marrón oscuro. La gama de tamaños de las esporas se encuentra entre los 7.2 y los 13.9  $\mu\text{m}$  (valores mínimos y máximos registrados) (Figuras 16-18). Del mismo modo, la coloración del hipotalo no es constante, puesto que hay ejemplares con un hipotalo calcáreo o del mismo color del estípite, y algunos otros cuyo color es translúcido, amarillento u ocráceo. Existen colecciones cuyo tamaño de los esporocarpos presenta una altura media de 0.4 mm mientras que en otras, la altura media es de 1.2 mm. El capilicio también presenta diferencias que concuerdan con en la literatura, pues el color puede ser translúcido o marrón oscuro (Figuras 19 y 20) (Martin y Alexopoulos 1969, Nannenga-Bremekamp 1991, Nebuert y cols. 1995, Poulain y cols. 2011).

Los ejemplares definidos como *D. applanatum* exhiben caracteres más constantes. Sus esporotecas son de forma aplanada, sin embargo, hay algunas colecciones cuyo tamaño de la esporoteca es más pequeño (Figuras 21-22). No hay presencia de columela, tal y como se menciona en las descripciones (Nannenga-Bremekamp 1991, Poulain y cols. 2011). Las esporas de este grupo presentan verrugas y grupos de las mismas sobre la periferia, la coloración es marrón claro (Figuras 23-24). El hipotalo es de forma discoide y de color translúcido, mientras que los estípites son siempre de un color ocráceo y de textura rugosa. Por otro lado, el material descrito como *D. nigrisporum* también muestra variación en la

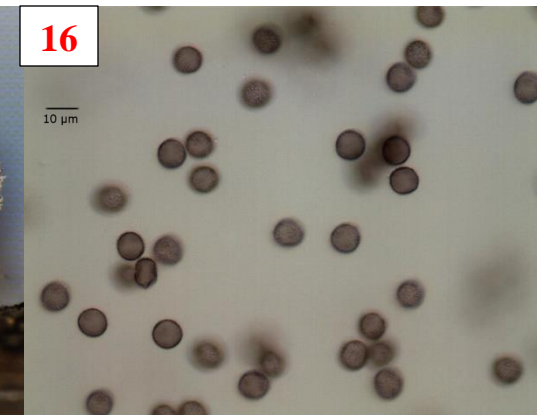
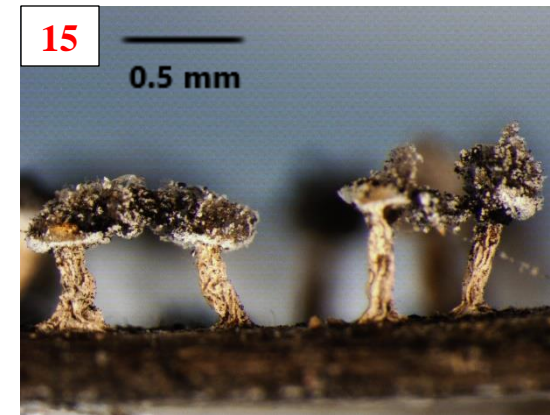
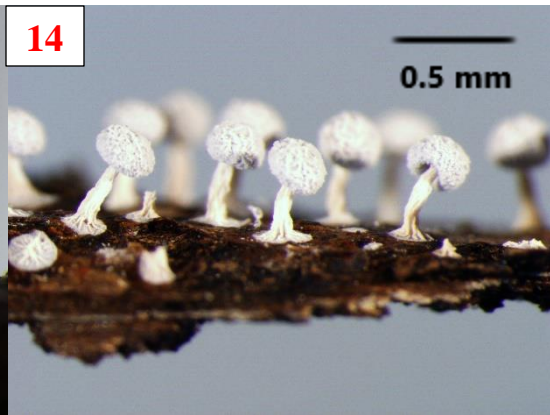
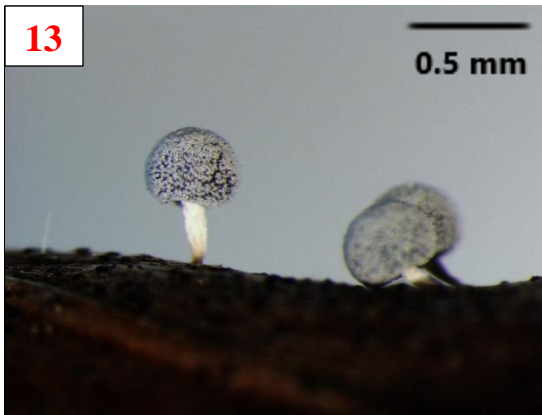
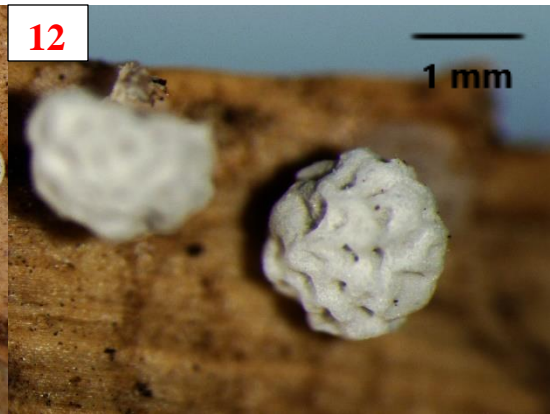
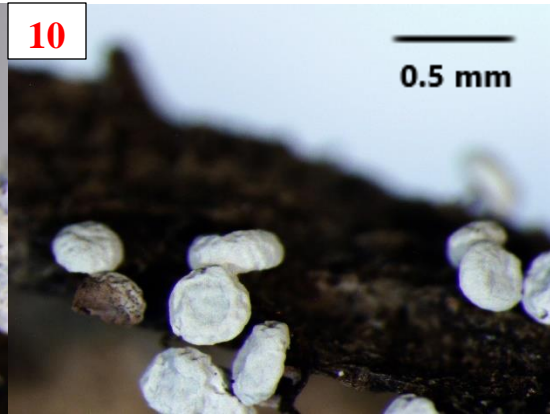
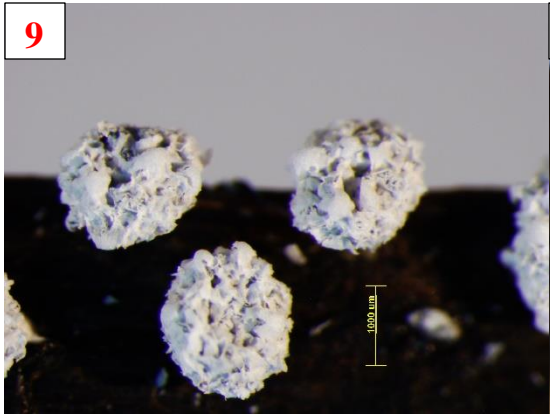
forma de las esporotecas, de igual forma que *D. squamulosum*. Estas diferencias en su morfología comprenden esporotecas globosas y hemisféricas, ligeramente aplanadas, con el peridio liso y sin fragmentarse, o bien, irregular, con la formación de surcos (Figuras 25-26). Los estípites regularmente son pequeños, comprendiendo un tercio de la altura total del esporocarpio, con una coloración blanquecina u ocrácea. El hipotalo es calcáreo o translúcido, de forma discoide. Las esporas de estas muestras son oscuras, angulares y verrucosas (Figuras 27-28). Es conveniente mencionar que algunos ejemplares son muy semejantes a otros identificados como *D. squamulosum*, complicando su separación.

