



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de caracteres moleculares y fenotípicos de
talos liquénicos de *Usnea* subgénero *Usnea* del
Parque Nacional La Malinche**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Juanita Tlalmis Corona

Directora

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2020



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de caracteres moleculares y fenotípicos de
talos liquénicos de *Usnea* subgénero *Usnea* del
Parque Nacional La Malinche**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Nombre de la Alumna

Juanita Tlalmis Corona

Comité Tutorial

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Arturo Estrada Torres

M. en C. Alejandro Kong Luz

Dr. Sergio Iván Ancona Martínez

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2020



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

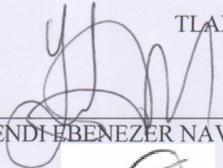


**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

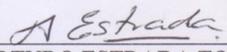
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Juanita Tlalmis Corona** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Análisis de caracteres moleculares y fenotípicos de talos liquénicos de *Usnea* subgénero *Usnea* del Parque Nacional La Malinche”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., 12 DE DICIEMBRE 2019



DRA. YENDI EBENEZER NAVARRO NOYA



DR. ARTURO ESTRADA TORRES



DR. SERGIO IVÁN ANCONA MARTÍNEZ



M.C. ALEJANDRO KONG LUZ



DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ



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



AGRADECIMIENTOS

Posgrado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC),
Universidad Autónoma de Tlaxcala.

INFR-2015-01 CONACyT, solicitud: 253217. Estudio de comunidades microbianas en
diferentes ambientes terrestres.

CONACyT No. 787555

A la Estación Científica La Malinche (UATx-UNAM).

Al Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CTBC.

Al comité tutorial:

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Arturo Estrada Torres

M. en C. Alejandro Kong Luz

Dr. Sergio Iván Ancona Martínez

Dr. José Luis Martínez y Pérez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco inmensamente el valioso apoyo de la Dra. Yendi Navarro-Noya, por invitarme a trabajar en su gran equipo de trabajo y permitirme desarrollar esta propuesta, por su disponibilidad, confianza y dedicación para realizar este proyecto, por estar siempre al pendiente de sus alumnos y, sobre todo, gracias por dejarse llevar en el mundo mágico de los líquenes.

Al Dr, Arturo Estrada-Torres, por su valiosa colaboración en este proyecto, por su gran entusiasmo al compartir sus ideas, por la revisión y orientación en las últimas etapas de esta investigación.

Al M. en C. Alejandro Kong, por su colaboración en el proceso de análisis de resultados, por las respuestas oportunas a mis inquietudes y por sus valiosos comentarios en cada evaluación tutorial.

Agradezco a los Drs. Yosef Chávez y Carmine Fusaro, al M. en C. Samuel Nolasco y a Silvia por gran apoyo en las salidas a campo, sin ustedes no me hubiera divertido tanto.

A la M. en C. Ligia Muñoz y a Ana Lilia Toriz, por su invaluable apoyo en la parte experimental del proyecto. Por su compañerismo en el laboratorio y por las charlas largas cada vez que nos fallaba algo.

RESUMEN

El género *Usnea* es de los más diversos dentro de la familia Parmeliaceae e incluye entre 300 y 600 especies. Se encuentra ampliamente distribuido en todos los continentes, aunque algunas especies tienen una delimitación restringida. La delimitación de las especies de *Usnea* es muy compleja, debido a su gran variación morfológica, anatómica y química. A pesar de las revisiones taxonómicas que se han realizado para el género, la identificación de caracteres taxonómicos apropiados para describir a algunas especies sigue siendo imprecisa, por lo cual, la diversidad real del género, así como las relaciones filogenéticas entre las especies, aún se desconocen. Debido a que la identificación de las especies de *Usnea* basada en los caracteres morfológicos es compleja, se ha optado por el uso de datos moleculares en conjunto con la taxonomía tradicional para determinar los límites de las especies dentro del género. En este estudio se utilizaron datos moleculares de las regiones ITS1 e ITS2 (ITS) de 117 ejemplares del subgénero *Usnea* del género *Usnea* recolectados en el Parque Nacional La Malinche (PNLM), los cuales se relacionaron con caracteres morfológicos, anatómicos y químicos. Bajo estos criterios, los ejemplares fueron catalogados en 12 morfotipos. La filogenia obtenida por máxima verosimilitud reveló cuatro clados que corresponden con los cuatro subgéneros circunscritos como: *Dolichousnea*, *Eumitria*, *Neuropogon* y *Usnea*, así como la sección *Usnea* dentro del subgénero *Usnea*, donde se agrupan la mayoría de los ejemplares del PNLM. Sin embargo, la resolución dentro de los clados del subgénero *Usnea* está pobremente resuelta, particularmente en los clados representados por las especies: *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata* y *U. hirta*, así como nueve clados representados únicamente por ejemplares del PNLM a los que se les refirió como *Usnea* 1 - 9. Los morfotipos 11 y 12, diferenciados morfológicamente por las estructuras de reproducción asexual y sexual, respectivamente, se distribuyen en la mayoría de los clados del árbol filogenético. Debido a la escasez de secuencias de especies de *Usnea* en las bases de datos, en comparación al registro taxonómico de las especies, y a la baja resolución filogenética, no se pudieron identificar a los ejemplares del PNLM a nivel de especie. Los datos obtenidos sugieren que los caracteres morfoanatómicos y químicos son altamente homoplásicos en el género y que el PNLM podría abarcar una gran diversidad de especies de *Usnea* o bien, podría tratarse de especies con divergencia reciente, lo que impide identificar con certeza a sus especies o reconocer nuevas especies. También es posible que la región ITS está muy conservada en los ejemplares analizados. Por lo que aún hace falta generar información detallada de los caracteres fenotípicos informativos y moleculares, incluyendo diferentes loci, de ejemplares de distintas regiones geográficas para establecer hipótesis más robustas sobre la delimitación de las especies de los complejos reconocidos en este trabajo.

ABSTRACT

Usnea is one of the largest genera in the family Parmeliaceae, as includes between 300 and 600 species. It is distributed worldwide, although some species have a restricted distribution. The delimitation of the species of *Usnea* is complicated due to its morphological, anatomical and chemical variation. Despite the taxonomic reviews that have been made for the genus, the identification of the appropriate taxonomic characters to describe some species remains imprecise. Consequently, the real diversity of the genus and the phylogenetic relationships between its species remain largely unknown. Recently, the use of molecular data together with the traditional taxonomy to determine the limits of the species of genus has been very useful. In this study, molecular data from the regions ITS1 and ITS2 (ITS) of 117 specimens the *Usnea* subgenus *Usnea* collected in the Malinche National Park (PNLM) were generated and related with morphological, anatomical and chemical characters. Under these criteria, the specimens were cataloged in 12 morphotypes. The phylogeny obtained by maximum likelihood revealed four clades that correspond to the four circumscribed subgenera: *Dolichousnea*, *Eumitria Neuropogon* and *Usnea*, as well as the section *Usnea* within the subgenus *Usnea*, where most of the specimens from the PNLM were grouped. However, the resolution within the clades of the subgenus *Usnea* is poorly resolved, particularly, in the clades represented by the species: *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata* and *U. hirta*, as well as nine clades that only clustered specimens of the PNLM referred to as *Usnea* 1 - 9. The morphotypes 11 and 12 were found in most clades of the phylogenetic tree, morphologically differentiated by asexual and sexual reproduction structures, respectively. The low phylogenetic resolution did not allow the identification of the specimens of the PNLM at species level. The data obtained suggest that the morpho-anatomic and chemical characters are highly homoplastic in the genus and that the PNLM might harbours a great diversity of *Usnea* species. Possibly, the recent divergence of the genus makes the species very hard to identify with certainty or to recognize new species. It is also possible that the ITS region is highly conserved in the analyzed specimens. So, it is still necessary to generate information of diagnostic phenotypic and molecular characters, including different loci, of specimens from different geographical regions to establish robust hypotheses about the delimitation of the species of the species complexes recognized in this work.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El género <i>Usnea</i> Dill. ex Adans	15
1.2. Caracteres morfológicos, anatómicos y químicos del género <i>Usnea</i>	16
1.2.1. Morfología	16
1.2.2. Anatomía	19
1.2.3. Química	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Primeros estudios moleculares del género <i>Usnea</i>	24
2.2. Estudios de <i>Usnea</i> en México	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo general:	29
4.2. Objetivos particulares:	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Área de estudio	30
5.2. Trabajo en campo	30
5.3. Trabajo de laboratorio	32
5.3.1 Caracterización morfológica, anatómica y química	32
5.3.2 Extracción de ADN	33
5.3.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS1-ITS2	34
6. ANÁLISIS DE DATOS	35
6.1. Análisis de calidad de las secuencias	35
6.2. Análisis de las secuencias del ITS	35
6.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	36
6.4 Análisis de distancia genética	36
7. RESULTADOS	37
7.1. Análisis morfológicos, anatómicos y químicos	37
7.2. Extracción y amplificación del ADN	39

7.3. Análisis filogenético.....	39
7.4 Distancia genética	52
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	63
11. REFERENCIAS	64
12.ANEXOS	73

1. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos que surgen de la asociación simbiótica entre un hongo denominado micobionte y uno o más microorganismos fotosintéticos, i.e. algas verdes y cianobacterias, denominados fotobionte (Brodo *et al.*, 2001; Nash III, 2008). Los micobiontes que participan en la asociación liquénica son principalmente del phylum Ascomycota y pocos del phylum Basidiomycota. Los géneros de fotobionte más frecuentes entre las algas verdes (Chlorophyta) son *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa* y *Myrmecia*, y entre las cianobacterias (Cyanobacteria) se encuentran *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gloeocapsa* y *Calothrix* (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Bungartz *et al.*, 2010). Desde el punto de vista taxonómico y de acuerdo con las normas del Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (Stiftung Herbarium Greuter), la clasificación de los líquenes se basa únicamente en el micobionte, es por ello que son ubicados dentro del Reino Fungi (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Bates *et al.*, 2010).

Durante la asociación liquénica, el micobionte es beneficiado con el fotosintato que produce el fotobionte o del suministro interno de nitrógeno que realizan algunas cianobacterias. El fotobionte recibe la protección de la radiación solar, el suministro de agua y minerales necesarios para su sobrevivencia y nutrición, así como el soporte estructural del talo (Purvis, 2000; Brodo *et al.*, 2001; Nahs III, 2008). La mayoría de los micobiontes son específicos para la elección del fotobionte al momento de formar el talo liquénico (Beck *et al.*, 1998), de tal manera que las hifas del hongo rodean a las células del fotobionte originando nuevas estructuras morfológicas (Hawksworth *et al.*, 2005). El grado de liquenización es variable ya que algunas células del fotobionte se asocian al azar con las hifas del micobionte, mientras que otras forman un talo complejo con capas estratificadas bajo el tejido cortical del micobionte (Nahs III, 2008). Esto da lugar a cuatro formas de crecimiento que son: costrosa, foliosa, fruticosa y compuesta (Herrera-Campos y Lücking, 2009; Bungartz *et al.*, 2010).

Los líquenes se reproducen de forma sexual y asexual (Barreno y Pérez-Ortega, 2003). El micobionte se reproduce de forma sexual mediante la producción de esporas por medio de estructuras reproductivas llamadas apotecios y peritecios, mientras que el fotobionte se

reproduce solo de manera asexual (Morales *et al.*, 2009). En ocasiones es difícil que las esporas del micobionte encuentren rápidamente a su socio fotosintético para el restablecimiento de la simbiosis (Nash III, 2008), por lo que el talo liquénico genera estructuras asexuales llamados isidios, soledios y soralios que contienen ambos simbiontes para reproducirse de manera asexual y de este modo puedan desarrollarse y establecerse nuevamente (Gilbert, 2004).

La distribución de los líquenes es extensa debido a la alta capacidad que tienen para deshidratarse y permanecer en un estado metabólicamente inactivo, por lo que son capaces de colonizar gran variedad de hábitats como bosques templados y tropicales, regiones polares, zonas alpinas y desiertos (Galloway, 2008; Nash II, 2008; Araujo 2015). La mayoría de los líquenes son terrestres, pero algunos pueden crecer en corrientes de agua dulce y en zonas intermareales (Nash III, 2008). Crecen sobre todo tipo de sustratos, tales como corteza, hojas, musgo, suelo, roca, materia en descomposición, sobre otros líquenes e incluso en materiales manipulados y/o hechos por el hombre, como vidrio, plástico, aluminio, madera y distintos materiales de construcción (Thormann, 2006; Herrera-Campos y Lücking, 2009; Sancho, 2011).

La importancia de los líquenes en los ecosistemas es significativa. Pueden ser organismos pioneros y aparecer en las etapas iniciales de sucesión en algunos ambientes (Ahmadjian y Hale 1973; Richardson 1988), contribuyen a la formación de las primeras capas de suelo, pues son capaces de degradar la roca, participan en la estabilización de suelos desérticos, evitan la erosión e intervienen en la fijación de nitrógeno en ambientes oligotróficos (McCune, 1993; Nash II, 2008). Desde el punto de vista de conservación, los líquenes proveen refugio y alimento para el desarrollo y establecimiento de varios organismos. Además, algunas especies son utilizadas como bioindicadores de la calidad del aire, de la contaminación por metales pesados y para conocer la continuidad de los bosques, pues son sensibles a los cambios ambientales (Purvis, 2000; Brodo *et al.*, 2001; Nimis *et al.*, 2002; Hawksworth *et al.*, 2005). Desde el punto de vista biotecnológico, son aprovechados por el hombre con fines alimenticios y de bioprospección (Brodo *et al.*, 2001; Müller 2001; Gilbert, 2004).

Para la identificación taxonómica de estos organismos, tradicionalmente se utiliza la morfología del talo liquénico (coloración y la presencia de rizinas, máculas, tomento, cilios, cifelas y pseudocifelas), la presencia de estructuras reproductivas sexuales y asexuales (apotecios, peritecios, isidios y soledios), la anatomía de las estructuras reproductivas sexuales (tipo de asca y ascosporas) y la anatomía del talo liquénico (corteza inferior/superior y médula) (Brodo *et al.*, 2001; Nahs III, 2008; Ekman *et al.*, 2008) (Figura 1). Otro elemento con valor taxonómico muy importante en los líquenes es la identificación de metabolitos secundarios debido a que tienen influencia en la coloración del talo liquénico y pueden ser característicos de especies, géneros e incluso familias (Culberson y Hale, 1973; Lumbsch, 1998; Ament, 2012). No obstante, se ha demostrado que existe gran variabilidad morfológica dentro de algunos géneros y el número de caracteres fenotípicos útiles son a menudo limitados, e.g. en el género *Usnea* (Articus *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2006; Printzem, 2010; Wirtz *et al.*, 2012; Moncada *et al.*, 2013). Incluso, en manos de expertos resulta complicado identificarlos, puesto que pueden ser muestras juveniles o fragmentadas que carecen de algunos caracteres, de tal modo que la identificación en algunos taxones ha sido cuestionable (Kelly *et al.*, 2011).

Actualmente, la adición de caracteres moleculares ha sido una herramienta muy valiosa en la sistemática de los líquenes puesto que 1) ha aportado gran conocimiento sobre el valor taxonómico de ciertos caracteres morfológicos y químicos, 2) ha servido para identificar especies, especialmente aquellas que son difíciles de clasificar mediante caracteres fenotípicos o por ser especies crípticas y 3) ha contribuido a esclarecer muchas de las relaciones filogenéticas en la clasificación y taxonomía de los ascomicetos liquenizados (Crespo *et al.*, 2010; Printzem, 2010; Singh, 2012; Moncada *et al.*, 2013). Además, los datos genéticos han ayudado a resolver problemas sobre genética de poblaciones y biogeográficos, e. g. la variación fenotípica entre individuos de una población, cambios evolutivos, flujo génico y deriva génica (Torstrom, Pangle y Swanson, 2014).

El Parque Nacional La Malinche (PNLM) forma parte de la Faja Volcánica Transmexicana y se le considera la montaña aislada más significativa del país (Yarza de la Torre, 2003), ya que presenta diversidad de ambientes y microclimas que ofrecen hábitats variados para el desarrollo y establecimiento de diversos organismos que dependen de variables

ambientales tales como el nivel altitudinal, tipo de vegetación, incidencia de luz, humedad e incluso las diferentes actividades antropogénicas que pueden modelar al bosque y completar el ciclo de vida (López-Domínguez, 2005). Sin embargo, en el PNLM existen grupos de organismos que han sido poco estudiados y que se consideran de importancia ecológica, tales como los líquenes. No obstante, se tiene una estimación sobre la flora liquénica que alberga esta región (Tlalmis-Corona, 2017), en el cual se señala la diversidad y complejidad en la identificación de las especies para ciertos géneros, especialmente para los más abundantes, entre ellos, el género *Usnea*. Considerando las condiciones ambientales y la posición geográfica del PNLM se podría estimar que alberga especies endémicas y/o aun no registradas para este sitio, por lo que es importante continuar con estudios que ayuden a detectar a estas especies con gran valor ecológico para la conservación de la biodiversidad.

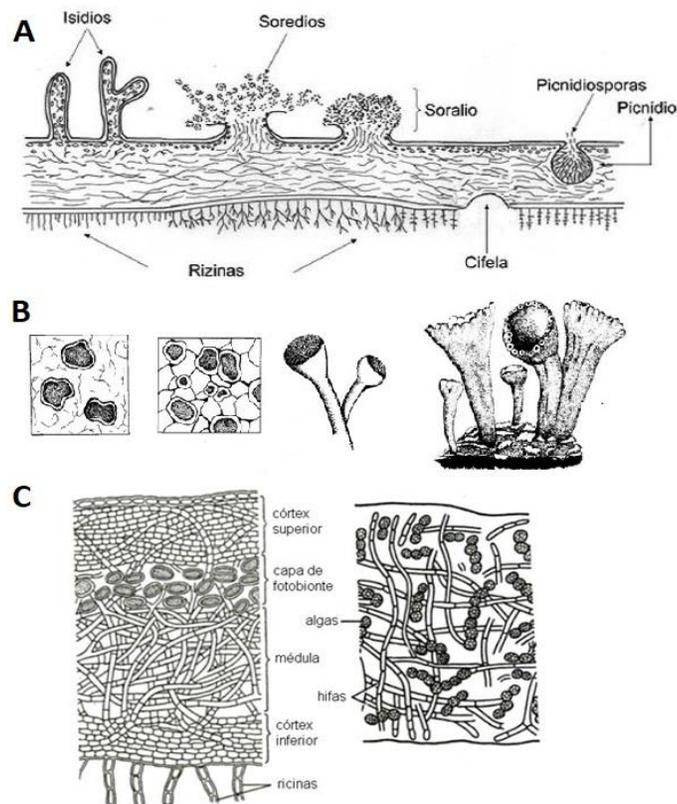


Figura 1. Morfología del talo liquénico. Estructuras reproductivas asexuales (A). Estructuras reproductivas sexuales (apotecios) (B). Anatomía del talo liquénico (C). Tomado de Barreno y Pérez-Ortega, 2003.

1.1. El género *Usnea* Dill. ex Adans

El género *Usnea* es un macrolíquén de crecimiento fruticoso perteneciente a la familia Parmeliaceae. Es uno de los géneros con mayor número de especies, pues se han reportado entre 300 y 600 especies, dependiendo de algunos autores (Hawksworth *et al.*, 1995; Herrera Campos, 1998; Wirtz *et al.*, 2006; Kirk *et al.*, 2008; Ohmura, 2012). Es conocido vulgarmente como “barbas de capuchino” o “musgo de árboles”, lo que hace referencia a su aspecto físico con numerosas ramificaciones. Aunque es fácil de reconocer, la identificación de las especies puede ser considerablemente difícil (Halonen 2000; Araujo, 2015).

Usnea se caracteriza por ser un talo pálido de color verde amarillento, aunque en algunas especies su coloración puede llegar a ser rojiza, su crecimiento es de simetría radial, tiene un eje cartilaginoso al interior que recorre todo el talo líquénico y químicamente contiene ácido úsnico en la corteza (Clerc, 1998). Su tamaño es variable, ya que puede ser un talo pequeño (5 cm), mediano (20 cm) y en algunos casos llega a alcanzar hasta varios metros de longitud (Tõrra y Randlane, 2007; Pérez-Vargas *et al.*, 2010). Los fotobiontes que se asocian en *Usnea* son del género *Trebouxia*, alga clorofita de la Clase Trebouxiophyceae y Orden Trebouxiales (Friedl y Zeltner, 1994). El micobionte es un ascomiceto de la Clase Lecanoromycetes, dentro del orden Lecanorales (Lumbsch y Huhndorf, 2007).

El género *Usnea* está ampliamente distribuido en todo el mundo, se desarrolla en regiones polares, templadas y tropicales, por lo que se le considera un género cosmopolita. No obstante, tiene mayor diversidad en bosques templados que en zonas áridas y árticas. Tiene una historia de divergencia reciente, que comenzó en los últimos 20-25 millones de años (Kraichak *et al.*, 2015; Divakar *et al.*, 2017). Ciertas especies de *Usnea* tienden a desaparecer en regiones urbanas, dado que son vulnerables a los contaminantes atmosféricos, por lo que son utilizadas como bioindicadoras de la calidad del aire y del estado de conservación de los ecosistemas (Halonen *et al.*, 1998; Herrera-Campos, 1998; Halonen, 2000). Su principal sustrato de colonización es la corteza de árboles y ocasionalmente, roca o materia en descomposición.