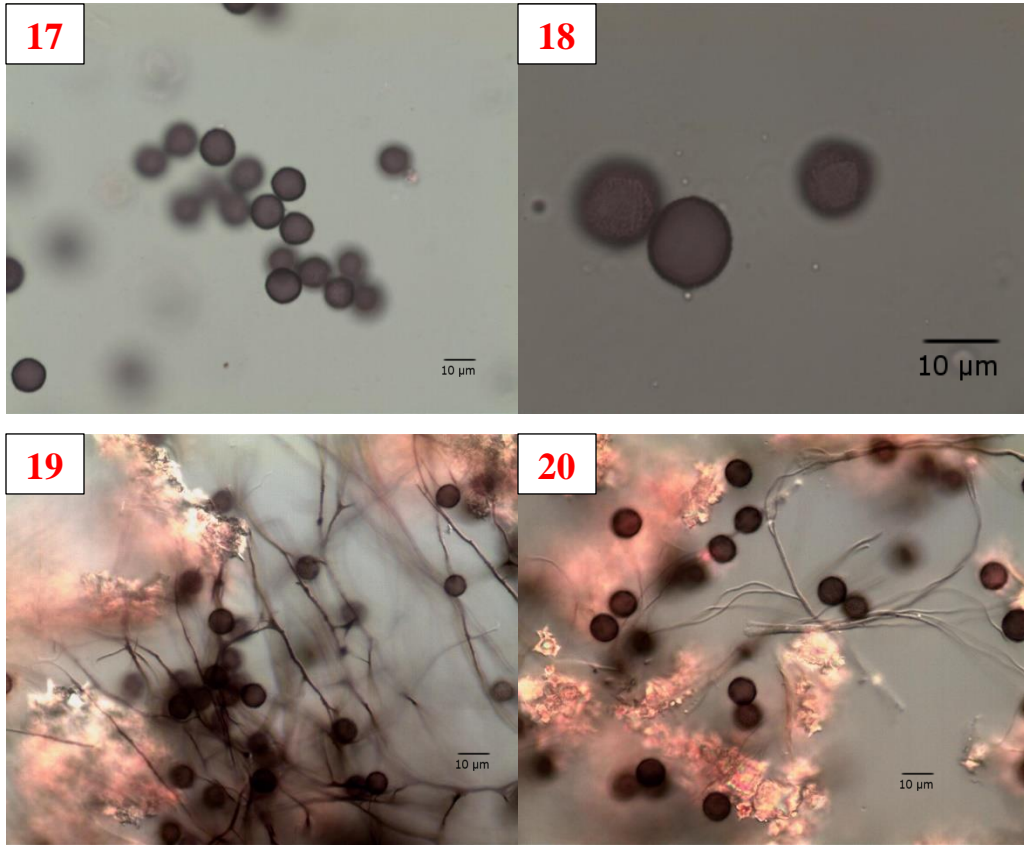
De acuerdo con la caracterización molecular, se obtuvieron secuencias de aproximadamente 960 pb y el alineamiento final estuvo conformado por 70 secuencias con un tamaño de 860 pb cada una. Con lo que respecta a los análisis filogenéticos, las topologías resultantes mediante ambos análisis fueron similares. El árbol que se muestra en la figura 29 es el obtenido con inferencias bayesianas con sus respectivos valores de probabilidades posteriores (derecha). A este árbol se anexaron los valores de bootstrap del análisis de Máxima Verosimilitud (izquierda).

La topología resultante con estos análisis es similar a la obtenida por Fiore-Donno y cols. (2010) (Figura 30). Es notorio observar que se recuperan los clados de “*Lamproderma*”, “*Didymium 2*”, “*Diderma*” “*Physaridae*” y “*Didymium 1*”. Este último clado está conformado por secuencias de morfoespecies semejantes a *D. squamulosum*, principalmente del grupo que presenta estípites calcáreos. En cambio, las morfoespecies de “*Didymium 2*” poseen estípites opacos, sin carbonato de calcio.

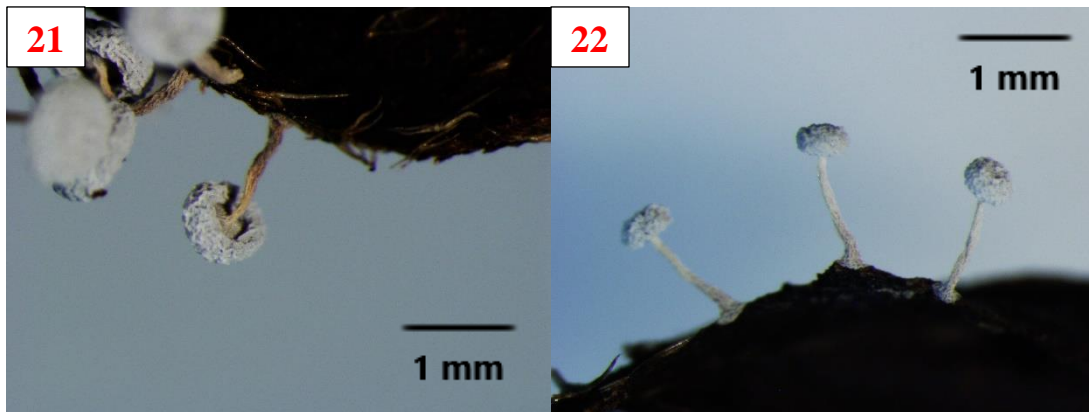
Todas las secuencias generadas en este estudio se agrupan dentro del clado “*Didymium 1*”, lo cual sugiere que al menos este grupo en particular de morfoespecies parecidas a *D. squamulosum* tienen un origen común.

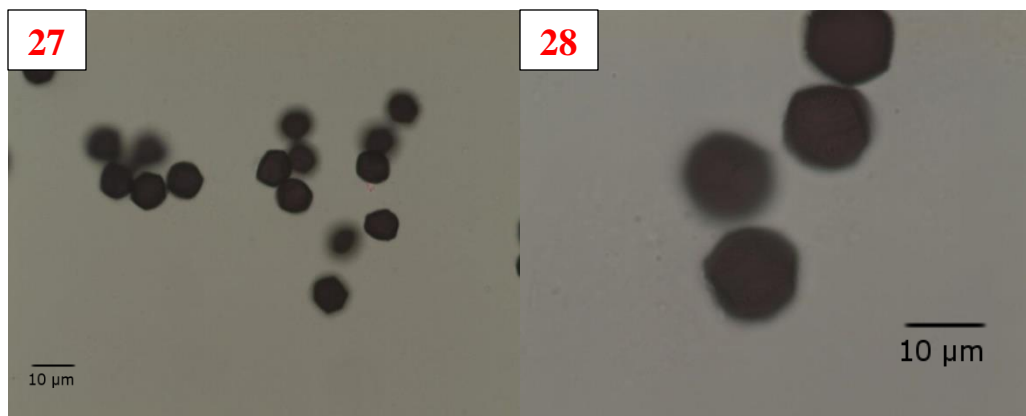
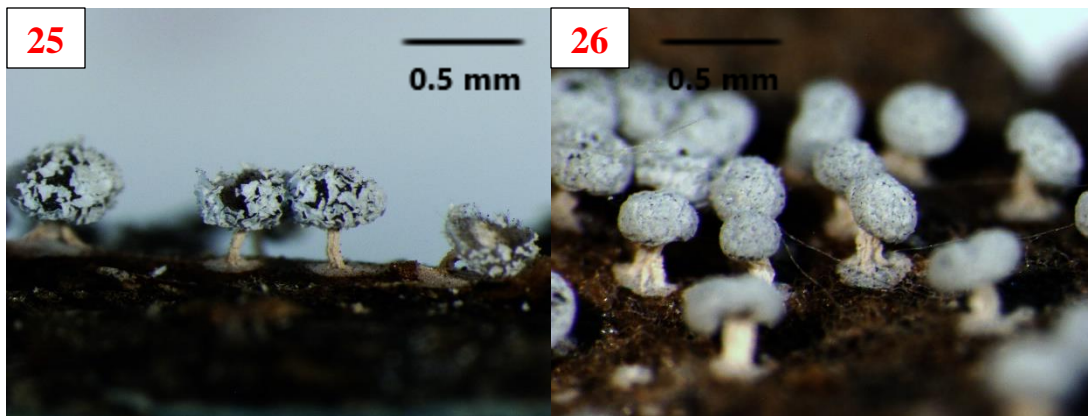
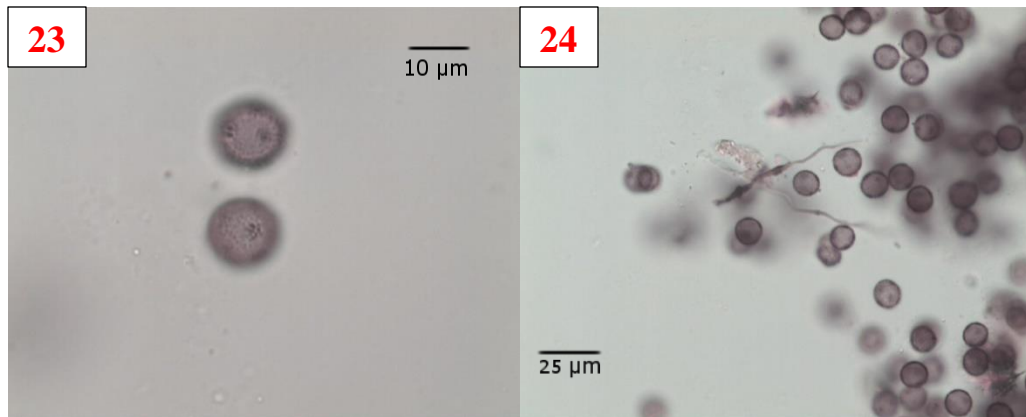
En el trabajo citado anteriormente, el clado “*Didymium 2*” aparece como un clado terminal del clado “*Didymiidae*”, mientras que al integrar las secuencias generadas en el presente estudio a dicho análisis, se observa que el clado “*Didymium 2*” resulta ser el grupo hermano del clado de “*Didymium 1*”.