1.2. Caracteres morfológicos, anatómicos y químicos del género *Usnea*

1.2.1. Morfología

Talo

Es de crecimiento fruticoso con simetría radial. Cuenta con un punto de anclaje hacia el sustrato. Su coloración suele ser verde, verde-amarrillo, rojizo o café. Su hábito de crecimiento puede ser erecto (talo divergente), subpéndulo (claramente divergente de las partes basales y convirtiéndose pendiente hacia los ápices) y péndulo (Halonen *et al.*, 1998; Herrera-Campos *et al.*, 1998, 2001; Ohmura, 2001) (Figura 2). El tamaño varía entre especies, pueden crecer desde pocos centímetros hasta varios metros de longitud (Herrera-Campos *et al.*, 1998).

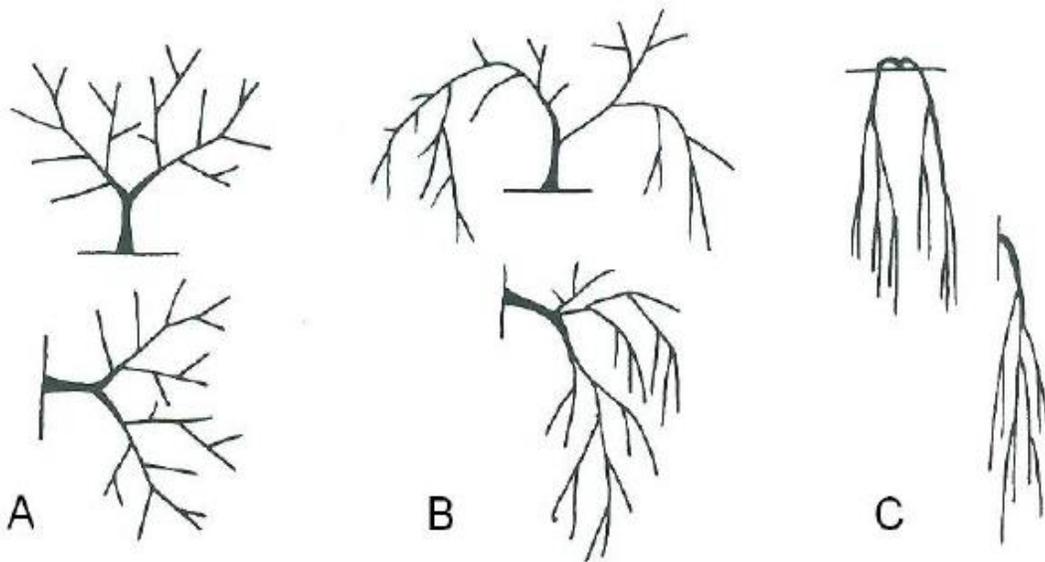


Figura 2. Hábito de crecimiento del género *Usnea*. A. Erecto, B. Subpéndulo y C. Péndulo. Tomado de Ohmura, 2001.

Base

Es el punto de anclaje hasta la ramificación principal. Su tamaño varía y tiene coloraciones distintas como café, negro y rojizo, o bien puede ser concoloro, i.e. tener la misma coloración del talo (Clerc, 1998; Herrera-Campos *et al.*, 1998, 2001; Ohmura, 2001). Por lo general, hay un tronco indiviso en la base de la que surgen una o más ramas principales, las cuales se dividen normalmente en pocas o varias ramas secundarias y terminales más delgadas (Halonen *et al.*, 1998).

Ramas

Las ramas son circulares en sección transversal o ligeramente angulosa y en ocasiones pueden presentar foveolas (hoyos redondos u ovalados en la corteza), también pueden presentar grietas anulares que están recubiertas por una parte medular blanca en forma de anillos de oxalato de calcio (Halonen *et al.*, 1998). La ramificación es generalmente dicotómica, pero, puede ser anisotómica o isotómica (Ohmura, 2001). A partir de la base del talo liquénico se originan las ramas principales que comúnmente son las más gruesas, seguidas de las ramificaciones secundarias que por lo general tienden a ser más delgadas. Las ramas principales pueden ser cónicas, cilíndricas, segmentadas, aplanadas y acostilladas (Halonen *et al.*, 1998; Herrera-Campos *et al.*, 1998).

Fibrillas

Tienen apariencia de ramas juveniles, pueden ser cortas o largas, suelen ser espínulas (abundantes) o dispersas y se les considera como una estructura de propagación vegetativa (Clerc, 1984; Herrera-Campos *et al.*, 1998).

Soralios

Son estructuras que desarrollan propágulos asexuales. Pueden ser farinosos o granulares, su origen se da en la corteza del talo, su tamaño es relativo al grosor de la rama en el que se desarrolla. Tienen forma circular, longitudinal oblongo, irregular o punctiforme. Pueden ser densos, dispersos o parcialmente confluentes y se localizan principalmente en las ramas terminales, en las ramas secundarias y en las fibrillas (Herrera-Campos *et al.*, 1998).

Isidiomorfos

Son proyecciones sobre la corteza o sobre los soralios en forma de pequeños dedos, su estructura interna es similar a la del resto del talo (Herrera-Campos *et al.*, 1998). Carecen del eje central y sirven como progámulos vegetativos (Halonen *et al.*, 1998).

Apotecios

Son estructuras reproductivas sexuales del talo por parte del micobionte, tienen apariencia de discos, comúnmente pruinosos y son de tipo lecanorino. Tienden a tener una coloración naranja-rosado, verde-amarillento o rara vez café oscuro. Cuentan con fibrillas alrededor del margen y pueden presentar soledios e isidiomorfos (Halonen *et al.*, 1998). Las ascas contienen ocho esporas incoloras simples, hialinas y elípticas (Araujo, 2015).

1.2.2. Anatomía

Corteza

Es la capa superior del talo liquénico, puede ser dura y de apariencia mate o brillante. La corteza está compuesta por plecténquima (tejido falso) de hifas con crecimiento radial o irregular (Halonen *et al.*, 1998). Cuenta con dos tipos de hifas, 1) leptodermatosas, hifas con pared celular delgada, y 2) paquidermatosas, hifas con pared celular extremadamente gruesas (Ohmura, 2001). Puede presentar papilas (protuberancias de tejido cortical) o tubérculos (protuberancias de tejido cortical y la médula) (Herrera-Campos, *et al.*, 1998; Ohmura, 2001). Su coloración varía de pajizo pálido a amarillo pálido, amarillo intenso, verde-amarillento, gris verdoso o raramente roja (Halonen *et al.*, 1998; Truong *et al.*, 2011).

Médula

Es el espacio entre la corteza y el eje central. Está conformada por hifas del micobionte (Halonen *et al.*, 1998). Es de apariencia laxa (hifas muy separadas), densa (hifas individuales pero aglutinadas) o compacta (hifas completamente aglutinadas) y puede ser de color rosa, rojizo, amarillo o marrón (Herrera-Campos, *et al.*, 1998).

Eje central

Es un cordón cartilaginoso que se encuentra a lo largo de todo el talo liquénico. Usualmente es de color blanco, pero también puede ser grisáceo, rosado, amarillo, naranja o marrón. El eje central está rodeado por la médula, en la que las hifas varían en disposición desde la parte aracnoidea hasta la compacta (Halonen *et al.*, 1998). Está compuesto por prosénquima (hifas alargadas y paralelas), por lo que hay dos tipos de eje central, fistuloso y sólido. El fistuloso se caracteriza por presentar un hueco o perforaciones dentro del eje, mientras que el sólido no tiene huecos en toda su longitud. En ocasiones puede haber fístulas en las partes viejas del talo (Ohmura, 2001).

Proporción de la corteza, médula y el eje central (CMA)

Estas proporciones son medidas para diferenciar entre especies de *Usnea* (Ohmura, 2001). Estos tres caracteres son medidos en la rama principal de la parte más ancha del talo líquénico, al hacer un corte longitudinal en la mitad de la rama, se mide el grosor de la corteza, la médula y el eje (Figura 3). La medida relativa en porcentaje se determina con respecto al grosor total de la rama (Clerc, 1984; Herrera-Campos *et al.*, 1998). Para calcular las medias y el porcentaje de corteza, médula y el eje central (CMA) se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$C = (c1 + c2)/2, \quad M = (m1 + m2)/2, \quad B = 2C + 2M + A,$$

$$\% C = (C/B) \times 100,$$

$$\% M = (M/B) \times 100,$$

$$\% A = (A/B) \times 100$$

Donde C es el grosor de la corteza, M es el grosor de la médula, A grosor del eje central y B es el grosor total de la rama.

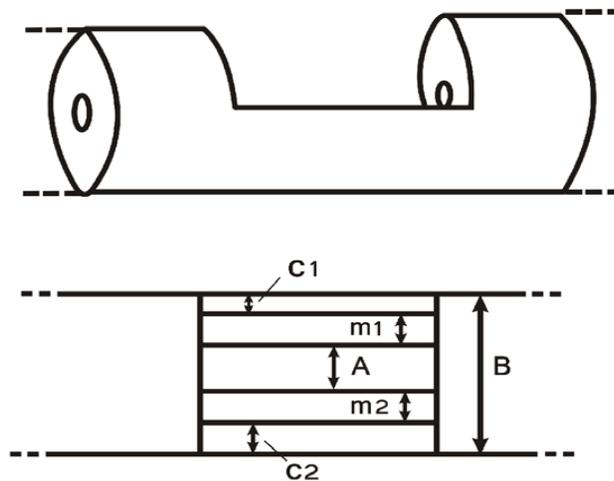


Figura 3. Sección longitudinal de la parte más gruesa de la rama principal. C1, C2, corteza; M1, M2, médula; A, eje, B, anchura total de la rama. Tomado de Clerc (1987).

1.2.3. Química

Los líquenes producen una amplia gama de metabolitos secundarios como azúcares, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, terpenoides, esteroides y carotenoides que se acumulan en el talo. El micobionte es el responsable de biosintetizarlos, su función está relacionada con los mecanismos de defensa y para contrarrestar las condiciones adversas del ambiente (Nahs III, 2008). Algunos de estos compuestos, también llamados sustancias o ácidos liquénicos, son utilizados para la identificación y clasificación taxonómica de los líquenes, especialmente para aquellos grupos con escasos caracteres morfológicos (Hale, 1983; Araujo, 2015). Aproximadamente se conocen alrededor de 850 ácidos liquénicos de los cuales el 50% sólo pueden obtenerse de esta asociación simbiótica (Nash III, 2008).

Para la identificación específica y precisa de estos metabolitos secundarios se emplea la cromatografía en capa fina, descrita y estandarizada por Culberson en 1972. De igual forma se emplean técnicas de tinción para inferir algunos ácidos liquénicos, esta técnica consiste en aplicar pequeñas gotas de Hidróxido de Potasio (KOH) al 10%, Hipoclorito de Calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) y Parafenilendiamina en Alcohol Etilico al 95% en la corteza y la médula del talo liquénico. Cuando las reacciones son positivas dan una coloración amarilla, naranja, rojo o púrpura (Brodo *et al.*, 2001; Nash III *et al.*, 2002).

La caracterización de los ácidos liquénicos es de gran ayuda en la identificación de algunas especies de *Usnea*, ya que la mayoría de los taxones son muy variables y pueden expresar diferentes quimiotipos (Halonen *et al.*, 1999). El ácido úsnico es característico del género *Usnea* y su acumulación en el talo influye en la coloración amarillenta, verde o rojo del talo liquénico (Herrera-Campos *et al.*, 1998; Nybakken y Gauslaa, 2007). Clerc (1998) mencionó que los talos de *Usnea* expuestos a una mayor cantidad de radiación solar son de color amarillento, mientras los que se encuentran en situaciones de sombra son de color verde grisáceo, reflejando así la escasa concentración de ácido úsnico en la corteza.

2. ANTECEDENTES

Algunos autores han hecho revisiones de las especies en el género *Usnea* y mencionan que de los 770 nombres que se han publicado, aproximadamente el 50% pueden ser sinónimos (Clerc, 1998). Por ejemplo, se ha reportado un efecto muy importante de diferentes parámetros ambientales en la modulación de la variación entre los individuos dentro de las especies de *Usnea*. Además, en las especies con reproducción sexual, las diferencias en parámetros ambientales y genéticos pueden tener un papel importante en la variación intraespecífica, mientras que, en las especies con reproducción asexual, los parámetros ambientales pueden tener un efecto sobre las diferencias individuales entre clonas (Clerc, 1998). Ante esta situación muchos autores reconocen la importancia de las especies con gran variación y potencial de diversificación genética, morfológica y química entre las poblaciones y, en consecuencia, se han considerado diferentes morfotipos, por lo que existe una gran discusión sobre el valor de los caracteres utilizados por los taxónomos en el género *Usnea* para la delimitación de sus especies, así como se muestra en la figura 4.

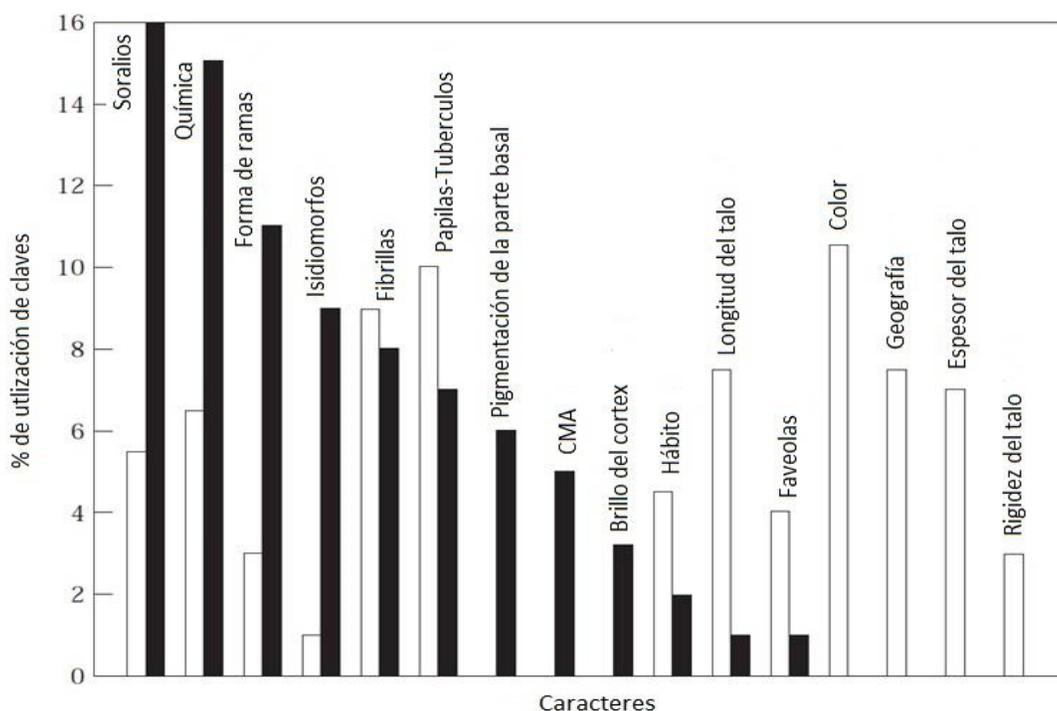


Figura 4. Principales caracteres utilizados por los taxónomos para identificar las especies del género *Usnea*, indicando en porcentaje la utilización de claves de identificación. Se seleccionaron las siguientes claves de identificación: barras negras (Tomada de Clerc, 1998).

Un importante número de estudios en líquenes que utilizan datos de secuencias de ADN han demostrado la incongruencia entre la delimitación de especies basada en rasgos fenotípicos y las reconstrucciones filogenéticas, revelando frecuentemente la presencia de distintos linajes dentro de un mismo taxón nominal (Kelly *et al.*, 2011; Lumbsch y Leavitt, 2011). Estos estudios han revelado diferencias sutiles, morfológicas o químicas, dentro los distintos linajes, que no se habían considerado previamente. Muchos de estos taxa suelen ser referidos como semi-crípticos. El término semi-críptico indica que nuestra actual interpretación de la morfología de los líquenes es inadecuada y que numerosas delimitaciones de especies basadas en la morfología de los líquenes están muy simplificadas. Ejemplos de esto se pueden encontrar en las familias Acarosporaceae (Wedin *et al.*, 2009), Teloschistaceae (Muggia *et al.*, 2008), Graphidaceae (Lumbsch *et al.*, 2008), Lecanoraceae (Leavitt *et al.*, 2011) y muchos géneros dentro de Parmeliaceae (Kroken y Taylor 2001; Molina *et al.*, 2004; Divakar *et al.*, 2005; McCune y Schoch 2009), incluida *Usnea* (Seymour *et al.*, 2007; Wirtz *et al.*, 2008).

Ante dicha incertidumbre, se han desarrollado métodos que calculan las distancias inter- e intraespecíficas derivadas de árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud inferidas a partir de secuencias de ADN para la detección de complejos de especies. Así, basándose en distancias, estos métodos utilizan umbrales de distancias genéticas para identificar a las especies. Este método ha demostrado su utilidad para identificar complejos de especies con alta diversidad genética en líquenes parmeloides (Kelly *et al.*, 2011; Lumbsch y Leavitt, 2011). Estos métodos basados en distancias genéticas pueden aplicarse a bases de datos de secuencias de un solo gen, e. g. datos de código de barras de ADN (Seifert, 2009; Kelly *et al.*, 2011). Los estudios de código de barras de ADN también han sido valiosos instrumentos para la identificación de especies crípticas (Johnson *et al.*, 2008; Zemlak *et al.* 2009; Le Gall y Saunders, 2010). Actualmente, se ha estado utilizando cómo código de barras de ADN la región del Espaciador Transcribible Interno (ITS) del ADN ribosomal nuclear en hongos formadores de líquenes para la identificación de especies (Kelly *et al.*, 2011).

2.1. Primeros estudios moleculares del género *Usnea*

El primer estudio molecular sobre el género *Usnea* fue realizado por Ohmura (2002), donde se analizaron los rangos infragenéricos del género *Usnea* con los subgéneros *Usnea* (secciones *Usnea* y *Ceratinae*), *Eumitria* y *Dolichousnea*. En dicho estudio se incluyeron 21 especies de Japón y Taiwan para delimitar al género. Las secciones *Usnea* y *Ceratinae* tuvieron una relación filogenética con bajo soporte con el subgénero *Eumitria* y de acuerdo con los datos obtenidos se validó a los subgéneros *Eumitria* y *Dolichousnea* dentro del género *Usnea* debido a que estos forman grupos monofiléticos altamente soportados. Ohmura (2001, 2002) caracterizó morfológicamente a estos subgéneros haciendo énfasis en las diferencias de la estructura de la corteza. Sin embargo, no se incluyó material de *Neuropogon*.

Neuropogon comparte muchos caracteres morfológicos con *Usnea* y se ha considerado como subgénero de *Usnea* por algunos autores (e.g. Motyka, 1936-1928 citado por Clerc, 1998; Walker, 1985). Sin embargo, otros autores habían hecho énfasis en sus autopomorfías, su ecología exclusivamente saxícola y su distribución exclusiva en regiones polares y alto-andinas y lo aceptaron como género válido (Krog, 1976, 1982; Galloway, 1983). La aceptación de *Neuropogon* como género fue evidente en gran cantidad de claves y literatura liquenológica (Galloway, 1985, 1992; Malcom y Galloway 1997; Stevens, 1999). Articus (2004), analizó las filogenias moleculares basadas en las secuencias nucleotídicas de ITS-LSU y parte de la región de la β -tubulina para investigar la relación de *Neuropogon* con *Usnea*, *Eumitria* y *Dolichousnea*. Este autor obtuvo una filogenia con dos clados bien soportados, uno que agrupa a los subgéneros *Usnea* y *Neuropogon* y otro que muestra una estrecha relación entre los subgéneros *Eumitria* y *Dolichousnea* formando un grupo hermano monofilético bien soportado, como subgéneros de *Usnea* que había planteado Ohmura. En este estudio se propuso que el subgénero *Dolichousnea* fuera elevado a nivel genérico, argumentando que este grupo está bien caracterizado y delimitado morfológicamente. Sin embargo, su propuesta no tuvo mucho eco en la literatura liquenológica.

En el 2013, Truong *et al.*, realizaron un estudio sobre las relaciones filogenéticas de 52 especies de *Usnea*, basadas en las secuencias nucleotídicas de ITS, LSU y los genes codificantes de las proteínas RPB1 y MCM7. La filogenia derivada de los datos concatenados reveló que el género *Usnea* se subdivide en cuatro clados altamente soportados, correspondientes con los subgéneros tradicionalmente circunscritos: *Eumitria*, *Dolichousnea*, *Neuropogon* y *Usnea*, en donde el primero de ellos se encuentra en una posición basal. Sin embargo, el estudio reveló que los caracteres morfológicos que se han utilizado para describir a los subgéneros son a menudo homoplásicos por lo que la caracterización de estos subgéneros se mantiene ambigua. En consecuencia, a estos clados (*Eumitria*, *Dolichousnea*, *Neuropogon* y *Usnea*) no se les otorgó ningún rango genérico. Por otro lado, dentro del clado *Usnea* la mayoría de las especies se reconocieron como monofiléticas y altamente soportadas, aunque hay especies que aún no han sido resueltas. La circunscripción de especies es, entonces, muy compleja en este grupo de hongos liquenizados debido a la alta plasticidad morfológica de las especies.

Por otra parte, existen estudios en los que se reconoce una problemática acerca de la identidad de especies dentro del género, especialmente para aquellas que tienen diferentes estrategias reproductivas, i.e. las apoteciadas y las sorediadas. Articus *et al.* (2002) realizaron un estudio con datos del ADN ribosomal (ITS y LSU) y de la β -tubulina para conocer la relación filogenética entre *Usnea florida* y *U. subfloridana*. Estas especies han sido reconocidas desde hace mucho tiempo mediante la taxonomía tradicional, donde la diferencia morfológica que las distingue es la presencia de estructuras reproductivas, i.e. *U. florida* presenta apotecios y *U. subfloridana* soralios. En dicho estudio se muestra que los especímenes de *U. florida* y *U. subfloridana* forman dos grupos con especímenes mezclados con presencia de apotecios y soralios, por lo que no forman linajes monofiléticos independientes a las estructuras reproductivas como se esperaba.