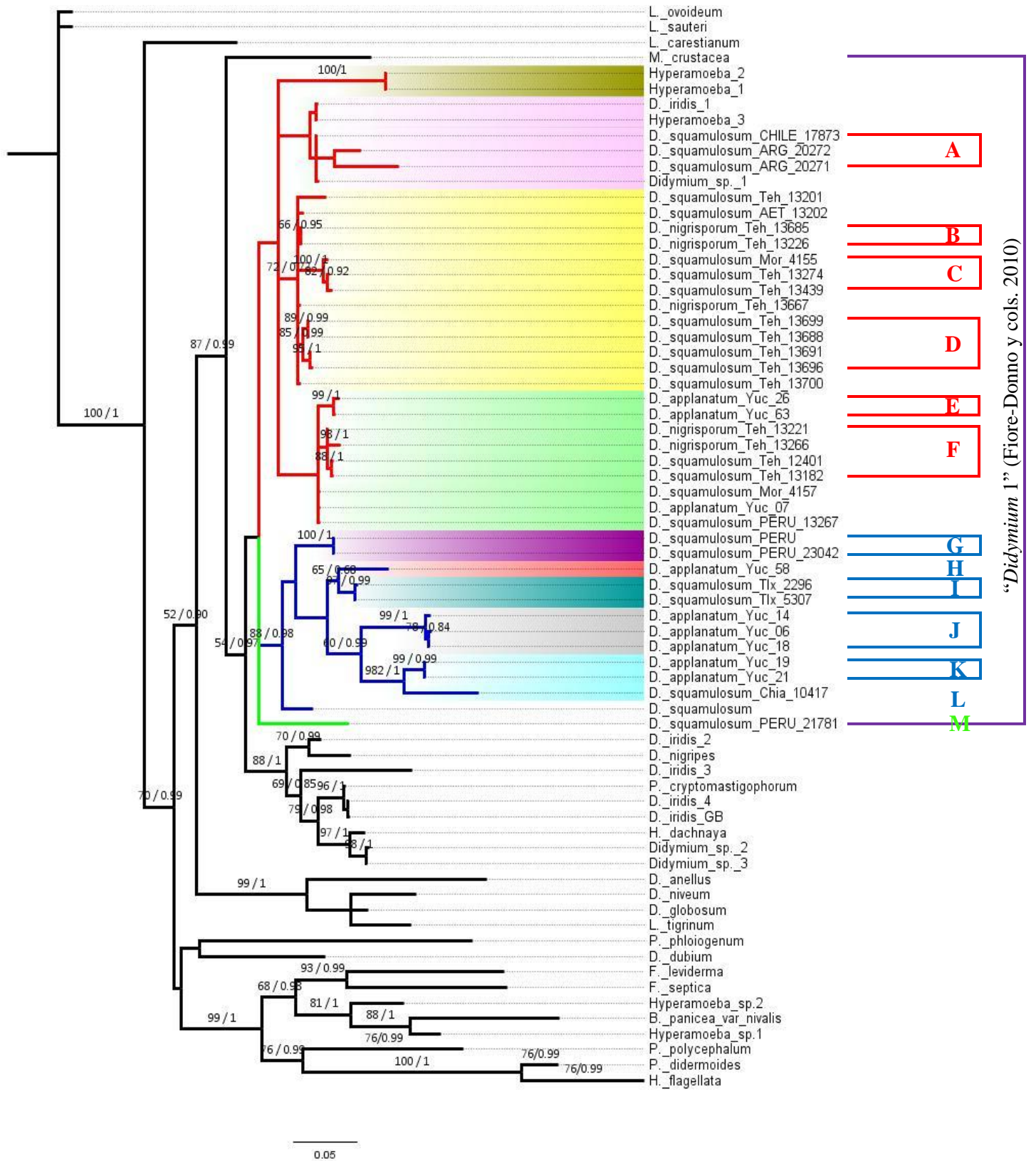


**Figuras 9-20.** Figuras 9-12: Esporotecas de *D. squamulosum*. Figuras 13-15: Esporocarpos de *D. squamulosum*. Figuras 16 y 18: Esporas de *D. squamulosum*. Figuras 19 y 20: Capilicio y esporas de *D. squamulosum*





**Figuras 21- 28. Figuras 21 y 22:** Esporocarpos de *D. applanatum*. **Figuras 23 y 24:** Esporas de *D. applanatum*. **Figuras 25 y 26:** Esporocarpos de *D. nigrisporum*. **Figuras 27 y 28:** Esporas de *D. nigrisporum*.



**Figura 29.** Filogenia del complejo de especies de *Didymium squamosum* realizado mediante Máxima Verosimilitud (valores izquierda) e Inferencias Bayesianas (valores derecha).



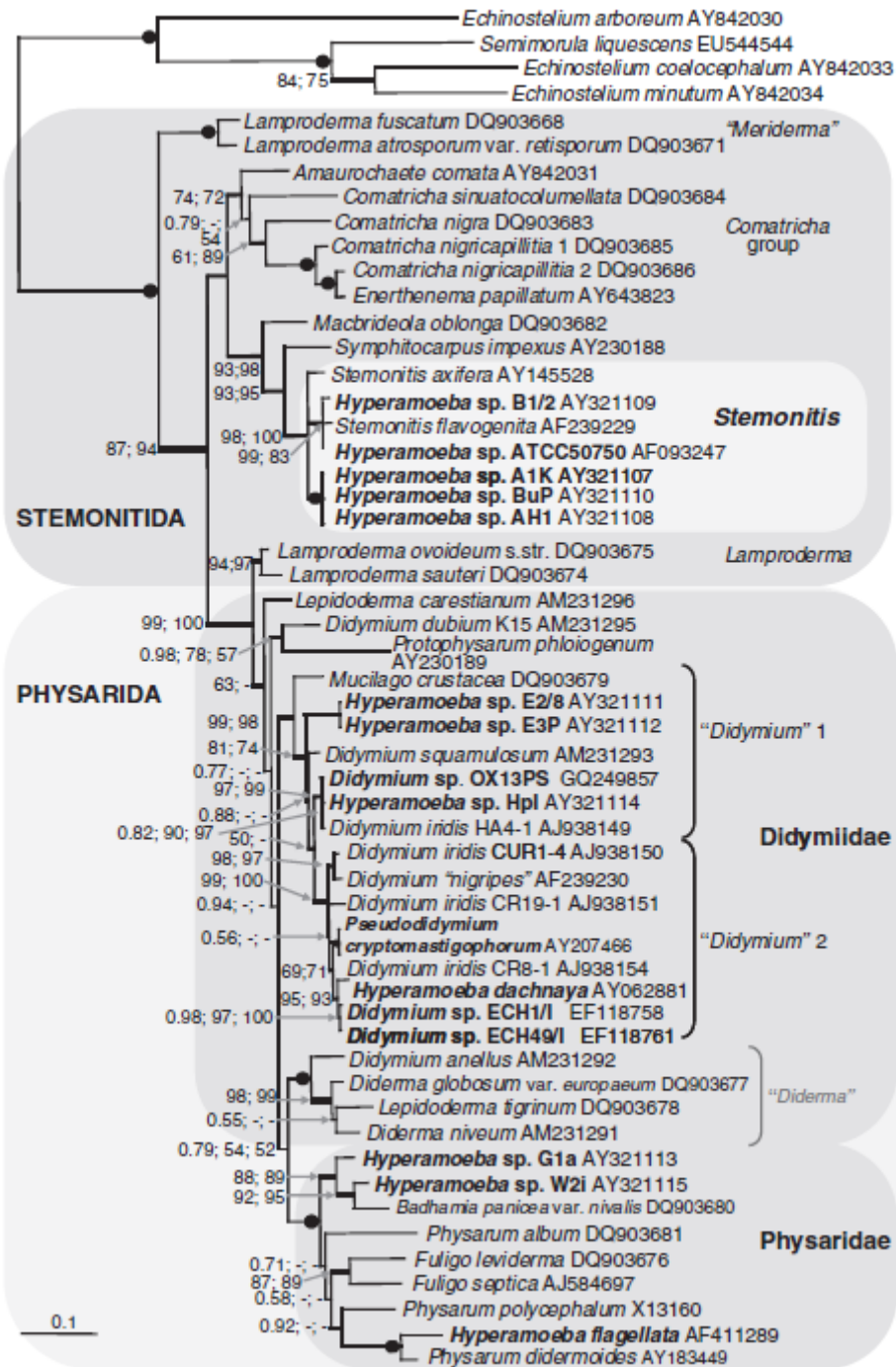


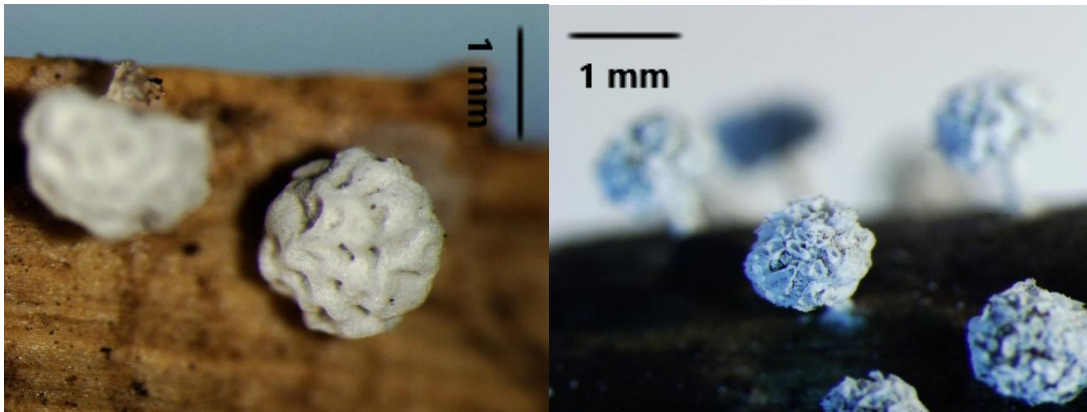
Figura 30. Filogenia realizada con una región parcial del gen 18S por Fiore-Donno y cols. 2010.

En esta filogenia (figura 29) se pueden observar tres clados (representados con líneas rojas, azules y verdes) al interior del grupo de interés, “*Didymium 1*”, en donde las relaciones no están resueltas y los valores de robustez son bajos (32/0.77). En el primer clado (líneas rojas) se agrupan la mayoría de las secuencias generadas en este estudio, así como cinco (tres de *Hyperamoeba*, una de *D. iridis* y una de *Didymium* sp.) de las seis secuencias que conforman el clado “*Didymium 1*” en los resultados de Fiore-Donno y cols. (2010). Del mismo modo, se forman cuatro sub-clados (dentro de este primer clado) cuyas relaciones no se resuelven con este análisis. El sub-clado 1 (color café), contiene dos secuencias de *Hyperamoeba* utilizadas en el estudio citado con anterioridad. El sub-clado 2 (color rosa) está conformado por tres secuencias sudamericanas, dos de Argentina y una de Chile, las cuales se generaron mediante este trabajo. Además se integran una secuencia de *D. iridis*, otra de *Hyperamoeba* y una de *Didymium* sp. del estudio anterior (Fiore-Donno y cols. 2010). Esta última secuencia parece estar más relacionada con las secuencias sudamericanas que con las del estudio original. El tercer sub-clado (color amarillo) se compone casi en su totalidad por ejemplares procedentes del Valle de Tehuacán, con excepción de uno proveniente del estado de Morelos, por lo que la consistencia de este clado parece ser geográfica. En ese grupo se incluyen especímenes determinados como *D. squamulosum* y *D. nigrisporum*. Además, es el único sub-clado con un soporte relativamente bueno (77/0.77). El último sub-clado (verde claro) agrupa ejemplares tanto morfológicamente como geográficamente heterogéneos, ya que contiene dos secuencias de *D. applanatum* estrechamente relacionadas provenientes de Yucatán, cuatro de Tehuacán que comprenden especímenes de *D. applanatum* y *D. nigrisporum* que también se encuentran relacionadas entre sí y finalmente tres secuencias de diferentes localidades pertenecientes a diferentes morfoespecies cuyas relaciones no están resueltas.

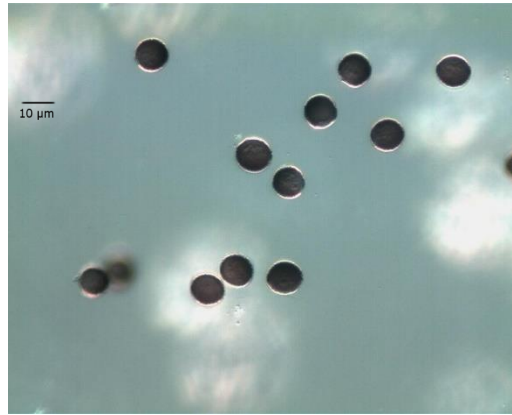
El segundo clado (líneas azules) tiene un soporte bueno (88/0.98) y las relaciones al interior están bien resueltas, formando cinco sub-clados bien soportados. El primer sub-clado (color morado) está representado por colecciones provenientes de Perú identificadas como *D. squamulosum*. El segundo (color anaranjado) corresponde a una sola secuencia de material de Yucatán, determinado como *D. applanatum*. El tercer sub-clado (color azul oscuro) comprende a las secuencias de *D. squamulosum* que proceden del estado de Tlaxcala. El sub-clado 4 (de color gris) contiene a especímenes de *D. applanatum* de selvas bajas caducifolias

de Yucatán. Finalmente, el último subclado (color azul celeste) también comprende material del sur del país, conformado por una colección de *D. squamulosum* y dos de *D. applanatum*. En la parte más basal de este clado se ubica la secuencia de *D. squamulosum* utilizada por Fiore-Donno y cols. (2010), la cual, fue la única que no se incluyó en el clado 1 (líneas rojas). Por último, el tercer clado (líneas verdes) está conformado por una sola secuencia de material procedente de Perú. Esta secuencia se localiza en la parte más basal del clado “*Didymium 1*”

De acuerdo con estos análisis, se detectaron, al menos 13 posibles linajes diferentes (clados de la A a la M), conformados dentro del grupo de interés, “*Didymium 1*”. El material del clado A, cuyos valores de robustez son bajos (41/0.65), presenta estípites con un tamaño medio de 0.64 mm y calcáreos. Las esporotecas son hemisféricas y con grandes placas de carbonato de calcio sobre el peridio, su tamaño medio es de 0.92 mm, es decir, representan casi dos tercios del tamaño total del esporocarpo, por lo cual, son catalogadas como esporotecas grandes. Las esporas son redondas, oscuras y verrucosas, sin grupos de verrugas ni retículos, con un tamaño que oscila entre los 10 y 11.7  $\mu\text{m}$  (Figura 33). El capilicio es de color marrón claro y ramificado. La colección de Chile (Figura 32) tiene estas placas con una forma típica de embudo mientras que las de Argentina (Figura 31) tienen las placas unidas formando una superficie continua pero irregular, como hendiduras.

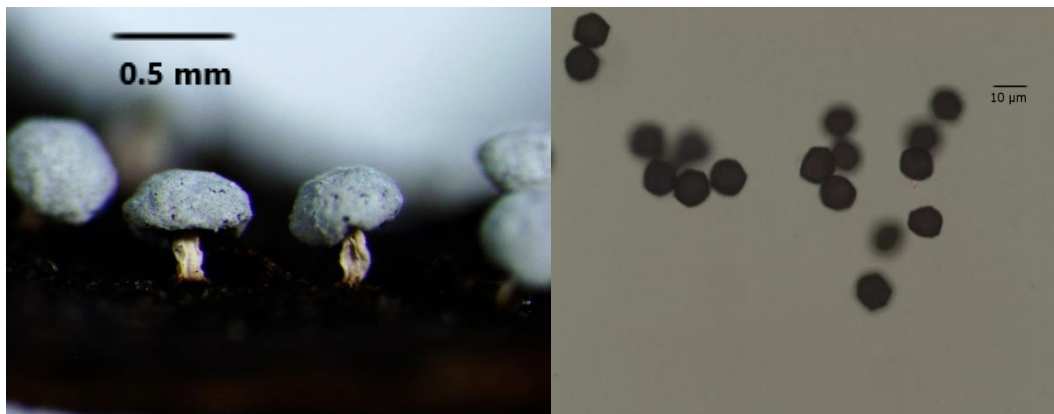


**Figura 31.** *D. squamulosum* ARG 20271      **Figura 32.** *D. squamulosum* CHILE 17873



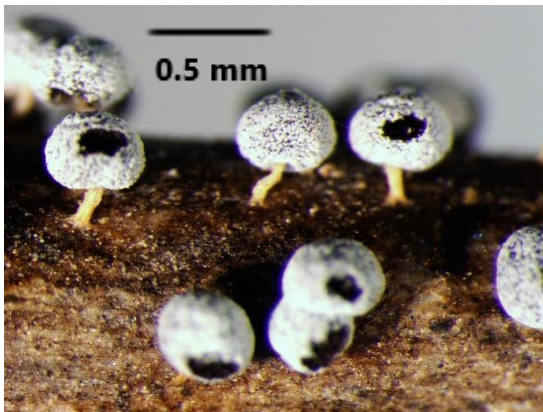
**Figura 33.** Esporas de *D. squamulosum* (17873)

El clado B contiene especímenes determinados como *D. nigrisporum* (Figura 34). Los valores de robustez son altos (66/0.95) Este material presenta estípites cortos con un tamaño de 0.28 mm, calcáreos. Sus esporotecas son hemisféricas, sin embargo, no presentan placas peridiales y su tamaño es de 0.54 mm. El peridio muestra una superficie lisa sin indicios de fragmentación. Las esporas de este grupo son angulares de color oscuro, verrucosas, con un tamaño de 11.6 a 12.7 µm (Figura 35). Su capilicio es marrón claro con algunos engrosamientos.