Mark *et al.* (2016) pusieron a prueba la monofilia de 18 especies de la sección *Usnea del* subgénero *Usnea* identificada por Articus (2004) y Truong *et al.* (2013), considerando las incongruencias entre las circunscripciones morfológicas y las moleculares debido a la gran variación y complejidad de los caracteres diagnósticos. En su estudio incluyeron especies de América del Norte y Europa, con talos que presentan estructuras de reproducción sexual y asexual, así como talos arbustivos y colgantes. Utilizaron seis loci: ITS, espaciador intergénico (IGS) y 4 genes codificantes de proteínas (β -tubulina, MCM7, RPB1 y RPB2). El análisis concatenado, así como la delimitación de especies basada en coalescencia recupera varios clados donde se incluyen especies reconocidas por taxonomía tradicional, mientras que otros clados forman grupos de dos o más especies mezcladas. Además, identificaron algunas sinonimias, e.g. *Usnea subterilis* y *Usnea lapponica* y reconocieron e identificaron a una especie nueva para Estados Unidos.

2.2. Estudios de *Usnea* en México

En México existen estudios sobre la distribución de algunas especies de *Usnea*, aunque, la mayor parte de las investigaciones están basadas en registros de presencia con un enfoque florístico (Herrera-Campos, 1998; Herrera-Campos *et al.*, 1998, Herrera-Campos *et al.*, 2001). La distribución real de los diferentes taxones de *Usnea* es desconocida en México, puesto que hay zonas que aún no han sido exploradas (Herrera-Campos, 1998) y tampoco se han hecho estudios profundos para conocer e identificar los posibles endemismos.

Herrera-Campos (1998) reportó 43 especies y cuatro agregados de *Usnea* en bosques templados de diferentes localidades del país. En su estudio empleó una combinación de caracteres morfológicos, anatómicos y químicos, y propuso algunos caracteres diagnósticos para la identificación de algunas especies, mientras que en otras se limitó a reconocer razas químicas, aunque sin reconocer un nivel taxonómico. Posteriormente, Herrera-Campos *et al.* (2001) revisaron el complejo de *Usnea fragilescens* en México, tomando en cuenta los caracteres morfológicos, anatómicos, químicos y de distribución, y reportaron nuevas especies para el país.

Ament (2012) realizó el primer estudio molecular sobre *Usnea* en México donde utilizó datos moleculares de tres loci, i.e. ITS, MCM7 y TSR1, en combinación con taxonomía clásica, incluyendo datos químicos para delimitar algunas especies del género *Usnea* pertenecientes a diversos bosques templados del país. Este autor propuso a *U. entoviolata* como especie críptica dentro del agregado de *U. ceratina*, encontró evidencia para rechazar cuatro pares de especies, reportó tres nuevos registros para México y otras posibles para la ciencia. También confirmó especies ya identificadas de *Usnea* por lo que permitió evaluar preliminarmente la relación entre poblaciones de diferentes continentes.

En el 2017, Tlalmis-Corona realizó un estudio taxonómico sobre la flora liquénica en el Parque Nacional La Malinche, muestreando desde los 2,800 hasta los 4,000 msnm abordando gran parte de la estructura arbórea de los rangos altitudinales. En dicho estudio se reportaron 71 especies de 23 géneros. De estos, *Usnea* fue uno de los más abundantes en todo el Parque Nacional La Malinche (212 ejemplares de un total de 1,408). Dada la complejidad morfológica entre las especies del género, solo se llegó a identificar a *Usnea florida* y *U. subfloridana* representadas por 22 ejemplares, 9 y 13 respectivamente, el resto de los ejemplares fueron agrupados en morfotipos de acuerdo con caracteres morfológicos compartidos.

El género *Usnea* posee una gran complejidad morfológica, anatómica y química, así como una alta plasticidad fenotípica que ha dificultado la correcta identificación taxonómica de sus especies. Esto ha generado un gran número de nombres sinónimos para una sola especie y la existencia de complejos de especies, en donde no es claro cuáles son los caracteres con importancia taxonómica. Debido a esta problemática, no se ha podido conocer con exactitud la diversidad que presenta este género. Por lo que es importante continuar con estudios donde se incluyan otras herramientas para una precisa identificación, tales como caracteres moleculares en relación con caracteres taxonómicos informativos.

3. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación generará información sobre la diversidad de especies del género *Usnea* presentes en los bosques de alta montaña del Parque Nacional La Malinche. La información sobre los caracteres morfológicos, anatómicos, ecológicos y químicos se correlacionará con la posición filogenética de las secuencias ITS1 e ITS2 de los ejemplares recolectados y su relación con secuencias de las bases de datos. La delimitación e identificación de las especies es crucial para el monitoreo y conservación de la biodiversidad y para conocer los factores que conducen a la diversificación de las especies. Recientemente, los avances en las herramientas moleculares han aportado información valiosa que ha contribuido a diferenciar especies externamente similares e identificar características morfológicas para discriminar entre ellas. *Usnea* es un género en el que se han encontrado incongruencias en la identificación de especies basadas en datos fenotípicos. Es necesario, entonces, desarrollar investigaciones que combinen datos fenotípicos y datos moleculares para establecer hipótesis robustas de los límites de especie en este grupo importante de hongos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de la diversidad del género *Usnea* subgénero *Usnea* del Parque Nacional La Malinche considerando caracteres genéticos, morfológicos, químicos, anatómicos y sitios de colonización.

4.2. Objetivos particulares:

- 1) Reconocer diferentes morfotipos de talos liquénicos de *Usnea* empleando caracteres morfológicos, anatómicos y químicos.
- 2) Conocer las posiciones filogenéticas de las especies del subgénero *Usnea* con base en secuencias de las regiones ITS1 e ITS2.
- 3) Analizar la variabilidad química, morfológica y ecológica de los filotipos de *Usnea*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de estudio

El Parque Nacional La Malinche (PNLM) está ubicado entre los estados de Tlaxcala y Puebla y se localiza en las coordenadas geográficas 19° 06' 30'' - 19° 20' 19'' Latitud Norte y los 97° 55' 32'' - 98° 09' 55'' de Longitud Oeste. Comprende una superficie total de 46,093 ha, de las cuales 33,032 ha corresponden al estado de Tlaxcala y 12,679 ha al estado de Puebla, su rango altitudinal va de los 2,200 msnm hasta los 4,461 msnm (López-Domínguez y Acosta, 2005; Montero, 2012). Se encuentran distintos tipos de vegetación en diferentes altitudes en las que se desarrollan diversas asociaciones como bosque de *Pinus* L. -*Quercus* L., de *Quercus*-*Alnus* Mill, de *Pinus*-*Quercus*-*Abies* Mill y de *Pinus*-*Quercus*-*Alnus* (Villers-Ruiz *et al.*, 2006; López-Domínguez y Acosta, 2005).

5.2. Trabajo en campo

El trabajo de campo se realizó entre octubre de 2017 y enero de 2018. El PNLM se dividió en tres orientaciones geográficas: Sur, Este y Oeste (Tlalmis-Corona, 2017). En cada orientación se recolectaron ejemplares de talos liquénicos con rasgos característicos del género *Usnea* subgénero *Usnea* (arbustivos, color verde-amarillento y con eje central) en diferentes altitudes, a partir de los 3,100 msnm donde se establece *Usnea*, abarcando las diversas asociaciones de vegetación como bosque de *Pinus*-*Alnus*, de *Pinus*-*Alnus*-*Abies* y bosque de *Pinus* (Villers-Ruiz *et al.*, 2006; López-Domínguez y Acosta, 2005; Tlalmis-Corona, 2017) (Figura 5, Tabla 1).

Con la finalidad de explorar y recolectar la mayor diversidad de especies del género *Usnea*, se realizó un muestro oportunista cualitativo (Sipman, 1996; Tlalmis-Corona, 2017). Los ejemplares fueron recolectados de manera directa en los diferentes forofitos del sitio de muestro, se colocaron en bolsas de papel estraza rotuladas con la información correspondiente al área de estudio: posición geográfica, altitud, forofito, fecha y nombre (Cáceres *et al.*, 2007, 2008).

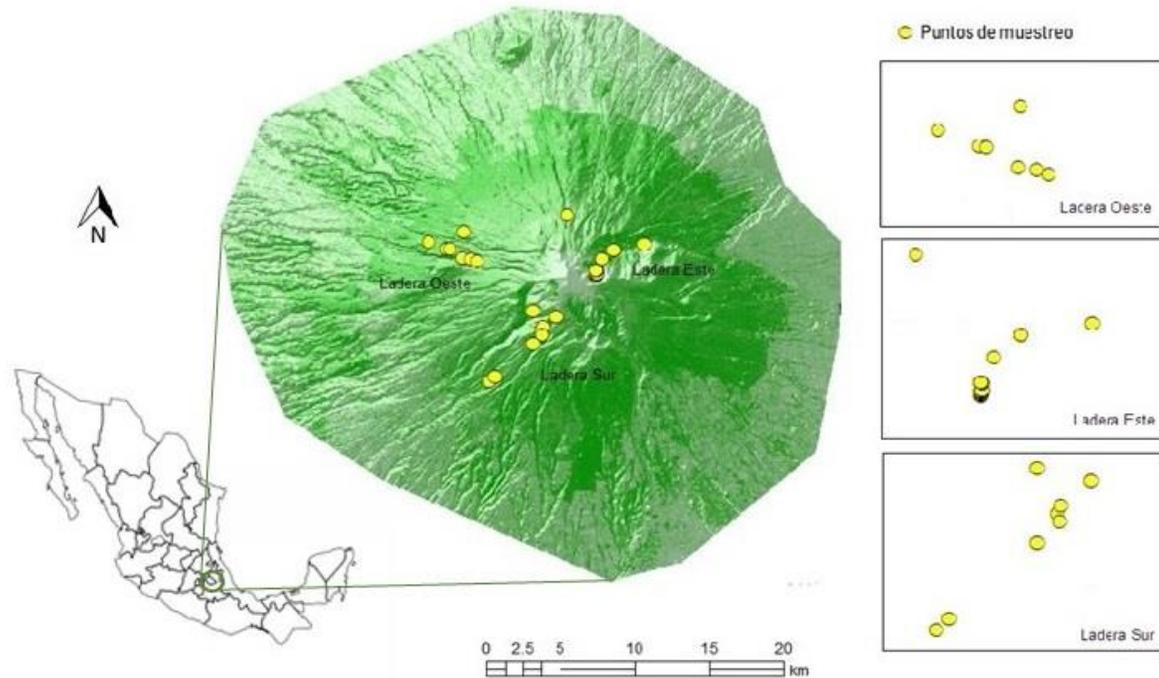


Figura 5. Mapa del Parque Nacional La Malinche donde se muestran los puntos de muestreo.

Tabla 1. Descripción del componente arbóreo de las altitudes muestreadas del PNLM.

Altitud	Transectos ^a		
	Este	Oeste	Sur
3100 msnm	Árboles jóvenes de <i>Abies religiosa</i> , zona expuesta a luz, rocas y suelo desnudo con poco sotobosque. 19°14'70.3'' N 97°59'59.5'' W	Estrato arbóreo de <i>Pinus montezumae</i> , árboles altos y maduros, zona expuesta a luz, presenta poco sotobosque. 19°13'26.8'' N 98°04'54.3'' W	Bosque de <i>Pinus-Alnus</i> , árboles jóvenes, zona expuesta a luz con poco sotobosque. 19°11'59.4'' N 97°59'22.9'' W
3400 msnm	Vegetación dominante de <i>A. religiosa</i> , baja densidad de luz con pendientes pronunciadas. 19°14'65.8'' N 98°00'76.2'' W	Árboles jóvenes y maduros de <i>A. religiosa</i> , zona expuesta a luz, suelo desnudo, escaso sotobosque con zonas afectadas por tala. 19°14'34.2'' N 98°03'23.6'' W	Bosque de <i>Pinus-Alnus</i> , árboles jóvenes y maduros, poca densidad de luz, escaso sotobosque con pendientes pronunciadas. 19°12'20.8'' N 98°00'00.3'' W

Continuación Tabla 1

3700 msnm	Densidad de árboles altos y maduros de <i>A. religiosa</i> , presencia de musgos, zona con pendientes pronunciadas. 19°14'08.0'' N 98°01'45.0'' W	Vegetación de <i>Pinus hartwegii</i> y <i>A. religiosa</i> , pendientes pronunciadas, zona cerrada a luz, con poco sotobosque. 19°14'23.8'' N 98°02'49.2'' W	Dominancia de <i>P. hartwegii</i> y <i>A. religiosa</i> , árboles altos y maduros con pendientes pronunciadas. 19°13'06.1'' N 98°00'39.0'' W
4000 msnm	<i>P. hartwegii</i> maduros y altos, zona expuesta a luz con pendientes ligeramente pronunciadas. 19°14'24.4'' N 98°01'40.1'' W	Zona pedregosa, vegetación dominante de <i>P. hartwegii</i> , árboles jóvenes y maduros, zona abierta a luz y poco sotobosque. 19°14'32.9'' N 98°02'14.1'' W	Vegetación dominante de <i>P.s hartwegii</i> , árboles jóvenes y maduros, mucho sotobosque, zonas abiertas a luz y pendientes pronunciadas. 19°13'33.1'' N 98°02'25.8'' W

^a Los transectos Este y Oeste corresponden al estado de Tlaxcala y el transecto Sur al estado de Puebla.

5.3. Trabajo de laboratorio

Los ejemplares recolectados se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar los análisis moleculares. Se seleccionaron aquellos talos liquénicos completos sin tener preferencia por el tamaño. Se realizó la curación de los ejemplares, donde se eliminó toda la maleza posible y se procedió a analizar los caracteres moleculares, morfológicos, químicos y anatómicos.

5.3.1 Caracterización morfológica, anatómica y química

El estudio morfológico y anatómico se realizó bajo microscopio estereoscópico (Olympus, EE. UU.), en el que se determinó la presencia/ausencia de apotecios, soraliós, isidiomorfos, surcos anulares y fibrillas y se determinó el color de la base del talo liquénico. Se midió la proporción de CMA con la ayuda de fotografías con una resolución de 4080 x 3072 dpi tomadas con ayuda de un estéreomicroscopio marca Olympus SZX7 conectado a una cámara digital Olympus DP10. El tamaño de las esporas se midió por medio de fotografías de 1024 x 768 dpi resolución capturadas por medio de un microscopio de campo claro marca Zeiss modelo Axioskop 2 Plus conectado a una cámara digital Infinity 1. Ambas cámaras estaban controladas por una computadora a través de software de digitalización de imágenes Image Pro-Plus versión 4.5. Las mediciones se realizaron mediante una rejilla calibrada con los objetivos correspondientes.

Para la caracterización química se realizaron las pruebas de tinción tal como se explicó en el apartado de química de los talos liquénicos (Brodo *et al.*, 2001; Nash III *et al.*, 2002). Se aplicaron pequeñas gotas de los reactivos: KOH 10% y Ca(ClO)₂ (conocido como reactivo C). Asimismo, se aplicaron los reactivos KOH y C uno seguido del otro, reacción indicada como KC. Como control negativo de reactivos se aplicó una gota de agua destilada estéril. Cuando las reacciones fueron positivas presentaron una coloración amarilla, naranja y rojo. También se observó la fluorescencia del talo liquénico ante luz UV, teniendo como control positivo a un ejemplar previamente caracterizado.

5.3.2 Extracción de ADN

Se utilizó el método modificado de Buffer de KCl para la extracción del ADN (Sook-Young *et al.*, 2014). Se tomaron 10 mg del talo liquénico que se colocaron en un tubo Eppendorf® estéril de 1.5 ml, se añadieron 300 µL de buffer de KCl [100 mM Tris HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1M KCl] y se trituró con una varilla de vidrio estéril. Una vez triturada la muestra, se mezcló por inversión fuertemente (aproximadamente 20 veces) para homogenizar la mezcla. Posteriormente se le adicionaron 300 µL de cloroformo–alcohol isoamílico 24:1 y nuevamente se invirtió 20 veces. En seguida, se centrifugó la muestra durante 1 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se extrajo la capa acuosa (aproximadamente 300 µL) y se transfirió a un tubo Eppendorf® nuevo de 1.5 mL. El ADN se precipitó con 180 µL (60% del volumen total) de isopropanol frío, se mezcló por inversión muy suavemente y se centrifugó durante 1 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. La pastilla resultante de ADN se lavó con 300 µL de etanol al 70% y se dejó secar a 65 ° C en un concentrador de vacío durante 10 min (Vacufuge, Eppendorf, EE. UU.). Posteriormente la pastilla se resuspendió en 100 µL de solución TE 1× (Tris-HCl 10 mM pH 8.0) y se dejó en incubación en un bloque de calor durante 5 min a 65 ° C. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en regulador TAE 1× [Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1mM (pH 8.0)].

5.3.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS1-ITS2

Se utilizó la región ITS1-ITS2 (ITS) del ADN ribosomal como blanco molecular. Se utilizaron los iniciadores que se muestran en la tabla 2 y que contienen los adaptadores para la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

La mezcla de reacción para la PCR (25 μ L) contuvo 1 \times de regulador, 10 mM de cada uno de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 10 μ M de cada iniciador, 0.7 U de ADN polimerasa y 20 ng de ADN metagenómico. Los parámetros del ciclo térmico fueron: desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 90 s a 72°C y un alargamiento final durante 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se purificaron utilizando el kit DNA Clean (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de los productos de PCR se realizó mediante PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) utilizando un Fluoroespectrómetro Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se combinaron en cantidades equimolares para su secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo en Illumina MiSeq por el Servicio de Secuenciación DNA Macrogen (Seúl, Corea).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para obtener las secuencias de ITS de *Usnea*.

Región genómica	Iniciador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Longitud aproximada del producto	Autor
ITS	ITS1	Forward	CTA CGG GIG GCW GCA G	Aproximadamente 650 pb	Gardes y Bruns, 1993
	ITS4	Reverse	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC		White <i>et al.</i> , 1990

6. ANÁLISIS DE DATOS

6.1. Análisis de calidad de las secuencias

Los análisis de las secuencias se realizaron con el software QIIME versión 1.9.1. (Caporaso *et al.*, 2010). El control de calidad se llevó a cabo mediante el script `split_libraries.fastq.py`. Se eliminaron las secuencias con umbral de calidad menor a 30 PRHED% y aquellas con nucleótidos sin resolver. Las quimeras se detectaron *de novo* utilizando Chimera Slayer (Hass *et al.*, 2011) y se eliminaron usando el script `filter_fasta.py`.

6.2. Análisis de las secuencias del ITS

Se seleccionó la región ITS por su amplio uso en la taxonomía micológica y liquenológica para inferir las relaciones filogenéticas de grupos muy diversos y para tratar problemas de delimitación de especies, debido a su elevada variabilidad interespecífica (Schoch *et al.*, 2009; Araujo, 2015). La región ITS está formada por tres subregiones: ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), 5.8S (una de las partes integrantes de la subunidad 60S de los ribosomas eucariotas) e ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) (Figura 6).

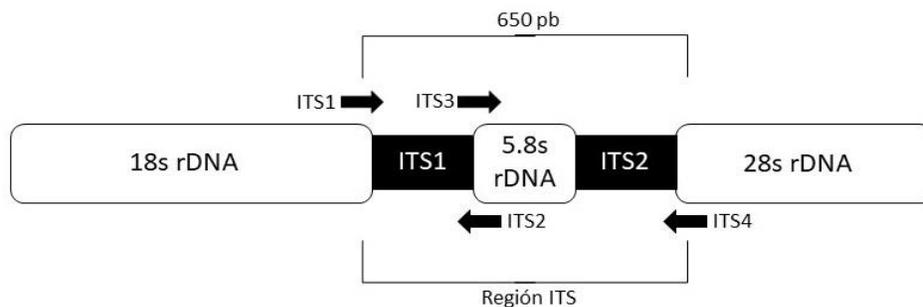


Figura 6. Localización del iniciador para secuenciar la región del ITS utilizado en este estudio para *Usnea*.

Las secuencias de buena calidad y no quiméricas de las regiones ITS se sometieron a una búsqueda de secuencias similares en GenBank por medio del programa BLASTn en la página del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). También se buscaron secuencias de géneros

hermanos de *Usnea* para la delimitación del género. Las secuencias relacionadas se seleccionaron con un criterio taxonómico y que reflejaran las relaciones filogenéticas de la secuencia problema con las secuencias previamente reconocidas. En total se seleccionaron 114 secuencias. El grupo externo se seleccionó con base en estudios previos (Truong *et al.*, 2013), así como los grupos hermanos (subgéneros) del clado *Usnea* que se describieron en trabajos anteriores (Ohmura, 2002; Articus, 2004; Truong, *et al.*, 2013).

6.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Para obtener el alineamiento definitivo de las secuencias, se realizaron múltiples alineamientos mediante el programa CLUSTALX versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). El mejor alineamiento resultante se visualizó y se editó manualmente verificando particularmente las zonas con gaps. Se eliminó la secuencia del 5.8S rRNA dado que es una región muy conservada. Se utilizó el software SEAVIEW para la editar y visualizar el alineamiento (Galtier *et al.*, 1996).