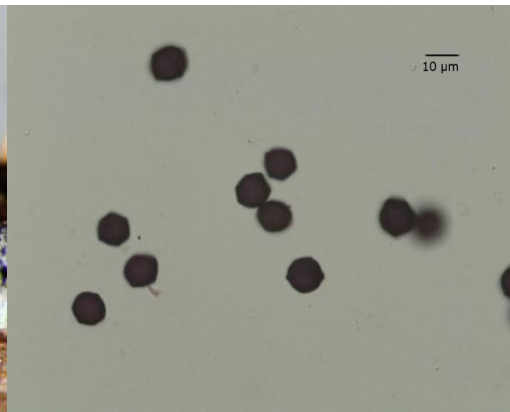


**Figura 34.** *D. nigrisporum* Teh 13226      **Figura 35.** Esporas de *D. nigrisporum* (13226)

El clado C, que presenta un buen soporte (100/1) lo conforma material identificado como *D. squamulosum* procedente del Valle de Tehuacán (Figura 36) y del estado de Morelos. Esas colecciones tienen una esporoteca globosa con un tamaño medio de 0.50 mm, tienen peridio calcáreo pero sin placas (la superficie es lisa). Su estípite es de un color blanquecino, con una altura de 0.21 mm y un hipotalo translúcido. Las esporas de este grupo son ligeramente angulares, oscuras y verrucosas con un tamaño de 11.3 a 12.6  $\mu\text{m}$  (Figura 37). Estas últimas características recuerdan a *D. nigrisporum*, sin embargo, *D. squamulosum* también puede presentar esporas con pliegues o líneas en la periferia, por lo que se decidió dejar el nombre que se le había asignado a algunas colecciones debido a la dificultad de identificarla de manera precisa a causa del solapamiento de caracteres. Su capilicio también es color marrón claro y con algunos engrosamientos.



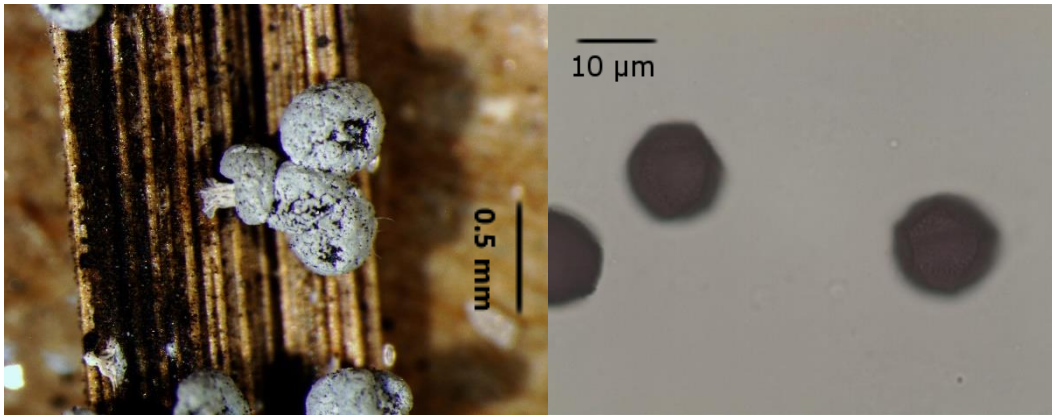
**Figura 36.** *D. squamulosum* Teh 13274



**Figura 37.** *D. squamulosum* Teh 13274

El clado D está representado por material proveniente del Valle de Tehuacán determinado como *D. squamulosum* (Figura 38). Los valores de soporte para este clado son buenos (85/0.99). De manera general los estípites son cortos y de un color blanquecino, pero la forma de las esporotecas es variada, yendo desde una forma hemisférica hasta globosa. Las placas del peridio pueden estar presentes o no en estas colecciones. El color del hipotalo también es variable, pues puede ser translúcido o calcáreo. La forma de las esporas es angular, de color oscuro y con grupos de verrugas (Figura 39). Estas características concuerdan más con la

descripción de *D. nigrisporum*, por lo que es muy probable de que se trate de material mal identificado.

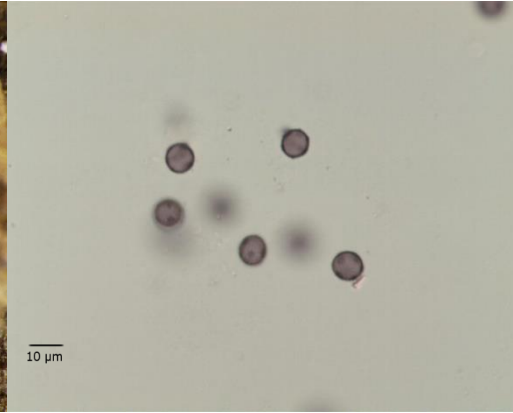


**Figura 38.** *D. squamulosum* Teh 13688    **Figura 39.** Esporas de *D. squamulosum* Teh 13696

Dos colecciones determinadas como *D. applanatum* (Figura 40) se agrupan en el clado E que presenta un buen soporte (99/1). Este material presenta un estípote largo, con un tamaño de 0.80 mm, de color blanquecino. Las esporotecas son de 0.28 mm de altura, pequeñas y con forma aplanada. Las placas de carbonato de calcio son irregulares, pues no tiene una forma definida. Las esporas presentan un tamaño de 8.4 a 9.6 µm, de color marrón claro y verrucosas con grupos de verrugas (Figura 41). El capilicio de estos especímenes es translúcido con un color rojizo demasiado claro, llegando a ser casi incoloro. Estos especímenes provienen de manglares del estado de Yucatán.



**Figura 40** *D. applanatum* Yuc 26

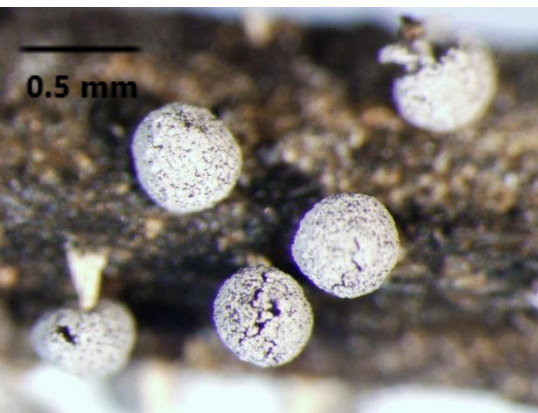


**Figura 41.** *D. applanatum* (26)

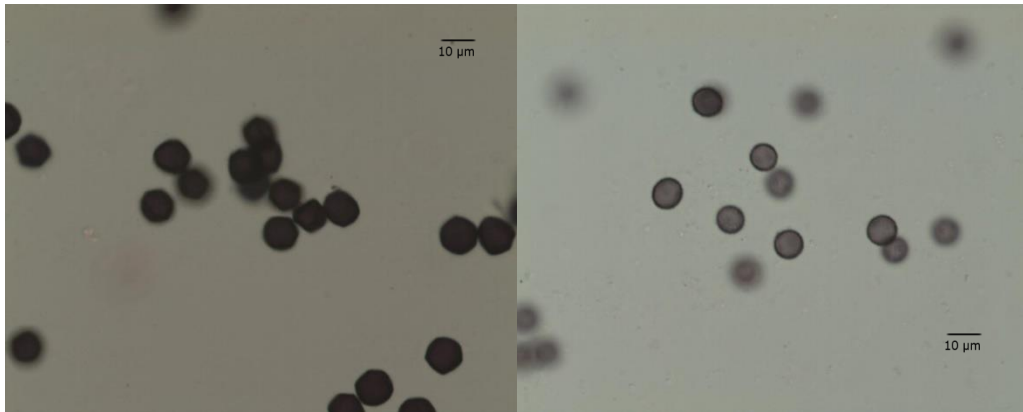
Dos ejemplares determinados como *D. nigrisporum* y dos como *D. squamulosum*, todos originarios del Valle de Tehuacán, se ubican en el clado F, cuyos valores de robustez son de 99/1 (Figuras 42 y 43). Éstos muestran estípites cortos, cuya altura es de 0.25 mm. Las esporotecas son globosas con un tamaño de 0.35 mm, el peridio no contiene placas y el carbonato de calcio forma escamas muy pequeñas que dan al peridio una apariencia granular. Las esporas de este grupo, de manera general, son verrucosas, oscuras y angulares, con un tamaño que va de los 10.6 a los 12.1  $\mu\text{m}$  (Figura 44), excepto en la colección 12401, cuyas esporas son globosas, con grupos de verrugas más marcadas y con un tamaño más pequeño, de 8.9 a 9.9  $\mu\text{m}$  (Figura 45).



**Figura 42.** *D. nigrisporum* Teh 13266

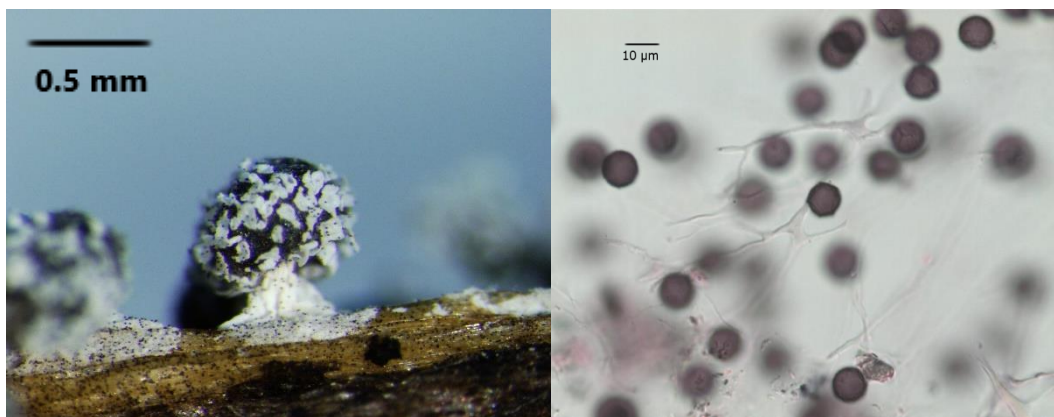


**Figura 43.** *D. squamulosum* Teh 12401



**Figura 44.** *D. nigrisporum* Teh 1326t **Figura 45.** Esporas de *D. squamulosum* (12401)

El material peruano que se agrupa en el clado G, que presenta un soporte alto (100/1) posee esporocarpos cortos. Sus estípites son reducidos pero se ensanchan en la parte basal del mismo y tienen una altura de 0.36 mm. El hipotalo es calcáreo y sus esporotecas son grandes, de un tamaño de 0.46 mm, con placas irregulares de carbonato de calcio que están separadas una de otras formando grietas diminutas (Figura 46). Las esporas de estos ejemplares son color marrón claro, verrucosas con pliegues formando “costillas”. Su tamaño va de los 10.6 a los 13.1 µm (Figura 47). El capilicio de estos especímenes es translúcido e incoloro, ramificado dicotómicamente y con ensanchamientos en donde se bifurca.



**Figura 46.** *D. squamulosum* PERU 2304 **Figura 47.** Esporas de *D. squamulosum* (23042)



El clado H está representado por una sola colección definida como *D. applanatum*, proveniente de manglares ubicados en Yucatán (Figura 48). La esporoteca no presenta la típica forma aplanada, sino más bien es hemisférica y pequeña. El estípite es de color amarillento y es largo con relación al tamaño total del esporocarpio. Las esporas presentan una ornamentación verrucosa con grupos de verrugas y un tamaño de 7.7 a 11  $\mu\text{m}$  (Figura 49). Su capilicio es de color marrón claro, delgado, ramificado y con engrosamientos pequeños.

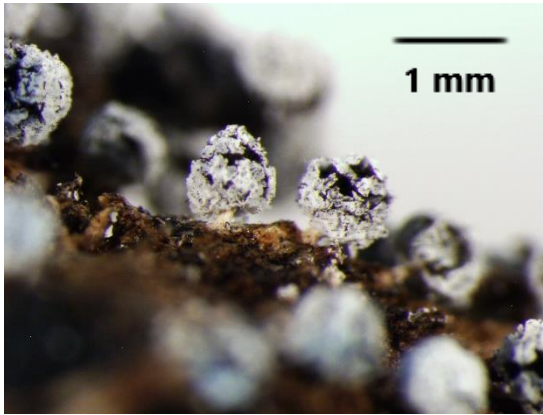


**Figura 48.** *D. applanatum* Yuc 58

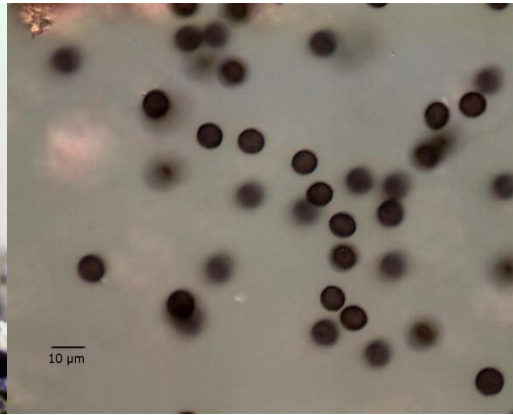


**Figura 49.** Esporas de *D. applanatum* (58)

Las colecciones del estado de Tlaxcala identificadas como *D. squamulosum* forman el clado I que tiene un valor de robustez alto (97/0.99) (Figura 50). Éstas exhiben estípites con un tamaño de 0.30 mm, de color blanco, esporotecas globosas de 0.50 mm y con grandes placas calcáreas aunque no tienen la típica forma de embudo descrita para la especie. Sus esporas presentan una coloración marrón oscura, con grupos más patentes de verrugas y un tamaño es de 7.9 – 10.2  $\mu\text{m}$  (Figura 51). El capilicio que presentan es translúcido, incoloro y poco ramificado.

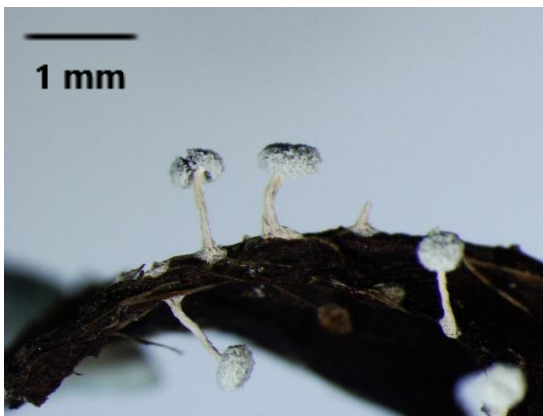


**Figura 50.** *D. squamulosum* Tlx 5307

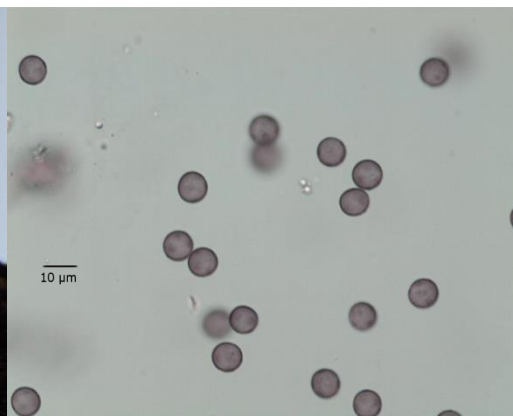


**Figura 51.** Esporas de *D. squamulosum* (5307)

Tres colecciones determinadas como *D. applanatum* que provienen de selvas bajas caducifolias de Yucatán forman el clado J con un buen soporte (99/1) (Figura 52). La morfología de estas colecciones muestra estípites largos, de una altura de 1 mm y de color amarillento o blanquecino. Sus esporotecas miden 0.26 mm de altura y son aplanadas. También son umbilicadas marcadamente por debajo de la esporoteca. Las esporas de este grupo son de color marrón claro, con grupos de verrugas y con un tamaño de 8.1 a 10.5 µm (Figura 53). El capilico es ligeramente rojizo, translúcido y con pocas ramificaciones.

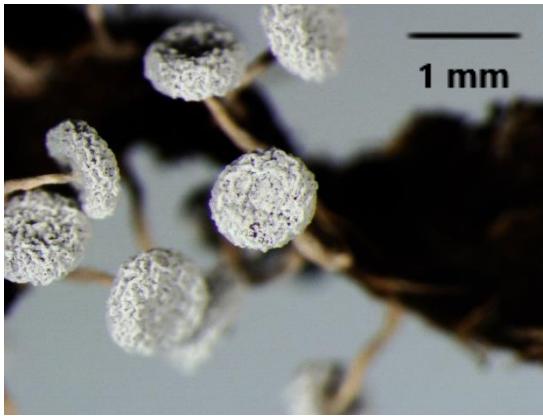


**Figura 52.** *D. applanatum* Yuc 18

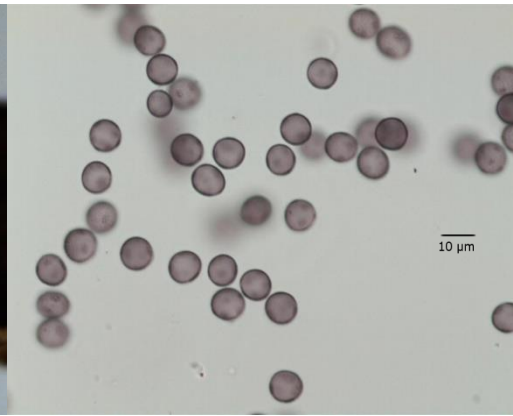


**Figura 53.** Esporas de *D. applanatum* (18)

Las últimas dos colecciones identificadas como *D. applanatum* forman el clado K con un soporte robusto (99/0.99) (Figura 54). Proceden, al igual que en el clado anterior, de selvas bajas caducifolias. Su morfología exhibe estípites con una altura de 1 mm, de color blanquecino. Las esporotecas son grandes y aplanadas, miden 0.28 mm de altura, presentan una umbilicación marcadamente por debajo de la esporoteca y peridio rugoso. Sus estípites son cilíndricos, delgados y de color ocráceo. Las esporas de este grupo son de color marrón claro, con grupos de verrugas y con un tamaño de 9.1 a 10.6  $\mu\text{m}$  (Figura 55). Su capilicio se muestra ligeramente rojizo, translúcido y poco ramificado.