Los análisis filogenéticos se realizaron por métodos de Máxima Verosimilitud con el programa IQ TREE (Nguyen *et al.*, 2015). El modelo de sustitución y los parámetros de estimación se determinaron con Criterios de Información Bayesiana utilizando ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). El mejor modelo de sustitución fue GTR+F+G4. Se establecieron 1,000 aleatorizaciones tipo Bootstrap (BS) para calcular los valores de soporte de rama. Se consideró a los clados bien soportados cuando su valor de BS fue igual o mayor al 75%. El árbol filogenético resultante se visualizó y de editó con el programa FigTree v1.4 (Rambaut, 2009).

6.4 Análisis de distancia genética

Se realizó un análisis de distancia genética en cada uno de los complejos para obtener la diferencia genética entre las secuencias de los ejemplares de *Usnea* del PNLM con las secuencias de GenBank. Para este análisis se utilizó el programa MEGA versión 4.2.4.0. Se construyeron matrices de distancia p a partir de alineamientos de cada complejo (Anexo 1-8).

7. RESULTADOS

Se recolectaron y se caracterizaron quimiomorfológica y molecularmente a 117 ejemplares de *Usnea*, de los cuales 25 pertenecen a la ladera Sur, 37 a la Oeste y la mayor parte con 57 especímenes a la ladera Este del PNLN. Todos los talos liquénicos fueron sustraídos de corteza en los forofitos (en orden ascendente por abundancia de ejemplares recolectados): *Pino*, *Abies*, *Alnus* y con menor frecuencia en arbustos.

7.1. Análisis morfológicos, anatómicos y químicos

Con base en los caracteres químicos, morfológicos y anatómicos analizados bajo microscopio y mediante la revisión de claves taxonómicas (Nash III *et al.*, 2002, 2004) se clasificaron los 117 ejemplares en 12 morfotipos (MT) (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de clasificación de los 12 morfotipos (MT).

Morfotipo	KOH	Ca (ClO) ₂	UV	Apotecios	Soralios	Isidiomorfos	Médula	Fibrillas	Surcos anulares	Forofito
MT 3	-	-	+	Ausentes	Ausentes	Presentes	Densa	Espiga- Dispersas	Presentes	<i>Pinus- Abies</i>
MT 11	-	-	-	Ausentes	Presentes	Presentes	Densa	Espiga	Ausentes	<i>Pinus- Alnus- Abies</i>
MT 2	-	-	+	Presentes	Ausentes	Ausentes	Densa- Compacta	Dispersas	Ausentes	<i>Pinus- Alnus</i>
MT 12	-	-	-	Presentes	Ausentes	Ausentes	Compacta	Dispersas	Presentes	<i>Pinus- Alnus- Abies</i>
MT 4	Amarillo	-	+	Ausentes	Presentes	Presentes	Laxa	Dispersas	Ausentes	<i>Alnus</i>
MT 9	Amarillo	-	-	Ausentes	Presentes	Presentes	Densa	Espigas	Ausentes	<i>Pinus- Alnus</i>
MT 7	Amarillo	-	-	Presentes	Ausentes	Ausentes	Densa	Espiga	Ausentes	<i>Pinus- Alnus</i>
MT 10	Naranja	-	-	Ausentes	Presentes	Presentes	Compacta	Dispersas	Ausentes	<i>Pinus- Abies</i>
MT 5	Naranja	-	-	Presentes	Ausentes	Ausentes	Densa- Compacta	Espiga	Ausentes	<i>Alnus</i>
MT 1	Rojo	-	-	Ausentes	Presentes	Presentes	Laxa	Dispersas	Ausentes	<i>Abies</i>
MT 8	Rojo	-	-	Ausentes	Presentes	Ausentes	Compacta	Espiga	Ausentes	<i>Abies</i>
MT 6	Rojo	-	-	Presentes	Ausentes	Ausentes	Densa	Espiga	Ausentes	<i>Pinus</i>

Ejemplos de algunas estructuras y reacciones positivas de las pruebas químicas pueden observarse en la figura 7.

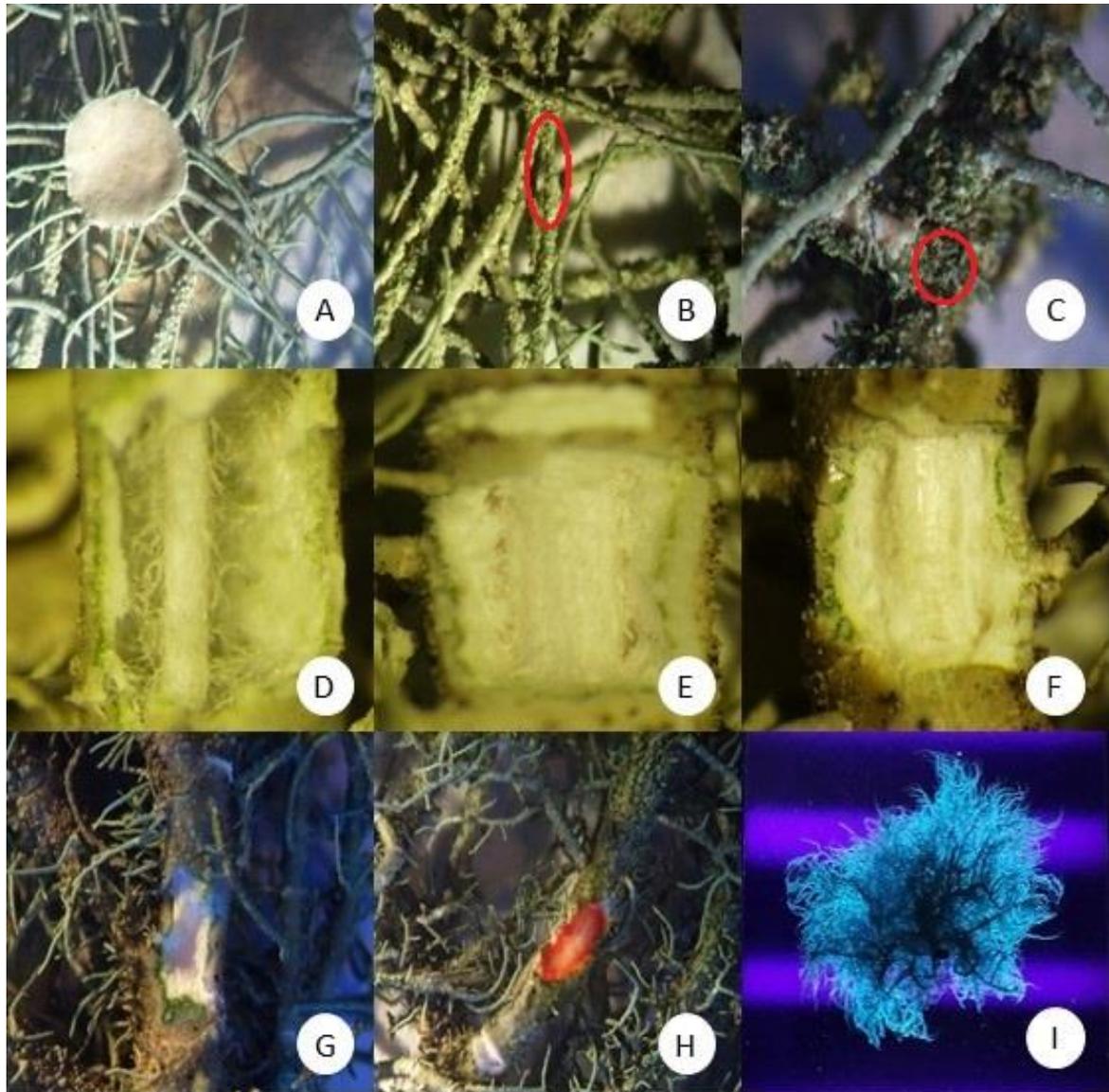


Figura 7. Estructuras morfológicas: apotecios del morfotipo 12 (A), soledios del morfotipo 11 (B) e isidiomorfos morfotipo 3(C); Tipo de médula: laxa del morfotipo 1(D), compacta del morfotipo 10 (E) y densa del morfotipo 9 (F); Pruebas químicas con KOH: negativo del morfotipo 3 (G), positivo rojo del morfotipo 6 (H) y UV positivo del morfotipo 2 (I).

7.2. Extracción y amplificación del ADN

La extracción de ADN con el método de Buffer de KCl permitió la extracción de ADN íntegro (Figura 8) y de calidad suficiente para la amplificación de la región de interés (Figura 9).

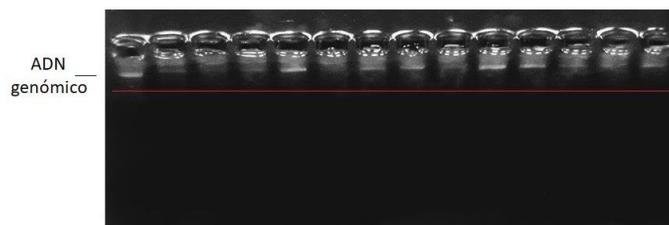


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del ADN total de talos liquénicos de *Usnea*.

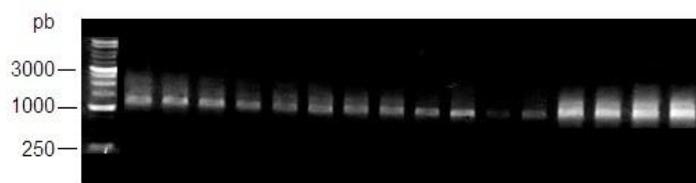


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de las amplificaciones de la región ITS mediante PCR a partir de ADN total de talos liquénicos de *Usnea*. El tamaño de los productos obtenidos es de 800 pb.

7.3. Análisis filogenético

Se alinearon un total de 205 secuencias, 124 procedentes de GenBank (incluyendo al grupo externo) y 117 generadas por este estudio (9 de estas representan 36 secuencias idénticas). La matriz de datos final contuvo 400 caracteres (165 son sitios variables y 235 sitios invariables).

El árbol obtenido muestra cuatro clados que representan a los cuatro subgéneros tradicionalmente descritos: *Dolichousnea*, *Eumitria*, *Neuropogon* y *Usnea* (Ohmura, 2002; Articus 2004; Truong *et al.*, 2013), de los cuales *Usnea* es el único clado que presenta bajo soporte (54% BS) (Figura 10). El clado del subgénero circunscrito como *Usnea*, agrupó a las especies descritas para este subgénero y a todos los ejemplares del PNLM. Sin embargo, en este clado se generaron dos subclados en su interior, uno altamente soportado y otro con bajo BS

donde se encuentra la sección *Usnea*. En la sección *Usnea* se agruparon la mayoría de los ejemplares del PNLN con alto soporte ($BS \geq 75\%$). Sin embargo, las relaciones de las especies dentro de los clados están pobremente resueltas, particularmente en los clados representados por las especies: *U. hirta*, *U. glabrata*, *U. fragilescens*, *U. lapponica*, *U. wasmuthii* y *U. filipendula*, así como nueve clados independientes que están representados únicamente por ejemplares del PNLN a los que me referiré como *Usnea* 1, *Usnea* 2, *Usnea* 3, *Usnea* 4, *Usnea* 4, *Usnea* 6, *Usnea* 7, *Usnea* 8 y *Usnea* 9.

El complejo *U. hirta* (Figura 11) es el clado hermano del complejo *U. rubicunda-U. rubricornuta-U. steineri-U. flammea*. Dentro de este complejo, *U. hirta* de Escocia se agrupa con bajo soporte con una secuencia del morfotipo 11 (O.31.S2.343_11). Los caracteres que describen a *U. hirta* son: talo corto, presencia de abundantes isidiomorfos, corteza delgada, médula laxa y eje estrecho, su química en médula es KOH, C y KC negativos, tienen una distribución por toda Europa y parte de Norteamérica, y su sustrato principal es en corteza y ocasionalmente se puede encontrar sobre roca. Los caracteres que *U. hirta* comparte con el ejemplar del morfotipo 11 son la presencia de soralios e isidiomorfos. Además, este ejemplar se agrupa con *U. hirta* con un bajo soporte.

En la figura 12 se observan las relaciones filogenéticas de secuencias de *U. flammea*, *U. cornuta*, *U. steineri*, *U. rubricornuta* y *U. rubicunda* formando grupos monofiléticos bien delimitados y agrupados en un clado con buen soporte (98% BS). *Usnea rubicunda* de Gran Bretaña se separa con alto soporte de *U. rubicunda* procedentes de Estados Unidos, las cuales se agrupan en un clado mayor con *U. rubricornuta* y *U. steineri*, ambas provenientes de Sudamérica. *Usnea cornuta* forma un grupo relacionado con los linajes anteriores con un soporte del 78% BS. Ejemplares de *U. cornuta* de Gran Bretaña se separan con buen soporte de *U. cornuta* de Perú. *Usnea flammea* de Gran Bretaña se agrupa a estos clados con un soporte de rama del 100% BS.

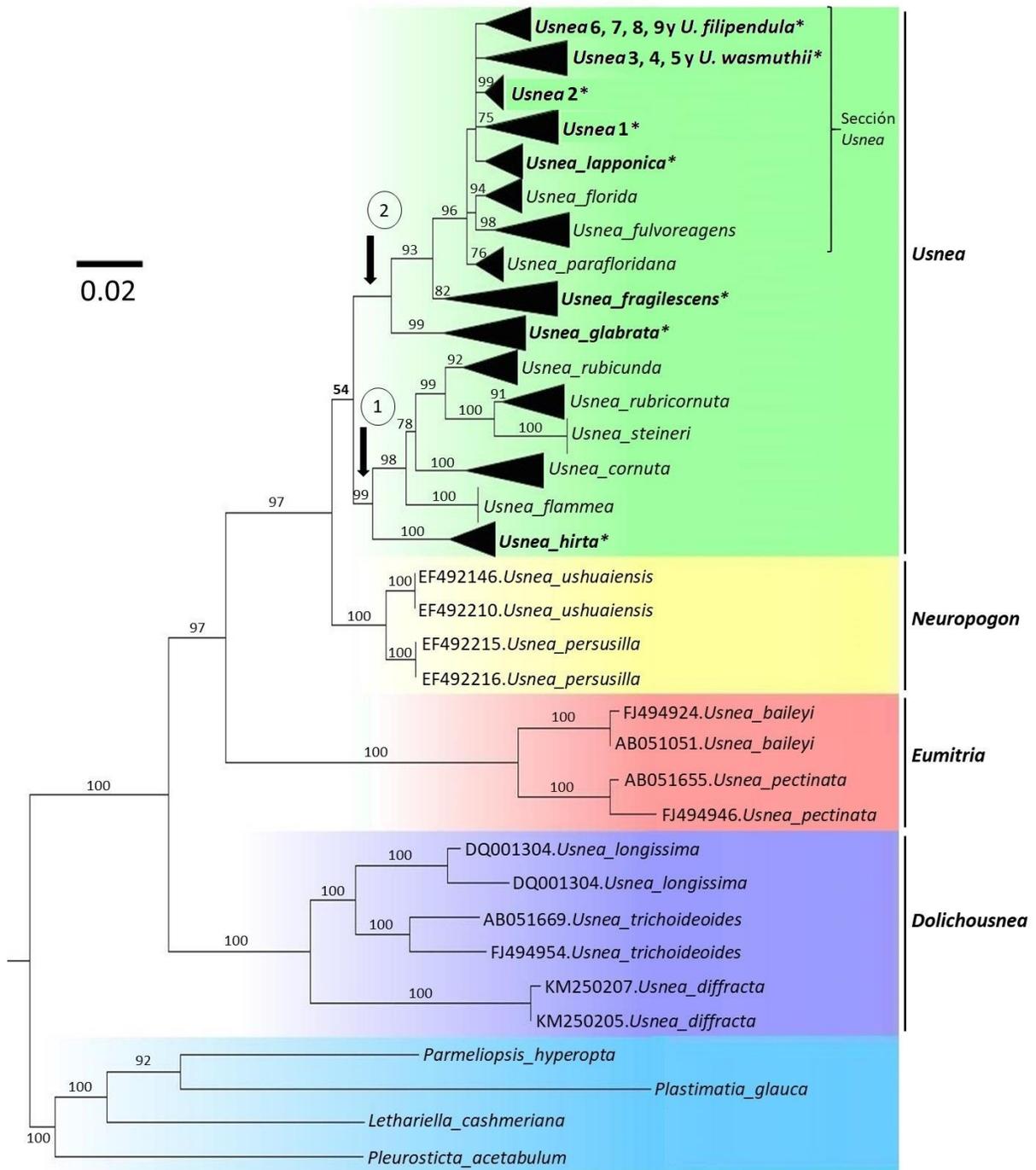


Figura 10. Árbol filogenético obtenido por el análisis máxima verosimilitud de la secuencia de la región ITS. Los números arriba de las ramas representan el valor de soporte de rama obtenido mediante 1,000 aleatorizaciones tipo Bootstrap. Se somborean en diferentes colores el grupo externo (azul), y los subgéneros *Dolichousnea* (violeta), *Eumitria* (rojo), *Neuropogon* (amarillo) y *Usnea* (verde). Los clados señalados con (*) incluyen ejemplares del Parque Nacional La Malinche. Los números 1 y 2 representan grupos monofiléticos dentro del subgénero *Usnea*.

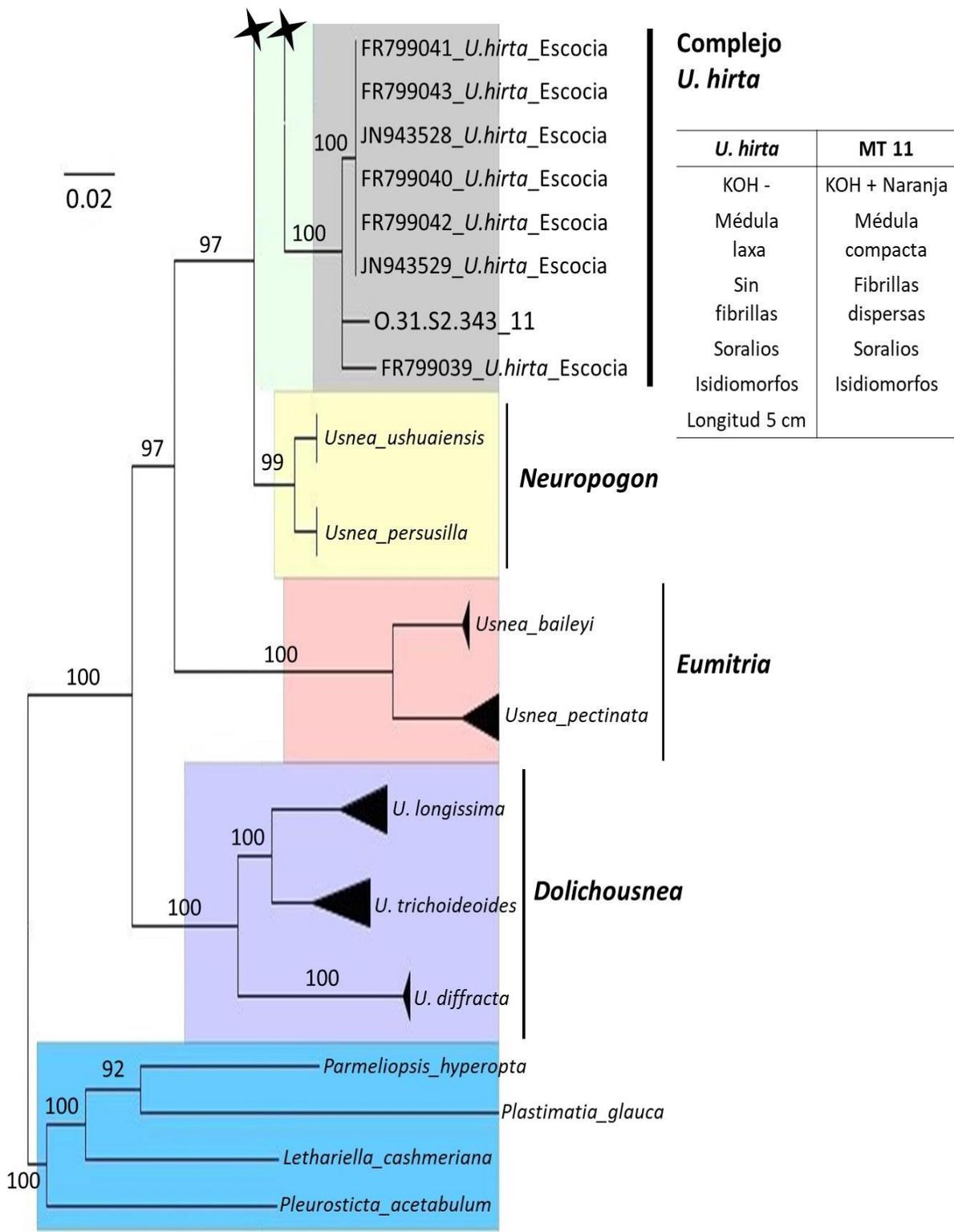


Figura 11. Se muestra a detalle el clado complejo *Usnea hirta* (A). Tabla comparativa entre los caracteres morfológicos de *U. hirta* con el morfotipo 11 (B).