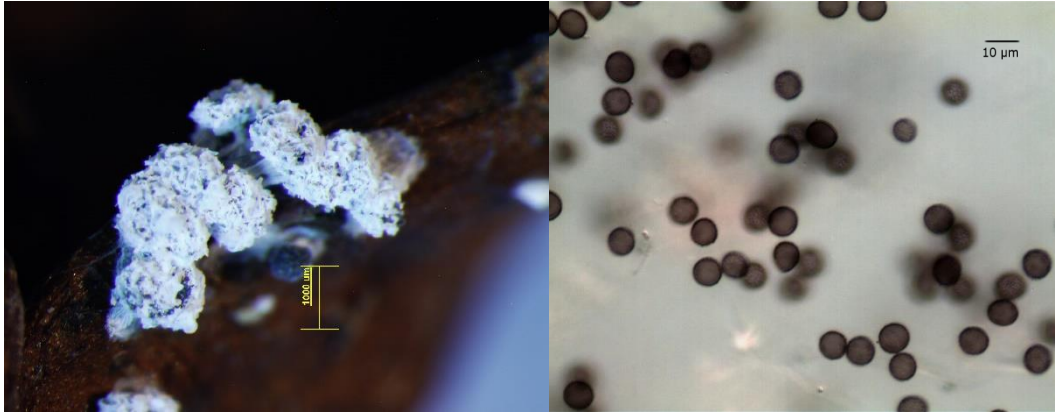


**Figura 54.** *D. applanatum* Yuc 19



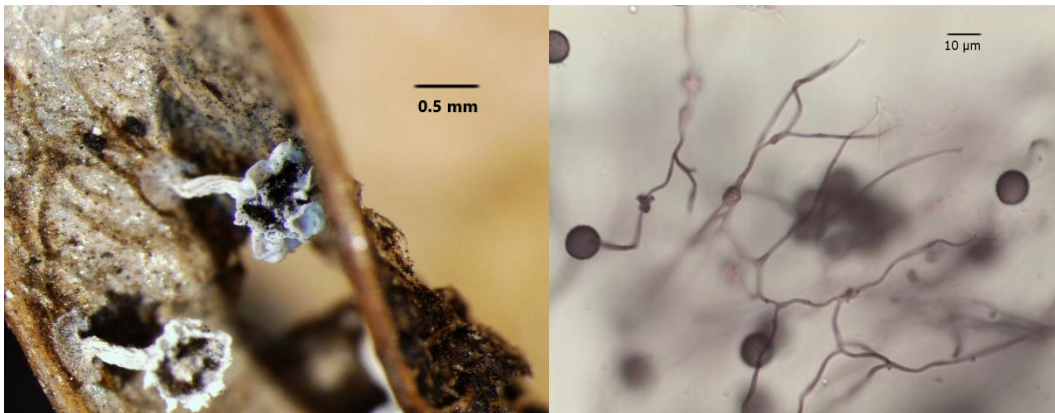
**Figura 55.** Esporas de *D. applanatum* (19)

El clado L está conformado por una colección de *D. squamulosum* procedente del estado de Chiapas. Su morfología comprende esporocarpos conglomerados con estípites calcáreos de color blanco, con estípites cortos, aproximadamente de 0.12 mm (Figura 56). Las esporotecas son aplanadas, recordando a *D. applanatum*, con un diámetro de 0.68mm. Las esporas de este ejemplar son color marrón oscuro, con grupos de verrugas y con un tamaño de 8.5 a 9.8  $\mu\text{m}$  (Figura 57). Su capilicio es incoloro y poco ramificado.



**Figura 56.** *D. squamulosum* Chia 10417 **Figura 57.** Esporas de *D. squamulosum* (10417)

Una colección identificada como *D. squamulosum* de Perú forma el clado M (Figura 58). Tiene estípites largos y calcáreos de 0.57 mm de altura. Las esporotecas son de forma hemisférica, miden 0.60 mm y presentan grandes placas de carbonato de calcio con la típica forma de embudo. El hipotalo está carbonatado y se desarrolla sobre hojarasca. Las esporas son de color marrón claro, presentan verrugas y algunas “costillas”, su tamaño está entre 10.4 y 11.4 μm (Figura 59). Su capilicio es marrón, delgado, ramificado dicotómicamente y con algunos nodos.



**Figura 58.** *D. squamulosum* PERU 2178 **Figura 59.** Esporas de *D. squamulosum* (21781)

## Discusión

La hipótesis obtenida en este trabajo muestra que existen al menos 13 linajes diferentes que podrían corresponder con entidades diferentes, especialmente en los clados G, H, I, J, K y L, pues en donde los valores de robustez arrojados por ambos análisis son altos y las relaciones en las partes más basales están bien resueltas y bien soportadas. La mayoría de los ejemplares se agrupan de acuerdo con la zona de donde provienen, como en el caso de Dagamac y cols. (2017), lo cual sugiere que representen especies con una distribución más restringida que lo que la identificación morfológica ha sugerido previamente. Esto también sugiere la existencia de algunas especies biológicas que pueden estar dominando ciertas regiones geográficas. Parte del material sudamericano, principalmente el de Argentina y Chile, se agrupa en un clado, con excepción del proveniente de Perú, que se ubica en tres clados diferentes. Las colecciones de los dos primeros países mencionados poseen una morfología consistente, mientras que las del último país presentan caracteres morfológicos más variados, lo cual indica que podría tratarse de especies diferentes, aunque es imposible asegurarlo pues los valores que dan soporte a sus clados son bajos.

El hecho de que los especímenes identificados como *D. squamulosum* se agrupen en distintos clados confirma que, al menos para esta región del planeta, se trata de un complejo de especies crípticas, tal y como lo sugiere ElHage y cols. (2000) con sus ensayos de compatibilidad reproductiva entre distintas cepas. Esto se debe a que, aunque existe todo un gradiente morfológico que cae dentro de lo descrito para la especie, se muestra evidencia de que algunos ejemplares (a pesar de ser determinados como *D. squamulosum*) son genéticamente distintos. Es el caso del material peruano (clado G) y el tlaxcalteca (clado I), pues se ubican en clados distintos, con valores de soporte altos, lo cual indica que se trata de entidades completamente diferentes a pesar de ser identificadas como una sola especie. Éstas, a su vez, son distintas en comparación con las del clado amarillo, sin embargo, es difícil conocer si las colecciones dentro de este clado también corresponden con entidades diferentes, puesto que los valores que otorgan soporte a este clado (y a los sub-clados internos) son bajos. A pesar de eso, es posible encontrar una correlación geográfica, pues en su mayoría, proviene de zonas áridas del Valle de Tehuacán, lo cual, muestra posibilidad de que sean entidades distintas, por ejemplo, del material sudamericano.

Aunque genéticamente se muestra que existen entidades distintas, la identificación de cada uno de estos grupos no es una tarea sencilla debido a la morfología semejante que poseen, y que para encontrar los caracteres que nos puedan ayudar a discernir entre entidades, se tiene que hacer análisis morfológicos más detallados como observaciones en microscopía electrónica de barrido (MEB) o ensayos morfométricos, de estructuras como la esporoteca, pues con la simple observación en microscopía de campo claro no es suficiente. Éste es el caso de *H. serpula* var. *serpula* y *H. serpula* var. *parviverrucospora* citado por Dagamac y cols. (2017), en donde la diferencia entre dichas entidades sólo puede ser detectada mediante un análisis MEB, pues el carácter que las distingue es la ornamentación de la pared celular de las esporas.

Uno de los caracteres que tiene mayor peso en la separación de grupos en este estudio es la forma de las esporotecas, pues ayuda a diferenciar a los especímenes del morfotipo *D. applanatum* de los de *D. squamulosum*, los cuales presentan esporotecas consistentemente aplanadas. Lado (2005-2018) consideró a *D. applanatum* como una variedad de la segunda. En este análisis, la mayoría de ejemplares de *D. applanatum* se agrupan en clados cuyos valores de robustez son altos y que no incluyen especímenes cuya morfología coincide más con las descripciones del *D. squamulosum* típico. Esto significa que *D. applanatum* corresponde con una o varias entidades diferentes de *D. squamulosum* que es posible diferenciar morfológicamente con relativa facilidad. Todas las colecciones de determinadas como *D. applanatum* proceden del estado de Yucatán, y sólo la colección “D. applanatum Yuc 07” presentó una morfología distinta a la reportada para la especie, consistiendo de una esporoteca globosa, y no a la típica con forma aplanada. Esto puede ser un error de identificación del ejemplar, pues éste se agrupa con ejemplares de *D. squamulosum*, con los que tiene mayor similitud morfológica, y por lo visto, genética. Las colecciones restantes de *D. applanatum* encajan sin problemas dentro de las descripciones reportadas, pero se agrupan en tres diferentes clados. Uno de estos clados comprende a los ejemplares procedente de petén de manglar (*D. applanatum* Yuc 26 y *D. applanatum* Yuc 63). Los ejemplares restantes provienen de selvas bajas caducifolias y se agrupan en dos clados. Esto sugiere que estos organismos presentan diferencias genéticas de acuerdo con el ecosistema en donde se desarrollen.

Es posible observar en la figura 26 que se forman clados (amarillo y verde) donde se encuentra material proveniente de distintas zonas y la morfología que se presenta es variable. En estos casos, es imposible encontrar un patrón morfológico preciso que nos ayude a diferenciar cada grupo. Es el caso de los ejemplares identificados como *D. nigrisporum* que se encuentran en diferentes clados, junto con la especie *D. squamulosum*. Una posible explicación para esto es que algunas de estas colecciones en realidad hayan tenido una maduración “incompleta” o se trate de formas “aberrantes”. Este fenómeno es común en los Myxomycetes, puesto que al ser de vida “efímera”, el proceso de formación de las estructuras reproductoras dura pocos días o incluso horas y los factores intrínsecos del ambiente pueden favorecer el desarrollo de ejemplares malformados (Dagamac y cols. 2017). Debido a esto, es viable pensar que esta amplia variabilidad morfológica se tratase de problemas en el desarrollo de los organismos.