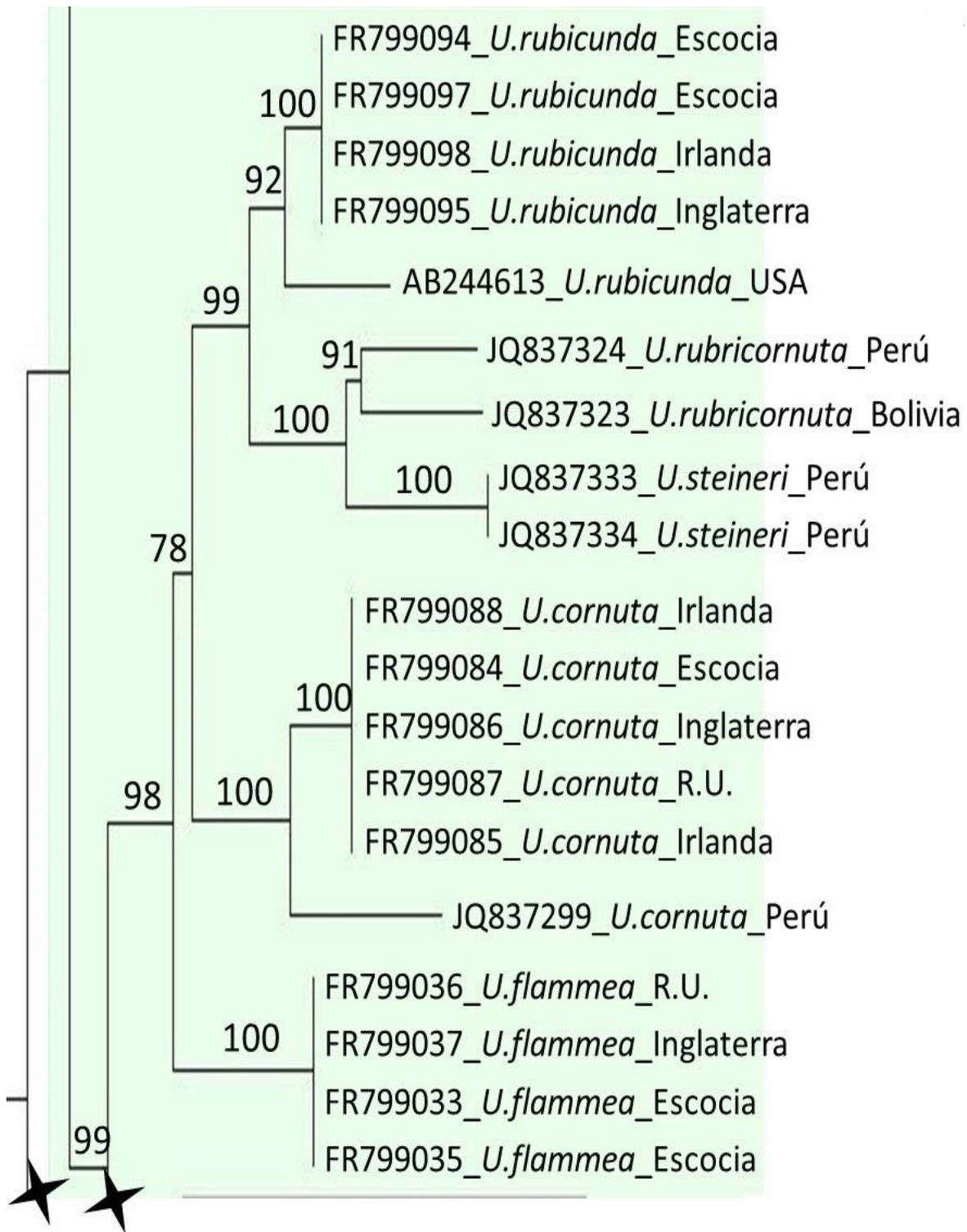
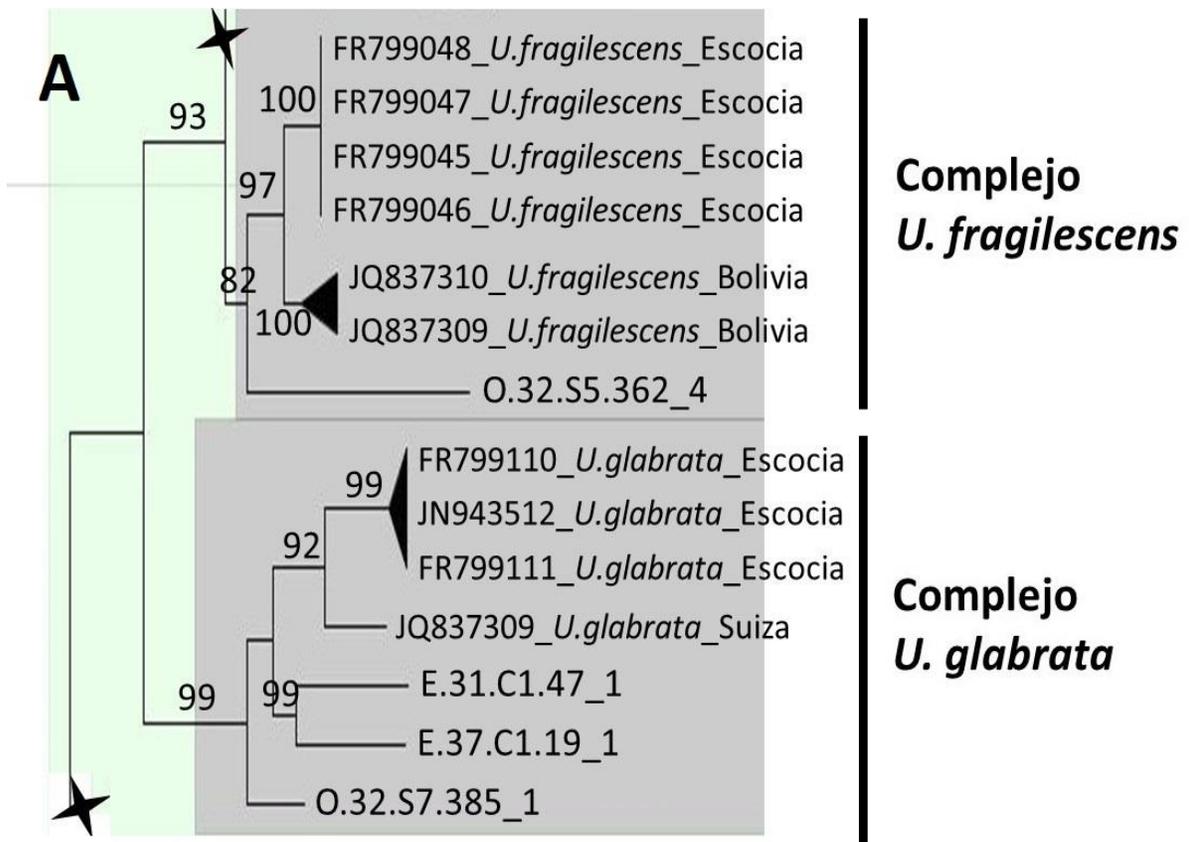


Figura 12. Detalle de los clados representados por las especies: *Usnea rubicunda*, *Usnea rubricornuta*, *Usnea steineri*, *Usnea cornuta* y *Usnea flammea*. Se muestran los valores de Bootstrap $\geq 75\%$.

El clado complejo *U. glabrata* muestra un alto soporte (99% BS), e incluye a tres ejemplares del morfotipo 1 y a ejemplares de *U. glabrata* de Escocia y Suiza. Los especímenes de *U. glabrata* de Escocia se separan claramente del ejemplar de Suiza, y éstos a su vez se agrupan dentro de un clado con dos ejemplares del morfotipo 1, el cual está enraizado por una secuencia de este mismo morfotipo, pero con bajo soporte. Los caracteres morfoanatómicos de *U. glabrata* y del morfotipo 1 son iguales, solo contrasta la química pues *U. glabrata* es negativa a KOH y C, mientras que el morfotipo 1 produce una reacción positiva al KOH dando una coloración roja. El clado complejo *U. fragilescens* está altamente soportado (Figura 13). Este complejo incluye un ejemplar de *Usnea* del PNLM (morfotipo 4) y ejemplares de *U. fragilescens* de Bolivia y de Escocia. Los ejemplares de Escocia forman un grupo claramente definido con un soporte del 97% BS. Ambos grupos se separan evidentemente por su distribución geográfica, lo que podría indicar que las condiciones ambientales y geográficas son factores que influyen en la divergencia de estos linajes. El morfotipo 4 comparte varios caracteres morfológicos, anatómicos y químicos con *U. fragilescens*, especialmente el tipo de reproducción (asexual), pero discrepa de dicha especie por tener fibrillas dispersas.

En los siguientes clados se encuentran la mayoría de las secuencias procedentes del GenBank de las especies: *U. silesiaca*, *U. parafloridana*, *U. fulvovirens*, *U. florida* y *U. subfloridana*. El complejo de especies de *U. subfloridana* y *U. florida* se agrupan con alto soporte y forman dos subclados bien definidos, ambos procedentes de Estados Unidos y Gran Bretaña, estas especies han sido materia de debate debido a su estrecha relación filogenética y a su distinta estrategia reproductiva (Articus *et al.*, 2002). *Usnea fulvovirens* también forma un clado con dos linajes altamente soportados. Uno de los grupos está conformado por especímenes de Estados Unidos y Reino Unido, mientras que el otro grupo contiene ejemplares de Estados Unidos exclusivamente. *Usnea parafloridana* y *U. silesiaca* forman un grupo monofilético con un 75% BS (Figura 14).



B

<i>U. fragilesceus</i>	MT 4
KOH + Amarillo o Rojo	KOH + Amarillo
Médula laxa	Médula laxa
Fibrillas en espiga	Fibrillas dispersas
Soralios	Soralios
Isidiomorfos	Isidiomorfos
Sustrato: roca	

C

<i>U. glabrata</i>	MT 1
KOH -	HOH + Rojo
Médula laxa	Médula laxa
Isidiomorfos	Isidiomorfos
Soralios	Soralios
Sin fibrillas	Sin fibrillas
Talo corto	Talo corto

Figura 13. Detalle del árbol donde destacan los clados de los complejos *Usnea fragilesceus* y *Usnea glabrata*, así como secuencias de GenBank. Se muestran los valores de Bootstrap $\geq 75\%$ (A). Tabla comparativa entre los caracteres morfológicos de *U. fragilesceus* y *U. glabrata* con los morfotipos 4 y 1 respectivamente (B y C).

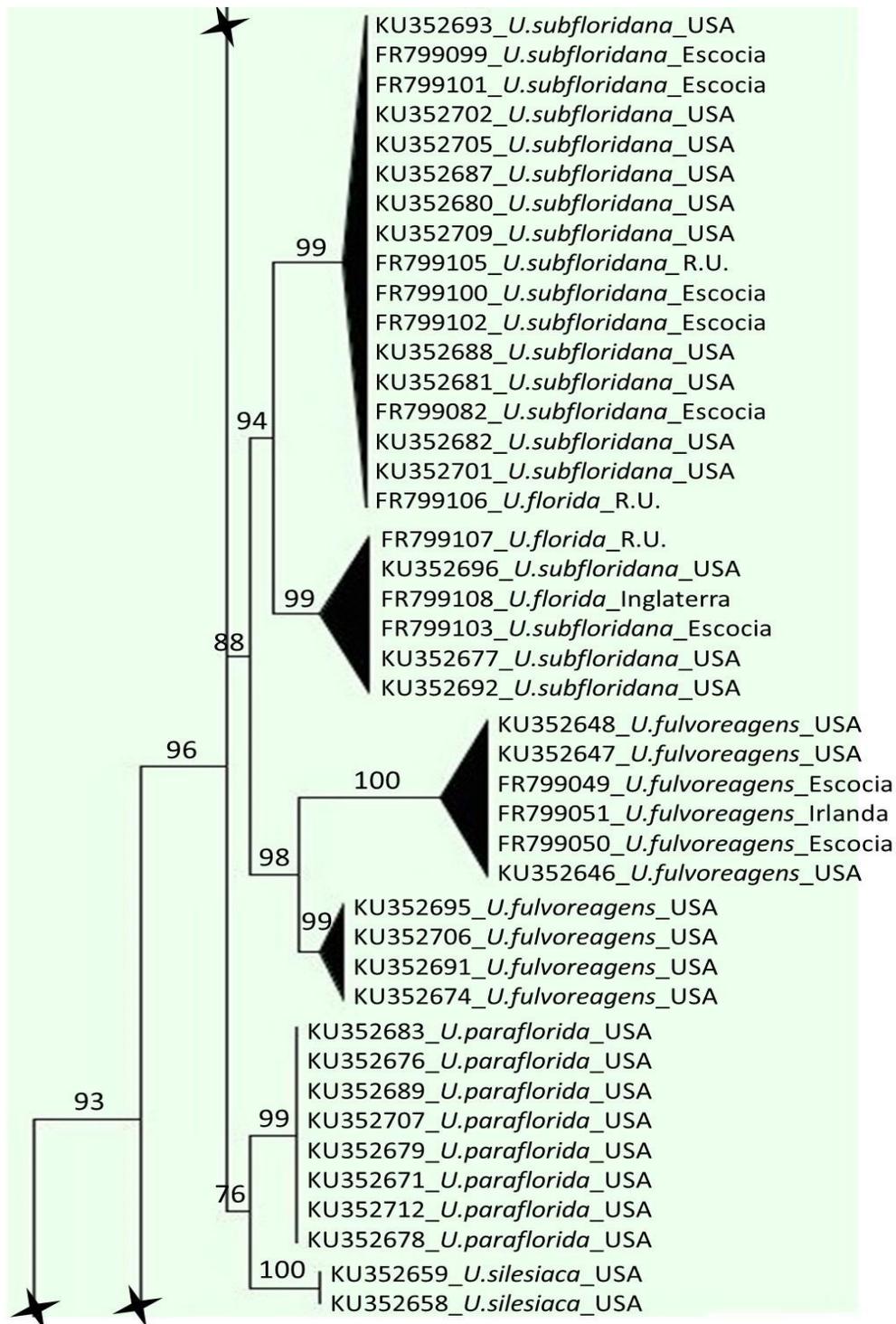


Figura 14. Detalle de los clados representados por las especies: *Usnea subfloridana*, *Usnea florida*, *Usnea fulvoreagens*, *Usnea paraflorida* y *Usnea silesiaca*. Se muestran los valores de Bootstrap $\geq 75\%$.

En la figura 15, se muestran los clados de los complejos *U. lapponica*, *Usnea* 1 y *Usnea* 2. En el clado complejo *U. lapponica* se forma un grupo altamente soportado (100% BS) con especímenes procedentes de Estados Unidos con los que se anidan dos ejemplares (E.31.C1.1_10 y S.37.C2.161_6) del PNLN sin buen soporte. Los caracteres morfológicos y químicos entre *U. lapponica* y los morfotipos 10 y 6 es muy variable. No obstante, el morfotipo 10 y *U. lapponica* comparten las fibrillas dispersas y la presencia de soraliós, mientras que el morfotipo 6 y *U. lapponica* comparten la médula densa, fibrillas en espiga y KOH positivo rojo (Figura 15B).

El complejo *Usnea* 1 tiene un soporte del 75% BS y se divide en cuatro subclados altamente soportados. El primer subclado agrupa a los morfotipos 10, 11 y 12 que no comparten ninguno de los caracteres analizados. El siguiente subclado agrupa a ejemplares de los morfotipos 2, 3 y 12, de los cuales el 2 y 12 comparten caracteres ecológicos, químicos, anatómicos y morfológicos. El morfotipo 3 se diferencia del 2 y 12 por la ausencia de apotecios. El tercer y más grande subclado genera en su interior una politomía con los morfotipos 8, 10, 11 y 12. Los ejemplares de los morfotipos 8 y 10 tienen una morfología bastante similar, su reacción con KOH es positiva (rojo y naranja, respectivamente). Los morfotipos 11 y 12 son negativos a las pruebas químicas, pero se distinguen por el tipo de reproducción. No obstante, a pesar de los caracteres morfoanatómicos compartidos sus relaciones tienen muy baja resolución filogenética. El cuarto y último subclado del complejo *Usnea* 1 lo conforman una politomía de ejemplares de los morfotipos 2, 11 y 12. Los morfotipos 2 y 12 comparten la mayoría de los caracteres morfológicos, anatómicos y químicos, y se diferencian del morfotipo 11 en la presencia de estructuras reproductivas asexuales y en la abundancia de fibrillas (Tabla 2). Dentro del complejo *Usnea* 2 se agrupan los morfotipos 3, 9 y 11 con alto soporte (99% BS), la longitud de rama amplia entre ellos y los caracteres morfológicos que comparten son la presencia de isidiomorfos, médula densa y fibrillas en espiga (Tabla 2).

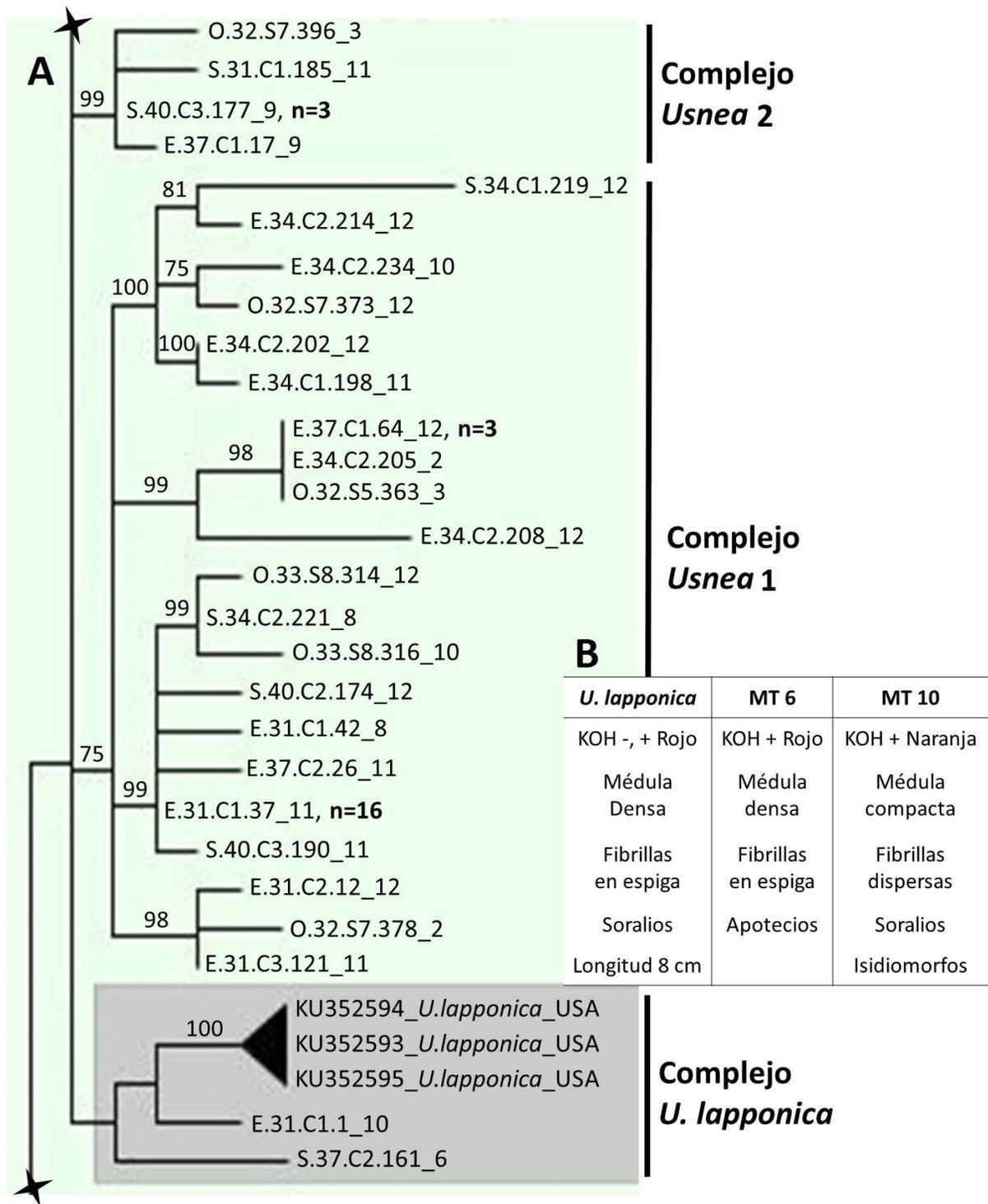


Figura 15. Detalle de los complejos *Usnea* 1, *Usnea* 2 y *Usnea lapponica*. Se muestran los valores de Bootstrap ≥ 75 %. Los ejemplares que representan a más de una secuencia se indican como n=* (A). Tabla comparativa entre los caracteres morfológicos de *U. lapponica* con los morfotipos 6 y 10 (B).

En el siguiente caldo de bajo soporte de BS se sitúan tres clados independientes altamente soportados referidos como complejos *Usnea* 3, *Usnea* 4 y *Usnea* 5 en los que se encuentran los morfotipos 8, 10, 11 y 12, este último es el único morfotipo con estructuras de reproducción sexual, por lo cual se muestra una gran variación morfológica, anatómica, química y ecológica. La ramificación de *U. cavernosa* y *U. wasmuthii* lo soporta un nodo con alto soporte (83% BS). La descripción de *U. cavernosa* está bien diferenciada de *U. wasmuthii*, puesto que *U. cavernosa* se caracteriza por tener una médula laxa con crecimiento de más de 40 cm de longitud y *U. wasmuthii* tiene una médula densa con una longitud de crecimiento de no más de 5 cm. Dentro del complejo, *U. wasmuthii* forma dos linajes altamente soportados, uno agrupa a especies procedentes de Gran Bretaña con ejemplares del PNLM, las cuales forman una politomía, mientras que el otro linaje está completamente resuelto y agrupa a ejemplares exclusivamente de Gran Bretaña. No obstante, el ejemplar E.31.C1.41_11 se asocia con estos grupos como una rama independiente con bajo soporte, lo que demuestra que las relaciones filogenéticas aún no están resueltas. Los caracteres químicos, morfológicos, anatómicos y ecológicos de los ejemplares del PNLM son diferentes a lo descrito para *U. wasmuthii*. Las relaciones de parentesco entre los linajes que se forman dentro del complejo *U. wasmuthii* no están completamente resueltas, aun cuando agrupa a dos clados con un soporte de rama mayor al 90% BS (Figura 16).

El último clado dentro del subgénero *Usnea* sección *Usnea* forma cinco subclados altamente soportados representados por los complejos: *Usnea* 6, *Usnea* 7, *Usnea* 8, *Usnea* 9 y *U. filipendula* cuyas relaciones en su interior no están resueltas (Figura 17). Los subclados referidos como complejos *Usnea* 6, *Usnea* 7 y *Usnea* 8 forman grupos independientes altamente soportados (99, 97 y 100%, respectivamente) y de dos ejemplares cada uno, con variabilidad morfológica, ecológica y química. El siguiente subclado representado por el complejo *U. filipendula* tiene un soporte del 99% BS, donde el ejemplar E.31.C1.10_5 ramifica con buen soporte a los ejemplares de *U. filipendula* de Escocia y que su vez se agrupan con el ejemplar E.34.C1.256_10. Estos ejemplares se relacionan morfológicamente por el tipo de reproducción asexual, no obstante, dentro de este subclado se agrupan en la base tres ejemplares del morfotipo 11 con clados independientes a *U. filipendula* generando una politomía. En el complejo *Usnea* 9, con un soporte del 98% BS, se forman seis grupos bien soportados. Sin embargo, las

relaciones al interior de estos seis grupos no están resueltas y muestran una gran politomía en el que la longitud de las ramas y los datos químicos, morfológicos, anatómicos y ecológicos son muy variables. El morfotipo 12 es constante en los complejos *Usnea* 6, *Usnea* 7, *Usnea* 8 y *Usnea* 9.

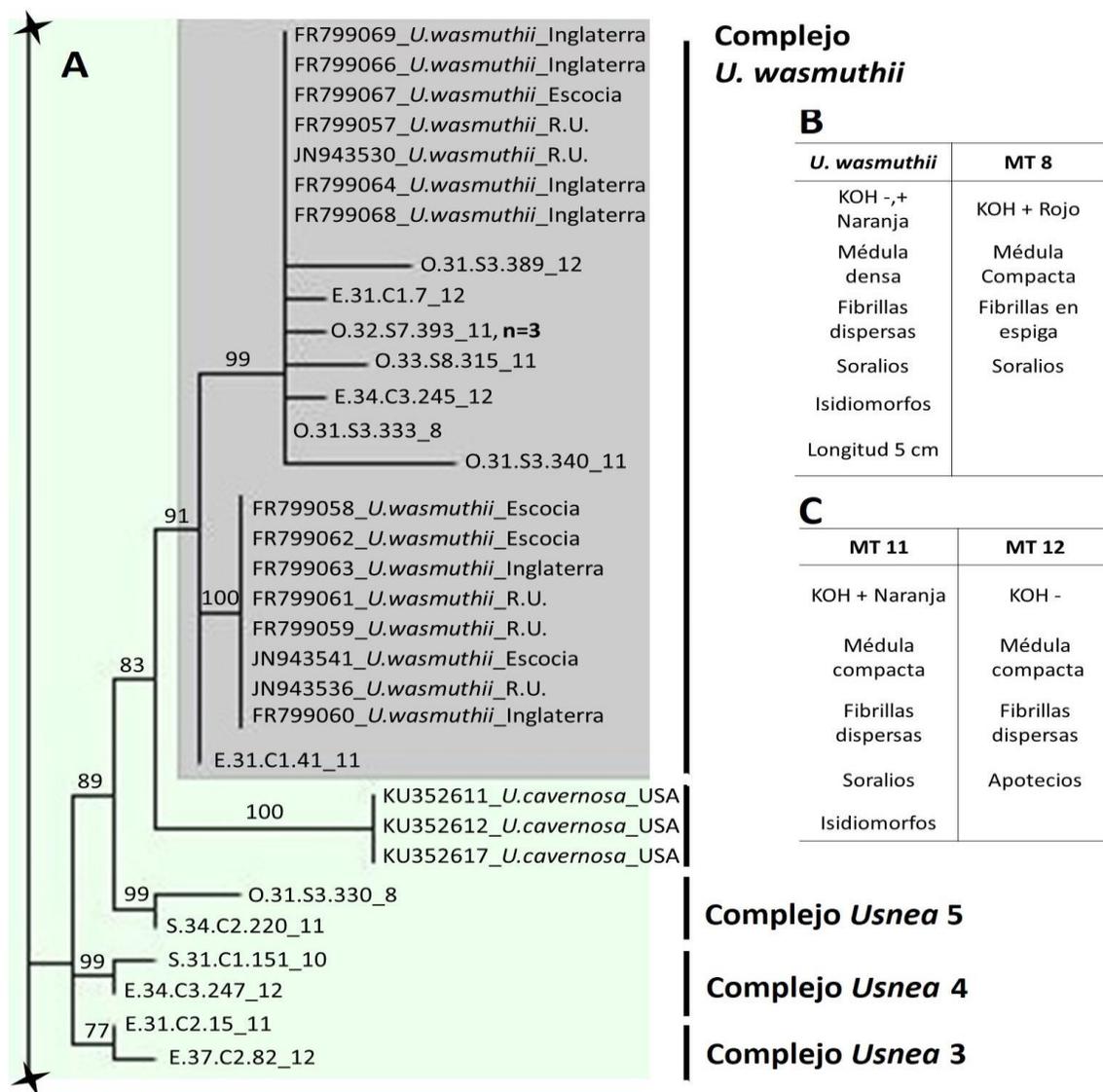


Figura 16. Detalle de los clados complejos *Usnea* 3, *Usnea* 4, *Usnea* 5 y *Usnea wasmuthii*, se muestran los valores de Bootstrap igual y mayores del 75% de soporte de rama, que muestra las relaciones de las especies *U. wasmuthii*, y *Usnea cavernosa* con los ejemplares del Parque Nacional La Malinche. Los ejemplares que representan a más de una secuencia se indican como n=* (A). Tabla comparativa entre los caracteres morfológicos de *U. wasmuthii* con los morfotipos 8, 11 y 12 (B y C).

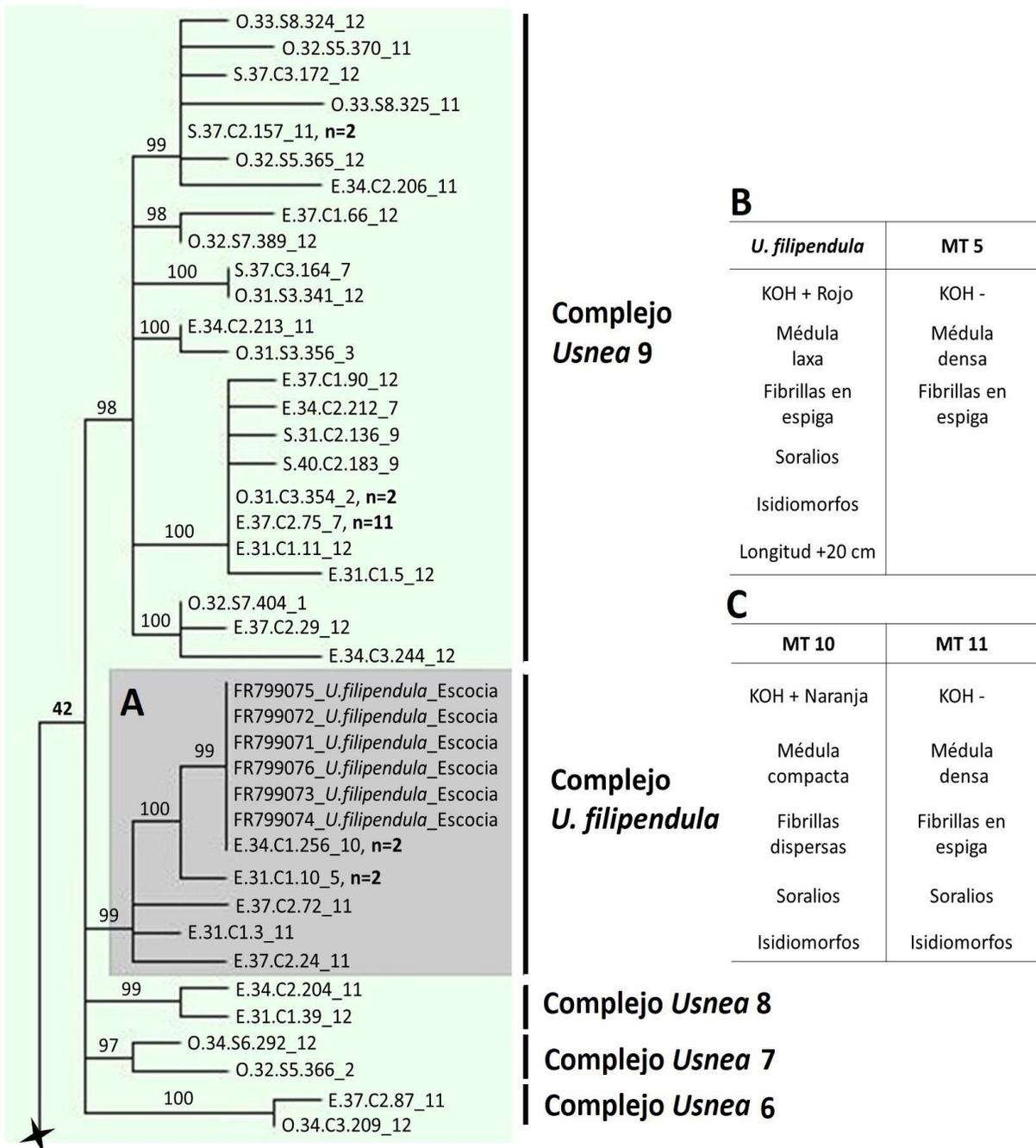


Figura 17. Detalle de los clados complejos *Usnea 6*, *Usnea 7*, *Usnea 8*, *Usnea 9* *Usnea filipendula* dentro del subgénero *Usnea*. Los ejemplares que representan a más de una secuencia se indican como **n=* (A)**. Tabla comparativa entre los caracteres morfológicos de *Usnea filipendula* con los morfotipos relacionados dentro del clado 5, 10 y 11 (B y C). El ejemplar E.34.C1.256_10 corresponde al morfotipo 10.

7.4 Distancia genética

Las secuencias de los subclados dentro de los complejos *U. filipendula*, *U. wasmuthii* y *Usnea* 1–9 presentan buen soporte de BS y menos del 1% de distancia genética con respecto a las secuencias de cada complejo. Las secuencias de GenBank dentro de los complejos *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata* y *U. hirta* presentan una diferencia entre 1.2 y 4.3% de distancia genética con respecto a las secuencias del PNLM, estas últimas se posicionan como ramas basales para cada complejo, excepto en el complejo *U. hirta*.

Con base en el análisis de distancia genética de este estudio y con relación al soporte de BS del análisis filogenético, los subclados bien soportados dentro de cada complejo se separan a partir del 1% de diferencia genética. Lo cual, nos permite especular que corresponden a diferentes especies de *Usnea*.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo, se estudiaron 117 ejemplares de *Usnea* provenientes del PNLM, los cuales se catalogaron en 12 morfotipos basados en caracteres morfológicos, anatómicos y químicos. El análisis molecular que empleó la región ITS de estos ejemplares generó clados que referiré como complejos de especies, dado que las relaciones filogénicas dentro de los clados no están resueltas.

La circunscripción del género *Usnea* ha sido motivo de debate por años y por diversos autores debido a la gran variabilidad morfológica que presentan las especies como respuesta a las condiciones ambientales (Clerc, 1998; Ohmura, 2002; Articus, 2004; Seymour *et al.*, 2007; Wirtz *et al.*, 2008; Truong *et al.*, 2013). Derivado de investigaciones que han usado diferentes marcadores moleculares y con ejemplares provenientes de diferentes lugares, se ha propuesto que dentro de este género se reconozcan al menos cuatro subgéneros (Ohmura, 2002; Articus, 2004; Truong *et al.*, 2013). El análisis filogenético de Ohmura (2002) empleó la región ITS con especies asiáticas de *Usnea* que formaron tres clados bien diferenciados que representan a los

subgéneros *Eumitria*, *Dolichousnea* y *Usnea*. Aunque su análisis tuvo bajo soporte BS éste sugiere que *Usnea* está más emparentada con *Eumitria*. Articus (2004), por su parte, utilizó la región del ITS y β -tubulina para delimitar a los subgéneros, pero en su estudio incluyó a especies de *Neuropogon*. Articus logró recuperar las divisiones de los subgéneros anteriormente mencionados, sin embargo, *Neuropogon* se ubicó como el grupo más cercano a *Usnea* y *Dolichousnea* se ubicó como el grupo más basal. La relación filogenética de los subgéneros *Usnea* y *Neuropogon* en los resultados de Articus coinciden con los del trabajo de Truong *et al.* (2013) que utilizó la región ITS y genes codificantes de proteínas (RPB1 y MCM7). En este estudio, el análisis filogenético de máxima verosimilitud empleando la región ITS casi recuperó la topología de los cuatro subgéneros de Truong *et al.* (2013), la única diferencia es que *Eumitria* fue el clado más basal en el análisis de Truong *et al.* y *Dolichousnea* fue el clado más basal en este trabajo. Truong *et al.* mencionaron que la información genética derivada de la región ITS contribuyó de manera más importante a la resolución de las relaciones filogenéticas dentro del género *Usnea*.

Todos los ejemplares de *Usnea* recolectados en este estudio del PNLM corresponden con el clado tradicionalmente circunscrito como subgénero *Usnea* debido a que la distribución de *Dolichousnea* se limita al hemisferio norte boreal, *Neuropogon* se distribuye en los polos y *Eumitria* en zonas tropicales (Ohmura, 2001; Ohmura y Kanda, 2004; Truong *et al.*, 2013). Dentro del subgénero *Usnea*, Ohmura (2001, 2002) evaluó y definió a las secciones *Usnea* y *Ceratina* con base al tipo de corteza. En su análisis filogenético encontró que la sección *Usnea* tuvo alto soporte de BS. Articus (2004) también encontró que la sección *Usnea* formó un grupo monofilético bien soportado. En este estudio, se formaron dos linajes, el primer linaje comprende clados con soporte $\geq 95\%$ BS y relativamente resueltos, el cual agrupa a especies de Gran Bretaña y del continente americano, así como especies del complejo *U. hirta*. Este linaje concuerda con algunas especies del clado “*Usnea* 4” del estudio de Truong *et al.* (2013), con excepción de *U. glabrata*, ya que esta especie se agrupa en la sección *Usnea* del subgénero *Usnea* de este estudio. El segundo linaje, con bajo soporte de BS que agrupó a los clados representados por los complejos de especies: *Usnea* 1–9, *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. lapponica*, *U. fragilescens* y *U. glabrata*. Este linaje corresponde con la mayoría de las especies de la sección *Usnea* del subgénero *Usnea* descrita por Ohmura (2002), o con el clado “*Usnea*

2” del análisis de Truong *et al.* (2013). Saag *et al.* (2011) observaron que la sección *Usnea* se caracteriza por agrupar especies difíciles de identificar y ramas cortas en los análisis filogenéticos y sugirieron que podría tratarse de especies de divergencia reciente, el mismo género *Usnea* es de divergencia reciente, i.e. 20-25 millones de años (Kraichak *et al.*, 2015; Divakar *et al.*, 2017). Este mismo patrón se obtuvo en el análisis filogenético con los ejemplares del PNLM dentro de la sección *Usnea*. La baja resolución que se observa dentro de los clados de las secciones del subgénero *Usnea*, puede ser explicada también porque las especies en esta región están en proceso de especiación o porque la región ITS es un marcador muy variable en esta sección. Por lo que es importante continuar con estudios añadiendo un mayor número de marcadores.

El complejo *U. hirta* es el grupo basal del clado 1 del subgénero *Usnea*, agrupa con buen soporte BS a ejemplares de Escocia y a uno del PNLM. Sin embargo, dentro de este clado las especies exclusivas de Escocia se separan del ejemplar del PNLM (O.31.S2.343_11). *U. hirta* tiene una amplia distribución, se encuentra en el Sur de Estados Unidos y en la parte Norte de México. El ejemplar O.31.S2.343_11 se encontró sobre corteza de *Pinus* en una altitud donde se encuentran muchas zonas expuestas al sol. La distancia genética de estas secuencias es mayor al 1.6% y sólo comparten el tipo de reproducción asexual, lo que podría indicar que se trata de una especie diferente.

El complejo *U. glabrata* es el grupo basal del clado 2 del subgénero *Usnea*. Se separan ejemplares de Escocia, de Suiza y del PNLM con buen soporte BS. Aunque los ejemplares del PNLM comparten varios caracteres morfológicos con *U. glabrata*, sus caracteres químicos son diferentes y la distribución de *U. glabrata* es en regiones boreales de Norteamérica (Brodo *et al.*, 2001). La distancia genética de las secuencias *U. glabrata* de Escocia y Suiza con respecto a las del PNLM es del 2.0 al 3.8%, y la distancia genética entre las secuencias del PNLM es del 2.9-3.2%, además de que se separaron con alto soporte de BS. Esta evidencia en conjunto con los caracteres morfológicos y químicos, así como el soporte de BS podría señalar que se tratan de cuatro especies distintas para el PNLM.

En el complejo *U. fragilescens*, ejemplares de Escocia se separan de ejemplares de Bolivia y éstos a su vez se separan de un ejemplar del PNLN. La distribución de *U. fragilescens* se limita a la costa oeste de Estados Unidos y comúnmente es saxícola (Brodo *et al.*, 2001). El ejemplar del PNLN es cortícola de Pino donde la zona está expuesta al sol y no hay presencia de rocas. La distancia genética entre ejemplares de Escocia y Bolivia es del 1.1%, y estas con las del PNLN es del 4.3 y 4.0%, respectivamente. Considerando el alto valor de BS, la distribución geográfica, el tipo de hábitat en el que fueron recolectadas los ejemplares, las distancias genéticas y los caracteres morfológicos, se podría especular para este complejo la presencia de una especie distinta relacionada filogenéticamente.

U. subfloridana y *U. floridana* han sido reconocidas desde hace mucho tiempo como especies distintas. Comparten muchos caracteres morfológicos, a diferencia de las estrategias reproductivas. Forman un clado altamente soportado (94% BS) donde se divide en dos linajes con ejemplares mezclados de ambas especies de Estados Unidos y Gran Bretaña, esto coincide con el trabajo de Articus *et al.* (2002). No obstante, estas especies no fueron reconocidas filogenéticamente para el PNLN, debido a que las secuencias generadas por este estudio no se agruparon dentro de este clado. Sin embargo, Tlalmis-Corona (2017) reconoció estas especies morfológicamente para el PNLN.

Dentro de la sección *Usnea* se agrupa el complejo *U. lapponica*. Este complejo parece tener poca resolución, los ejemplares del PNLN se separan con bajo soporte de las especies de Estados Unidos y son pocos los caracteres químicos y morfológicos que comparten. La distancia genética entre los ejemplares del PNLN con respecto a las de *U. lapponica* de Estados Unidos es mayor al 1.2%. Además, *U. lapponica* se distribuye en bosques boreales de Norteamérica. Lo mismo sucede con los complejos *U. fragilescens*, *U. glabrata* y *U. hirta*. Los ejemplares del PNLN del complejo *U. lapponica* se recolectaron en zonas poco conservadas donde predominan los bosques de *Pinus* y *Abies* a una altitud de 3100 y 3700 msnm. Con base en el análisis de distancia genética y con los caracteres morfológicos, sugieren que se tratan de dos especies distintas para el PNLN. Sin embargo, sería difícil especular que se trate de la misma o de diferente especie debido al bajo soporte de BS que presenta el clado. Por lo que es importante continuar con estos estudios para delimitar a estos ejemplares.

Los complejos *Usnea* 1 y 2 agrupan únicamente a ejemplares del PNLM con una gran variabilidad morfológica, química, genética y ecológica. Éste es un hallazgo novedoso porque podría indicar nuevas especies o nuevos registros para México. Sin embargo, filogenéticamente no hay nada reportado que se relacione con estos ejemplares. Los ejemplares de estos complejos se encuentran altamente distribuidos en el PNLM, pues abarcan las tres laderas geográficas (Este, Oeste y Sur), así como los diferentes gradientes altitudinales y los diferentes tipos de estructura arbórea. Es difícil especular si se trata de diferentes especies o de una misma especie con gran variabilidad fenotípica, ecológica y genética dentro de cada complejo, ya que el marcador molecular usado en este estudio no nos permitió confirmarlo. Estudios anteriores han utilizado la región ITS y genes codificantes de proteínas (β -tubulina, MCM7, RPB1 y RPB) como marcadores moleculares (Articus, 2004; Truong *et al.*, 2013; Mark *et al.*, 2016). El ITS es el marcador molecular que ha dado más resolución a los análisis filogenéticos en comparación con genes codificantes. Sin embargo, el análisis de distancia genética reveló que entre los subclados bien soportados de los complejos *Usnea* 1 y *Usnea* 2 hay una diferencia del 1.7%. Dentro del complejo *Usnea* 1 se forman cuatro subclados altamente soportados, y en su interior parecen no están resueltas debido a que forman una politomía, la distancia genética entre estos subclados es del 1.4-2.1%, esta evidencia podría indicar que se tratan de cuatro especies potencialmente distintas para el PNLM. La similitud entre las secuencias dentro de los subclados del complejo *Usnea* 1 es menor del 1%, al igual que en complejo *Usnea* 2, lo cual indicaría que pertenecen a la misma especie. La adición de otros marcadores moleculares ayudaría a corroborar la identidad de las posibles especies de *Usnea* para PNLM dentro de estos complejos.