En algunas ramas terminales se observa que hay secuencias de ejemplares que parecen ser idénticas (clados B, G y K). Esto puede deberse a que la región parcial del gen que se está usando en este estudio no es lo suficientemente informativa para poder obtener una mejor resolución en estas ramas dentro del cladograma. En trabajos como el de Fiore-Donno y cols. (2011), Dagamac y cols. (2017) y Feng y cols. (2016) se ha utilizado un marcador molecular adicional al usado en este estudio, el EF-1 $\alpha$ . El añadir secuencias de diferentes genes provee información que los programas utilizan para generar cladogramas con una mejor resolución. En ese caso, sería factible utilizar una región más grande de este mismo gen (18S) o anexar secuencias de otros genes a los análisis.

Es importante mencionar que, aunque se muestra que la alta variabilidad morfológica que presenta la morfoespecie *D. squamulosum* no está dada por plasticidad fenotípica, sino por variación genética, debido a que se trata de entidades diferentes y no de una sola especie, es imposible saber cuál de ellas corresponde con la especie tipo, puesto que no se incluyó una secuencia de este ejemplar, ni de algún espécimen procedente de la localidad tipo. Lo mismo podría señalarse para *D. applanatum*, de la cual tampoco se incluyó la secuencia del ejemplar tipo.

## **Conclusión**

Se observan tres clados en los que se encuentran al menos 13 linajes diferentes.

Todas las secuencias se agrupan en un solo clado llamado “*Didymium 1*”.

Los organismos están más emparentados de acuerdo con la zona de donde provienen ya que la mayoría se agrupan de esta manera, lo que indica una distribución más restringida que la sugerida por las características morfológicas.

Las esporotecas aplanadas son un carácter que separa al sub-clado donde se encuentran la mayoría de ejemplares de Yucatán, indicando que *D. applanatum* podría corresponder con uno o varios taxones independientes de *D. squamulosum*.

No es posible saber con toda seguridad si *D. nigriposrum* es una entidad diferente de *D. squamulosum*.

## **Perspectivas**

Utilizar un fragmento más grande del gen 18S para obtener una mayor cantidad de regiones informativas.

Anexar al menos un gen más al estudio, en este caso, el EF-1 $\alpha$ .

Realizar análisis más detallados sobre la morfología de los ejemplares que incluyan observaciones de los patrones de la ornamentación de las esporas en MEB o estudios de la morfometría de estructuras como la esporoteca.

Es pertinente estudiar especímenes de otras regiones o ecosistemas, además de incluir a los especímenes tipo o ejemplares procedentes de la localidad tipo.

Ejecutar otro tipo de estudios, como los de coalescencia donde se incluyan análisis multigénicos.



## Bibliografía

Aguilar, M., Fiore-Donno, A. M., Lado, C., Cavalier-Smith, T. (2013). Using environmental niche models to test the 'everything is everywhere' hypothesis for *Badhamia*. *The ISME Journal* 1-9.

Baldauf, L. S. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* 46 (3): 263–273.

Dagamac, N. H. A., Rojas, C., Novozhilov, Y. K., Moreno, G. H., Schlueter, R., Schnittler, M. (2017). Speciation in progress? A phylogeographic study among populations of *Hemitrichia serpula* (Myxomycetes). *PLoS ONE* 12(4).

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8), 772.

Eduars A., Civetello, A., Hammond H. A., Caskey, T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human Genetics* 49:746-756.

ElHage, N., Clark, D. J., Stephenson, L. S. (2000). Biosystematics of the *Didymium squamulosum* complex. *Mycologia* 92 (1): 54-64.

Estrada Torres, A. (2015). *Mixomicetes de la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. JF062. México D. F.

Feng, Y., Klahr, A., Janik, P., Ronikier, A., Hoppe, T., Novozhilov, K. Y., Schnittler, M. (2016). What an intron may tell: Several sexual biospecies coexist in *Meriderma* spp. (Myxomycetes). *Protist* 167: 234-253.

Fiore-Donno, A. M., Meyer, M., Baldauf, L. S., Pawlowski, J. (2008). Evolution of dark-spored Myxomycetes (slime-molds): Molecules versus morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi:10.1016/j.ympev.2007.12.011.

Fiore-Donno, A. M., Kamono, A., Chao, E. E., Fukui, M., Cavalier-Smith, T. (2010). Invalidation of *Hyperamoeba* by transferring its species to other genera of Myxogastria. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (2): 189-196.

Fiore-Donno, A. M., Novozhilov, K. Y., Meyer, M., Schnittler, M. (2011) Genetic structure of two protist species (Myxogastria, Amoebozoa) suggests asexual reproduction in sexual amoebae. *PLoS ONE* 6(8): e22872. doi:10.1371/journal.pone.0022872.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010). Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27 (2) 221-224.

Guindon, S., Gascuel, O. (2003). PhyML: "A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood". *Systematic Biology*, 52(5):696-704.

Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66(4):411-453.

Hillis, D. M., Wiens, J. J. (2000). Molecules versus morphology in systematics. In: J.J. Wiens (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.

Ing, B. (1994). The phytosociology of mixomicetes. *New Phytologist* 129: 175-202.

Lado, C. (2005-2018). An online nomenclatural information system of Eumycetozoa. <http://eumycetozoa.com>

Lado, C., Wrigley de Basanta, D., Estrada-Torres, A., Stephenson, L. S. (2012). The biodiversity of myxomycetes in central Chile. *Fungal Diversity*. doi 10.1007/s13225-012-0159-8.

Lado, C., Wrigley de Basanta, D., Estrada-Torres, A., Stephenson, S. L. (2016). Myxomycete diversity in the coastal desert of Peru with emphasis on the lomas formations. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 73: e032.

Martin, G. W., Alexopoulos, C. J. (1969). *The Myxomycetes*. University Iowa Press, Iowa City. Pp 560.

Martin, G. W., Alexopoulos, C. J., Farr, M. L., (1983). *The Genera of Myxomycetes*. University of Iowa Press, Iowa City, USA.

Nannenga-Bremekamp, N. (1991). *A guide to temperate myxomycetes*. Biopress. Bristol. Pp 409.

Neubert, Hermann., Nowotny, Wolfgang., Baumann, Karlheinz. (1995). *Die Myxomyceten, Band 2 Physarales*.

Poulain M., Meyer, M., Bozonnet, J. (2011). *Les Myxomycètes*. Tomo I y II. Francia.

Rentería, A. M. (2007) Breve revisión de los marcadores moleculares en: *Ecología Molecular*. Eguiarte, E. L., Souza, V., Aguirre, X (eds). SEMARNAT, México DF pp. 541.

Rozen, S., Skaletsky, J. H. (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawertz, S., Misener, S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N. J. pp 365-386.

Ronquist, F., Huelsenbeck J. P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572-1574.

Sáez, A. G. (2009). Genes y especies. *Ecosistemas* 18(1):3-9.

Sanderson, M. J., Donoghue, M. J. (1989). Patterns in levels of homoplasy. *Evolution* 44:1671-1684.

Stephenson, L. S., Fiore-Donno, A. M., Schnittler, M. (2011). Myxomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (2011): 2237-2242

Stephenson, L. S., Winsett, E. K. (2008). Using ITS sequences to assess intraspecific genetic relationships among geographically separated collections of the myxomycete *Didymium squamulosum*. *Revista Mexicana de Micología* 27: 59-65.

## Anexos

### Anexo 1. Caracteres morfológicos.

<b>Caracteres morfológicos:</b>	<b>Definición:</b>
<b>Esporocarpo</b>	Estructura reproductora, en este caso, de los Myxomycetes que se originan por fragmentación y concentración del plasmodio y que puede estar diferenciada en un hipotalo estípite y esporoteca. Son estáticos y portan a las esporas.
<b>Hipotalo</b>	Es la estructura que une al esporocarpo con el sustrato. Es membranoso o coriáceo.
<b>Estípite</b>	Estructura que separa a la esporoteca. Suele ser tubular o fibrosa e incluso calcárea. Algunas especies pueden carecer de esta estructura.
<b>Peridio</b>	Envoltura membranosa o coriácea que cubre la esporoteca. Puede ser evanescente o perenne, dependiendo de la especie.
<b>Columela</b>	Prolongación del estípite en el interior de la esporoteca. Presenta el mismo origen y conformación que el estípite.
<b>Capilicio</b>	Filamentos tubulares, reticulares o filiformes encontrados en el interior de la esporoteca. Ayudan a la dispersión de las esporas.
<b>Esporoteca</b>	Parte del esporocarpo que contiene a las esporas. Su forma y coloración son variados.
<b>Espora</b>	Elemento reproductor localizado en el interior de la esporoteca. Generalmente de forma globosa con ornamentación diversa. Su tamaño oscila entre los 5 y 20 $\mu\text{m}$ .