El complejo *U. wasmuthii* forma dos linajes altamente soportados y similares a los que obtuvo Ament (2012) y Truong *et al.* (2013) en su clado “*Usnea* 2”. Para este estudio, uno de los linajes contiene especies de Gran Bretaña y el otro contiene ejemplares de Gran Bretaña y del PNLM, donde estos últimos forman una politomía dentro del clado. El único carácter que comparte *U. wasmuthii* con algunos ejemplares del PNLM es la presencia de soralioides. Estos linajes se observan en la filogenia de Ament pero con especies de Reino Unido, Estonia y Japón. La distancia genética entre las secuencias de GenBank del primer linaje de *U. wasmuthii* y las del PNLM es menor al 1%. Sin embargo, *Usnea wasmuthii* está ampliamente distribuida en regiones boreales y montañosas en Gran Bretaña y Norteamérica (Ohmura 2012; Halonen

2000), por lo que los ejemplares del PNLN podrían corresponder con especies diferentes. Mientras que, la diferencia genética entre las secuencias del PNLN y las del segundo linaje de *U. wasmuthii* es del 1-1.8%, excepto con el ejemplar O.31.S3.333_8 que presenta menos del 1% de distancia genética, por lo que podría tratarse de otra especie distinta. En general, existe muy poca información morfológica, química y molecular de *U. wasmuthii*, por lo que, para comprender mejor las relaciones filogenéticas dentro de este complejo, es necesario agregar ejemplares de otros países, especialmente del continente americano. Igualmente, es necesario integrar más información basada en caracteres químicos, anatómicos y morfológicos, así como secuencias de otros loci para poder delimitar claramente a las especies del complejo *U. wasmuthii*.

Usnea cavernosa de Estados Unidos se agrupa como grupo hermano del complejo *U. wasmuthii*, los caracteres químicos y morfológicos entre *U. wasmuthii* y *U. cavernosa* son distintos y la distancia genética entre estos clados es mayor al 2%, además, se separan con alto soporte de BS y su distribución geográfica es diferente, lo que indicaría que son de especies distintas. Herrera-Campos (1998) describió a *U. cavernosa* en el centro de México, sin embargo, no hay datos moleculares de estos ejemplares para poder ser incluidos en análisis filogenéticos. Fuera de este linaje se agrupan más especies de distintos morfotipos del PNLN sin resolver ninguna relación filogenética.

Los complejos *Usnea 3*, *Usnea 4* y *Usnea 5* se agrupan de forma independiente, cada uno con dos ejemplares del PNLN, y con alto soporte de BS con los complejos *U. wasmuthii* y *U. cavernosa*. La distancia genética entre estos complejos es mayor al 1%, lo que indicaría que cada complejo representa a una especie diferente. La variabilidad morfológica, química y ecológica entre los ejemplares de cada complejo dificulta diferenciar a estas posibles especies, ya que en estos complejos agrupan a los morfotipos 8, 10, 11 y 12. Esto mismo sucede en los complejos *Usnea 6*, *Usnea 7* y *Usnea 8* con los morfotipos 2, 11 y 12. Sin embargo, estos últimos se agrupan con el clado complejo *U. filipendula*. Dada la evidencia de la distancia genética entre los complejos y a la gran variabilidad morfológica no se encontró ningún carácter informativo que separe a estos complejos, por lo que se sugiere hacer un remuestreo sobre los caracteres utilizados.

El complejo *U. filipendula* incluye siete ejemplares del PNLM con una gran variabilidad morfológica y química, y la longitud de las ramas sugieren grandes diferencias genéticas entre las secuencias. Los morfotipos 11 y 12 tienen diferente forma reproducción y son los más comunes en este complejo, sin embargo, no forman grupos definidos. El ejemplar E.34.C1.256_10 se encontró en la zona más conservada el PNLM, a los 3, 400 msnm del transecto Este, donde predomina el bosque de *Abies*. La secuencia E.34.C1.256_10, aunque no presenta una disimilitud, y los ejemplares E.31.C1.10_5 y E.31.C1.3_11 del PNLM tienen una similitud menor al 1% con respecto a ejemplares de *U. filipéndula* de Escocia, difieren morfológicamente por el tipo de médula y la disposición de las fibrillas, por lo que podría tratarse de la misma especie. Además, la distribución de *U. filipendula* en el continente americano está limitada a Canadá (Brodo *et al.*, 2001). Aunque Herrera-Campos (1998) la describe en el sur de México, su identificación está basada únicamente en taxonomía tradicional y es posible que los caracteres empleados no eran los más adecuados para la identificación. Los complejos 6–8 están altamente soportados y con una distancia genética mayor al 1 y 2%, así como alta variabilidad fenotípica, lo que probablemente indicaría que son especies distintas.

Dentro del complejo *Usnea* 9 se forman seis subclados altamente soportados y en su interior parece estar no resuelta. Tres de los subclados crean una politomía y agrupan a dos a mas morfotipos, los subclados restantes solo agrupan a dos secuencias del PNLM pertenecientes al mismo o diferente morfotipo. La distancia genética entre estos subclados es mayor al 1% y la similitud entre las secuencias de cada subclado es menor al 1%, lo que especularía que se tratan de seis especies potenciales para el PNLM. Sin embargo, los caracteres morfológicos, anatómicos, químicos y ecológicos, son variables dentro de cada subclado.

A pesar de las distribuciones geográficas restringidas de algunos linajes de la familia Parmeliaceae (Crespo *et al.*, 2010; Divakar *et al.*, 2010), existe evidencia de que ocurren eventos de dispersión a larga distancia por medio de las estructuras vegetativas asexuales que han sido de gran importancia en la diversificación de especies dentro de la familia y podría ser responsable de la distribución actual de algunos linajes (Muñoz *et al.*, 2004; Fernández-Mendoza *et al.*, 2011; Gerlach *et al.* 2019). Posiblemente, es debido a estos mecanismos de dispersión que se agrupan secuencias provenientes de regiones geográficas tan distantes como

U. fragilescens de Escocia, Bolivia y del PNLM, y que se separan con alto soporte de BS. También, podría explicar distribuciones disyuntas de organismos que pudieran estar filogenéticamente relacionadas. Sin embargo, es necesario un análisis más profundo y considerando otros loci para definir si se trate de la misma especie o de un complejo de especies estrechamente relacionadas.

En algunos estudios taxonómicos basados en la identificación tradicional de especies de *Usnea* se ha demostrado que varios taxones son químicamente variables y muestran varios quimiotipos (Stevens 2004; Clerc, 2007; Herrera-Campos, 2016). No obstante, la química es un buen predictor de la delimitación de especies de varios grupos de hongos liquenizados (Lumbsch, 1998; Printzen, 2010), y en particular para *Usnea* (Clerc, 1998), cuando se correlaciona con otros caracteres, ya que resultan ser de gran utilidad en la delimitación de algunos clados, aun cuando los ejemplares estén en un estado juvenil. Por otro lado, en estudios moleculares anteriores (Ohmura, 2008; Wirtz *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2013) se ha mostrado que la mayoría de las especies descritas con base en caracteres morfológicos y químicos son generalmente monofiléticas, lo que sugiere que la taxonomía tradicional basada en la morfología y química ha sido una herramienta adecuada para la delimitación de especies en el género. Sin embargo, en este estudio no se identificaron grupos monofiléticos asociados con los morfotipos delimitados con base en la morfología, anatomía y la composición de metabolitos secundarios de los ejemplares del PNLM. Por lo anterior, podríamos decir que los caracteres morfológicos, anatómicos y químicos comúnmente utilizados para otras especies del género *Usnea* son homoplásicos en las especies del PNLM y por lo tanto no son útiles para la delimitación de estas especies. Wirtz *et al.* (2008) mencionaron que podrían existir especies crípticas o ignoradas debido a sutiles diferencias fenotípicas, lo cual podría estar pasando con las especies de *Usnea* del PNLM. Gerlach *et al.* (2019) mencionaron que la separación incompleta de linajes es un fenómeno común en especies de divergencia reciente, e.g. *Usnea*, lo cual también repercute en la delimitación de las especies de este estudio.

Los datos taxonómicos y moleculares utilizados en diferentes regiones geográficas pueden ser un indicador de las especies para cada región, como es el caso de Japón y Taiwan (Ohmura, 2001; 2002), Gran Bretaña (Truong *et al.*, 2013), Europa (Randlane *et al.*, 2009),

Canadá (Halonen *et al.*, 1998), Estados Unidos (Clerc, 2007) y México (Herrera-Campos, 1998; Ament, 2012). Sin embargo, estos trabajos son aislados, de regiones geográficas relativamente pequeñas y los datos moleculares generados no representan a las especies descritas con rigurosidad taxonómica. Además, es posible que existan especies raras o no descritas de áreas no exploradas o diversos linajes crípticos dentro de *Usnea*. En este estudio se logró separar con alto soporte de BS a algunas especies de Gran Bretaña con las de Norteamérica, Sudamérica y estas a su vez con las del PNLM, estas últimas ramificando a los subclados dentro de cada complejo. Este patrón podría indicar que las regiones geográficas, así como el tipo de hábitat y clima de cada región puede influir en la morfología y delimitación de las especies, ya que algunas son de ambientes húmedos y otras de ambientes áridos. No obstante, es importante continuar con trabajos de taxonomía integrativa, haciendo una revisión más meticulosa de los caracteres fenotípicos y con ejemplares procedentes de diferentes y más áreas geográficas.

Poco se sabe sobre la ecología de *Usnea*, debido a la dificultad en la identificación de sus especies (Ament, 2012). No obstante, se conoce que las especies de *Usnea* colonizan árboles viejos y grandes (Hilmo, 1994), además se encuentran en bosques menos perturbados ya que son vulnerables a las condiciones ambientales (Boudreault *et al.* 2000). La mayoría de los ejemplares del PNLM fueron recolectados en la orientación Este, que es considerada la parte más conservada de la montaña. En cuanto a la altitud, el género se encontró a partir de los 3,100 hasta los 4,000 msnm y con más abundancia en los 3,400 a los 3,700 msnm abarcando los diferentes tipos de vegetación. Herrera-Campos *et al.* (1998; 2001) reportó que *Usnea* se distribuye a partir de los 1,300 hasta los 4,000 msnm en hábitats como matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña y bosque de coníferas. Todos los ejemplares del PNLM fueron recolectados en corteza. Podría encontrarse una relación entre el tamaño de los talos liquénicos y la especie del forofito, por ejemplo, los talos con longitud mayor a 10 cm fueron recolectados en *Abies religiosa*, mientras que los de menor longitud se recolectaron en corteza de *Pinus* y *Alnus*. Es importante mencionar que el bosque de *Abies* alberga más humedad en comparación con el bosque de *Pinus*, por lo cual se explica el mayor tamaño del talo liquénico.

Con base en el análisis filogenético obtenido en este estudio el número mínimo de especies de *Usnea* que podrían estar presentes en el PNLM están representadas por los 15 complejos de especies: *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. hirta*, *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata*, *Usnea* 1–9 con alta variabilidad morfológica, anatómica y química. No obstante, la resolución dentro de los clados no está claramente resuelta y de acuerdo con los resultados del análisis de distancia genética y con relación al soporte de BS podría indicar que los ejemplares del PNLM que se relacionan filogenéticamente dentro de los complejos como subclados podrían representar hasta 26 especie de *Usnea*.

Por otro lado, la proporción de especies reportadas taxonómicamente para Norteamérica es de 79 (Brodo *et al.*, 2001), de las cuales, *U. filipendula*, *U. lapponica*, *U. fragilescens* y *U. glabrata* se reconocen en este estudio. Las secuencias de especies de *Usnea* para Norteamérica reportadas en las bases de datos son: *U. cornuta*, *U. rubicunda*, *U. subricornuta*, *U. baileyi*, *U. intermedia*, *U. strigosa*, *U. subfloridana*, *U. parafloridana*, *U. lapponica*, *U. cavernosa*, *U. silesiaca*, y *U. fulvoreagens*, de las cuales únicamente *U. lapponica* se agrupa con secuencias del PNLM. Estas investigaciones han abarcado una pequeña parte de las especies descritas taxonómicamente y molecularmente en áreas relativamente bien conocidas, por lo que puede existir especies raras en áreas aún no exploradas.

9. CONCLUSIONES

Con base en caracteres morfológicos, anatómicos, químicos y ecológicos se encontraron a 12 morfotipos agrupados en 15 complejos, seis de ellos asociados a especies conocidas a los cuales se refieren como “aff” *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata* y *U. hirta*, y nueve a especies desconocidas. Por lo que se podrían reconocer al menos 15 especies. Sin embargo, la caracterización fenotípica y filogenética dentro de los complejos de especies sigue siendo ambigua.

El análisis filogenético de la región ITS recuperó la filogenia que separa a los cuatro subgéneros tradicionalmente circunscritos del género *Usnea*, reflejando la monofila de lo que podría ser el subgénero *Usnea*, este último con bajo soporte de BS, lo que podría indicar que exista otro subgénero sin reconocer.

Todos los ejemplares del PNLM se agruparon con buen soporte de BS dentro del subgénero *Usnea* y la mayoría dentro de la sección *Usnea*.

La resolución dentro de los clados del subgénero *Usnea*, aunque presentan alto soporte de BS, está pobremente resuelta, particularmente en los clados representados por los complejos: *U. filipendula*, *U. wasmuthii*, *U. lapponica*, *U. fragilescens*, *U. glabrata* y *U. hirta*, así como dos clados representados únicamente por ejemplares del PNLM a los que les ha denominado *Usnea* 1, *Usnea* 2, *Usnea* 3, *Usnea* 4, *Usnea* 5, *Usnea* 6, *Usnea* 7, *Usnea* 8 y *Usnea* 9.

Con base en la evidencia de la distancia genética entre los subclados de cada complejo, estos podrían presentar hasta 26 especies potenciales para el PNLM.

Los morfotipos 11 y 12 se encuentran en la mayoría de los clados del árbol filogenético, diferenciados morfológicamente por las estructuras de reproducción asexual y sexual, respectivamente. Por lo que se considera que las estructuras reproductivas no son un carácter de gran valor taxonómico. Además, ninguno de los caracteres fenotípicos estudiados fue informativo para cada complejo.

Los datos filogenéticos en donde se mapearon caracteres taxonómicos sugieren estos son homoplásicos en el género, puesto que no se encontró ningún carácter morfológico informativo.

El PNLN podría abarcar una gran diversidad de especies de *Usnea* o bien, podría tratarse de especies con divergencia reciente, esto último, también impide identificar con certeza a sus especies o reconocer nuevas especies, por lo que es importante continuar con estos estudios añadiendo más métodos analíticos.

10. PERSPECTIVAS

La inclusión de más especies y ejemplares de distintas regiones geográficas, ecosistemas, así como la búsqueda de más genes o marcadores moleculares permitirá resolver más claramente y atribuir más robustez a las relaciones filogenéticas dentro de cada complejo.

Una evaluación minuciosa de caracteres fenotípicos que son poco considerados o no son tomados en cuenta en la identificación taxonómica y observaciones detalladas de las diferentes estructuras morfológicas y anatómicas que ya son tomadas en cuenta bajo microscopio electrónico de barrido, integradas a los análisis filogenéticos, permitiría identificar caracteres informativos. Hacer un remuestreo sobre los caracteres morfológicos y anatómicos de los ejemplares agrupados en cada complejo identificando aquellos caracteres informativos.

La adición de otros métodos analíticos como análisis de coalescencia, meta-filogenéticos y de ecología microbiana podrían establecer hipótesis más robustas sobre la delimitación de las especies de los complejos reconocidos en este trabajo.

El estudio del fotobionte y otros miembros de la asociación simbiótica como los hongos liquenícolas podría contribuir a dilucidar entre especies crípticas y en la identificación a nivel de especie.

11. REFERENCIAS

- Ahmadjian, V. y M.E. Hale. 1973. *The Lichens*. London: Academic Press.
- Ament, S.L. 2012. Diversidad genética y delimitación de especies de *Usneas* (Parmeliaceae, Ascomycetes liquenizados) en bosque templados de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF. 209 pp.
- Araujo, C.E. 2015. Sistemática integrada del género *Usnea* Dill. Ex Adans (Parmeliaceae) en la Península Ibérica. Memoria doctoral. Madrid. 328 pp.
- Articus, K. 2004. *Neuropogon* and the phylogeny of *Usnea s. l.* (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycetes). *Taxon* 53: 925-934.
- Articus, K., J.E. Mattsson, L. Tibell, M. Grude y M. Wedin. 2002. Ribosomal DNA and β -tubulin data to not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *Usnea subfloridana* as distinct species. *Mycological Research* 106: 412-418.
- Barreno, E., y S. Pérez-Ortega. 2003. Líquenes de La Reserva Natural Integral de Muniellos, Austria. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Austria y KRK ediciones. 595 pp.
- Bates, S.T., A. Barber, E. Gilbert, R.T. Schroeder y T.H. Nash III. 2010. A revised catalog of Arizona lichens. *Canotia* 6: 26-43.
- Beck, A., T. Friedl y G. Rambold. 1998. Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* 139: 709-720.
- Blanco, O., A. Crespo, R.H. Ree, y H.T. Lumbsch. 2006. Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 52-69.
- Boudreault, C., S. Gauthier y Y. Bergeron. 2000. Epiphytic lichens and bryophytes on *Populus tremuloides* along a chronosequence in the Southwestern boreal forest of Québec, Canada. *The Bryologist* 103: 725-738.
- Brodo, I., S. Duran-Sharnoff y S. Sharnoff. 2001. *Lichens of North America*. Unites states of America. Yale University. New Havenand London. 795 pp.
- Bungartz, F., F. Nugra, A. Guézou y F. Ziemmeck. 2010. Guía rápida de líquenes de las Islas Galápagos. Fundación Charles Darwin. Puerto Ayora, Santa Cruz, Galápagos. 106 pp.

- Cáceres, M.E. 2007. Corticolous crustose and microfoliose lichens of northeastern Brazil-Diversity, ecology and conservation. *Library Botanic* 22: 1–168.
- Cáceres, M.E., R. Lücking y G. Rambold. 2008. Efficiency of sampling methods for accurate estimation of species richness of corticolous microlichens in the Atlantic rainforest of northeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation* 17: 1285-1301.
- Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336.
- Clerc, P. 1984. Contribution à la revision de la systématique des usnées (Ascomycotina, *Usnea*) d'Europe I.-*Usnea florida* (L.) Wigg. emend. Clerc. *Cryptogamie, Bryologie et Lichénologie* 5: 333–360.
- Clerc, P. 1987. Systematics of the *Usnea fragilesceus* aggregate and its distribution in Scandinavia. *Nordic Journal of Botany* 7: 479–495.
- Clerc, P. 1998. Species Concepts in the genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes). *The Lichenologist* 30: 321–340.
- Clerc, P. 2007. *Usnea* en Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. Volume III (balance of the microlichens, and the lichenicolous fungi), Nash III, T.H., Gries, C. y Bungartz, F. (eds.), *Lichens Unlimited*, School of Life Sciences, Arizona State University, USA.
- Crespo, A., F. Kauff, P.K. Divakar, R. del Prado, S. Pérez-Ortega, G.A. de Paz, Z. Ferencova, O. Blanco, B. Roca-Valiente, J. Nunez-Zapata, P. Cubas, A. Arguello, J.A. Elix, T.L. Esslinger, D.L. Hawksworth, A. Millanes, M.C. Molina, *et al.* 2010. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59: 1735–175.
- Culberson, C.F. 1972. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72: 113–125.
- Culberson, C.F. y J.M.E. Hale. 1973. Chemical and morphological evolution in *Parmelia* sect. *Hypotrachyna*: product of ancient hybridization? *Brittonia* 25: 162-173.

- Divakar, P.K., M.C. Molina, H.T. Lumbsch y A. Crespo. 2005. *Parmelia barroenoae*, a new lichen species related to *Parmelia sulcata* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *The Lichenologist* 37: 37–46.
- Divakar, P.K., A. Crespo, E. Kraichak, S.T. Leavitt, G. Singh, I. Schmitt, H.T. Lumbsch. 2017. Using a temporal phylogenetic method to harmonize family and genus-level classification in the largest clade of lichen-forming fungi. *Fungal Divers.*
- Divakar, P.K., G. Figueras, N.L. Hladun y A. Crespo. 2010. Molecular phylogenetic studies reveal an undescribed species within the North American concept of *Melanelixia glabra* (Parmeliaceae). *Fungal Diversity* 42: 47–55.
- Ekman, S., H.L. Andersen y M. Wedin. 2008. The limitations of ancestral state reconstruction and the evolution of the ascus in the *Lecanorales* (lichenized Ascomycota). *Systematic Biology* 57: 141-156.
- Fernández-Mendoza, F., S. Domaschke, M.A. García, P. Jordan, M.P. Martín, C. Printzen, 2011. Population structure of mycobionts and photobionts of the widespread lichen *Cetraria aculeata*. *Molecular Ecology* 20: 1208–1232.
- Friedl, T. y C. Zeltner. 1994. Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the microthamniales (Chlorophyta) with 18S ribosomal RNA gene sequence comparisons. *Journal of Phycology* 30: 500-506.
- Galloway, D.J. 2008. Lichen biogeography en *Lichen Biology*, Nash III, T.H. Cambridge University Press, USA.
- Galloway, D.J. 1983. New taxa in the New Zealand lichen flora. *New Zealand J. Botanic* 21: 191–200.
- Galloway, D.J. 1985. *Flora of New Zealand Lichens*. P. D. Hasselberg, Government Printer, Wellington.
- Galloway, D.J. 1992. Checklist of New Zealand Lichens. DSIR Land Resources Scientific Report, No. 26, DSIR Land Resources, Christchurch.
- Gerlacha A., Z. Toprakb, Y. Nacirib, E. Araujo, R.M. Borges, P. Clerc. 2019. New insights into the *Usnea cornuta* aggregate (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota): Molecular analysis reveals high genetic diversity correlated with chemistry. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 125-137.
- Gilbert, O. 2004. *Lichens*. Scottish Natural Heritage. British Library. 46 pp.

- Haas, B.J., D. Gevers, A.M. Earl, M. Feldgarden, D.V. Ward, G. Giannoukos, *et al.* 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research* 21: 494-504.
- Hale, M.E. 1983. *The biology of lichens*. 3ra edition. London: Arnold.
- Halonen, P. 2000. *Studies on the lichen genus Usnea in East Fennoscandia and Pacific North America*. PhD: Oulu University Library.
- Halonen, P., P. Clerc, T. Goward, I.M. Brodo y K. Wulff .1998. Synopsis of the genus *Usnea* (lichenized Ascomycetes) in British Columbia, Canada. *The Bryologist* 101: 36–60.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kirk, B.C. Sutton y D.N. Pegler. 1995. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. wallingford: CAB International, Cambridge University Press.
- Hawksworth, D.L., T. Iturriaga y A. Crespo. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medioambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 22: 71-82.
- Herrera-Campos, M. A. 1998. *Revisión sistemática del género Usnea (Hill 1753) en México*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 221 pp.
- Herrera-Campos, M. A., T.H. Nash III y A. Zambrano García. 2001. Preliminary study of the *Usnea fragilescens* aggregate in Mexico. *The Bryologist* 104: 235-259.
- Herrera-Campos, M.A, P. Clerc, y T.H. Nash II. 1998. Pendulos species of *Usnea* from the temperate forests in Mexico. *The Bryologist* 101: 303-329.
- Herrera-Campos, M.A. 2016. *Usnea* in Mexico. *Bibliotheca Lichenologica* 110, 505–620.
- Herrera-Campos, M.A. y R. Lücking. 2009. Líquenes. En *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel*, Z. Cano-Santana y A. Lot (Eds.). UNAM. México, D.F. 81-94 pp.
- Hilmo, O. 1994. Distribution and succession of epiphytic lichens on *Picea abies* branches in a boreal forest, Central Norway. *Lichenologist* 26: 149-169.
- Johnson, SB., A. Waren, R.C. Vrijenhoek. 2008. DNA barcoding of *Lepetodrilus* limpets reveals cryptic species. *Journal Shellfish Research* 27: 43–51.
- Kalyaanamoorthy, S., B.Q. Minh, T.K. Wong, A. von Haeseler y L.S. Jermiin. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14: 587–589.

- Kelly, L.J., P.M. Hollingsworth, B.J Coppins, C.J. Ellis, P. Harrold, J. Tosh y R. Yahr. 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist* 191: 288–300.
- Kirk, P.M., P.F Cannon., D.W. Minter y J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th Edition. Wallingford: CAB International.
- Kraichak, E., P.K. Divakar, A. Crespo, S.D. Leavitt, M.P. Nelsen, R. Lucking, H.T. Lumbsch. 2015. A tale of two hyper-diversities: diversification dynamics of the two largest families of lichenized fungi. *Scientific Reports* 5: 10028.
- Krog, H. 1976. *Lethariella* and *Protousnea*, two new lichen genera in the Parmeliaceae. *Norweg. Journal Botany* 23: 83–106.
- Krog, H. 1982. Evolutionary trends in foliose and fruticose lichens of the Parmeliaceae. *Botanical Laboratory*. 52: 303–311.
- Kroken, S. y J.W. Taylor. 2001. A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93: 38-53.
- Larkin, MA., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, *et al.* 2007. [Clustal W and Clustal X version 2.0](#). *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Le Gall, L. y GW Saunders. 2010. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, *Rhodophyta*) in the Canadian flora. *Journal Phycology* 46: 374–389.
- Leavitt, S.D., L. Johnson y L.L. St. Clair. 2011. Species delimitation and evolution in morphologically and chemically diverse communities of the lichen-forming genus *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in western North America. *American Journal of Botany* 98: 175- 188.
- López-Domínguez, J.C. y P.R. Acosta, 2005. Descripción del Parque Nacional Malinche. En Fernández, J.A. y J.C. López-Domínguez (Compiladores). *Biodiversidad del Parque Nacional La Malinche*. Coordinación General de Ecología, Gobierno del Estado de Tlaxcala, México. 3-24.
- Lumbsch, H.T. 1998. The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. *The Lichenologist* 30: 357–367.

- Lumbsch, H.T. y S.D. Leavitt. 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* 50: 59–72.
- Lumbsch, H.T. y S.M. Huhndorf. 2007. Outline of Ascomycota. *Myconet* 13: 1-58.
- Lumbsch, H.T., A.L., Hipp, P.K., Divakar, O. Blanco y A. Crespo. 2008. Accelerated evolutionary rates in tropical and oceanic parmelioid lichens (Ascomycota). *BMC Evolutionary Biology* 8.
- Malcolm, W.M. y D.J. Galloway. 1997. *New Zealand Lichens: Checklist, Key, and Glossary*. Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa, Wellington.
- Mark, K.L., Saag, S.D. Leavitt, S. Will-Wolf, M.P. Nelsen, T. Tõrra, A. Saag, T. Randle y H.T. Lumbsch. 2016. Evaluation of traditionally circumscribed species in the lichen-forming genus *Usnea*, section *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) using a six-locus dataset. *Organisms. Diversity and Evolution* 16:497–524.
- McCune, B. 1993. Gradients in epiphyte biomass in three *Pseudotsuga-Tsuga* forests of different ages in Western Oregon and Washington. *The Bryologist* 96: 405-411.
- McCune, B. y C. Schoch. 2009. *Hypogymnia minilobata* (Parmeliaceae), a new lichen from coastal California. *Bryologist* 112:94–100.
- MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets.
- Molina, M.C., A. Crespo, O. Blanco, H.T. Lumbsch y D.L. Hawksworth. 2004. Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s. str. (Parmeliaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and β -tubulin sequences. *The Lichenologist* 36: 37–54.
- Moncada, B., R. Lücking y A. Suárez. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Sticta* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) in Colombia. *Fungal Diversity* 64: 205–231.
- Montero, A.G. 2012. *Matlalcueye, El volcán del alma tlaxcalteca*. México. Porrúa Print. 221 pp.
- Morales, E.A., R. Lücking y R. Anze. 2009. *Introducción al estudio de los líquenes de Bolivia*. Universidad Católica Boliviana “San Pablo”. Serie Ecología No 1. 33 pp.
- Motyka, J. 1936–1938. *Lichenum generis Usnea studium monographicum*. Pars Systematica, vol. 1. Leopolis.
- Muggia, L., M. Grube y M. Tretiach. 2008. A combined molecular and morphological approach to species delimitation in black-fruited, endolithic *Caloplaca*: high genetic and low morphological diversity. *Mycological Research* 112:36–49.

- Müller, K. 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 9–16.
- Muñoz, J., A.M. Felicísimo, F. Cabezas, A.R. Burgaz y I. Martínez. 2004. Wind as a longdistance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 21: 1144–1147.
- Nash III, T.H., B.D. Ryan, P. Diederich, C. Gries y F. Bungartz. 2004. Lichen flora of the greater Sonoran Desert region. Vol. II. *Lichens Unlimited*. Arizona State University. Tempe, Arizona, U.S.A. 742 pp.
- Nash III, T.H. 2008. *Lichen Biology*. 2nd Ed. Cambridge: University Press. 486 pp.
- Nash III, T.H. y C. Gries. 2002. 'Introduction' en *Lichen Flora of the Greater Sonora Desert Region Vol.1*, Nash III, T.H., Ryan, B.D., Gries, C. y Bungartz, F. (eds.), *Lichens Unlimited*, Arizona State University, EUA.
- Nguyen, L.M., A.H. Schmidt, A. Haeseler y B.Q. Minh. 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 269-274.
- Nimis, P.L., C. Scheidegger y P.A. Wolseley. 2002. *Monitoring with lichens—monitoring lichens*. Dordrecht: Netherlands.
- Nybakken, L. y Y. Gauslaa. 2007. Difference in secondary compounds and chlorophylls between fibrils and main stems in the lichen *Usnea longissima* suggests different functional roles. *The Lichenologist* 39: 491–494.
- Ohmura, Y. 2001. Taxonomic study of the genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes) in Japan and Taiwan. *Journals of the Hattori Botanical Laboratory* 90: 1-96.
- Ohmura, Y. 2002. Phylogenetic evaluation of infrageneric groups of the genus *Usnea* based on ITS regions in rDNA. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 92: 231-243.
- Ohmura, Y. 2008. Taxonomy and Molecular Phylogeny of *Usnea rubicunda* and *U. rubrotincta* (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycotina). *The Journal of Japanese Botany* 83: 347-355.
- Ohmura, Y. 2012. A Synopsis of the lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Taiwan. *Memoirs of the National Museum of Nature and Science* 48: 91–137.
- Ohmura, Y. y H. Kanda. 2004. Taxonomic status of section *Neuropogon* in the genus *Usnea* elucidated morphological comparisons and ITS rDNA sequences. *Lichenologist* 36: 217–225.

- Pérez–Vargas, I., C. Hernández Padrón, R. Arroyo y E. Serriñá. 2010. *Usnea brasiliensis* (Zahlbr.) Motyka (Parmeliaceae), a new amphi–Atlantic disjunct lichen species. *The Bryologist* 113: 308–312.
- Printzen, C. 2010. Lichen systematics: the role of morphological and molecular data to reconstruct phylogenetic relationships. *Progress in Botany* 71: 233–275.
- Purvis, W. 2000. *Lichens*. The Natural History Museum, London, UK. 112 pp.
- Rambaut A. 2009. FigTree: Tree figure drawing tool, version 1.3.1. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Randlane, T., T. Tõrra, A. Saag y L. Saag. 2009. Key to European *Usnea* species. *Bibliotheca Lichenologica* 100: 419–462.
- Richardson, D.H.S. 1988. Medicinal and other economic aspects of lichens. In *Handbook of Lichenology*, Vol. 3 (M. Galun, ed.): 93–108. Boca Ratón: CRC Press.
- Saag, L., T. Tõrra, A. Saag, R. Del-Prado, y T. Randlane. 2011. Phylogenetic relations of European shrubby taxa of the genus *Usnea*. *The Lichenologist* 43: 427–444.
- Sancho, L.G. 2011. Lichens. In *Encyclopaedia of astrobiology* Vol. 1 (M. Gargaud, J. Cernicharo Quintanilla, R. Amils, H.J. Cleaves, W.M. Irvine, D. Pinti & M. Viso, eds.). Berlin: Springer.
- Schoch, C.L., G.-H. Sung, F. López-Giráldez, J.P. Townsend, J. Miadlikowska, V. Hofstetter, B. Robbertse, P.B. Matheny, F. Kauff, Z. Wang, C. Gueidan, R. M. Andrie, K. Trippe, L.M. Ciuffetti, A. Wynns, *et al.* 2009. The Ascomycota tree of life: A phylum wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological trait, *Systematic. Biology* 58: 224–239.
- Seifert, KA. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9:83–89.
- Seymour, F.A., P.D. Crittenden, W. Nora, D.O. Øvstedal, P.S Dyer y H.T. Lumbsch. 2007. Phylogenetic and morphological analysis of Antarctic lichen forming *Usnea* species in the group *Neuropogon*. *Antarctic Science* 19: 71–82.
- Singh, A. 2012. Molecular taxonomy: use of modern methods in the identification of species. *Indian J.L. Society* 1: 143–147.

- Sipman, H.J.M. 1996. Corticolous lichens. En Gradstein, S.R., Hietz P., Lücking R., Lücking A., Sipman, H.J.M., Vester H.F.M. y Wolf J.H.D., Gardatte E. (Eds). How to sample epiphytic diversity of tropical rainforest. *Ecotropica* 2:59-72.
- Sook-Young, P., J. Seol-Hwa, O. Soon-Ok, K. Jung y H. Jae-Seoun. 2014. An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. *Mycobiology* 42: 311-316.
- Stevens, G.N. 1999. A revision of the lichen family Usneaceae in Australia. *Bibliotheca Lichenologica* 72: 1-128.
- Stevens, G.N. 2004. Usneaceae. In: McCarthy, P.M., Mallett, K. (Eds.), *Flora of Australia*. ABRS/CSIRO, Melbourne pp. 78–98 and 107–115.
- Thormann, M.N. 2006. Lichens as indicators of forest health in Canada. *The Forestry Chronicle* 83: 335-343.
- Tlalmis-Corona, J. 2017. Composición liquénica del Parque Nacional La Malinche. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología, UATx. Tlaxcala, Tlax. 57 pp.
- Tõrra, T. y T. Randlane. 2007. The lichen genus *Usnea* (lichenized Ascomycetes, Parmeliaceae) in Estonia with a key to the species in the Baltic countries. *The Lichenologist* 39: 415–438.
- Torstrom S., K. Pangle y B. Swanson. 2014. Shedding subspecies: the influence of genetics on reptile subspecies taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76: 134-143.
- Truong, C., F. Bungartz y P. Clerc. 2011. The lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae) in the tropical Andes and the Galapagos: species with a red–orange cortical or subcortical pigmentation. *The Bryologist* 114: 477–503.
- Truong, C., K.P. Divakar, R. Yahr. A. Crespo y P. Clerc. 2013. Testing the use of ITS rDNA and protein-coding genes in the generic and species delimitation of the lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 357–372.
- Villers-Ruiz, L., F. Rojas y P. Tenorio. 2006. Guía botánica del Parque Nacional Malinche, Tlaxcala-Puebla. Centro de Ciencias de la Atmósfera e Instituto de Biología, UNAM. México. 196 pp.
- Wedin, M., M. Westberg, A.T. Crewe, A. Tehler y O.W. Purvis. 2009. Species delimitation and evolution of metal bioaccumulation in the lichenized *Acarospora smaragdula* (Ascomycota, Fungi) complex. *Cladistics* 25:161–172.

- Wirtz, N., C. Printzen y T. Lumbsch, 2012. Using haplotype networks, estimation of gene flow and phenotypic characters to understand species delimitation in fungi of a predominantly Antarctic *Usnea* group (Ascomycota, Parmeliaceae). *Organisms Diversity and Evolution* 12: 17-37.
- Wirtz, N., C. Printzen, y T. Lumbsch, 2008. The delimitation of Antarctic and bipolar species of neuropogonoid *Usnea* (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. *Mycological Research* 112: 472-484.
- Wirtz, N., Printzen C., Sancho L.G. y Lumbsch H.T. 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) revisited. *Taxon* 55: 367–376.
- Yarza de la Torre, E. 2003. Los volcanes del Sistema Volcánico Transversal. *Investigaciones Geográficas*, México. D.F. 220-234.
- Zemlak, T.S., RD. Ward, A.D. Connell, B.H. Holmes y P.D. Hebert. 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 9: 237–242.

12.ANEXOS

- Anexo 1.** Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea hirta*.
- Anexo 2.** Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea fragilescens*.
- Anexo 3.** Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea glabrata*..
- Anexo 4.** Matriz de distancia genética de las secuencias del complejo *Usnea lapponica*.
- Anexo 5.** Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea* 1.
- Anexo 6.** Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea* 2.
- Anexo 7.** Matriz de distancia genética p de las secuencias de los complejos *Usnea* 3-5, *U. wasmuthii* y *U. cavernosa*.
- Anexo 8.** Matriz de distancia genética p de las secuencias de los complejos *Usnea* 6-9 y *U. filipendula*.

Anexo 1. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea hirta* (región ITS1-ITS2).

	Gp1_Usnea_hirta_Escocia	O.31.S2.343_11	Gp2_Usnea_hirta_Escocia
Gp1_Usnea_hirta_Escocia			
O.31.S2.343_11	0.016		
Gp2_Usnea_hirta_Escocia	0.019	0.024	

Anexo 2. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea fragilescens* (región ITS1-ITS2).

	U.fragilescens_Bolivia	U.fragilescens_Escocia	O.32.S5.362_4
U.fragilescens_Bolivia			
U.fragilescens_Escocia	0.011		
O.32.S5.362_4	0.040	0.043	

Anexo 3. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea glabrata* (región ITS1-ITS2).

	U.glabrata_Escocia	U.glabrata_Suiza	E.31.C1.47_1	E.37.C1.19_1	O.32.S7.385_1
U.glabrata_Escocia					
U.glabrata_Suiza	0.020				
E.31.C1.47_1	0.039	0.035			
E.37.C1.19_1	0.038	0.035	0.032		
O.32.S7.385_1	0.028	0.029	0.032	0.029	

Anexo 4. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea lapponica* (región ITS1-ITS2).

	U.lapponica	E.31.C1.1_10	S.37.C2.161_6
U.lapponica			
E.31.C1.1_10	0.012		
S.37.C2.161_6	0.020	0.016	

Anexo 5. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea* 1 (región ITS1-ITS2). Los números en rojo sígnica menos del 1%.

	S.34.C1.219_12	E.34.C2.234_10	E.34.C2.214_12	E.34.C2.202_12	O.32.S7.373_12	E.34.C1.198_11	E.31.C1.4_2_8	O.33.S8.314_12	S.40.C2.174_12	O.32.S5.36_3_3	E.37.C1.64_12	E.34.C2.208_12	S.40.C3.190_11	E.31.C2.12_12	E.34.C2.205_2	O.33.S8.316_10	E.37.C2.26_11	O.32.S7.378_2	S.34.C2.221_8	E.31.C3.121_11	E.31.C1.37_11	
S.34.C1.219_12																						
E.34.C2.234_10	0.026																					
E.34.C2.214_12	0.018	0.013																				
E.34.C2.202_12	0.021	0.010	0.008																			
O.32.S7.373_12	0.024	0.008	0.005	0.008																		
E.34.C1.198_11	0.024	0.013	0.008	0.003	0.008																	
E.31.C1.42_8	0.029	0.018	0.016	0.013	0.016	0.016																
O.33.S8.314_12	0.029	0.018	0.010	0.013	0.010	0.013	0.010															
S.40.C2.174_12	0.029	0.018	0.016	0.013	0.016	0.016	0.010	0.010														
O.32.S5.363_3	0.032	0.021	0.016	0.016	0.016	0.013	0.018	0.016	0.018													
E.37.C1.64_12	0.032	0.021	0.016	0.016	0.016	0.013	0.018	0.016	0.018	0.000												
E.34.C2.208_12	0.034	0.029	0.026	0.024	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.018	0.018											
S.40.C3.190_11	0.026	0.016	0.013	0.010	0.013	0.013	0.008	0.008	0.008	0.016	0.016	0.024										
E.31.C2.12_12	0.029	0.018	0.016	0.013	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.021	0.013									
E.34.C2.205_2	0.032	0.021	0.016	0.016	0.016	0.013	0.018	0.016	0.018	0.000	0.000	0.018	0.016	0.018								
O.33.S8.316_10	0.032	0.021	0.013	0.016	0.013	0.016	0.013	0.008	0.013	0.018	0.018	0.029	0.010	0.016	0.018							
E.37.C2.26_11	0.029	0.018	0.016	0.013	0.016	0.016	0.010	0.010	0.010	0.018	0.018	0.026	0.008	0.016	0.018	0.013						
O.32.S7.378_2	0.029	0.021	0.019	0.016	0.018	0.018	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021	0.029	0.016	0.008	0.021	0.019	0.018					
S.34.C2.221_8	0.026	0.016	0.008	0.010	0.008	0.010	0.008	0.003	0.008	0.013	0.013	0.024	0.005	0.013	0.013	0.005	0.008	0.016				
E.31.C3.121_11	0.027	0.016	0.013	0.010	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.016	0.024	0.011	0.003	0.016	0.013	0.013	0.005	0.011			
E.31.C1.37_11	0.024	0.013	0.010	0.008	0.010	0.010	0.005	0.005	0.005	0.013	0.013	0.021	0.003	0.010	0.013	0.008	0.005	0.013	0.003	0.008		

Anexo 6. Matriz de distancia genética p de las secuencias del complejo *Usnea* 2 (región ITS1-ITS2). Los números en rojo sígnica menos del 1%.

	O.32.S7.396_3	E.37.C1.17_9	S.31.C1.185_11	S.40.C3.177_9
O.32.S7.396_3				
E.37.C1.17_9	0.006			
S.31.C1.185_11	0.008	0.006		
S.40.C3.177_9	0.004	0.002	0.004	

Anexo 7. Matriz de distancia genética p de las secuencias de los complejos *Usnea* 3-5, *U. wasmuthii* y *U. cavernosa* (región ITS1-ITS2). Los números en rojo sígnica menos del 1%.

<i>U. wasmuthii</i>	<i>U. wasmuthii</i>	<i>U. cavernosa</i>	<i>Usnea 3</i>	<i>Usnea 4</i>	<i>Usnea 5</i>
<i>U. cavernosa</i>	0.02142				
<i>Usnea 3</i>	0.01280	0.02118			
<i>Usnea 4</i>	0.01739	0.02257	0.01177		
<i>Usnea 5</i>	0.01728	0.02258	0.01177	0.00785	

Anexo 8. Matriz de distancia genética p de las secuencias de los complejos *Usnea* 6-9 y *U. filipendula* (región ITS1-ITS2).

	<i>Usnea 9</i>	<i>U. filipendula</i>	<i>Usnea 8</i>	<i>Usnea 7</i>	<i>Usnea 6</i>
<i>Usnea 9</i>					
<i>U. filipendula</i>	0.0162				
<i>Usnea 8</i>	0.0165	0.0177			
<i>Usnea 7</i>	0.0133	0.0142	0.0164		
<i>Usnea 6</i>	0.0204	0.0195	0.0211	0.0184	